ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียบางกลุ่ม ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

นางสาว วิสา ฉิมน้อย

วิทยานิพนธ์นี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-178-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF SOME BACTERIA IN THE AREA OF PLANT GENETIC CONSERVATION PROJECT IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE

Miss Wisa Chimnoi

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Department of Botany
Graduate school
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-178-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียบางกลุ่มในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

โดย นางสาว วิลา ฉิมน้อย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พรรณี ชิโนรักษ์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ยุวดี ตาลาวนิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิสา ฉิมน้อย : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียบางกลุ่มในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา (GENETIC DIVERSITY OF SOME BACTERIA IN THE AREA OF PLANT GENETIC CONSERVATION PROJECT IN NAKHON RACHASIMA PROVINCE) อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 95 หน้า. ISBN 974-333-178-6

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียจากดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา ในพื้นที่ทุ่งหญ้า 4 แปลงคือ ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืชและขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) ทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช (GLP) เปรียบเทียบกับดินจากทางที่ใช้สัญจร (C) โดยเก็บตัวอย่างแปลงละ 4 ตัวอย่าง ในเดือน ธันวาคม 2540 มีนาคม 2541 มิถุนายน 2541 กันยายน 2541 พบว่าปริมาณแบคทีเรียในพื้นที่ทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยเป็น 3.90×10^{6}, 1.10×10^{9}, 5.42×10^{8}, 8.51×10^{8} และ 2.11×10^{9} CFU/g soil ตามลำดับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่ทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยเป็น 5.07×10^{2}, 1.07×10^{3}, 1.90×10^{3}, 3.07×10^{3} และ 8.65 CFU/g soil ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสในพื้นที่ทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.25×10^{6}, 2.97×10^{4}, 9.88×10^{3}, 1.53×10^{5} และ 4.65×10^{4} CFU/g soil ตามลำดับ ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนโดยอิสระได้แก่จีนัส *Azotobacter Beijerinkia Derzia* ซึ่งพบได้ทั้ง 5 พื้นที่ กลุ่มแบคทีเรียที่พบปริมาณมากที่สุด คือแอคติโนมัยซีสสามารถแยกได้ 60 ไอโซเลท และ เมื่อนำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะพบ 30 ไอโซเลทจาก 60 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบบนอาหาร MY agar โดยสามารถสร้างสาร aminoglycoside / sulphonamide ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 11778 จำนวน 29 ไอโซเลท (48.33 %) สามารถสร้างสาร tetracyclines ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 6633 จำนวน 25 ไอโซเลท (41.67 %) สร้างสาร betalactams / sulphonamide ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 จำนวน 24 ไอโซเลท (40.0 %) และ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1237 จำนวน 10 ไอโซเลท (16.67 %) ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด 30 ไอโซเลท คิดเป็น 50 % เมื่อเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะสูง 10 ไอโซเลท คือ AC 2 AC 7 AC 23 AC 39 AC 46 AC 49 AC 50 AC 52 และ AC 57 มาศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใย และ ลักษณะสปอร์ พบว่าโคโลนีเป็นกลุ่มของเส้นใยที่ฟูกิ่งก้านสาขาพันกันแน่น สายสปอร์มีลักษณะเส้นใยตรง ม้วนงอตรงปลาย หรือบิดเป็นเกลียว มีกลิ่นดิน ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายจีนัส *Streptomyces* เมื่อวิเคราะห์ DAP-isomer (diaminopimelic acid-isomer) โดยวิธี Thinlayer chromatography ปรากฏว่าทั้ง 10 ไอโซเลท ให้ผลการวิเคราะห์เป็น LL-DAP (มีโครงสร้างของ diaminopimelic acid (DAP) แบบ LL) ซึ่งเป็นสมบัติของจีนัส *Streptomyces* การวิเคราะห์ไอโซไซม์ของเชื้อโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ในเอนไซม์ 5 ระบบ คือ EST, ADH, MDH, PER, G-6-PD ผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์มีความแตกต่างของแถบไอโซไซม์ในเอนไซม์ 3 ระบบ คือ EST, ADH และ MDH

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 1542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

3971756123 MAJOR BOTANY

KEY WORD: Actinomycetes / *Streptomyces spp.* / soil bacteria / Isozyme pettern Actinomycetes

WISA CHIMNOI : GENETIC DIVERSITY OF SOME BACTERIA IN THE ARIA OF PLANT GENETIC CONSERVATION PROJECT IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D. 103 pp. ISBN 974-333-178-6

A study of genetic diversity among soil bacteria was conducted in order to compare samples collected from 4 different areas in Plant Genetic Conservation Project in Nakorn rachaseema Province. Samples were collected at 4 different times (December 1997, March 1998, June 1998, and September 1998) from 4 grassland areas [grassland checkdam planting (GLDP), grassland control. (GLC), grassland checkdam (GLD), and grassland checkdam planting (GLP)] were collected to compare with the sample from control (C). It was found that the average number of bacterial colony from the above 5 locations was 3.90×10^9, 1.10×10^9, 5.42×10^8, 8.51×10^8, and 2.11×10^9 CFU/g soil, respectively. The average colony number of cellulose-degrading bacteria in those five areas were 5.07×10^2, 1.07×10^3, 1.90×10^3, 3.07×10^3, and 8.65 CFU/g soil, respectively, while those of the actinomycete bacteria in the same areas were 1.25×10^5, 2.97×10^4, 9.88×10^3, 1.53×10^5, and 4.65×10^4 CFU/g soil respectively. The free-living nitrogen-fixing bacteria of the genera *Azotobacter*, *Beijerinkia*, and *Derzia* were found in all 5 locations. Actinomycetes was the group found most and could be isolated into 60 different strains. Thirty isolates were found to have the ability to secrete antibacterial antibiotics on MY agar plates. Twenty-nine isolates (48.33%) could secrete aminoglycoside and sulfonamide antibiotics that inhibited the growth of *Bacillus subtilis* ATCC11778. Twenty-five isolates (41.67%) could secrete tetracyclines that inhibited *Bacillus cereus* ATCC 6633. Twenty-four isolates (40.00%) could secrete betalactams and sulfonamide that inhibited *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Antibiotics secreted from 10 isolates (16.67%) could inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC 1237. And 30 isolates (50.00%) did not inhibit the growth of all four species tested. Observations on characteristics of colony, hypha, and spores were conducted on 10 actinomycete isolates that could produce the most antibiotics (AC2, AC7, AC23, AC39, AC46, AC49, AC50, AC52, AC 53 and AC57). It was found that 5 isolates (AC2, AC7, AC23, AC39, AC52) were similar to *Streptomyces* in colony fluffiness, earthy-smelled, straight hypha, and twisted or curve-ended spore chain. When analyzed for DAP-isomer (diaminopimelic acid-isomer) by thin-layer chromatography, 10 isolates (AC2, AC7, AC23, AC39, AC46, AC49, AC50, AC52, AC 53 AC 53 and AC57). showed LL-DAP (structural form of diaminopimelic acid was LL). The analysis of 5 isozyme systems: EST ADH MDH PER, and G-6-PD of the strains by Polyacrylamide gel electrophoresis, pattern differences of 3 isozyme systems (EST, ADH, and MDH) were detected.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พืชไร่นาสวน ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือ จากหลายฝ่ายด้วยกันผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านดังนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยด้วยดีตลอด

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน และรองศาสตราจารย์ พรรณี ชิโนรักษ์ ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่อง ให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริที่ให้ทุนและพื้นที่ในการศึกษา คณาจารย์ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชทุกท่านได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องพื้นที่การเก็บตัวอย่าง แนะนำ ให้ประสบการณ์แก่ผู้เขียนที่ได้ และดูแลช่วยเหลือตลอดการเก็บตัวอย่างดิน

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ยุวดี ตาลาวานิช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และ คำแนะนำในการวิจัย

กราบขอบพระคุณ คณาอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ความรู้ และประสบการณ์แก่ผู้เขียน

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เพ็ญพรรณ ยังคง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ดำรง กรเกศกมล ผู้อำนวยการโรงเรียนลำปลายมาศ ที่เปิดโอกาสที่มีค่าในการศึกษาเล่าเรียน และ เพื่อนอาจารย์หมวดวิทยาศาสตร์ โรงเรียนลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ ที่รับภาระสอนแทนตลอดระยะเวลาที่ลาศึกษา

กราบขอบพระคุณ คุณดวงดาว วงศ์สมมาตร และ กองวิเคราะห์อาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ. นนทบุรี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลพืชธนาคารพืชพรรณสวนจิตรดาที่ให้ความเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ สารเคมี และ เทคนิคการปฏิบัติการไอโซไซม์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์วันเชิญ โพธาเจริญ และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความเอื้อเฟื้อสารเคมีและห้องปฏิบัติการ ขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกและช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณ คุณวัชรพงศ์ วิสุทธิพงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ท้ายนี้ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ญาติพี่น้อง ซึ่งสนับสนุนการศึกษาให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอจนสำเร็จการศึกษา กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่สั่งสมความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มเรียนจนถึงปัจจุบัน

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญภาพ..... ช
สารบัญภาพ(ต่อ)..... ฌ
สารบัญตาราง..... ญ
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 ตรวจเอกสาร..... 3
3 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์..... 21
4 วิธีดำเนินการศึกษา..... 24
5 ผลการศึกษา..... 43
6 อภิปรายผลการศึกษา..... 81
7 สรุปผลการทดลอง..... 87
รายการอ้างอิง..... 89
ภาคผนวก..... 95
ประวัติผู้เขียน..... 103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง peptidoglycan ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย.....	13
2	โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย.....	13
3	แสดงผลการตรวจหา DAP-isomer.....	14
4	พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัด นครราชสีมา.....	24
5	แผนผังการจัดแปลงแต่ละแนว (Line 7).....	25
6	การเก็บตัวอย่างดินจะเก็บในแนวทแยงมุมแต่ละแปลงทดลอง.....	26
7	แปลงศึกษาแนวที่ 7 (GLDP).....	27
8	แปลงศึกษาแนวที่ 7 (GLP).....	28
9	แปลงศึกษาแนวที่ 7 (Control).....	29
10	แปลงศึกษาแนวที่ 10 (GLD).....	30
11	แปลงศึกษาแนวที่ 10,11 (GLC).....	31
12	แสดงลักษณะการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ตัวอย่าง เป็นแปลงสี่เหลี่ยมจตุรัส.....	32
13	กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุจากดินตัวอย่าง ในพื้นที่โครงการ.....	45
14	กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุจากดินตัวอย่าง ในพื้นที่โครงการ.....	45
15	กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณความชื้นจากดินตัวอย่าง ในพื้นที่โครงการ.....	47
16	กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณความชื้นจากดินตัวอย่าง ในพื้นที่โครงการ.....	47
17	กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างจากดินในพื้นที่โครงการ..	49
18	กราฟเส้นเปรียบเทียบค่าความเป็น กรด-ด่างจากดินในพื้นที่โครงการ..	49
19	กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียในพื้นที่.....	52
20	กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียในพื้นที่.....	52
21	กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่	54
22	กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่	54

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณแอคติโนมัยซีสจากดินในพื้นที่	56
24	กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณแอคติโนมัยซีสจากดินในพื้นที่	56
25	ลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร MY agar	62
26	ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 2	64
27	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 2	64
28	ลักษณะ และสีโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 7	65
29	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 7	65
30	ลักษณะ และสีโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 23	66
31	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 23	66
32	ลักษณะ และสีโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 39	67
33	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 39	67
34	ลักษณะ และสีโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 46	68
35	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 46	68
36	ลักษณะ และสีโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 49	69
37	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 49	69
38	ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 50	70
39	ลักษณะสายสปอร์ ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 50	70
40	ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 52	71
41	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 52	71
42	ลักษณะ และ สีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 53	72
43	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 53	72
44	ลักษณะ และ สีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส.รหัส AC 57	73
45	ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 57	73
46	ผลการตรวจสอบชนิดของ DAP-isomer	75
47	ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ EST	77
48	ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ ADH	78
49	ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ MDH	79
50	ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ PER	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1	ปริมาณอินทรีย์วัตถุในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัด นครราชสีมา	44
2	ปริมาณความชื้นในบริเวณป่าทุ่งหญ้าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา	46
3	ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินใน พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา	48
4	ปริมาณแบคทีเรียในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา	51
5	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่ ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา	53
6	ปริมาณแอคติโนมัยซีสจากดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา	55
7	ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจน	57
8	การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar ของแอคติโน้ยซีส	58
9	จำนวนแอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมาตรฐาน ทั้ง 4 สายพันธุ์	61
10	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีส 10 ไอโซเลท	74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ป่าไม้เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีค่ายิ่ง ประโยชน์ของป่าไม้มีอยู่มาก เช่น ต้นไม้ใช้ก่อสร้างที่อยู่อาศัย ใช้เป็นยาสมุนไพร เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าซึ่งเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ ในระบบนิเวศ ป่าไม้จะมีความอุดมสมบูรณ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องมากมาย เช่น ปริมาณอาหารและแร่ธาตุในดิน ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินรอบรากของพืชนั้นมีประโยชน์ในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ เพื่อให้พืชนำไปใช้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ในดินยังมีประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์ดินและ น้ำ การย่อยสลายเศษซากอินทรีย์วัตถุในดินมีผลทำให้ดินร่วนซุย เนื้อดินมีความโปร่ง เมื่อฝนตกน้ำฝนสามารถซึมผ่านผิวดินได้ดี ทำให้ลดการไหลของน้ำบริเวณผิวดิน ช่วยลดการกัดเซาะของผิวหน้าดินจากน้ำได้

ปัจจุบันป่าไม้ถูกทำลายเป็นจำนวนมาก ระบบนิเวศในป่าไม้เกิดการเปลี่ยนแปลง ดินที่เป็นแหล่งแร่ธาตุและอาหารเสื่อมโทรมลง เป็นผลให้จุลินทรีย์ในดินลดน้อยลงด้วย สภาพของป่าไม้ที่อุดมสมบูรณ์บางแห่งเสื่อมโทรมเปลี่ยนจากสภาพของป่าไม้กลายเป็นทุ่งหญ้า

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพฯ นอกจากมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวมพันธุ์ไม้แล้ว ยังมีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพป่าที่เสื่อมโทรม การปรับปรุงดินในพื้นที่ให้อุดมสมบูรณ์ สิ่งชีวิตอาศัยอยู่ดำรงชีวิตได้เป็นอย่างดีทั้ง พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในดิน การศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ในดินแต่ละกลุ่ม ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันในหลายสภาพพื้นที่ทุ่งหญ้า จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อทราบความแตกต่างของจุลินทรีย์ ซึ่งใช้เป็นข้อมูลเพื่อหาแนวทางในการปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพของดินในป่าที่เสื่อมโทรมได้ จุลินทรีย์เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการฟื้นฟูของสภาพของดินที่ได้รับการปรับปรุงว่าเป็นดินที่อยู่ในสภาพที่ดีเพียงใด การศึกษาการแพร่กระจายของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆในดินทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตและทราบชนิดความหลากหลายของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถใช้เป็นประโยชน์ต่อไปได้

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจหาปริมาณ และชนิดของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์หลายกลุ่ม ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ เช่น แบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส แบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส เพื่อเป็นข้อมูล และแนวทางในการปรับปรุงสภาพของป่า และเพื่อนำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเปรียบเทียบจำนวน และความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ และกลุ่มแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินในทุ่งหญ้าและเส้นทางที่ใช้สัญจร ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

2. เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ที่แยกได้สำหรับใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตงานวิจัย

1. กำหนดเขตพื้นที่ที่ทำการวิจัย สุ่มตัวอย่างดิน 5 พื้นที่ ในช่วงเดือนที่กำหนด
2. นำดินมาวิเคราะห์ เปอร์เซนต์ความชื้น วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณอินทรีย์วัตถุ
3. แยกแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ และกลุ่มแอคติโนมัยซีส
4. เก็บรวบรวมข้อมูลจำนวนประชากรของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม ศึกษารายละเอียดของสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือกลุ่มแอคติโนมัยซีส
5. ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส
6. จำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับ จีนัส
7. หาระบบของไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส กลุ่มตรึงไนโตรเจนโดยอิสระ และกลุ่มแอคติโนมัยซีส และทราบความแตกต่างของแบคทีเรียบางสายพันธุ์จากการวิเคราะห์ทางไอโซไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน

ในปัจจุบันนี้ป่าไม้มีจำนวนลดลงในหลายพื้นที่ของประเทศ การลดลงของป่าไม้มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต การฟื้นฟูสภาพป่านอกจากจะทำให้สภาพป่ากลับคืนเหมือนเดิม เพื่อเป็นแหล่งเก็บความชุ่มชื้น และอาหารของสิ่งมีชีวิตหลายๆกลุ่มแล้ว ยังเป็นการรักษาไว้ซึ่งสภาพความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในป่าด้วย จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบนิเวศของป่า จุลินทรีย์ในดินมีความสำคัญคือสามารถผลิตอาหารจากกระบวนการย่อยสลายซากพืช และซากสัตว์ ให้กับพืชหรือจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเนื่องจากการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ในดินเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยเฉพาะพืช ดังนั้นจุลินทรีย์ดิน จึงเป็นดัชนีที่ดีที่สุดในการบ่งชี้ประสิทธิภาพการฟื้นฟูคุณภาพของดินการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์เปรียบเทียบกันในพื้นที่ต่างกัน จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่เกี่ยวข้อง (กรรณิการ์ วงวุฒิญาน, 2536)

ปัจจัยที่ควบคุมปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ในดิน (ประกิตติ์สิน สีหนนท์, 2540)

1. **ความชื้นของดิน** น้ำนอกจากเป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์แล้ว ยังเป็นตัวทำละลายแร่ธาตุต่างๆที่อยู่ในดินระดับน้ำในดินที่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรีย 50-75% WHC (Water Holding Capacity) ถ้ามีมากหรือน้อยกว่านี้ ปริมาณของแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (aerobic bacteria) จะลดลง ซึ่งถ้าเป็นบริเวณที่มีน้ำขังจะทำให้มีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (anaerobic bacteria) มากขึ้น

2. **การถ่ายเทอากาศในดิน** การถ่ายเทอากาศในดินมีผลต่อปริมาณออกซิเจน ถ้าดินมีการถ่ายเทอากาศดี ปริมาณของออกซิเจนจะมีมาก ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญอาหารเพิ่ม การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินละดีขึ้น ถ้าการระบายอากาศในดินไม่ดี ทำให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ กระบวนการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนมีอัตราที่ช้าลงหรือหยุดชะงัก ทำให้เกิดสารที่เป็นผลกระทบต่อพืช เช่น ไนไตรท์ มีเธน ซัลไฟด์ เฟอร์รัส และแมงกานีส ซึ่งเป็นผลผลิตของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญอาหาร

3. **อุณหภูมิของดิน** จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนั้นอุณหภูมิดินที่แตกต่างกันจะมีผลต่อปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์

4. **ปริมาณแร่ธาตุที่เป็นประโยชน์ในดิน**แร่ธาตุที่อยู่ในดิน จุลินทรีย์ต้องสามารถนำแร่ธาตุต่างๆที่ต้องการไปใช้ ถ้าอยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากปริมาณจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินก็มาก การใส่ปุ๋ยก็เป็นวิธีการหนึ่งของการเพิ่มธาตุอาหารในดินเพื่อให้มีจุลินทรีย์มากขึ้น

5. Cation Exchange Capacity (CEC) ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินมากทำให้เพิ่มปริมาณการเก็บกักธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ให้แก่จุลินทรีย์ เพราะอนุภาคอินทรีย์วัตถุมีประจุลบทำให้ดูดซับไอออนบวกได้มาก ธาตุที่มีไอออนบวกเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ของจุลินทรีย์มากที่สุด ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนในเม็ดดิน คือ ค่า Cation Exchange Capacity (CEC) ซึ่งพบว่าดินที่มีอินทรีย์วัตถุมากจะมีค่า CEC สูง ส่วนดินที่มีอินทรีย์วัตถุน้อยเช่น ดินทรายจะมีค่า CEC ต่ำ

6. **สภาพ กรด-ด่างของดิน** สภาพความเป็นกรด-ด่างของดินมีผลต่อการใช้ธาตุอาหารของจุลินทรีย์ ธาตุอาหารบางชนิดละลายได้ดีในสภาพที่เป็นกรด บางชนิดละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการความเป็นกรด – ด่างในการเจริญต่างกัน เช่น ราสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรด แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง ส่วนแอคติโนมัยซีสเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง โดยทั่วไปแล้วดินจะมีความเป็นกรดซึ่งความเป็นกรดของดินเกิดได้จากหลายสาเหตุและส่งผลกระทบต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินนั้นด้วย

7. **อินทรีย์วัตถุในดิน**โดยทั่วไป หมายถึง ฮิวมัส (humus) เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน ฮิวมัส จะเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของจุลินทรีย์ ประกอบด้วยซากเน่าเปื่อยและจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่หรือตายแล้ว และ สารซึ่งได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยธาตุที่เป็นองค์ประกอบของฮิวมัส ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส กำมะถัน และธาตุอื่นอีกเล็กน้อย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหมุนเวียนของธาตุอาหารในดิน

การสลายตัวของวัตถุต้นกำเนิดดิน และฝนที่ตกลงมานั้นมีความสำคัญต่อการเจริญของพืช พืชซึ่งเป็นผู้ผลิตปฐมภูมิจะนำธาตุอาหารที่ได้ ไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างมวลชีวภาพ จะเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารไปยัง สัตว์กินพืช สัตว์กินเนื้อ และ กลับคืนสู่ดินอีกครั้งหนึ่ง โดยการตายหรือการขับถ่าย กลายเป็นซากเหลือกลับสู่ดิน ซึ่งซากเหลือเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารของพวกจุลินทรีย์ในดิน และภายหลังการสลายตัวของซากโดยจุลินทรีย์ในดินแล้ว พืชจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีกครั้ง หมุนเวียนไปเรื่อยๆ (กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาณ, 2536) จุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุซึ่งจะถูกแปรสภาพไปอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเกิดจากที่จุลินทรีย์ต้องการ พลังงาน และแหล่งคาร์บอน สำหรับสังเคราะห์เซลล์ใหม่ ผลพลอยได้จากการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเธน และกรดอินทรีย์ต่างๆ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีบทบาทสำคัญในการดำเนินกิจกรรมต่างๆในดิน คือเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส

รา เป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรีย แต่เนื่องจากปริมาตรของรามีมากกว่าแบคทีเรียเพราะลักษณะของราเป็นแบบ filamentous mycelium หรือ hyphae ซึ่งทำให้เซลล์รามีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียมาก (สมศักดิ์ วังใน, 2528) ความสำคัญของเชื้อราในดินเหมือนกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในดิน สภาพของดินที่มีการถ่ายเทน้ำและอากาศได้ดี จะพบว่ามีราเป็นจำนวนมากและเป็นตัวการที่สำคัญที่สุดในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในดิน เนื่องจากราเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ดังนั้นจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน, และพลังงานที่ใช้ในกิจกรรมต่างๆของราจึงได้จากการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุทั้งสิ้น ในดินป่า รามีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเศษอินทรีย์วัตถุต่างๆ เช่น ซากกิ่งไม้ ใบไม้และยังสามารถควบคุมสิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นศัตรูพืช เช่น ไส้เดือนฝอย และโปรโตซัว อีกด้วย ราหลายชนิดทำให้เกิดโรคในพืช คน และ สัตว์ โดยราจากดินสามารถปลิวเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ก่อโรคติดเชื้อต่างๆ (Landerkin, 1952)

แบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่พบมากที่สุดในดินเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ดินกลุ่มอื่น (สมศักดิ์ วังใน, 2528: 5) แบคทีเรียในดินโดยทั่วไปมีรูปร่าง 3 แบบ คือ แบบแท่ง (Bacillus) แบบกลม (coccus) และแบบเกลียว (spirillum) ในดินพบแบคทีเรียแบบแท่งและแบบกลมมากที่สุด ขนาดของแบคทีเรียดินจะมีขนาดตั้งแต่ 0.5 - 5 ไมโครเมตร จนถึงขนาดใหญ่เท่าอนุภาคดินเหนียวพบว่าแบคทีเรียคือจุลินทรีย์ที่เพิ่มจำนวนในดินอย่างรวดเร็วและดำรงชีวิตอยู่ในดินได้ดี ซึ่งจะพบแบคทีเรียดินจำนวนมากในบริเวณใกล้รากพืชและปริมาณจะลดลงในบริเวณที่ไกลออกไป ซึ่งองค์ประกอบ

ความหนาแน่นของป่าไม้เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อจำนวนจุลินทรีย์ดิน (กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาณ, 2536) ชนิดของแบคทีเรียที่พบในดินได้แก่ *Pseudomonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* และ *Mycobacterium spp.* เป็นต้น ในดินรอบรากของต้นไม้พบแบคทีเรียที่มีความสำคัญมาก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส ที่มีความสัมพันธ์กับพืชแบบภาวะมีการเกื้อกูล (comensalism) และกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนซึ่งมีความสัมพันธ์กับพืชแบบภาวะได้ประโยชน์ร่วมกัน (protocooperation) (สมศักดิ์ วังใน, 2528: 73-174)

แบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ โดยพบว่าเป็นส่วนประกอบในพืชถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง เซลลูโลสเป็นสารชีวโมเลกุลที่ไม่ถูกย่อยภายในกระเพาะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โมเลกุลของเซลลูโลสไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยหน่วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 1-4 กลูโคซิดิค (β1-4-glucosidic bonds) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของกูลโคสโมเลกุลกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 200,000 จนถึง 2,000,000 ซึ่งมีกลูโคสเชื่อมกันอยู่มากถึง 1,800 ถึง 10,000 โมเลกุล โมเลกุลของเซลลูโลสแต่ละสายเรียงขนานอยู่เป็นมัดๆ เรียกว่า ไฟบริล (fibril)ซึ่งจับกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทำให้ไม่ละลายน้ำ เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของพืช เมื่อเกิดการย่อยสลาย จุลินทรีย์จะเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่ถูกทำลายได้ยาก แต่ถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (สุวรรณา ภูวนวิทยาคม, 2528)

แบคทีเรียหลายชนิดมีบทบาทเด่นในการย่อยสลายเซลลูโลส เช่น *Clostridium spp.*, *Trichoderma spp.*, และ *Bacillus spp.*, (สมศักดิ์ วังใน, 2528) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเศษซากพืช ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน (lignin) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) แบ่งได้เป็น 3 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. Aerobic mesophilic bacteria ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งเจริญเติบโตในอุณหภูมิระหว่าง 15-45 องศาเซลเซียล ได้แก่ *Cytophaga spp.*, *Sporocytophaga spp.*, *Angiococcus spp.*, *Polyangium spp.*, *Achromobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Bacillus spp.*, *Cellulomonas spp.*, *Cellovibrio spp.* และ

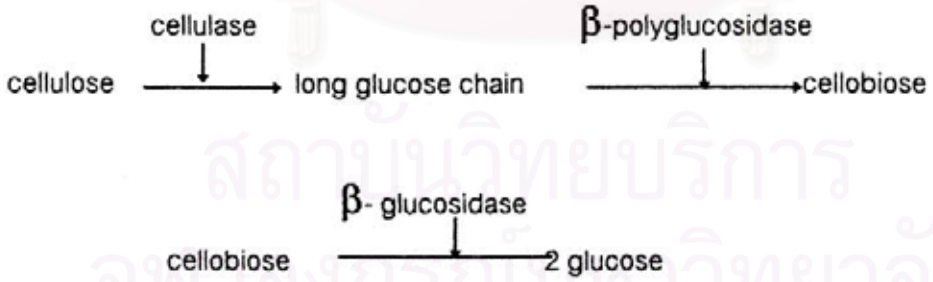
Cellfalcicula spp., ซึ่งแบคทีเรียที่กล่าวมาถือว่าย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี (Went และ Jong, 1966 ; Rai และ Srivastava 1982)

2. Anaerobic mesophilic bacteria ได้แก่ แบคทีเรียที่ ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาพนี้ได้ดีกว่า รา และแอคติโนมัยซีส ได้แก่ *Clostridium spp.* ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายได้ดีทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

3. Thermophilic bacteria ได้แก่ แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 45-65 องศาเซลเซียล ได้แก่ *Clostridium thermocellum* และ *Clostridium thermocellulaseum* ซึ่งย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ส่วน *Clostridium thermophiles* สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (สุวรรณา ภูวนวิทยาคม, 2528)

<u>การย่อยเซลลูโลสทางชีวเคมี</u>

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจะสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งทำให้เกิดการแยกตัวของเซลลูโลสได้กลูโคส และสารประกอบอื่นๆที่ละลายน้ำได้ และซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานต่อไป สำหรับกลไกในการย่อยสลายเซลลูโลสได้แสดงตามแบบแผนดังนี้ (สมศักดิ์ วังใน, 2528: 65)



ผลที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลส

แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจนได้ผลผลิต คือ คาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ ส่วน จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน และกลุ่มที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน ผลที่เกิดจากการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ ผลผลิตที่ได้จะเป็น ก๊าซไฮโดรเจน เอธานอล กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิค กรดบิวไทริค และกรดแลคติก แต่ยังมีจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้กรดอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่สมบูรณ์เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานทำให้ได้ มีเธน เกิดขึ้น (สุวรรณา ภูวนวิทยาคม, 2528)

ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลล์ลูโลส

การย่อยสลายเศษใบไม้ กิ่งไม้หรือลูกไม้ในป่าทำให้ได้ผลผลิตเป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ต่างๆ ผลผลิตที่ได้จะเป็นประโยชน์ในแง่การให้แร่ธาตุและการเอื้อลักษณะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของพืชในบริเวณนั้น (สมศักดิ์ วังใน, 2528)

แบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนโดยอิสระ
(Free-living nitrogen-fixing bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 3 กลุ่มคือ obligatory aerobes, facultatively anaerobes และ strict anaerobes (Quisspel, 1974: 39)

ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนโดยอิสระพบ Family Azotobacteraceae เป็นชนิดที่สำคัญที่สุด เพราะมีสมาชิกหลายสปีชีส์และทุกสปีชีส์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Quispel, 1974: 39) จีนัส *Azotobacter* ถูกค้นพบและเริ่มศึกษาในปี ค.ศ.1901 2 สปีชีส์ คือ *Azotobacter chroococcum* พบอยู่ในดินที่มีสภาพเป็นด่างและ *Azotobacter agillis* อยู่ในดินเหลว (Quispel, 1974: 41) ต่อมามีการค้นพบแบคทีเรียกลุ่มนี้อีกหลายสปีชีส์ซึ่งมักพบในดินที่มีสภาพเป็นด่าง แบคทีเรียที่สำคัญอีก 2 กลุ่ม คือ *Beijerinkia spp.* และ *Derxia spp.* มักพบในดินที่มีสภาพเป็นกรด แบคทีเรีย 2 กลุ่ม จะตรึงไนโตรเจนนี้ออกซิเจนเพียงพอสำหรับการหายใจ สำหรับ *Beijerinkia spp.* นอกจากพบในดินแล้วยังมีรายงานว่าสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ที่ผิวของใบพืชบางชนิดด้วย (สมศักดิ์ วังใน, 2528: 83)

การกระจายของแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนในดิน

ในดินที่ระดับความลึกตั้งแต่ 0 - 50 เซนติเมตร พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้มากที่สุดอยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere) (Quispel, 1974)

ไนโตรเจนในดิน

ไนโตรเจนในดินอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น polypeptide amino acid ammonia nitrate และnitrite (วิไลลักษณ์ ศัตรูลี้, 2522) การแปรรูปของสารประกอบไนโตรเจนจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ หรือปรากฏการณ์ธรรมชาติ เช่น ฟ้าผ่า ก็สามารถทำให้ปริมาณของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นได้ (Hutchinson, 1944) การตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยกระบวนการจากจุลินทรีย์และฟิสิกส์เคมีเกิดขึ้นประมาณ 140-700 มิลลิกรัมต่อตารางเมตรต่อปี (วิไลลักษณ์ ศัตรูลี้, 2522) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากจุลินทรีย์ มีเพียงส่วนน้อยที่เกิดจากกระบวนการทางฟิสิกส์เคมี การเปลี่ยนแปลงปริมาณของไนโตรเจนในป่าขึ้นอยู่กับซากอินทรีย์วัตถุ ซากพืชที่ร่วงหล่นตามฤดูกาล ในพื้นที่ที่มีซากพืชทับถมรวมกันอยู่ ปริมาณไนโตรเจนจะมากกว่าบริเวณที่มี การทำความสะอาดแผ้วถางอยู่เสมอ (Moore, 1966)

การตรึงไนโตรเจนในดิน

ปริมาณการตรึงไนโตรเจนในป่าและในทุ่งหญ้ามีความแตกต่างกันกล่าวคือ พบว่าในป่ามีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ำ ประมาณ 11-37 กิโลเมตรต่อเฮคแตร์ต่อปี ส่วนในทุ่งหญ้าพบว่ามีการตรึงไนโตรเจนในอัตราที่สูงกว่าคือ ประมาณ 56-95 กิโลเมตรต่อเฮคแตร์ต่อปี แต่พบว่าในสภาพทุ่งหญ้าถึงแม้ว่ามีอัตราการตรึงไนโตรเจนที่สูงกว่า แต่ปริมาณไนโตรเจนในดินจะถูกพืชใช้หมดได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีการชะล้างและการระเหิดมากกว่าในสภาพป่าปกติ ทำให้ไนโตรเจนที่ตรึงได้นั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืชในทุ่งหญ้า (Moore, 1966) นอกจากนี้ในพื้นที่ที่มีอินทรีย์วัตถุมาก การตรึงไนโตรเจนก็จะมากขึ้น และพบว่าในช่วงที่มีการสังเคราะห์แสงมาก การตรึงไนโตรเจนก็จะมากตามไปด้วย พบว่าการตรึงไนโตรเจนจะสูงมากบริเวณรากของพืช (Trolldenier, 1977)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน

นอกจากปริมาณของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าตรึงไนโตรเจน ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องอีก ดังนี้

1. ออกซิเจน

ถึงแม้ว่า *Azotobacter spp, Beijerinkia spp, Derxia spp.* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่ที่ระดับความหนาแน่นของออกซิเจนในอากาศ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าที่ระดับความหนาแน่นของออกซิเจน 10-20 เปอร์เซ็นต์ ถึง 3 เท่า (ลาวัลย์ ฟุ้งขจร, 2528) การเจริญของเชื้อ *Azotobacter spp* บางสปีชีส์จะหยุดชะงัก ถ้าความดันของออกซิเจนในบรรยากาศมากกว่า 0.3 บรรยากาศ เนื่องจากออกซิเจนและไนโตรเจนแย่งกันเข้าสู่บริเวณ terminal hydrogen acceptor ของเอนไซม์ ไนโตรจีเนส ที่ใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Stewart, 1969)

2. สภาพความเป็นกรด-ด่าง

Azotobacter spp. สามารถเจริญได้ดีในดินที่มี pH ที่มากกว่า 6 หรือในสภาพที่เป็นกลาง แต่ก็พบว่าบางสปีชีส์สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรด สภาพความเป็นกรด-ด่างจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+concentration) ซึ่งจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ (Gainney and Fowler, 1945) ส่วน *Beijerinkia spp.* และ *Derxia spp.* สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรด อาจมีบางสปีชีส์สามารถเจริญได้แม้ว่ามี pH ต่ำกว่า 3 (Stewart, 1969)

3. อินทรีย์วัตถุ

อินทรีย์วัตถุที่จำเป็นต่อการตรึงไนโตรเจน เช่น น้ำตาล กรดไขมัน แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ อินทรีย์วัตถุจะทำให้ปริมาณ C/N ratio ในดินสูง การตรึงไนโตรเจนจึงเกิดได้มากขึ้น (ประกิตติ์ลิน สีหนนท์, บรรยาย: 2540)

4. อนินทรีย์วัตถุ

สมศักดิ์ วังใน (2528) รายงานว่าการตรึงไนโตรเจนมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟอสเฟตโดยตรง โดยที่เชื้อ *Azotobacter* จะใช้ฟอสเฟต 1 กรัมต่อการตรึงไนโตรเจน 4 -10 มิลลิกรัม ถ้าขาดฟอสเฟตจะทำให้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนลดลง เนื่องจากฟอสเฟตเป็นสารประกอบอย่างหนึ่งของสารที่ให้พลังงาน และยังพบว่าสามารถป้องกันการเป็นพิษของออกซิเจนอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีธาตุอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีก เช่น แคลเซียม ซึ่งเป็นธาตุหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter* ส่วนธาตุ โมลิบดินัม (Mo) โคบอลท์ (Co) และเหล็ก (Fe) จะเป็นธาตุที่มีความสำคัญที่ช่วยในการตรึงก๊าซไนโตรเจน (Jurgensen และDavey, 1973)

ธาตุไนโตรเจนในดินสามารถยับยั้งการตรึงไนโตรเจนได้ เนื่องจากธาตุไนโตรเจนจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่หากมีธาตุไนโตรเจนต่ำเกินไป จะสามารถยับยั้งการตรึงไนโตรเจนได้เช่นกัน (Stewart, 1969)

5. อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter* ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้อยู่ระหว่าง 20-45 องศาเซลเซียล (Jensen, 1942)

6.ความชื้น

เชื้อ *Azotobacter* ต้องการความชื้นสูง โดยที่ WHC (water holding capacity) 70 เปอร์เซนต์ พบว่าเชื้อ *Azotobacter* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูง ส่วนที่ WHC 60 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมต่อเจริญเติบโตของเชื้อ*Azotobacter*

เชื้อ *Azotobacter* กับการเจริญเติบโตของพืช

เชื้อ *Azotobacter* เจริญอยู่รอบรากพืช และได้รับธาตุอาหารและสารอาหารที่ปล่อยออกมาจากรากพืช และเชื้อ *Azotobacter* สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทำให้บริเวณนั้นมีไนโตรเจนสูงขึ้นเป็นประโยชน์แก่พืช (ลาวัลย์ ฟุ้งขจร, 2528: 19) สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดอยู่ด้วยกันแบบพึ่งพาอาศัยทำให้ได้ประโยชน์ทั้ง 2 ฝ่าย นอกจากนี้เชื้อ *Azotobacter* ยังสร้างสารเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น indolyl-3-acetic acid (IAA), authentic giberellin (GA_3) (Brown and Buringham, 1968 ; Lee et al., 1970) วิตามิน B_{12} (Bagdasarian, 1965; Mishustin, 1970) auxin (Allinson, 1947; Alexander, 1967) cyrocynins (Barca and Margaret, 1974) นอกจากนี้ เชื้อ *Azotobacter* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการสร้างสาร fungistatic substance ได้อีกด้วย (Dobereiner et al., 1972)

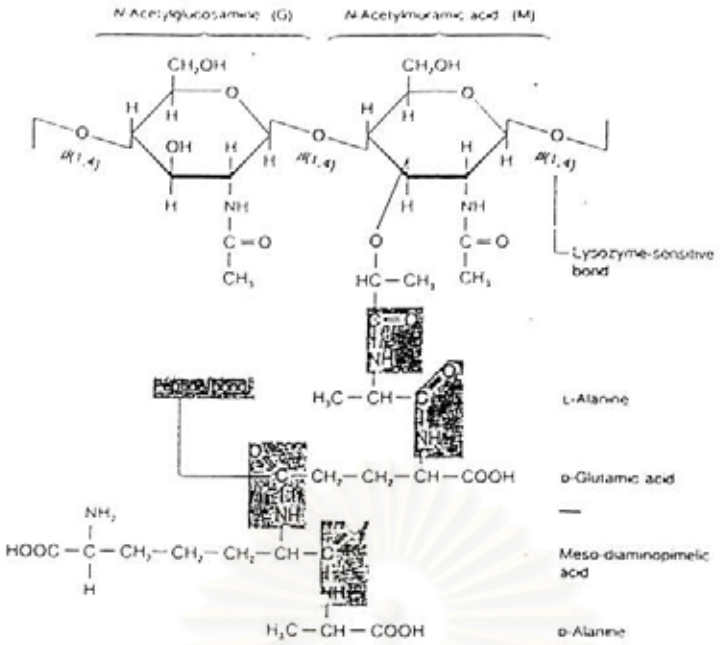
เชื้อ *Azotobacter* กับจุลินทรีย์อื่นในดิน

เชื้อ *Azotobacter* จะเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นในระยะแรกของการปลูกพืช เพราะสามารถใช้สารที่ขับออกมาจากเซลล์ซึ่งเป็นส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Rovira, 1956) ต่อมาเมื่อรากของพืชขับสารอื่น เช่น กรดอะมิโนออกมามากขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์กลุ่มอื่น เช่น รา และ แอคติโนมัยซีส เจริญได้ดีกว่าเชื้อ*Azotobacter* (Patel and Brown, 1969) โดยที่ แอคติโนมัยซีส และ รา ชนิด *Penicillium spp. Fusarium spp.* และ

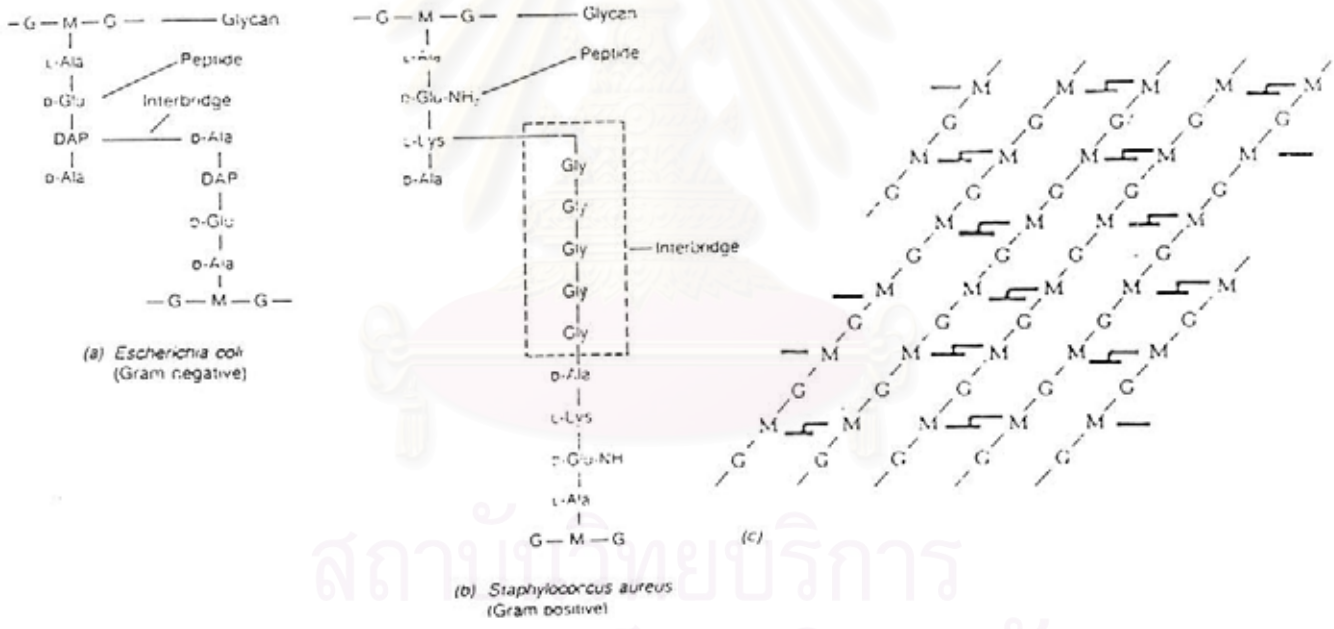
Mortierella spp. รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่ม Bacill จะสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Azotobacter* (Allinson, 1947; Petal and Brown, 1962; Virtanen, 1957) การตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นหากมีจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้อยู่ด้วย ได้แก่ *Agrobacterium, Aerobacter, Clostridium, Aureobasidium, Photobacterium, Saccharomycetes, Rhodotorula, Corynebacterium* และ *Pseudomonas* (Parker, 1955;) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถช่วยให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* ดีขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดจะช่วยย่อยอินทรีย์วัตถุให้อยู่ในรูปของคาร์บอนที่นำไปใช้ได้ง่าย จุลินทรีย์บางชนิดสามารถปล่อยธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อเชื้อ *Azotobacter* ออกมา บางชนิดช่วยแปรรูปของสารพิษที่อยู่ในดิน เช่น ช่วยใช้ออกซิเจนที่มีอยู่ในดิน เมื่อออกซิเจนลดลงการตรึงไนโตรเจนก็จะมีอัตราที่สูงขึ้น (ลาวัลย์ ฟุ้งขจร 2528)

แอคติโนมัยซีส

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีส เชื้อแอคติโนมัยซีส จัดเป็นแบคทีเรีย อยู่ใน Order Actinomycetales เนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และ ไมโตคอนเดรีย (Cross and Goodfellow, 1973) และมีการสร้างเส้นใยแตกกิ่งก้านสาขาคล้ายเชื้อราแต่เส้นใยมีความบอบบางและสั้นกว่า ซึ่งจะแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น และผนังเซลล์มีชั้นของ peptidoglycan (murein) (Komagata และ Suzuki, 1987: 190) ประกอบด้วยสารพวก protein, lipid และ polysaccharide โดยมี protein และ polysaccharide เป็นโครงสร้างหลัก (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2538) เชื้อแอคติโนมัยซีสจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ผนังเซลล์พบว่ามี polysaccharide อยู่ 2 ชนิดคือ N - acetyl muramic acid (NAM) และ N - acetyl glucosamine (NAG) โดยที่ NAM จะมีโมเลกุลของ amino acid มายึดเกาะประกอบด้วย L - alanine, D - glutamine, L - lysine, และ amino acid diaminopimelic acid (DAP) (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2538และ Brock, 1966:) ผนังเซลล์ของ แอคติโนมัยซีส บางจีนัส อาจมีหรือไม่มี DAP ก็ได้ DAP บนผนังเซลล์ของ *Streptomyces* และ *Streptoverticillum* จะเป็นแบบ LL- DAP (LL-diaminopimetic acid) ส่วนแอคติโนมัยซีสในจีนัสอื่นที่ไม่ใช่ *Streptomyces* และ *Streptoverticillum* จะเป็นแบบ meso - DAP

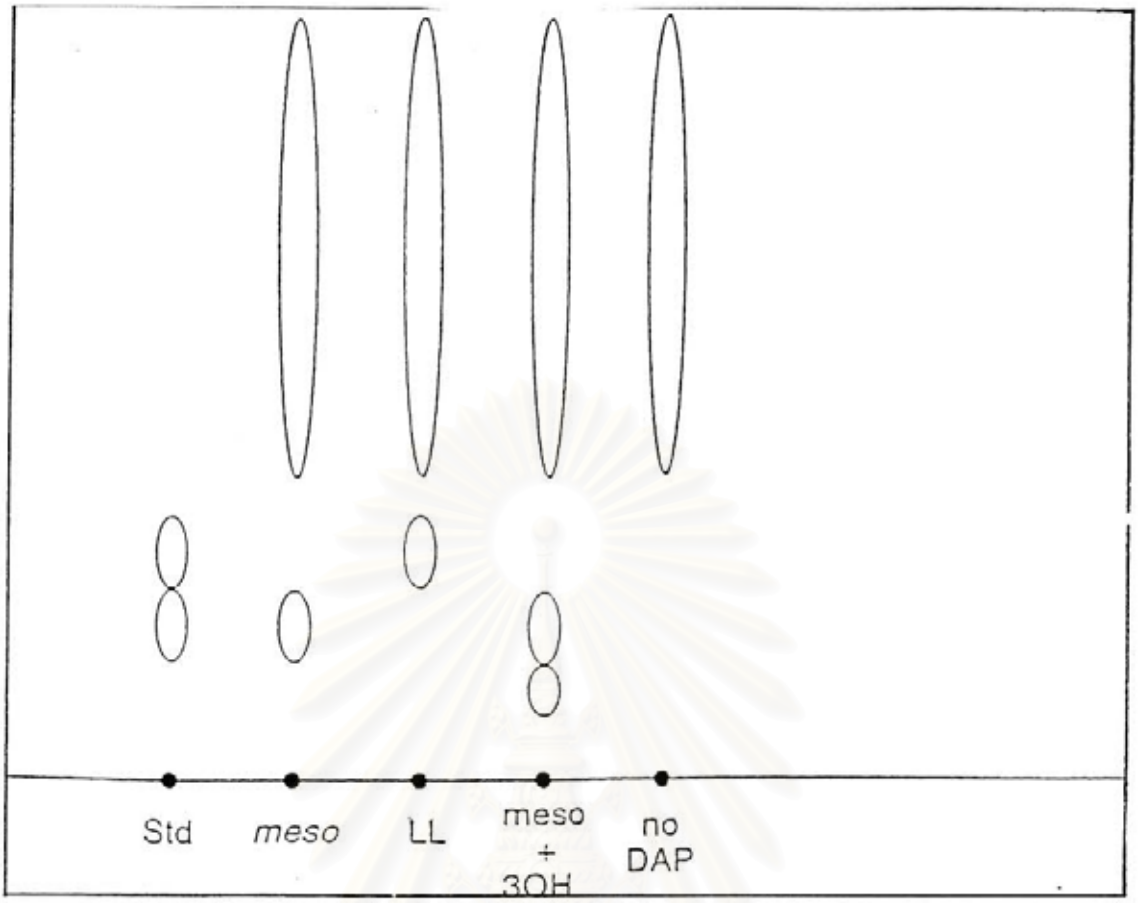


ภาพที่ 1 โครงสร้างของ peptidoglycan **ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย** (ภาพจาก Brock Madigan 1991 Biology of microorganism. P. 56)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (a) แกรมลบ (b) แกรมบวก (C) ลักษณะการเชื่อมโครงสร้างของ peptidoglycan (ภาพจาก Brock Madigan 1991 Biology of microorganism. P. 56)

การตรวจสอบชนิดของ DAP-isomer อยู่บนผนังเซลล์ของ แอคติโนมัยซีส ที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ ใน จีนัส *Streptomycetes* (Komagata และ Suzuki, 1987) การตรวจหาชนิดของ DAP สามารถตรวจได้โดยวิธี Thinlayer chromatography (Komagata, 1987)



ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจหา DAP-isomer (เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ Bangkok MIRCEN Thailand Institute of Scientific and Technologyal Research (TISTR), 1996)

เชื้อแอคติโนมัยซีส จะสร้างเส้นใยเจริญอยู่เหนืออาหาร (airial hypha) หรืออยู่ในอาหาร (substrate hypha) เส้นใยสั้นยาวแตกต่างกัน มีรูปร่างลักษณะของสปอร์ที่มีความแตกต่างกัน เช่น มีสปอร์ที่อยู่กันเป็นคู่หรือมีรูปร่างเป็นเส้นตรง ขดเป็นเกลียว ม้วนงอตรงปลาย และสายสปอร์อาจเกิดเดี่ยวๆ จากเส้นใยหรือเกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใยก็ได้

Familly Streptomycetaceae เป็นวงศ์หนึ่งในที่มีความสำคัญทาง เศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์ โดยเฉพาะใน จีนัส *Streptomyces* เนื่องจากจีนัส *Streptomyces* สามารถเกิดมิวเตชั่นในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างได้ง่าย การนำเชื้อในสกุลนี้มาปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพจึงเป็นงานที่น่าศึกษา (Nikov, 1960)

(1971) แนะนำให้เติมสาร nystatin หรือ pimaricin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่นเดียวกับ Williams และ Davies (1965) แนะว่าการเติมสาร cyclohexamide จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าใช้ nystatin และ cyclohexamide อย่างละ 50 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่โดยไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ แอคติโนมัยซีส (ภูริพันธ์ ลีละศุลีธรรม, 2526)

นอกจากการเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นแล้วิธีหนึ่ง ได้แก่ การจัดองค์ประกอบในอาหารเพื่อสนับสนุนการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส ได้แก่แหล่งคาร์บอนบางชนิด เช่น แป้ง และกลีเซอรอล แหล่งของไนโตรเจนบางชนิด เช่น casein asparagine และ arginine (ภูริพันธ์ ลีละศุลีธรรม, 2526) เชื้อแอคติโนมัยซีส จะนำแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาไปใช้ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียและรา Kuster และ Williams (1964) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* จากกองปุ๋ยหมักโดยใช้ Strach Casein Agar Linggappa

การใช้ความร้อนในการคัดแยกแอคติโนมัยซีสเป็นการลดปริมาณจุลลินทรีย์ชนิดอื่นที่ให้ผลดีอีกวิธีหนึ่ง Nonomura และ Hayakawa (1988) ได้ทดลองใช้สารละลายดินที่มีระดับความเจือจาง 1:100 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที ในสารละลายที่ประกอบด้วย 6% yeast extract และ 0.05% sodium dodecyl sulfate (pH 7.0) พบว่าเป็นวิธีที่ได้ผลสำหรับการกำจัดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน Aguate และ Bhat (1965) สามารถลดจำนวนของเชื้อชนิดอื่นโดยบ่มสารละลายดินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถลดการเจริญของเชื้ออื่นได้ดี แต่เชื้อแอคติโนมัยซีส ก็ลดจำนวนลงเช่นกัน

วิธีการเหวี่ยงแยก (centrifuge) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น Rehacels (1971) พบว่าการนำสารละลายดินมาเหวี่ยงแยกด้วยแรงเหวี่ยง 1690 กรัม เป็นเวลา 20 นาที จะทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นตกตะกอนยกเว้นเชื้อแอคติโนมัยซีส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การคัดเลือกเชื้อ แอคติโนมัยซีส ที่สร้างสารปฏิชีวนะ</u>

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสระยะแรกๆใช้วิธีการ crowded plate techniques (Waksman, 1957) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นโดยมีวิธีการดังนี้ คือ บ่มสารละลายดินที่ต้องการทดสอบในจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตจุลินทรีย์ที่ให้ inhibition zone หรือทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะโดยเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ต้องกาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำโดยการฟ่นทับลงบนผิวหน้าอาหาร (Stansly, 1947) หรือใช้ water agar suspension ของเชื้อเททับลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะอยู่แล้วสังเกตการเกิด inhibition zone

Kelner (1948) ตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งซึ่งประกอบด้วยชั้นวุ้น 4 ชั้น โดยชั้นแรกเป็นอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ชั้นที่สองประกอบด้วย 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลวที่มีวุ้นอยู่ 0.25 เปอร์เซนต์ กับสารละลายดินเจือจางเชื้อประมาณ 30-50 โคโลนีต่อ 1 จานเพาะเชื้อชั้นที่สามประกอบด้วยชั้นอาหารวุ้นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10-15 มิลลิลิตรและชั้นที่สี่ใช้อาหารวุ้นที่มีสารละลายแบคทีเรีย 3 มิลลิลิตรเททับลงบนผิวหน้า สังเกตผลของการทดสอบโดยสังเกต inhibition zone ที่แพร่ขึ้นมายับยั้งแบคทีเรียที่เททับลงบนผิวหน้าสุด

Lechavalier และ Corke (1953) ดัดแปลงวิธีการตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะจากวิธีการของ Lederberg's replica plate method โดยการเจือจางสารละลายดินให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการคัดแยกแล้วเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ผ้าสักหลาด (velveteen stamps) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายโคโลนีลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ หรือมากกว่าเก็บจุลินทรีย์ที่เจริญแล้วไว้ในตู้เย็น 1 ซ้ำ นำส่วนที่เหลือทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะกับแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเลือกเก็บโคโลนีที่ต้องการจากจานเพาะเชื้อที่เก็บในตู้เย็น

การคัดเลือกเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะอีกวิธีหนึ่งที่นิยมกันมากคือ cross streak plate (Waksman, 1959) วิธีนี้ทำโดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสบนอาหารแข็งให้มีการเจริญเติบโตเต็มที่โดยการลากเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นเส้นตรงกลางจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการใช้ทดสอบลากขวางแนวของเชื้อแอคติโนมัยซีสบ่มไว้ 24 ชั่วโมง บันทึกผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความกว้างของ inhibition zone

การตรวจหาแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะในธรรมชาติ

การตรวจหาสายพันธ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในระยะแรกมีการทดลองกับเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ (Vanek, 1958) ปัจจุบันได้มีการทดลองกับเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อรา โปรโตซัว แบคทีเรีย และเซลล์มะเร็ง

Nakhimovskaia (1967) พบแอคติโนมัยซีสที่กระจายอยู่ในดินชนิดต่างๆในรัสเซีย จำนวน 80 เชื้อ พบว่ามี 47 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilus* ได้ อีก 27 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ที่เหลือไม่ได้รายงานผลการทดสอบ

Waksman (1957) แยกแอคติโนมัยซีสจากดินและปุ๋ยหมัก จำนวน 244 ชนิด และนำแอคติโนมัยซีสที่แยกได้ไปทดสอบกับ *Bacillus subtilis* พบว่า มีแอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ถึง 43.4 เปอร์เซ็นต์

Burkholder (1946) ศึกษาแอคติโนมัยซีสจำนวน 7,369 ที่แยกได้จากดินพบว่ามี 1,819 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococus aureus* 261 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ 514 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญ *Candida albicans*

Landerkin (1952) พบว่าแอคติโนมัยซีสที่แยกได้ 61.2 เปอร์เซ็นต์ จากดินทางตอนเหนือของประเทศแคนาดาสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ดี

Linder และ Wallhausser (1967) แยกแอคติโนมัยซีส ได้ 2,500 สายพันธุ์จากดินแหล่งต่างๆ พบว่า 77 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ที่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococus aureus* 40 เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง *E.coli* 32 เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* และ 18 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger*

Wooddruff และ Mcdanial (1967) พบว่าแอคติโนมัยซีส 2,500 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ มี 2,250 สายพันธุ์ สร้างสาร streptomycin หรือสารที่มีความใกล้เคียง 125 สายพันธุ์สร้าง streptomycin 42 สายพันธุ์สร้าง tetracyclin สายพันธุ์ที่เหลือสร้างสารปฏิชีวนะอื่นๆ และมี 30 สายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะไม่ทราบชนิด

Vanek et al. (1958) แยกแอคติโนมัยซีสจากดินในประเทศจีนเป็นจำนวน 115 ตัวอย่าง ได้แอคติโนมัยซีสทั้งหมด 739 สายพันธุ์ พบว่าประมาณ 69.7 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่ทดสอบได้ดี

Routien (1961) ได้สำรวจการกระจายของเชื้อแอคติโนมัยซีสทางตอนใต้ของประเทศอเมริกาตั้งแต่รัฐเท็กซัสจนถึงรัฐแคนซัส และได้ศึกษาถึงการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ที่แยกได้ พบว่า แอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินบางชนิดไม่สร้างสารปฏิชีวนะโดยส่วนใหญ่จะสร้างสาร

ปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin และ streptolin มีเชื้อส่วนน้อยที่สร้าง chloramphenicol PA-91 และ cycloserine

ภูริพันธ์ ลีละศุลีธรรม (2526) ได้แยกแอคติโนมัยซีสจากดินจอมปลวกจากป่าดิบแล้งและป่าเต็งรังในฤดูกาลที่แตกต่างกัน พบว่าแอคติโนมัยซีส ถูกพบในฤดูฝนมากที่สุด และสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 513 สายพันธุ์ ตรวจสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า มี 79 - 164 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *E.coli* 15-84 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ 10-17 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ*Pseudomonas aeroginosa*

วารุณี ศรีประเสริฐกุล, (2526) แยกแอคติโนมัยซีส 680 สายพันธุ์ จากดินในประเทศไทยจำนวน 68 ตัวอย่าง และศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งพบว่ามี เชื้อ 142 สายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ และเมื่อนำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว 3 ชนิด คือ GMP broth, soybean meal และ KAVA medium พบว่ามี 32 สายพันธุ์ ที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

สุรีลักษณ์ รอดทอง, (2527) ได้แยกเชื้อ แอคติโนมัยซีส จำนวน 137 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว โดยใช้อาหารเหลว 3 ชนิดคือ glucose meat extract peptone broth ,KAYA medium และ glucose-soybean medium คัดเลือกเชื้อได้ 33 สายพันธุ์ ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินจอมปลวก จังหวัดนครราชสีมา สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ดี

กัลยา ปรีชานุกูล, (2528) ได้แยกแอคติโนมัยซีส 132 สายพันธุ์จากดิน 30 ตัวอย่างพบว่ามีอยู่ 87 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ และอีก 45 สายพันธุ์ไม่สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, (2541) แยกแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดิน 86 ตัวอย่าง จากป่าชายเลนในจังหวัด ชลบุรี จันทบุรี เพชรบุรี และพังงา ได้แอคติโนมัยซีส 151 สายพันธุ์ และพบว่ามี 95 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 885, *Micrococcus luteus* TISTR 884 และ *Candida albicans* TISTR 5239

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีสโดยใช้แบบแผนไอโซไซม์ (Isozyme pattern)

<u>ไอโซไซม์ และอิเลคโตรโฟลิซีสแบบโพลิอะคริลาไมด์เจล</u>

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ ปัจจุบัน ได้นำเอาวิธีนี้มาใช้อย่างแพร่หลาย ในงานทดลองและงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์โดยอาศัยหลักการที่ว่าการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ภายในเซลล์ต้องอาศัยเอนไซม์ โดยที่เอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นการสร้างเอนไซม์จึงต้องถอดรหัสพันธุกรรมจาก ดี เอ็น เอ และโดยทั่วไป เอนไซม์ชนิดเดียวกันทำงานในปฏิกิริยาหลักเดียวกันอาจมีรูปร่างหรือมวลที่แตกต่างกัน แม้ว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันก็ตาม ดังนั้นการศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์จึงเป็นการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ที่มีในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์นั้น เป็นการศึกษาเอนไซม์ที่มีในสิ่งมีชีวิตทั่วไปซึ่งเอนไซม์ที่ศึกษานั้นจะอยู่ภายในวิถีเมทาบอลิซึมเดียวกันความแตกต่างของไอโซไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตมาจากสาเหตุ 2 ประการ คือ ประการที่หนึ่งเป็น ความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมเนื่องจาก การเกิดการกลายพันธุ์ และ ประการที่สองเป็นความผิดปกติของยีน หรือ โครโมโซม จนเกิดการเปลี่ยนแปลงของการพัฒนาเอนไซม์ ซึ่งประการหลังนี้จะเกิดขึ้นหลังจากการแปลรหัสพันธุกรรมเป็นสายโพลีเปปไทด์แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลง จนทำให้รูปร่างลักษณะของเอนไซม์ที่ได้นั้นมีความแตกต่างกันไป เช่น เมื่อมีการแปลรหัสออกมาแล้ว เกิดการรวมตัวของสายโพลีเปปไทด์ (post-translation addition) การหลุดออกของสายโพลีเปปไทด์ (post-translation deletion) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเอนไซม์เพื่อการทำหน้าที่ หรือ เกิดการม้วนพับกันของสายโพลีเปปไทด์ (post-translation conformation) (Micales, 1990)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีน และเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตโดยการวิเคราะห์จากแบบแผนของไอโซไซม์ อาศัยหลักการที่โมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุไฟฟ้าแตกต่างกันเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลซึ่งเป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน เนื่องจากแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลเฉื่อยต่อสารเคมี มีความเสถียรสูงทำงานในช่วง pH และอุณหภูมิที่กว้าง และยังสามารถลดการแพร่ของเอนไซม์หรือโปรตีน ทำให้แถบของโปรตีนมีความคมชัด และการใช้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จะทำให้ได้รูพรุนของแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ที่มีขนาดที่เหมาะสม ทำให้สามารถแยกโปรตีนได้ทั้งขนาดและประจุที่ต่างกัน

การเกิดประจุในโปรตีนหรือเอนไซม์เนื่องจากหมู่กรดอะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ side chain ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนแต่ละโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันในการเรียงตัวของกรดอะมิโน ก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน เมื่อนำ

สารที่ต้องการวิเคราะห์มาแยกแล้ว สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของเอนไซม์หรือโปรตีนนั้น โดยการนำสารละลายสีย้อมที่มี substrate กับ co-enzyme ซึ่งเป็นสารที่สามารถจับกับเอนไซม์ที่สนใจและปรากฏให้เห็นบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล จึงสามารถแปลผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้ (สุจิตรา จางตระกูล, 2535)

ด้วยคุณสมบัติของไอโซไซม์ที่กล่าวมา จึงได้ศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เพื่อใช้เป็นข้อมูลนำมาศึกษาความหลากหลายของประชากรสิ่งมีชีวิต เพราะการศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์นั้นสามารถบอกระดับความแตกต่างของอัลลีลได้ ได้มีการนำแบบแผนไอโซไซม์มาใช้ศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม เช่น การศึกษาการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อราในสายพันธุ์ของ *Agaricus*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Gaeumannomyces*, *Glomus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pleurotus*, *Puccinia*, *Rhizopogon*, และ *Scytinostroma* (Micales, Bonde and Peterson, 1981) ประโยชน์ของเทคนิคการวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์สำหรับเชื้อรานั้น พบว่าสามารถใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานสำหรับเชื้อราที่ไม่ทราบสายพันธุ์ที่แน่นอนได้

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแอคติโนมัยซีส โดยใช้แบบแผนไอโซไซม์ มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลการศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถจำแนกถึงความเกี่ยวเนื่องในสายของวิวัฒนาการ Oh, Ahnc และ Kim (1998) ได้ศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *Streptomyces spp.* 24 สายพันธุ์ โดยใช้โพลิอะคริลาไมด์เจล เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Streptomyces spp.* ทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ จากเอนไซม์ 11 ชนิด คือ hexokinase glucose-6-phosphate dehydrogenase phosphogluconate dehydrogenase malate dehydrogenase isocitrate dehydrogenase glucose dehydrogenase alcohol dehydrogenase 3-hydroxybutyrate dehydrogenase phophoglucose isomerase peroxidase และ esterase เป็นการศึกษาเพื่อค้นหาเอนไซม์ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของ *Streptomyces spp.* ในสายพันธุ์ต่างๆ ว่ามีความแตกต่างกันของแถบเอนไซม์เพียงใด จากงานวิจัยนี้พบว่าเอนไซม์กลุ่ม glucose dehydrogenase alcohol dehydrogenase 3-hydroxybutyrate dehydrogenase phophoglucose isomerase peroxidase และ esterase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบว่ามีความแตกต่างของแถบไซโมแกรมและเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตรวจหาความแตกต่างของสายพันธุ์ *Streptomyces spp.*

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

- ถุงพลาสติกใสขนาด 6x 10 นิ้ว
- พลั่วขุดดิน
- ป้ายพลาสติกสำหรับทำเครื่องหมาย
- จานเพาะเชื้อ
- ขวดรูปชมพู่
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ตะเกียงอัลกอฮอล์
- หม้อนึ่งอัดไอน้ำ
- เครื่องทำลายเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น W 375 บริษัท Heat systems-ultrasonics
- เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง รุ่น J2-21 บริษัท Backman
- ตู้ laminar flow รุ่น ISSCO บริษัท Dwyer
- กล้องถ่ายรูป PENTEX super A soft case 32650
- กระดาษกรองเบอร์ 1 บริษัท Whatman
- เครื่องอิเล็คโตรโฟริซีสรุ่น BIO-RAD power pac 300
- กล่องพลาสติกทึบแสงสำหรับใส่สีย้อม
- TLC aluminium sheets cellulose F (merck) No 5574
- หลอดใส่สารเคมีขนาดเล็กมีฝาปิด (screw-capped tube)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ**

- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์(ภาคผนวก)
- ammonium persulfate (Merck)
- butanol (Merck)
- calcium sulfate (Carlo)
- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Merck)
- hydrochloric acid (Sigma)
- malt extract (Difco)
- magnesium sulfate (M & B)
- mercaptoethanol (Pharmacia biotech)
- methanol (Merck)
- 5-methylphenazinium methyl sulfate (Merck)
- nicotinamide-adenindinucleotide (Merck)
- Nutrient broth (Merck)
- pyridine (Fluka)
- potassium sodium tartrate tetrahydrate (Merck)
- potassium hydrogen phosphate (M & B)
- yeast extract (Difco)
- Glucose (Merck)
- K_2HPO_4(Merck)
- $MgSO_4 . 7H_2O$(Merck)
- $FeSO_4 .7H_2O$(Merck)
- Agar (Difco)
- Peptone (Difco)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Yeast extract (Difco)
- Malt extract (Difco)
- Polypeptone (Difco)
- NaCl (M & B)
- $MgSO_4.7H_2O$(M & B)
- Sucrose (M & B)
- Sodiumcitrat (Difco)
- Nitroblue tetrazol (Merck)
- Phenazine metrosulfate (Merck)
- 3-amino-9-ethylcarbazole (Merck)
- napthyl acid phosphate (Merck)
- Fast blue BB salt (Merck)
- nepthyl acetate (Merck)
- $MgCl_2 6H_2O$ (Merck)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

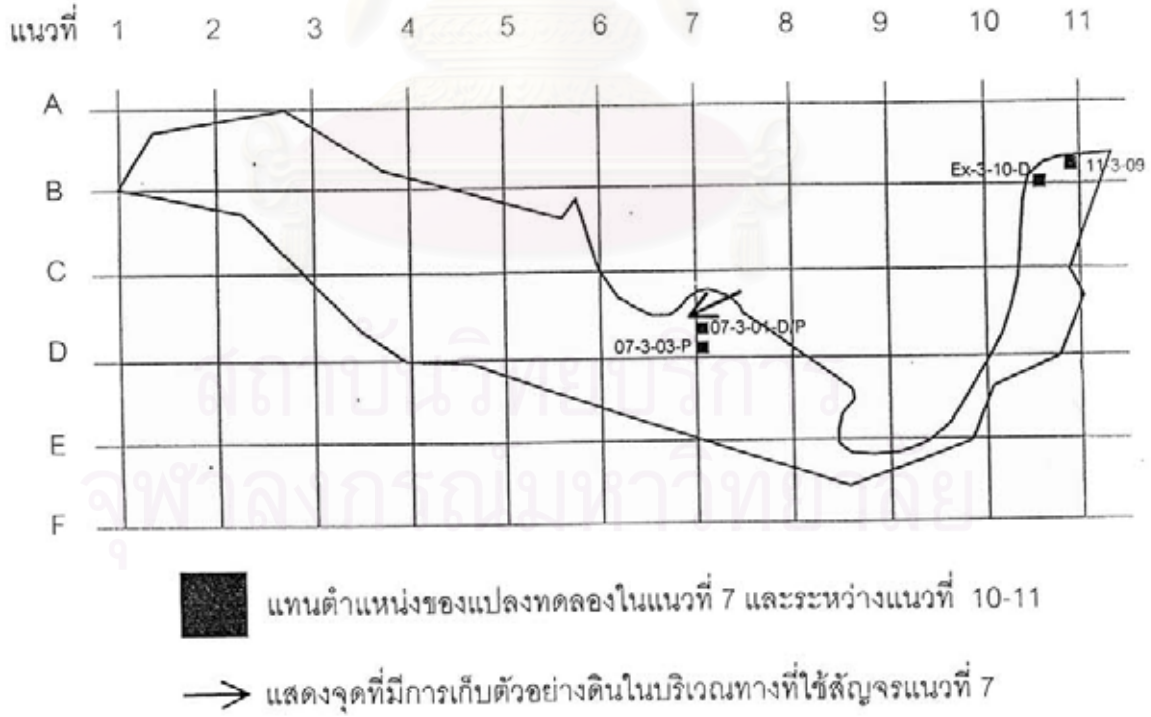
วิธีการดำเนินการศึกษา

1. ลักษณะทั่วไปของพื้นที่

พื้นที่ที่ศึกษาคือพื้นที่ของโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ลักษณะพื้นที่เป็นป่าดิบแล้งลุ่มต่ำในระดับไม่เกิน 400 เมตร จากระดับน้ำทะเล บางส่วนของพื้นที่มีสภาพเสื่อมโทรมซึ่งกลายสภาพเป็นทุ่งหญ้าส่วนใหญ่

ลักษณะพื้นที่โครงการ

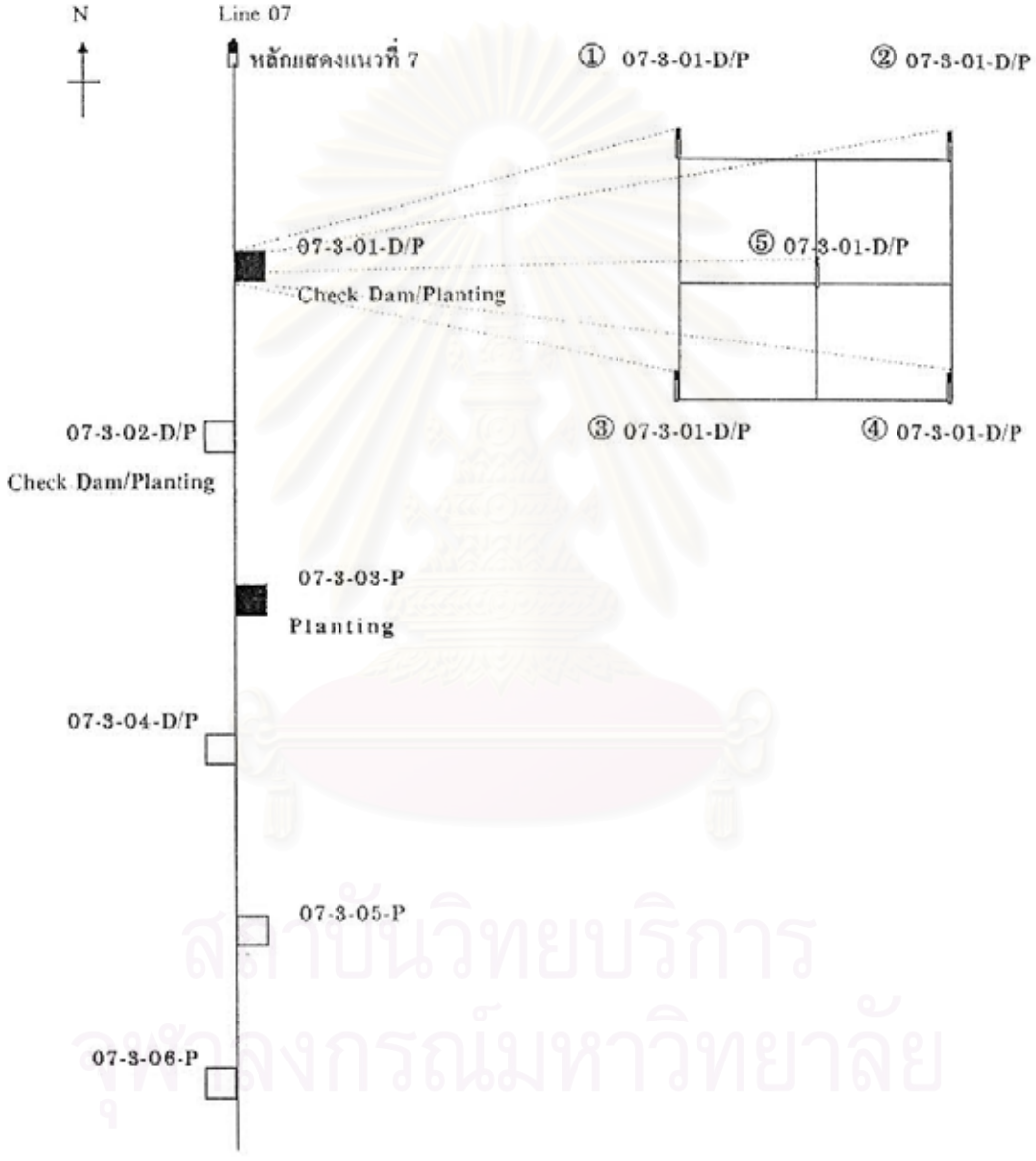
พื้นที่โครงการเป็นพื้นที่อยู่ในส่วนอุทยานแห่งชาติทับลาน ในส่วนอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ลักษณะพื้นที่ลักษณะคล้ายปลาวาฬ (ภาพที่ 4)แบ่งแนวพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง 11 แนว (L1 - L11) การเก็บตัวอย่างจะเก็บตั้งแต่ แนวที่ 7 (L7) แนวที่ 10 (L10) และแนวที่ 11 (L11) เนื่องจากพื้นที่เป็นทุ่งหญ้า



ภาพที่ 4 พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

2. การกำหนดแปลงทดลอง

แต่ละแนว (ภาพที่ 5 แสดงแนวที่ 7) จะแบ่งเป็นแปลงย่อย 6 แปลงแต่ละแปลงจะมีขนาด 20 x 20 เมตร

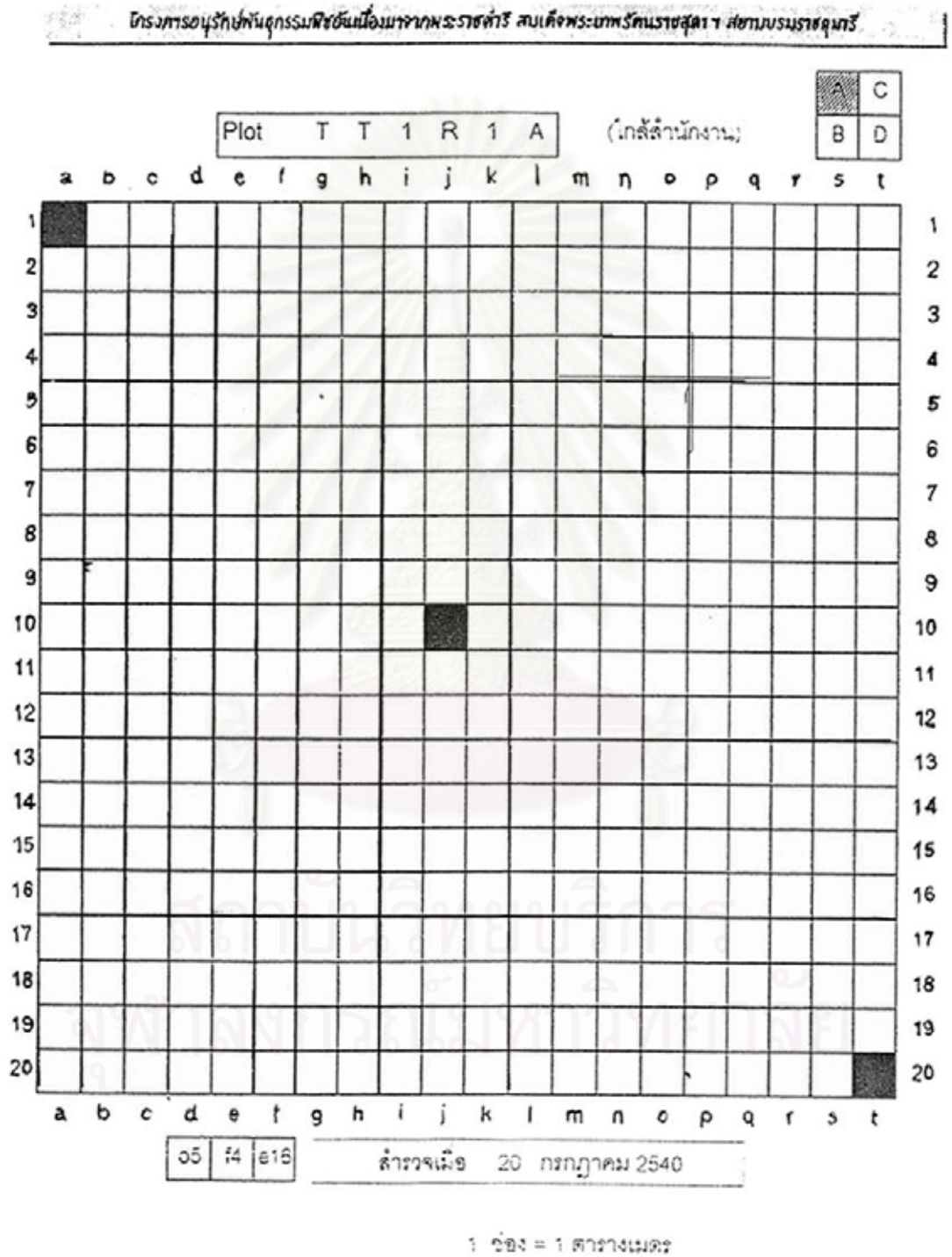


ภาพที่ 5 แผนผังการจัดแปลงแต่ละแนว (Line 7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวางแปลงทดลองสำหรับการเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดินจะเก็บในแต่ละแปลงโดยจะแบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 1 x 1 ตารางเมตร (ภาพที่ 6)สุ่มการเก็บตัวอย่างจากแปลงย่อย 3 แปลงในแนวทแยงมุม โดยเก็บดินที่ความลึก 1-20 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินทุก 3 เดือน ตั้งแต่ ธันวาคม 2540 ถึง กันยายน 2541



ภาพที่ 6 การเก็บตัวอย่างดินจะเก็บในแนวทแยงมุมแต่ละแปลงทดลอง

4. **แสดงลักษณะของแปลงเก็บตัวอย่างดิน**

ภาพที่ 7 แปลงศึกษาแนว 7 (GLDP)

เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีรหัสเป็น 07-3-01-D/P ตามการกำหนดแปลงศึกษาของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง เนื้อดินละเอียด มีซากหญ้าทับถมเป็นจำนวนมากลักษณะดินมีความชุ่มชื้น แปลงนี้ได้ปลูกกล้าไม้ที่เพาะขึ้นตามโครงการฯโดยการปลูกถั่วมะแฮะเป็นพี่เลี้ยง มีการขุดคันดินกั้นน้ำ

หมายเหตุ: ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืชร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (Grassland-checkdam-planting) สัญลักษณ์ (GLDP)
รหัสประจำแปลง 07-3-01 D/P อพ.สธ.ครบุรี (07 = แนวแปลงที่ 7, 3 = หญ้าคา, 01 = แปลงทดลองที่ 1, D/P = Checkdam-planting, อพ = อนุรักษ์พันธุกรรมพืช, สธ = สิรินทร, ครบุรี = อำเภอครบุรี)

ภาพที่ 8 แปลงศึกษาแนว 7 (GLP)

เป็นทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) มีรหัสเป็น 07-3-03-P ตามการกำหนดแปลงศึกษาของพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินสีแดง

หมายเหตุ: ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช (Grassland -planting) สัญลักษณ์ (GLP)
รหัสประจำแปลง 07-3-03P อพ.สธ.ครบุรี (07=แนวแปลงที่ 7, 3 = หญ้าคา, 01 = แปลงทดลองที่ 1, อพ = อนุรักษ์พันธุกรรมพืช , สธ = สิรินทร, ครบุรี = อำเภอครบุรี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 9 แปลงศึกษาแนว 7 (Control)

จุดศึกษาเป็นลักษณะทางใช้สัญจร (Control) เป็นเส้นทางที่ใช้เดินทางเข้าสู่แปลงในเส้นทางที่ 7 ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ลักษณะของพื้นที่เนื่องจากเป็นเส้นที่ใช้ในการสัญจร ดินจึงถูกอัดแน่นในหน้าแล้งมีลักษณะเป็นดินที่แห้งไม่ค่อยชุ่มชื้น เป็นดินละเอียด ในหน้าฝนดินจะอ่อนตัวลงสองข้างทางเป็นป่าหญ้า

หมายเหตุ: เส้นทางที่ใช้สัญจร (control) สัญลักษณ์ C เป็นจุด control สำหรับการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 10 แปลงศึกษาแนว 10 (GLD)

เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) ภายในแปลงเป็นป่าหญ้า ดินสีแดง มีเศษซากหญ้าทับถมอยู่บริเวณผิวดินเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้น น้ำที่อยู่ภายในคันดินกั้นน้ำ (check dam) สามารถเก็บกักน้ำไว้ได้

หมายเหตุ: ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (Grassland-checkdam) สัญลักษณ์ (GLD) รหัสประจำแปลง EX-3-01 อพ.สธ.ครบุรี (Ex = Extra (แปลงที่เพิ่มขึ้นเพื่อศึกษาเป็นกรณีพิเศษ), 3 = หญ้าคา, 01 = แปลงทดลองที่ 1, อพ = อนุรักษ์พันธุกรรมพืช , สธ = สิรินทร, ครบุรี = อำเภอครบุรี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 11 ระหว่างแปลงศึกษาแนว 10 -11 (GLC)

เป็นทุ่งหญ้า (GLC) ลักษณะของดินเป็นดินเนื้อละเอียด ดินมีสีแดง เก็บความชื้นได้ดี เป็นแปลงที่ไม่มีการปรับปรุงหรือฟื้นฟูลักษณะของแปลงจะเป็นทุ่งหญ้าที่ปล่อยให้มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติ

หมายเหตุ: ทุ่งหญ้า (Grassland-control) สัญลักษณ์ (GLC)
รหัสประจำแปลง 07-3-01 อพ.สธ.ครบุรี (07 = แนวแปลงที่ 7, 3 = หญ้าคา, 01 = แปลงทดลองที่ 1, อพ = อนุรักษ์พันธุกรรมพืช, สธ = สิรินทร, ครบุรี = อำเภอครบุรี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการทดลอง

5.1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่ศึกษา 5 แห่ง แห่งละ 3 จุด คือ บริเวณมุมแต่ละพื้นที่ 2 จุดตรงกันข้ามกัน และกึ่งกลางพื้นที่อีก 1 จุด พื้นที่ที่ศึกษา ได้แก่

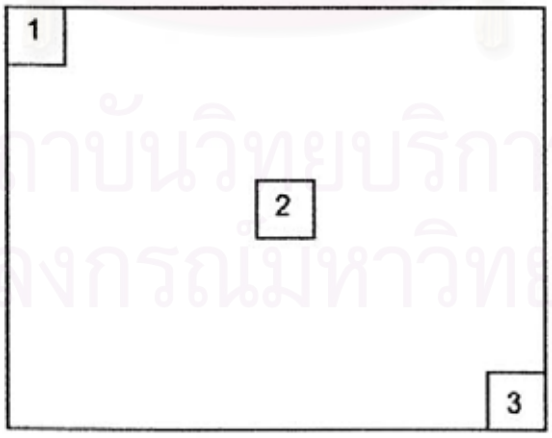
5.1.1. พื้นที่ทางที่ใช้สัญจรกำหนดเป็นพื้นที่ control

5.1.2. ป่าทุ่งหญ้าที่อยู่ในธรรมชาติซึ่งเกิดความเสื่อมโทรมของป่า เป็นพื้นที่ที่ปล่อยให้มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติ ซึ่งจากการทดลองได้กำหนดไว้เป็นพื้นที่ทุ่งหญ้า control

5.1.3. ทุ่งหญ้าที่มีการฟื้นฟูสภาพของทุ่งหญ้าโดยการปลูกพืช กำหนดเป็นพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช

5.1.4. ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำซึ่งสามารถเก็บกักน้ำ กำหนดเป็นพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ

5.1.5. ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืชและขุดคันดินกั้นน้ำ เพื่อการใช้ประโยชน์จากแอ่งน้ำที่ขุด ส่วนการปลูกพืชร่วมด้วยนั้นเป็นการฟื้นฟูสภาพทุ่งหญ้า กำหนดเป็นพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืชและขุดคันดินกั้นน้ำ



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่ศึกษา
ที่เป็นแปลงสี่เหลี่ยมจตุรัส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2. เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 4 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 วันที่ 5 ธันวาคม 2540
ครั้งที่ 2 วันที่ 9 มีนาคม 2541
ครั้งที่ 3 วันที่ 6 มิถุนายน 2541
ครั้งที่ 4 วันที่ 9 กันยายน 2541

5.3. วิธีการเก็บตัวอย่างดิน และขอบข่ายการวิเคราะห์ดิน

การเก็บตัวอย่างดินจะเก็บส่วนผิวหน้าดินและลึกลงไปประมาณ 20 เซนติเมตร ปริมาณที่เก็บประมาณ 1 กิโลกรัมนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ คือ ความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ และวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพ คือ ปริมาณจุลินทรีย์

ดินที่เก็บมาแต่ละครั้งจะทำการวิเคราะห์ทั้งลักษณะทางกายภาพและชีวภาพดังนี้

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- ความเป็น กรด-ด่าง ของดิน
- เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน
- เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน

การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในดิน
- ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดิน
- ปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส
- แบคที่เรียกลุ่มที่ตรึงในโตรเจน
- แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4. วิธีการวิเคราะห์กายภาพของดินในพื้นที่

5.4.1. การวิเคราะห์ความเป็น กรด-ด่าง ของดิน (ดัดแปลงจาก Jackson, 1956)ชั่งดิน 20 กรัมเติมน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน วัดส่วนที่เป็น suspension และ supernatant ด้วยเครื่องตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

5.4.2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน (Jackson, 1956) อบถ้วยอลูมิเนียมที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียล 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ หลังจากนั้นใส่ดิน 10 กรัม ชั่งน้ำหนักรวมของดินและถ้วยอลูมิเนียม อบดินในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแจะเก็บไว้ใน desicator อบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล 24 ชั่วโมง นำมาชั่งอีกครั้งจนน้ำหนักคงที่ เก็บดินที่อบจนแห้งไว้ใน desicator นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

กำหนดให้ A = น้ำหนักภาชนะ

B = น้ำหนักภาชนะรวมน้ำหนักดินเปียก

C = น้ำหนักภาชนะรวมกับน้ำหนักดินอบแห้ง

$$\% \text{ moisture content} = \frac{B - C}{C - A} \times 100$$

5.4.3. การศึกษาหาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Jackson, 1956) นำ Porcelain crucibles ไปเผาที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือเผาบนไฟจนร้อนแดงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใส่ใน desicator รอให้เย็นก่อนนำไปชั่งน้ำหนักเป็นน้ำหนักของ porcelain crucibles ที่เผาแล้ว นำดินใน desicator จากข้อ 3.4.2. ใส่ใน porcelain crucibles ชั่งน้ำหนักเป็นน้ำหนักของ porcelain crucibles + ดินอบแห้ง นำไปเผาที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือเผาไฟจนดิน และ porcelain crucibles ร้อนแดงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วใส่ใน desicator จนเย็นแล้วให้ชั่งน้ำหนักเป็น น้ำหนักของดิน + porcelain crucibles หลังเผา นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ organic matter ดังนี้

A = น้ำหนัก porcelain crucibles หลังเผา

B = น้ำหนัก porcelain crucibles + ดินอบแห้ง

C = น้ำหนัก porcelain crucibles +ดินอบแห้งหลังเผา

$$\% \text{ organic matter} = \frac{B - C}{B - A} \times 100$$

5.5. วิธีการวิเคราะห์ทางชีวภาพของดิน

5.5.1. การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรีย (btal plates count) โดยใช้วิธีการ pour plates

1. เตรียมอาหารสูตร nutrient agar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียมความเจือจางของดินที่ระดับความเจือจาง 1: 100,000 1: 1,000,000 และ 1: 10,000,000 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่างๆ ใส่ในจานเพาะเชื้อ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร

3. เท nutrient agar ที่หลอมไว้จนเหลวในช่วงอุณหภูมิของอาหารประมาณ 45 - 50 องศาเซลเซียล ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายดินอยู่เขย่าจานเพาะเชื้อ เป็นวงกลมทางซ้าย 3 ครั้ง ขวา 3 ครั้ง และวนให้เป็นเลขแปดอีก 3 ครั้งเพื่อให้สารละลายดินกระจายสม่ำเสมอระวังอย่าให้อาหารเปื้อนฝาจานเพาะเชื้อ เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อที่มาจากแหล่งอื่น

4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทุกวันบันทึกและแปลผลการทดลอง

5.5.2. การวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีส

<u>มีวิธีการดังนี้</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Caseinate agarนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียมความเจือจางของดินที่ระดับ 1: 100 ,1: 1,000 และ 1: 10,000 ใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตรที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่างๆใส่ในจานเพาะเชื้อ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร

3. เท Caseinate agar ที่หลอมไว้จนเหลวในช่วงอุณหภูมิของอาหาร ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียล ลงใน จานเพาะเชื้อ ที่มีสารละลายดินอยู่ วนจานเพาะเชื้อเป็นวงกลมทางซ้าย 3 ครั้ง ขวา 3 ครั้ง และวนเป็นเลขแปดอีก 3 ครั้งเพื่อให้สารละลายดินกระจายสม่ำเสมอระวังอย่าให้อาหารเปื้อนฝาจานเพาะเชื้อ เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น

4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 7 วัน

5. นับโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.5.3. การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน (nonsymbiotic nitrogenfixation bacteria)

ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Aerobic Nitrogen Fixers คือกลุ่ม *Azotobacter spp.* , *Bijerinkia spp.* และ *Derxia spp.* ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม Acid medium สำหรับคัดเลือกเชื้อ *Bijerinkia spp.* และ *Derxia spp* และ Alkaline medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter spp* นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซล-เซียล ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง และตรวจสอบการปนเปื้อน

2. ชั่งดิน 0.25 กรัม โปรยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซล เซียล 1-2 สัปดาห์ ควรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างดี (ใช้น้ำกลั่นในการเตรียม) อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้น สังเกตการขึ้นของเชื้อโดยดูโคโลนีเป็นเมือกเหนียวเมื่อฉายด้วยแสงอุตราไวโอเลตจะเรืองแสงสีเขียว

3. บันทึกผลการทดลอง

5.5.4. การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส (decomposition of cellulolytic bacteria) มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสูตรดัดแปลงสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยเฉพาะ ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 160 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่กระดาษกรองขนาด 1 x 12 เซนติเมตร ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซล เซียล ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
2. เตรียมดินที่ระดับความเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000 1:10,000 และ1:1,000,000 ใส่สาร ละลายดินแต่ละระดับความเจือจางลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง cellulolytic bacteria หลอดละ 1 มิลลิลิตร แต่ละระดับความเจือจางให้ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ หรืออย่างน้อย 5 ซ้ำต่อหนึ่งตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล สังเกตจากความสามารถในการย่อย สลายกระดาษเซลลูโลส
3. วิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจากตาราง MPN (Most Probable Numbers Table) สำหรับ แบคทีเรียในดิน(ตารางวิเคราะห์ MPN ภาคผนวกข)

5.6. การคัดแยกและการเก็บเชื้อจุลินทรีย์

5.6.1. คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา นำมาลากลงบนผิวอาหาร nutrient agar ในจานเพาะเชื้อ จนได้เชื้อที่มีโคโลนีเดี่ยว และนำมาเก็บลงในอาหาร nutrient agar ที่เจือจางระดับความเข้มข้นลดลง 1 เท่า ในหลอด โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ต้องการ แทงลงในอาหาร บ่มไว้ 1 - 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30° C แล้วนำเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° C

5.6.2. เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสลงบนอาหาร Mannitolmungbean agar ประมาณ 2 สัปดาห์จนได้ปริมาณมากพอ เขี่ยสปอร์ที่ได้ลงในสารละลายกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 20% 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม ประมาณ 5 นาที กรองผ่านลำลีปลอดเชื้อ จะได้สปอร์แขวนลอย นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล

5.7. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง มีขั้นตอนดังนี้

5.7.1. เตรียมอาหาร MY agar (Lodder, 1970) ซึ่งเป็นอาหารทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้อาหารแห้งและเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อน

5.7.2. เตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ (test microorganism)

M. luteus ATCC 9341 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญคือ betalactams / sulphonamide

B. cereus . ATCC 11778 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญคือ tetracyclines

E. coli ATCC 12937

B. subtilis ATCC 6633 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญคือ aminoglycoside / sulphonamide

5.7.3. ลากแอคติโนมัยซีสตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar เป็นแนวตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงลากเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อทดสอบจากข้อ 5.7.2. ลากในแนวตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยซีส บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) ที่ใช้ทดสอบโดยคัด

เลือกเชื้อ 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติ และตรวจสอบจำแนกเบื้องต้น

5.8. การจัดหมวดหมู่เชื้อแอคติโนมัยซีส

5.8.1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้ด้วยวิธี cover slip culture การศึกษามีขั้นตอนดังนี้ เทอาหาร MY agar ลงในจานเพาะเชื้อเมื่ออาหารเริ่มแข็งตัว (ยังไม่แข็งตัวมาก) นำ cover slip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปักลงบนอาหาร MY agar เป็นมุม 45 องศาเซลเซียล เมื่ออาหารแข็ง เขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ลากลงบนอาหารใกล้กับ cover slip บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 - 14 วันตามลักษณะความสามารถในการเจริญของชื้อ นำ cover slip มาทำ wet mount ด้วย lectophenol แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) แล้วนำไปจัดหมวดหมู่ของเชื้อ

5.8.2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนในผนังเซลล์เพื่อการคัดแยกในระดับจีนัส วิธีการดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์ใน Yeast extract-dextrose medium 100 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียล 3-4 วัน นำไปเซนตริฟิวจ์และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น
2. แช่เซลล์ที่ได้ในเอธานอล 1 คืน
3. เซนตริฟิวจ์เซลล์ที่ได้ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียล 1 คืน
4. นำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมมาเติม 6 นอร์มอล HCl 1 มิลลิลิตร ใน screw capped tube แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียล เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดกรองเซลล์ออกจากกรดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
5. นำมาทำให้แห้งด้วยการใช้เครื่อง rotary evaporration อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล ใน flask ขนาด 10 มิลลิเมตร
6. ละลายเซลล์ที่แห้งแล้วด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้แห้งด้วยการใช้เครื่อง rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล อีกครั้ง
7. ละลายเซลล์ที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร
8. นำสารละลายที่ได้ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน TLC aluminium sheets cellulose F No 5574 รอให้แห้ง

9. นำ cellulose TLC plate แช่สารตัวทำละลาย (solvent) (methanol : water :
10. นอร์มอล HCl : pyridine ในอัตราส่วน 80:26:4:10) โดยให้ปลายด้านล่างของแผ่น (cellulose TLC plate) จุ่มสารตัวทำละลาย ขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร
11. เมื่อ solvent เคลื่อนที่มาถึงจุดที่ต้องการแล้ว สเปรย์ทับด้วย 0.2% ninhydrin solution ใน butanol แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 5 นาที
12. วิเคราะห์ผลการทดลอง ตรวจดูแถบสีเขียวปนน้ำตาล

5.8.3. การวิเคราะห์ไอโซไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกมาได้ 10 สายพันธุ์

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีส

นำ spore suspension 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เขย่าเป็นเวลา 2 - 4 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ขั้นตอนการเตรียม crude extracts

กรอง mycelia ที่เลี้ยงไว้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้าง mycelia ด้วย Tris HCl pH 8.2 นำ mycelia ที่กรองได้ละลายในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ Tris HCl 0.1 โมล pH 8.2 100 มิลลิเมตร + mercapto ethanol 0.5 มิลลิเมตร + sucrose 10 กรัม

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายเอนไซม์

ละลายเซลล์ที่ได้ 0.2 กรัม 0.5 มิลลิตร ใน Tris HCl 0.1 โมล pH 8.2 100 มิลลิลิตร + Mercapto ethanol 0.5 มิลลิลิตร + sucrose 10 กรัม ให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicater) นำไปแยกเศษเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที นำส่วน supernatant ใส่ไว้ใน microtube แล้วเติม Marker dye solution (bromophenol blue 0.05 กรัม : solution C 10 มิลลิเมตร : Glycerol 1 มิลลิเมตร) ประมาณ 1-2 หยด เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียล เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ขั้นตอนการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

เตรียมอุปกรณ์ อิเลคโตรโฟรีซีสรุ่น Mini-protein II ของบริษัท Bio-rad

การเตรียมสารละลาย B : Tris chloride buffer pH 8.9

HCl 1 นอร์มอล 48 มิลลิเมตร : Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ละลายในกรด HCl และปรับ pH ให้ได้ 8.9) 36.6 กรัม : TEMED 0.23 มิลลิเมตร : เติมน้ำจนครบ 100 มิลลิเมตร กรองสารละลายที่เตรียมได้แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด

การเตรียมสารละลาย C ; Tris chloride buffer pH 6.7

HCl 1 นอร์มอล 48 มิลลิเมตร : Tris (hydroxymethyl) aminomethane 5.98 กรัม : TEMED 0.46 มิลลิเมตร :เติมน้ำจนครบ 100 มิลลิเมตร ปรับ pH ด้วย HCl และ NaOH กรองสารละลายที่เตรียมได้แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด

การเตรียมสารละลาย D : Acrylamide stock

Acrylamide 28 กรัม : N,N'- methyne bisacrylamide 0.74 กรัม : เติมน้ำจนครบ 100 มิลลิเมตร : กรองสารละลายที่เตรียมได้แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด

การเตรียมสารละลาย E : $(NH_4)_2SO_4$ solution (เตรียมแล้วใช้ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม : เติมน้ำจนได้ 1 มิลลิเมตร

การเตรียมสารสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้นของเจล 8.5 %

เตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิด ɒnning gel ใช้ความเข้มข้นของเจล 8.5 % โดยละลายในสารละลาย B 1.87 มิลลิเมตร สารละลาย D 4.55 มิลลิเมตร น้ำ 8.57 มิลลิเมตร สารละลาย E 125 ไมโครลิตร TEMED 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำโพลิอะคริลาไมด์เจลที่เตรียมนำมาหยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกจนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศและควรทำด้วยความรวดเร็ว หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้จนแข็งจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นอย่างชัดเจนเทน้ำกลั่นออกให้หมดและซับน้ำออกจนหมด เตรียม stocking gel โดยผสมสาระลาย D 1.25 มิลลิเมตร น้ำกลั่น 4.20 มิลลิเมตร

สารละลาย E 70 ไมโครลิตร สารละลาย C 0.72 มิลลิเมตร TEMED 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยอดลงในช่องว่างบน running gel ให้สูงขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเสียบหวี (comb) ก่อนที่เจลจะแข็งตัว เพื่อให้เกิดช่อง สำหรับหยอดตัวอย่าง ตั้งเจลทิ้งไว้ให้แข็งตัว

ขั้นตอนการทำ อิเล็กโตรฟอรีซิส

นำโพลีอะคริลาไมด์เจลที่เตรียมไว้ใส่ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จากนั้นรินสารละลาย Electrode buffer ชนิด Tris-glycine pH 8.3 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.0 กรัม Glycine 28.8 กรัม เติมน้ำจนครบ 1,000 มิลลิเมตร ปรับ pH โดยใช้ NaOH จนได้ pH ที่ต้องการ) ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ลงในอ่างบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่นโพลิอะคริลาไมด์เจล ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วหยอดสารสกัดเอนไซม์จำนวน 20 ไมโครลิตร ใส่ในช่องเจล โดยใส่ 1 ช่อง ต่อ 1 สายพันธุ์ จนครบทุกตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ต่อขั้วกระแสไฟฟ้าให้ครบวงจร แล้วเปิดเครื่องป้อนกระแสไฟฟ้ากระแสตรงโดยใช้ค่ากระแสไฟฟ้า และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ ทิ้งไว้ให้สารสกัดเอนไซม์เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของแผ่นเจลโดยห่างจากปลายล่างประมาณ 1 เซนติเมตร (ประมาณ 50-60 นาที)

ขั้นตอนการย้อมสี โพลิอะคริลาไมด์เจล

ย้ายเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรฟอเรซิสออกจากกระจก ตัด stocking gel ออก ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปใส่ในกล่องย้อมสีเอนไซม์ แต่ละชนิดเมื่อครบกำหนดเวลาให้เทสีย้อมเอนไซม์ออก แล้วล้างด้วยน้ำ นำไปแช่ใน acetic acid ความเข้มข้น 7 % เพื่อล้างสีส่วนเกินออกจนแผ่นเจลใส บันทึกไซโมแกรมที่ได้โดยการถ่ายรูปพร้อมทั้งวาดแผนภาพที่ปรากฏลงบนกระดาษ

ขั้นตอนการทำให้เจลแห้ง

ใช้กระดาษเซลโลเฟนแช่น้ำสะอาด นำกระจกสะอาดที่มีขนาดที่กว้างกว่าแผ่นเจลเล็กน้อย นำกระดาษเซลโลเฟนที่แช่น้ำไว้ปูลงบนกระจกให้เรียบนำเจลที่ย้อมสีและเห็นแถบไอโซไซม์แล้ววางลงบนกระดาษเซลโลเฟน ใช้กระดาษเซลโลเฟนแช่น้ำอีกแผ่นหนึ่งวางประกบบนแผ่นเจล ทุกขั้นตอนที่ทำต้องไม่ให้มีฟองอากาศ เมื่อจัดตำแหน่งเจลจนสวยงามพับกระดาษเซลโลเฟนที่เหลือขอบไปด้านหลังกระจกแล้วใช้คลิบปากเปิดตำหนีบทั้ง 4 ด้านตั้งทิ้งไว้จนแผ่นกระดาษและเจลแห้งสนิทซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น เมื่อแห้งสนิทตัดขอบและแต่งให้สวยงามเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ไซโมแกรม

นำไซโมแกรมที่ได้มาประเมินผลเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏโดยคำนวณหาค่า R_f (relative fraction) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะแถบไอโซไซม์ของแต่ละชนิด ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์}}{\text{ระยะทางทั้งหมดที่สารสกัดเคลื่อนที่}}$$

นำค่า R_f ที่ได้บันทึกลงในแถบไซโมแกรมไว้เพื่อนำมาจัดลำดับ เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีส แต่ละสายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

ผลการศึกษาปัจจัยทางกายภาพของดินในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (ตารางที่ 1) พบว่าพื้นที่ทางที่ใช้สัญจร (C) มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุโดยเฉลี่ยต่ำสุด (17.39%) และป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLPD) มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุโดยเฉลี่ยสูงสุด (21.57%) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในเดือนที่เก็บตัวอย่างพบว่าในเดือน ธันวาคม 2540 และเดือนกันยายน 2541 มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุสูงกว่าเดือนมีนาคม 2541 และเดือนมิถุนายน 2541 แสดงให้เห็นความแตกต่างได้โดยกราฟ (ภาพที่ 13,14)

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นความชื้น (ตารางที่ 2) บริเวณทางที่ใช้สัญจร (C) มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุด (9.62%) ส่วนในทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยเฉลี่ยสูงสุด (16.61%) เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ในแต่ละเดือนที่เก็บตัวอย่างพบว่าเดือน ธันวาคม 2540 มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำสุดเมื่อเทียบกับเดือนอื่นที่เก็บตัวอย่าง เปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างโดยการใช้กราฟ (ภาพที่ 15,16)

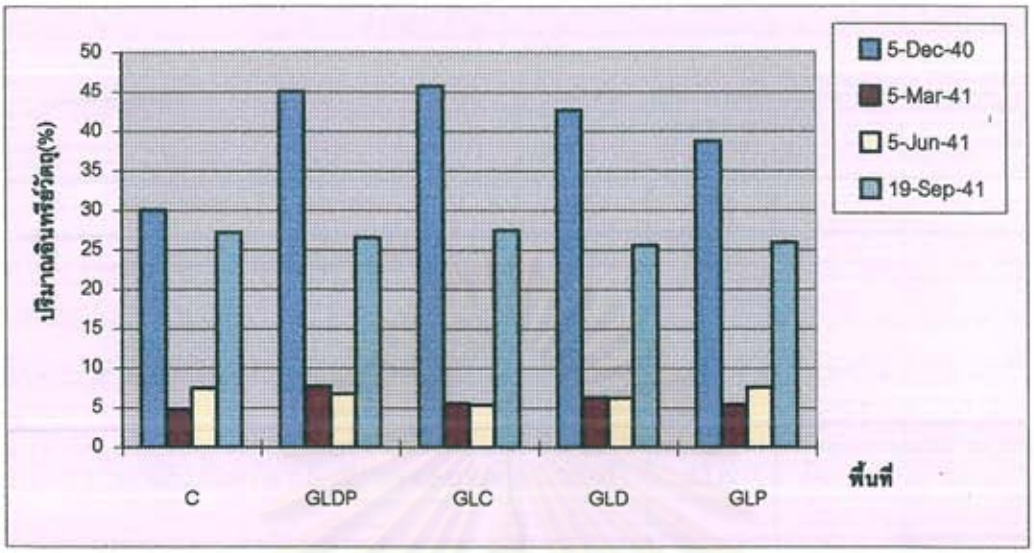
สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (ตารางที่ 3) พบค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.2 - 7.9 โดย เส้นทางที่ใช้สัญจร (C) มีค่าความเป็นกรด-ด่างโดยเฉลี่ยต่ำสุด (5.7) ส่วนพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) ค่าเฉลี่ยสูง (7.2) แต่ละเดือนที่เก็บตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างโดยการใช้กราฟ (ภาพที่ 17,18)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

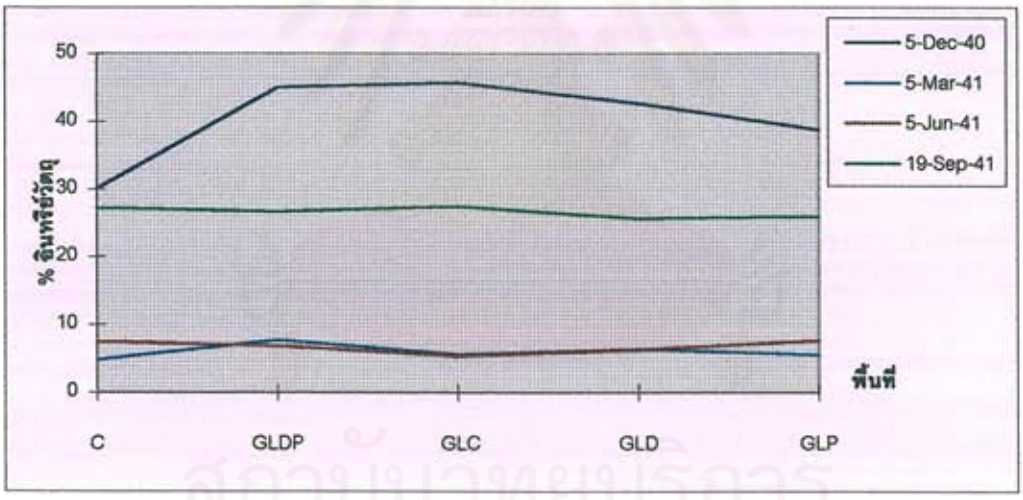
ตารางที่ 1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุในบริเวณป่าทุ่งหญ้า โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซนต์อินทรีย์วัตถุในช่วงเวลาต่างกัน				
	5-Dec-40	5-Mar-41	5-Jun-41	19-Sep-41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อพ.สธ.ครบุรี line 7 (C)	30.06	4.79	7.5	27.24	17.39
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อพ.สธ.ครบุรี (GLDP)	45.06	7.76	6.83	26.63	21.57
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อพ.สธ.ครบุรี Line 10-11 (GLC)	45.75	5.61	5.39	27.47	21.05
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อพ.สธ.ครบุรี (GLD)	42.69	6.38	6.27	25.64	20.25
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อพ.สธ.ครบุรี (GLP)	38.76	5.49	7.64	25.94	19.46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุจากดินตัวอย่างในพื้นที่โครงการ



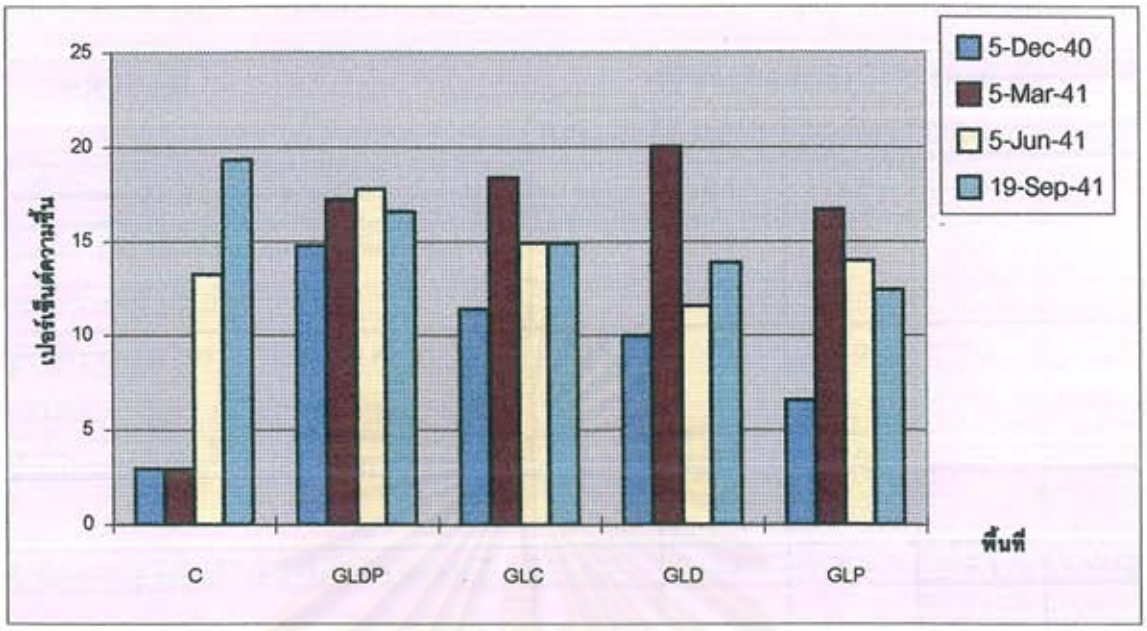
ภาพที่ 14 กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุจากดินตัวอย่างในพื้นที่โครงการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

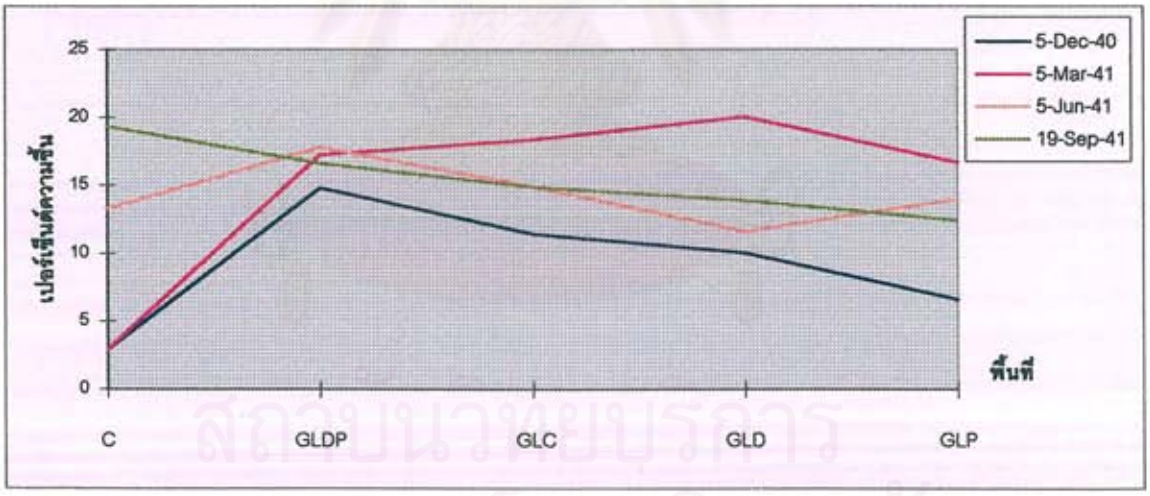
ตารางที่ 2 ปริมาณความชื้นในบริเวณป่าทุ่งหญ้าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซนต์ความชื้นในช่วงเวลาต่างกัน				
	5-Dec-40	5-Mar-41	5-Jun-41	19-Sep-41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อพ.สธ.ครบุรี line 7 (C)	2.94	2.94	13.27	19.34	9.62
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อพ.สธ.ครบุรี (GLDP)	14.80	17.24	17.79	16.61	16.61
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อพ.สธ.ครบุรี Line 10-11 (GLC)	11.42	18.40	14.92	14.91	14.91
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อพ.สธ.ครบุรี (GLD)	10.01	20.03	11.60	13.88	13.88
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อพ.สธ.ครบุรี (GLP)	6.60	16.71	14.01	12.44	12.44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณความชื้นจากดินตัวอย่างในพื้นที่โครงการ

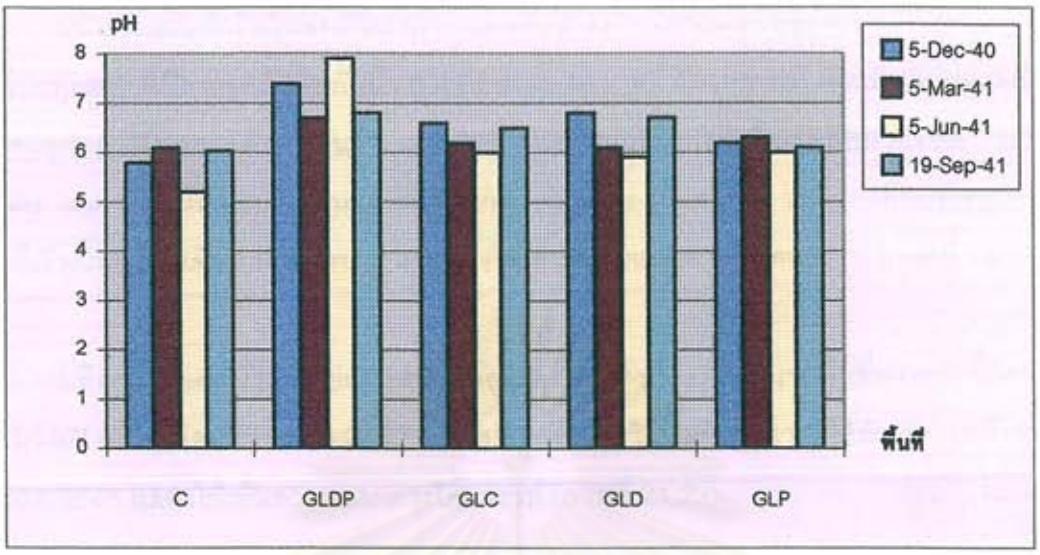


ภาพที่ 16 กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณความชื้นจากดินตัวอย่างในพื้นที่โครงการ

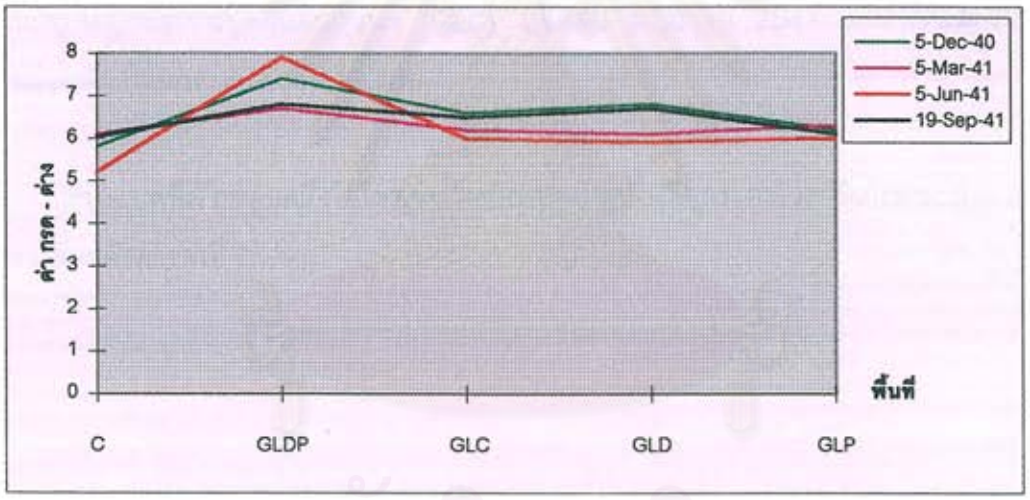
ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงเวลาต่างกัน				
	5-Dec-40	5-Mar-41	5-Jun-41	19-Sep-41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อพ.สธ.ครบุรี line 7 (C)	5.8	6.1	5.2	6.03	5.78
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P)อพ.สธ.ครบุรี (GLDP)	7.4	6.7	7.9	6.8	7.2
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อพ.สธ.ครบุรี Line 10-11 (GLC)	6.6	6.2	6.0	6.5	6.33
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อพ.สธ.ครบุรี GLD	6.8	6.1	5.9	6.7	6.38
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อพ.สธ.ครบุรี (GLP)	6.2	6.3	6.0	6.1	6.15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 17 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างดินในพื้นที่โครงการ



ภาพที่ 18 กราฟเส้นเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างดินในพื้นที่โครงการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรีย

ปริมาณแบคทีเรียในพื้นที่โครงการ (ตารางที่ 4) ปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียน้อยที่สุดคือพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) พบ 5.42 x 10^8 CFU/g soil ส่วนพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีปริมาณแบคทีเรียโดยเฉลี่ยมากที่สุด 3.9x10^8 CFU/g soil เดือนที่พบปริมาณแบคทีเรียมาก คือเดือน กันยายน 2541 เดือนที่พบปริมาณแบคทีเรียน้อย คือ เดือน มิถุนายน 2541แสดงให้เห็นความแตกต่างได้โดยกราฟ (ภาพที่ 19,20)

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส (ตารางที่ 5) พบมากพื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดกล้าไม้ (GLP) ในเดือน ธันวาคม 2540 และมีปริมาณน้อยในพื้นที่เส้นทางที่ใช้สัญจร (C) ในเดือนมีนาคม 2541 แสดงให้เห็นความแตกต่างโดยกราฟ (ภาพที่ 21,22)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสที่ตรวจสอบในพื้นที่จะอยู่ระหว่าง 10^3-10^6 CFU/g soil (ตารางที่ 6) พบมากในพื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) ในเดือน ธันวาคม 2540 พบน้อยในพื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) ในเดือน มิถุนายน 2541 สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างโดยกราฟ (ภาพที่ 23,24)

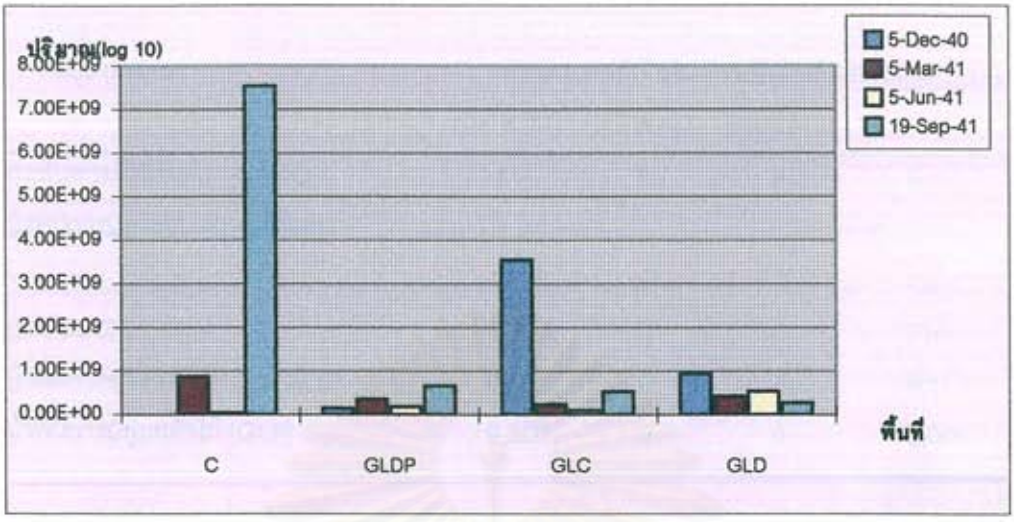
ส่วนแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนโดยอิสระพบทุกพื้นที่ทุกระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

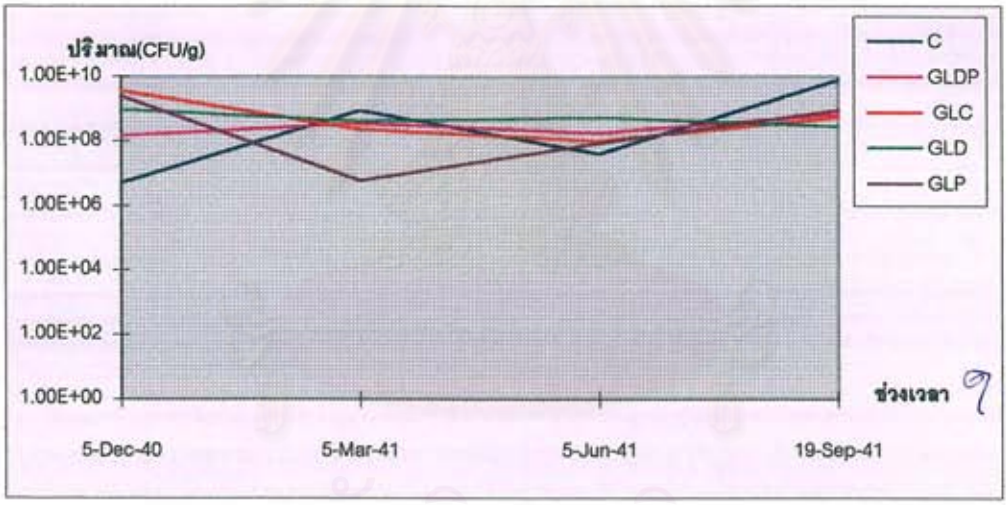
ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	จำนวนแบคทีเรียในเดือนที่เก็บตัวอย่าง (CFU/g soil)				
	5/ธ. ค./40	5/มี. ค./41	5/มิ.ย./41	19/ก.ย./41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร (Control)	5.00×10^{6}	8.63×10^{8}	4.00×10^{7}	7.53×10^{9}	2.11×10^{9}
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช และ ขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP)	1.44×10^{8}	3.53×10^{8}	1.80×10^{8}	6.62×10^{8}	3.90×10^{9}
ทุ่งหญ้า (GLC)	3.55×10^{9}	2.30×10^{8}	1.00×10^{8}	5.26×10^{8}	1.1×10^{9}
ทุ่งหญ้าที่มีการขุ ดคันดินกั้นน้ำ (GLD)	9.37×10^{8}	4.14×10^{8}	5.40×10^{8}	2.75×10^{9}	5.42×10^{8}
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP)	2.45×10^{9}	6.00×10^{6}	8.50×10^{7}	8.61×10^{8}	8.51×10^{8}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียในพื้นที่(โดยใช้ค่า Log 10)



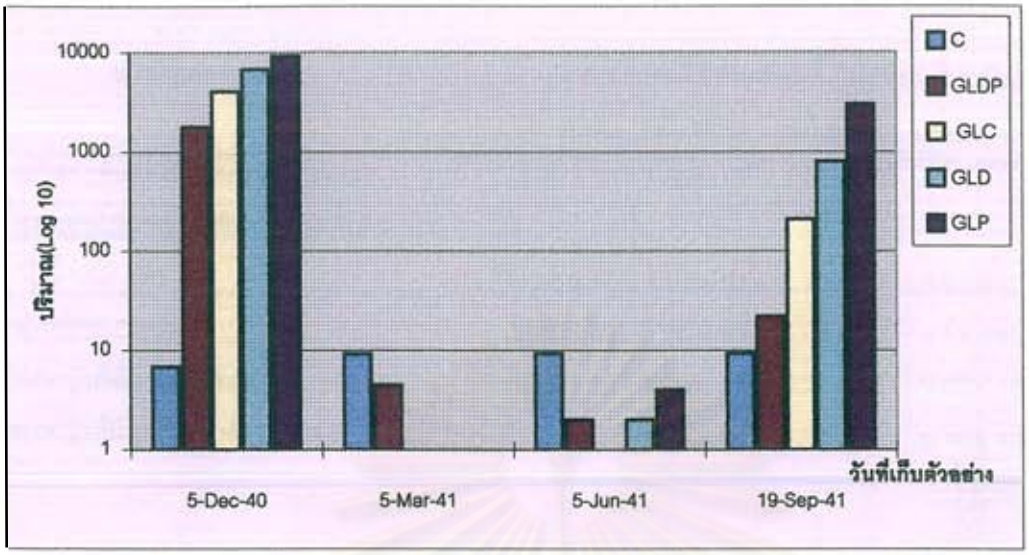
ภาพที่ 20 กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียในพื้นที่ (โดยใช้ค่า Log 10)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

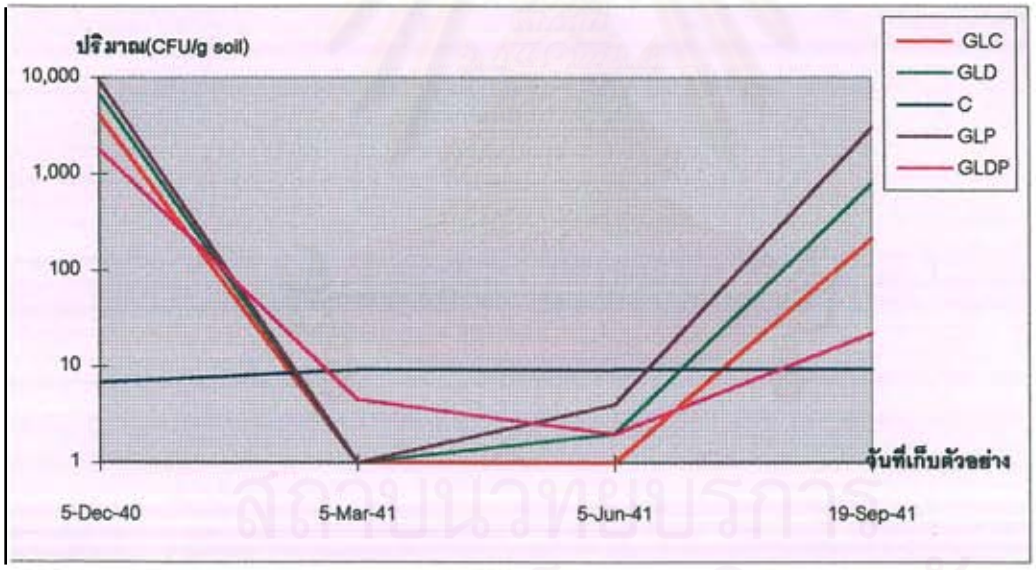
ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	จำนวนแบคทีเรียในเดือนที่เก็บตัวอย่าง (CFU/g soil)				
	5/ธ. ค./40	5/มี. ค./41	5/มิ.ย./41	19/ก.ย./41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร (Control)	7	9	9	9	9
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช และ ขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP)	1,800	5	2	22	507
ทุ่งหญ้า (GLC)	4,100	0	0	210	1,077
ทุ่งหญ้าที่มีการขุ ดคันดินกั้นน้ำ (GLD)	6,800	0	2	800	1,900
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP)	9,300	0	4	3,000	3,076

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 21 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่

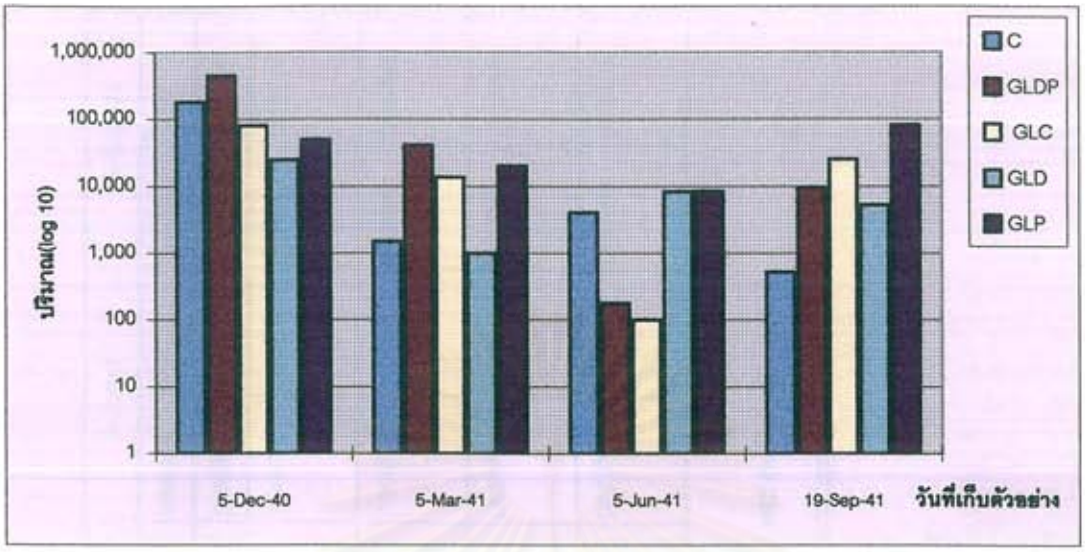


ภาพที่ 22 กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในพื้นที่

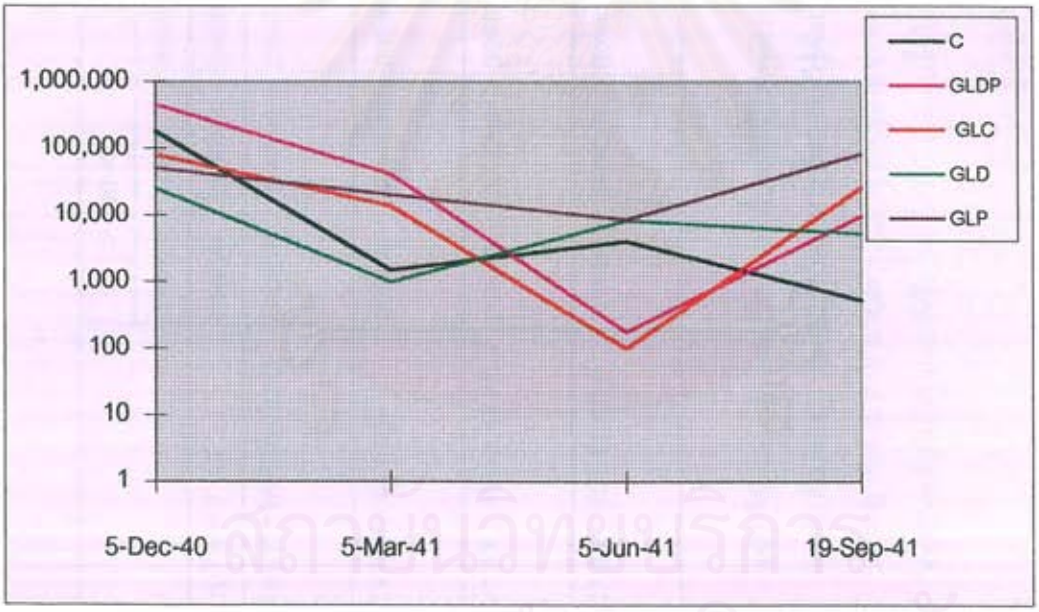
ตารางที่ 6 ปริมาณแอคติโนมัยซีสในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ. นครราชสีมา

แปลงทดลอง	จำนวนแบคทีเรียในเดือนที่เก็บตัวอย่าง (CFU/g soil)				
	5/ธ. ค./40	5/มี. ค./41	5/มิ.ย./41	19/ก.ย./41	เฉลี่ย
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร (Control)	1.80×10^5	1.50×10^3	1.01×10^3	5.25×10^2	4.65×10^4
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกพืช และ ขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP)	4.50×10^5	4.10×10^4	1.79×10^2	9.65×10^3	1.25×10^5
ทุ่งหญ้า (GLC)	8.00×10^4	1.35×10^4	1.01×10^2	2.53 x 104	2.97×10^4
ทุ่งหญ้าที่มีการขุ ดคันดินกั้นน้ำ (GLD)	2.50×10^4	1.00×10^3	8.25×10^1	5.25×10^3	9.88×10^3
ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP)	5.00×10^4	2.00×10^5	8.50×10^3	8.18×10^4	1.52×10^5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 23 กราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณแอคติโนมัยซีสจากดินในพื้นที่



ภาพที่ 24 กราฟเส้นเปรียบเทียบปริมาณแอคติโนมัยซีสจากดินในพื้นที่

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนโครงการอนุรักษ์ป่าพันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา

พื้นที่	5-Dec-40		5-Mar-41		5-Jun-41		19-Sep-41	
	alkaline	acid	alkaline	acid	alkaline	acid	alkaline	acid
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อพ.สธ.ครบุรี line 7 (C)	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกต้นไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P)อพ.สธ.ครบุรี (GLDP)	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อพ.สธ.ครบุรี Line 10-11 (GLC)	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ(EX-3-10)อพ.สธ.ครบุรี GLD	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้(07-3-03P)อพ.สธ.ครบุรี (GLP)	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive

หมายเหตุ : acid คือ acid medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเชื้อ *Derzia spp* . และ *Beijeringia spp* .

Alkalin คือ Alkalin medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกเชื้อ *Azotobactor spp*.

positive คือมีแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนขึ้นในจานเพาะเชื้อ

negative คือไม่มีเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนขึ้นในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ รหัส	*B. subtilis*	*B. cereus*	*M. luteus*	*E. coli*
AC1	-	-	-	-
AC2	+++++	+++++	+++++	+++++
AC3	-	-	-	-
AC4	-	-	-	-
AC5	-	-	-	-
AC6	-	-	-	-
AC7	+++	+++	+	-
AC8	-	-	-	-
AC9	++	+++	++++	-
AC10	-	-	-	-
AC11	-	-	-	-
AC12	-	-	-	-
AC13	+++	-	+	-
AC14	-	-	-	-
AC15	-	-	-	-
AC16	+	+	+	+
AC17	+	+	+	+
AC18	-	-	-	-
AC19	+	+++++	+	+
AC20	+++	+++++	+	-
AC21	-	-	-	-
AC22	-	-	-	-
AC23	++++	++++	++++	+
AC24	-	-	-	-
AC25	++	-	-	-
AC26	-	-	-	-
AC27	-	-	-	-
AC28	-	-	-	-
AC29	-	-	-	-
AC30	-	-	-	-
AC31	+	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 8 ต่อ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	*B.subtilis*	*B.cereus*	*M.luteus*	*E.coli*
AC32	-	-	-	-
AC33	++	++++	++	-
AC34	+++	+++	++	-
AC35	++	++++	-	-
AC36	+	-	-	-
AC37	+	-	-	-
AC38	++	+	+	-
AC39	+++++	+	++	-
AC40	-	+++++	-	-
AC41	-	-	-	-
AC42	+	+++++	++	-
AC43	-	-	-	-
AC44	+	++++	+++	-
AC45	-	-	-	-
AC46	+++++	+++++	+++++	+++++
AC47	+	+	+	-
AC48	-	-	-	-
AC49	+++++	++++	+++	++
AC50	+++++	+++++	+++++	++++
AC51	+	+	++	-
AC52	++++	+++++	+++++	++
AC53	+++++	+++++	+++	-
AC54	-	-	-	-
AC55	-	-	-	-
AC56	+	+++++	++	-
AC57	++++++	+++++	++++	++
AC58	-	-	-	-
AC59	-	-	-	-
AC60	-	-	-	-

หมายเหตุ AC คือแอคติโนมัยซีส หมายเลขหลังคือหมายเลขของเชื้อตามลำดับ

B.subtilis = *Bacillus subtilis* ACTT 11778 (กลุ่มสารที่ต้านคือ aminoglycoside/sulphonamide)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B.cereus = *Bacillus cereus* ATCC 663 (กลุ่มสารที่ต้านคือ tetracyclines)

M.luteus = *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (กลุ่มสารที่ต้านคือ betalactams/sulphonamides)

E.coli = *Eschericia coli* ATCC 1237

+++++ = ความกว้างของ inhibition zone ตั้งแต่ 26 มิลลิเมตรขึ้นไป

++++ = ความกว้างของ inhibition zone ตั้งแต่ 21-25 มิลลิเมตรขึ้นไป

+++ = ความกว้างของ inhibition zone ตั้งแต่ 16-20 มิลลิเมตรขึ้นไป

++ = ความกว้างของ inhibition zone ตั้งแต่ 11-15 มิลลิเมตรขึ้นไป

+ = ความกว้างของ inhibition zone ตั้งแต่ 5-10 มิลลิเมตรขึ้นไป

- = ไม่มีบริเวณยับยั้งการเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

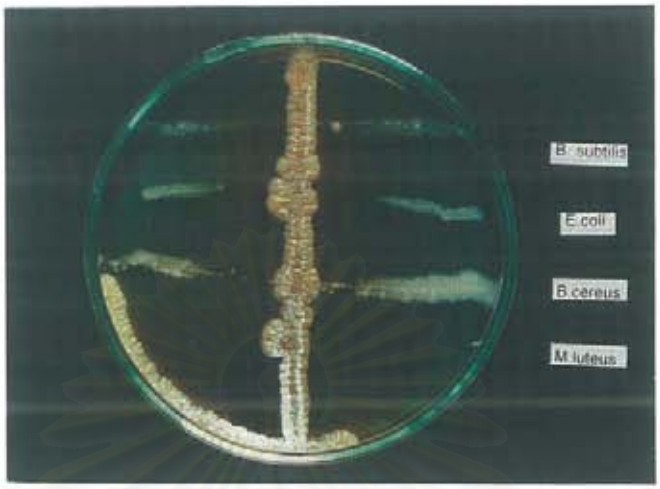
3. ผลการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยซีส

ได้เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งหมด 60 ไอโซเลท และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ บนอาหาร MY agar แสดงผลการทดสอบดังภาพที่ 25 และภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการสร้างสารปฏิชีวนะทั้ง 60 ไอโซเลทใน ตารางที่ 8

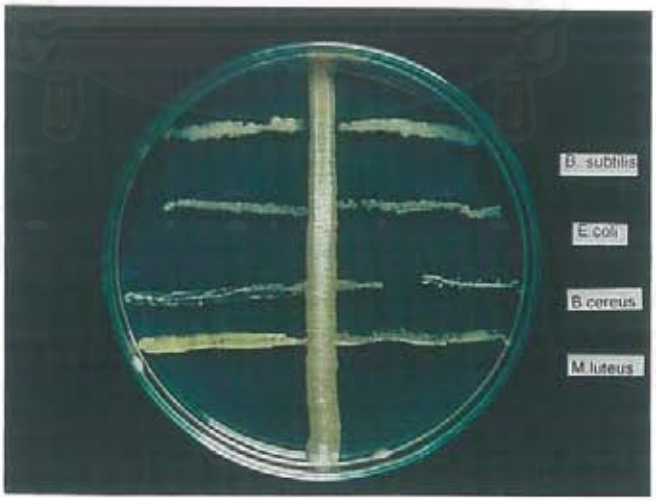
ผลการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมีดังนี้ (ตารางที่ 9) สามารถสร้างสาร amonoglycoside / sulphonamide ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 11778 จำนวน 29 ไอโซเลท (48.33 %) สามารถสร้างสาร tetracyclines ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 6633 จำนวน 25 ไอโซเลท (41.67 %) สามารถสร้างสาร betalactams / sulphonamide ยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341จำนวน 24 ไอโซเลท (40 %) และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 1237 จำนวน 10 ไอโซเลท (16.67 %) ส่วนเชื้อที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์มีจำนวน 30 ไอโซเลท คิดเป็น 50 % ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบพบว่าให้ผลการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 11778 มากที่สุด และให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ATCC 1237 (ตารางที่ 9) น้อยที่สุด

ตารางที่ 9 จำนวนแอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียมาตรฐานทั้ง 4 สายพันธุ์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญ(ไอโซเลท)	จำนวนแอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญ(เปอร์เซ็นต์)	ชนิดสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญ
B. subtilis ATCC 11778	29	48.33%	amonoglycoside / sulphonamide
B. cereus ATCC 6633	25	41.67%	tetracyclines
M.luteus ATCC 9341	24	40.00%	betalactams / sulphonamide
E.coli ATCC 1237	10	16.67%	ไม่ทราบชนิด



ภาพที่ 25 ก แอคติโนมัยซีสที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยมีบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของ *M. luteus* (ระดับการยับยั้ง = +++++ สารปฏิชีวนะที่ยับยั้ง betalactams / sulphonamide) *B. cereus* (ระดับการยับยั้ง = + สารปฏิชีวนะที่ยับยั้ง tetracyclines) *E. coli* (ระดับการยับยั้ง = ++) และ *B. subtulis* (ระดับการยับยั้ง = ++ สารปฏิชีวนะที่ยับยั้ง betalactams / sulphonamide)



ภาพที่ 25 ข แอคติโนมัยซีสที่ไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) กับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ภาพที่ 25 ลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบที่ระดับต่างๆบนอาหาร MY agar

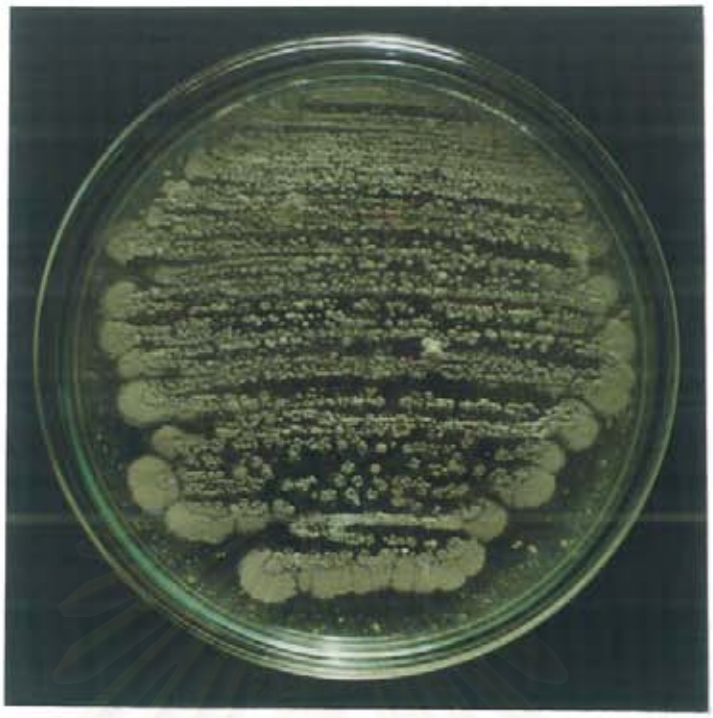
4. การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับ จีนัส

คัดเลือกแอคติโนมัยซีส 10 ไอโซเลทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด สำหรับการวิเคราะห์ morphology chemotaxonomy และ isozyme

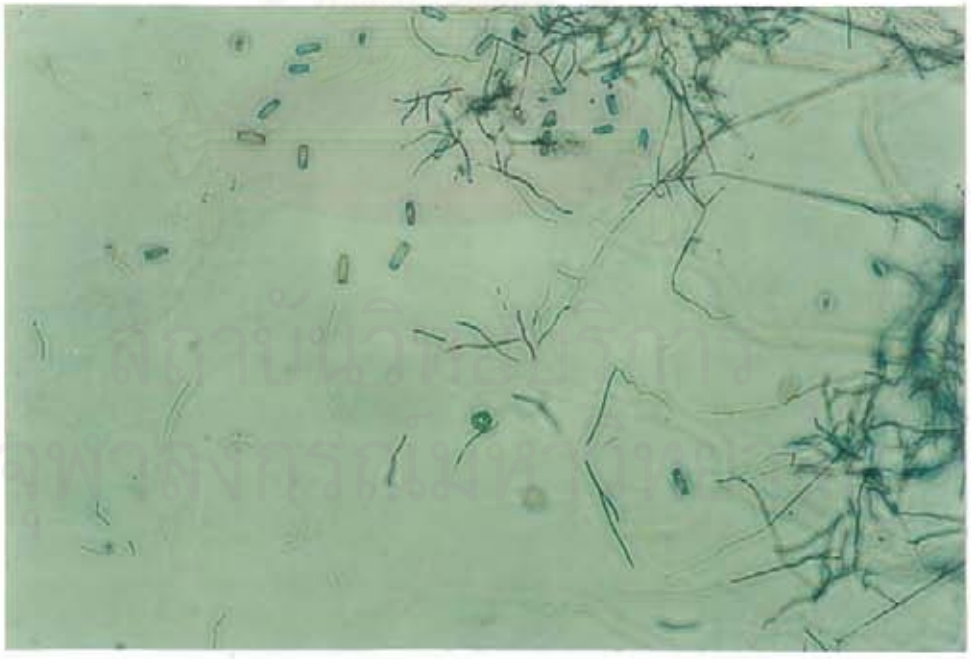
4.1. สัณฐานวิทยา (morphology)

ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยดูลักษณะโคโลนี และเส้นใย แสดงผลการศึกษาดัง.ภาพที่ 26 - 45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

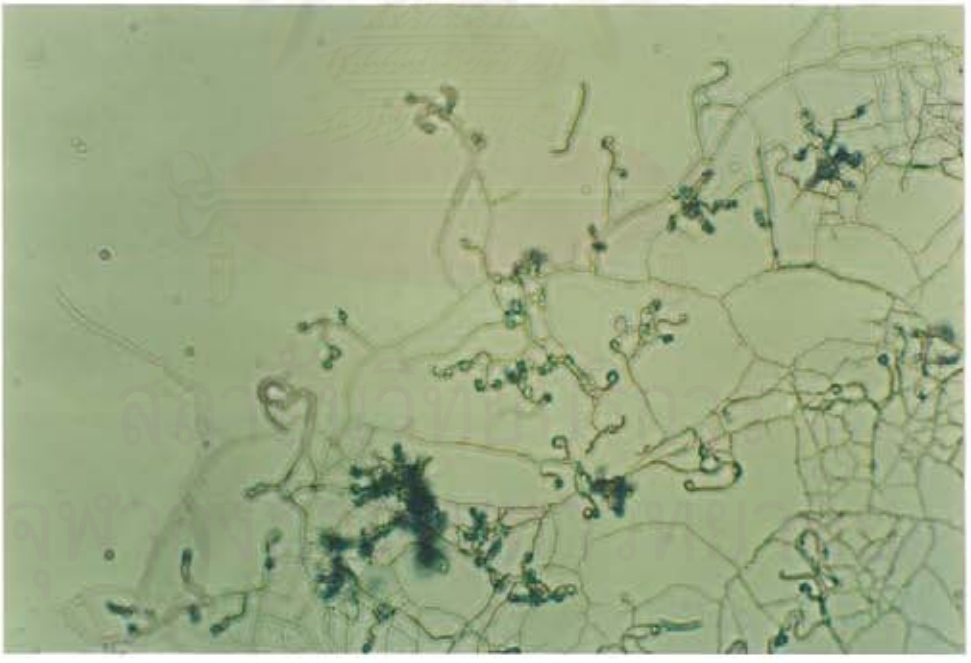


ภาพที่ 26 ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 2 มีสีเทา โคโลนีขนาดเล็ก



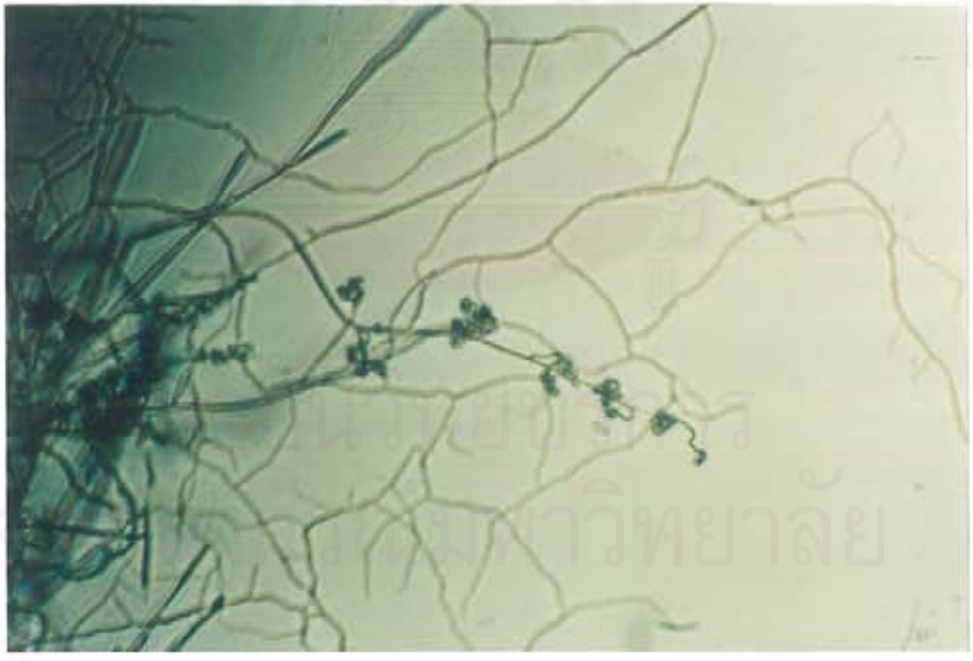
ภาพที่ 27 แสดงลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส AC2 ลักษณะสปอร์ตรงสายสปอร์ไม่เรียบ (flexuous) สายสปอร์เกิดเดี่ยวๆจากเส้นใย

ภาพที่ 28 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส AC 7เป็นผง และสีเทา

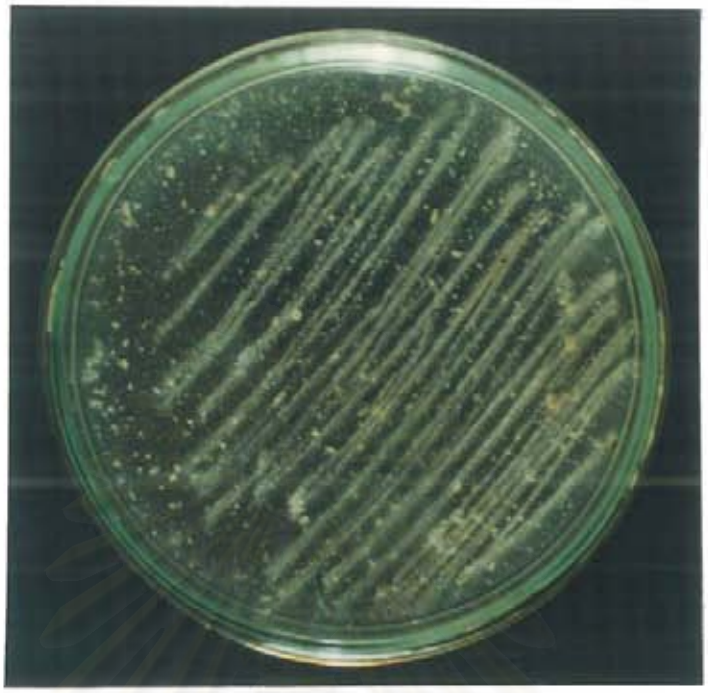


ภาพที่ 29 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 7 มีลักษณะ บิดเป็นเกลียว (spira) เป็นรูปขอ (rectinaculum apertum) ลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดจากเส้นใย

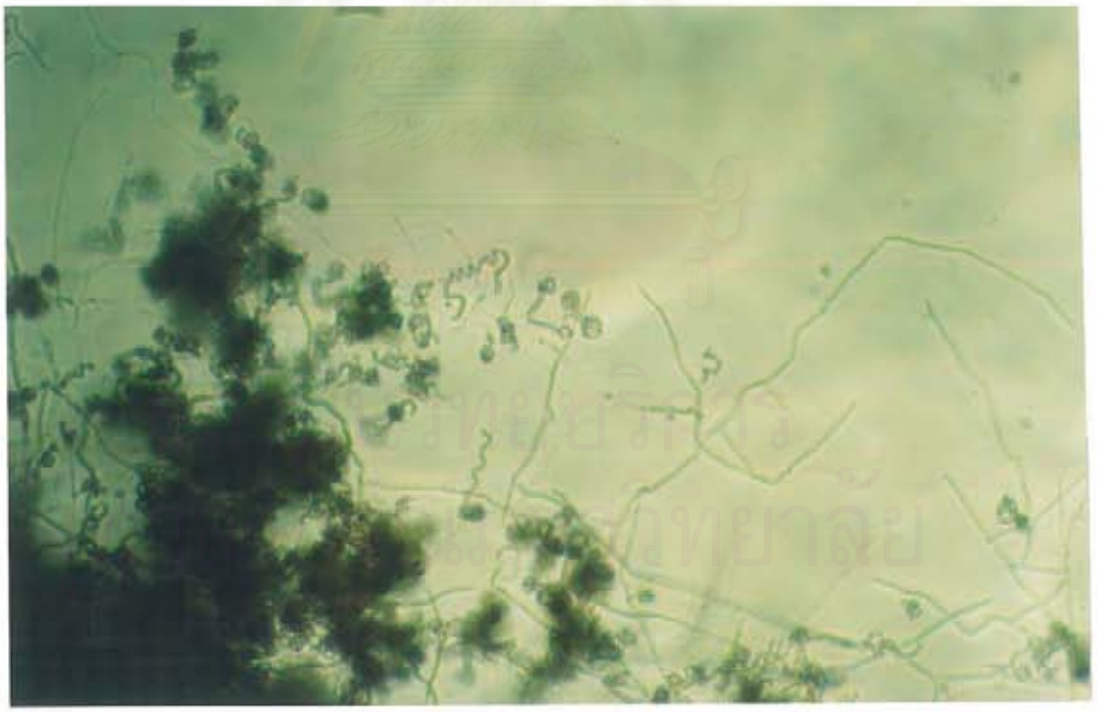
ภาพที่ 30 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 23 ขนาดเล็กสีน้ำตาล



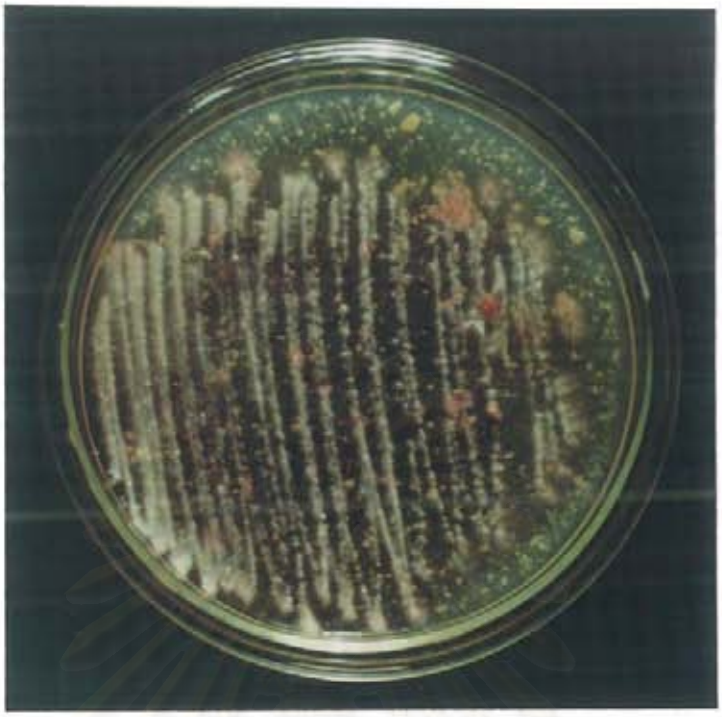
ภาพที่ 31 ลักษณะสปอร์เชื้อแอคติโนมัยซีสรหัส AC 23 บิดเป็นเกลียว (spira) ขดเป็นวงซ้อนกันขนาดเล็ก (compact coils) สายสปอร์เป็นสายเดี่ยวแยกออกจากเส้นใย



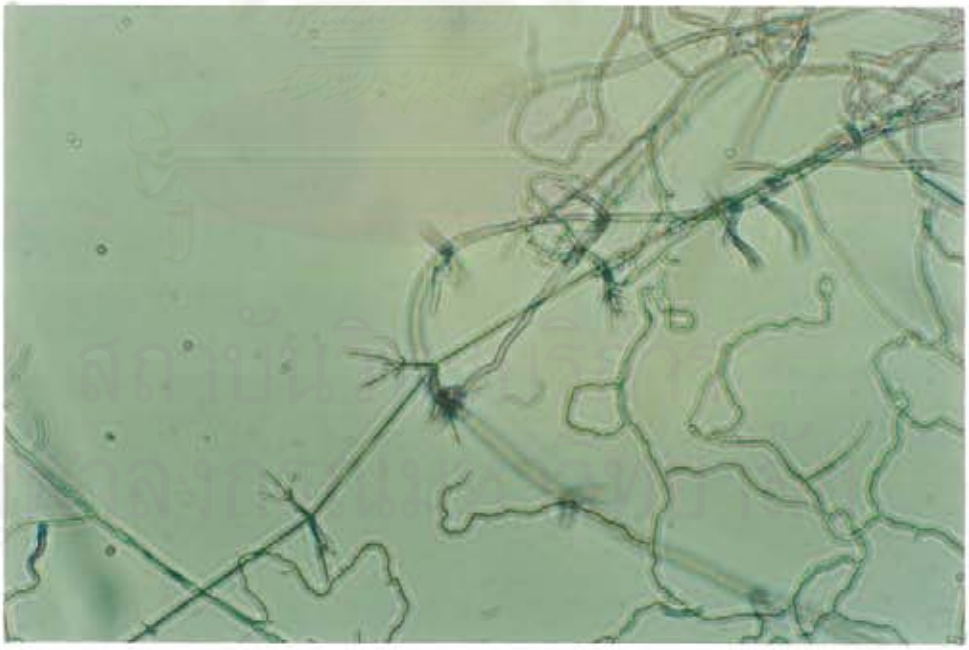
ภาพที่ 32 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC39 มีสีขาว



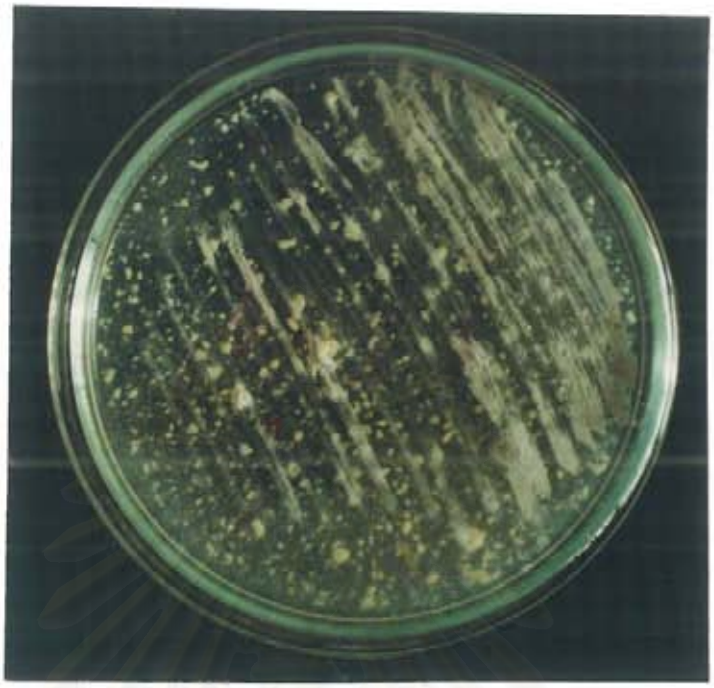
ภาพที่ 33 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 39 สายสปอร์บิดเป็นเกลียว (spira) สปอร์เป็นสายเดี่ยวแตกออกจากเส้นใย



ภาพที่ 34 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 46 มีสีขาว



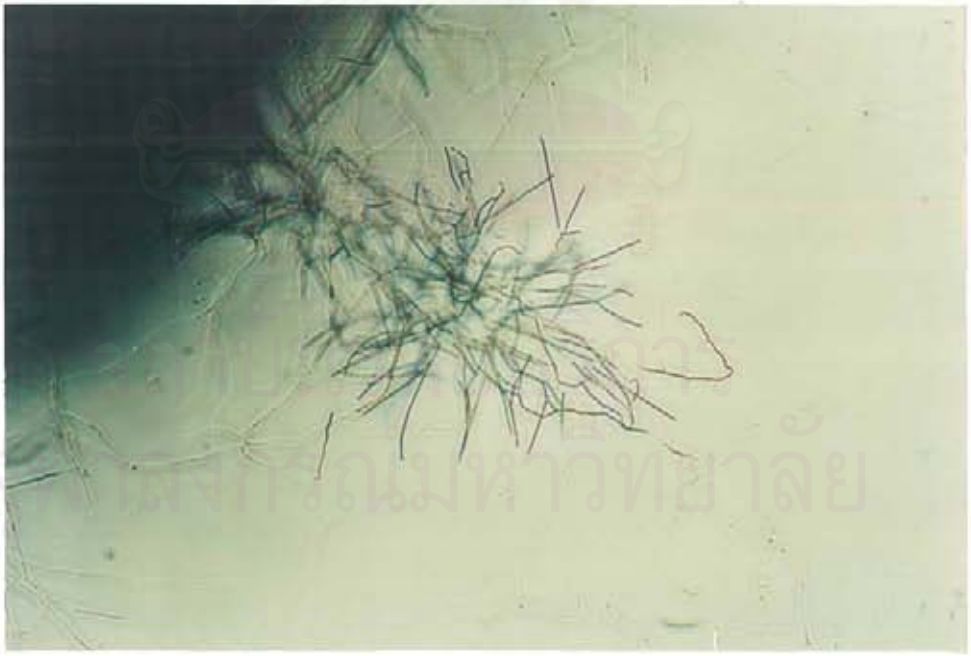
ภาพที่ 35 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 46 สปอร์ตรง (straight) ลักษณะสายสปอร์เกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย



ภาพที่ 36 โคโลนีของแอคติโนมัยซีส รหัส AC 49 มีสีเทา

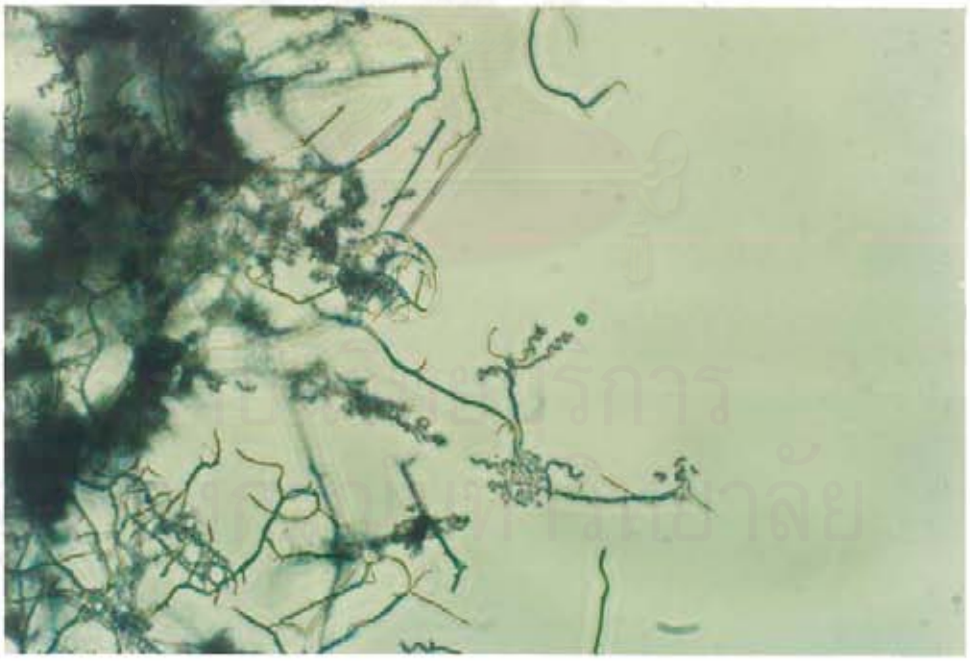
ภาพที่ 37 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีส รหัส AC 49 สายสปอร์ตรง (straight) สปอร์เป็นสายเดี่ยวเกิดจากเส้นใย

ภาพที่ 38 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 50 เป็นผงสีเทา



ภาพที่ 39 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 50 สายสปอร์ตรง (straight) สปอร์เป็นสายเดี่ยวเกิดจากเส้นใย

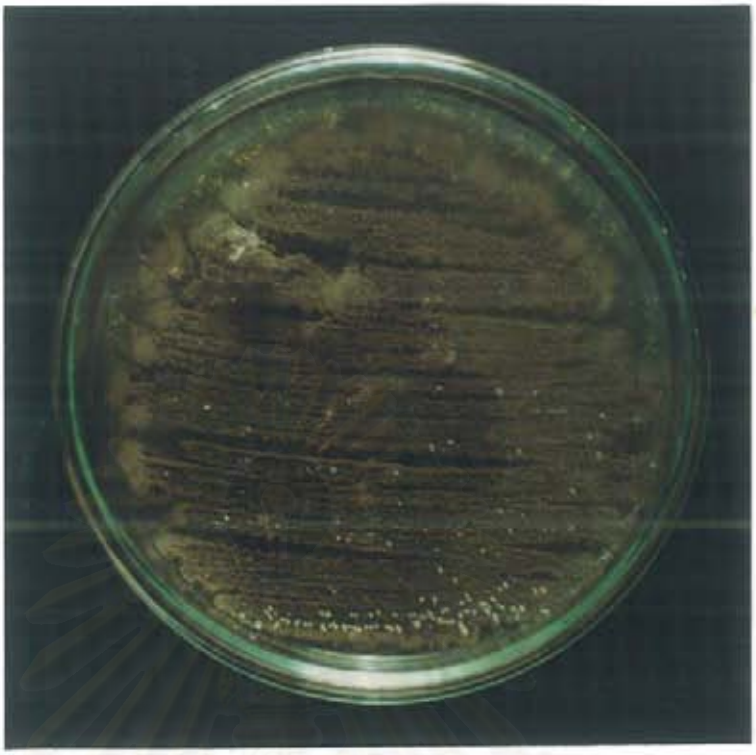
ภาพที่ 40 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 52 มีสีเทา



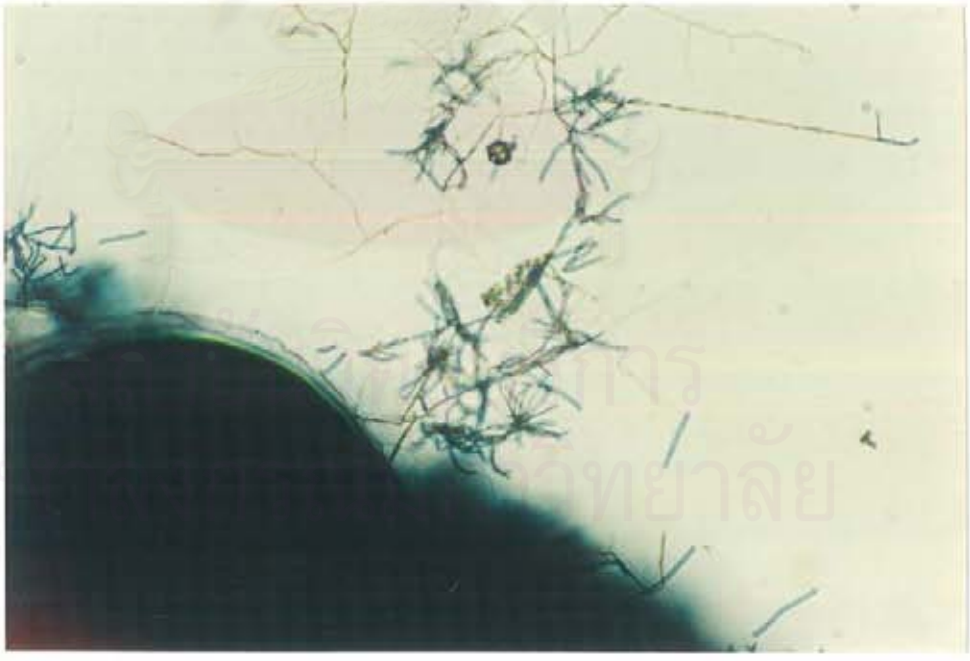
ภาพที่ 41 ลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีส รหัส AC 52 ลักษณะสปอร์บิดเป็นเกลียว (spira) สปอร์เป็นสายเดี่ยวเกิดจากเส้นใย

ภาพที่ 42 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 53 มีสีเทา

ภาพที่ 43 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 53 สายสปอร์ปิดเป็นเกลียว (spira) สปอร์เป็นสายเดี่ยวเกิดจากเส้นใย



ภาพที่ 44 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส AC 57 มีสีน้ำตาล



ภาพที่ 45 ลักษณะสายสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส 57 สายสปอร์ตรงแบบ flexuos และ เป็นสปอร์เป็นสายเดี่ยวเกิดจากเส้นใย

ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีส 10 ไอโซเลท

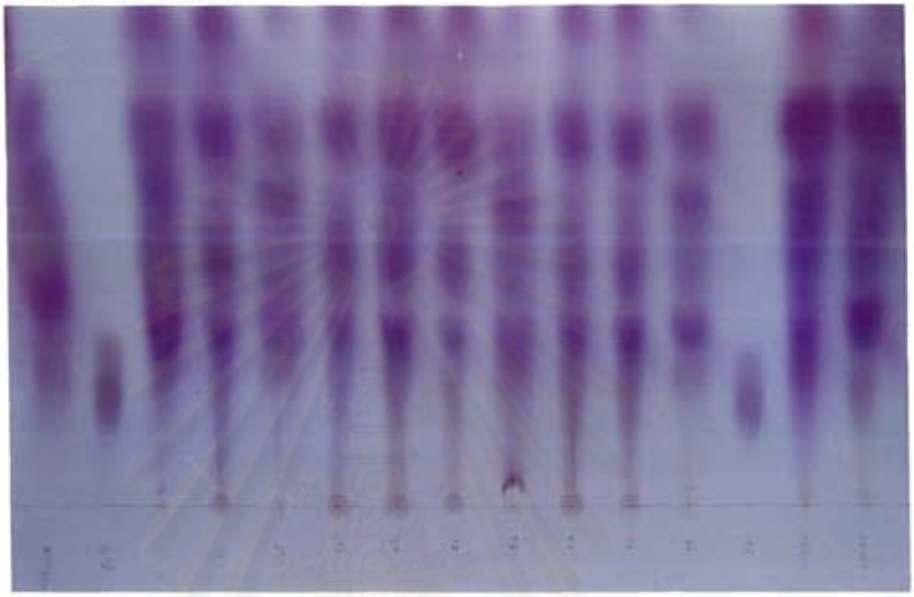
รหัส	spore chain	colour of spore	colour substrate mycelium	colour aerial mycerium
AC2	straight	เทา	สีน้ำตาล	เทา
AC7	Loop	เทา	ครีม	เทา
AC23	spiral,Loop	น้ำตาล	น้ำตาลเหลือง	น้ำตาล
AC39	spiral	ครีม	ขาว	ขาว
AC46	straight	ขาว	แดง	แดง
AC49	straight	เทา	เหลือง	ขาว
AC50	straight	เทา	เหลือง	เทา
AC52	spiral	เทา	เหลือง	ขาว
AC53	spiral	เทา	เหลือง	ขาว
AC57	straight	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.การจำแนกโดยใช้ chemotaxonomy

ผลการตรวจ DAP-isomer บนผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีส ทั้ง 10 สายพันธุ์เพื่อยืนยันผลในระดับจีนัส ได้ผลดังภาพที่ 46

ผลการศึกษา DAP-isomer



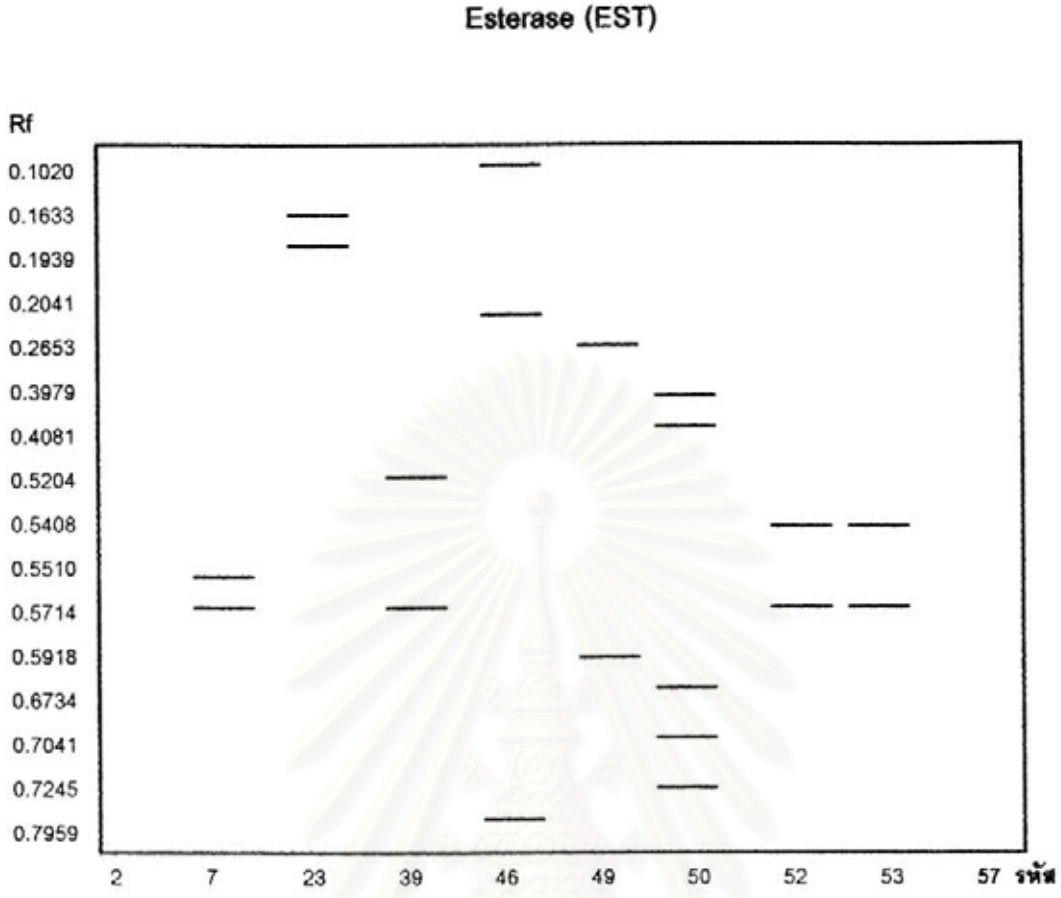
ภาพ 46 ผลการตรวจสอบชนิดของ DAP-isomer *Streptomyces spp.* ทั้ง 10 ไอโซเลทมีแถบของ LL-DAP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3. การหาระบบของไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีส

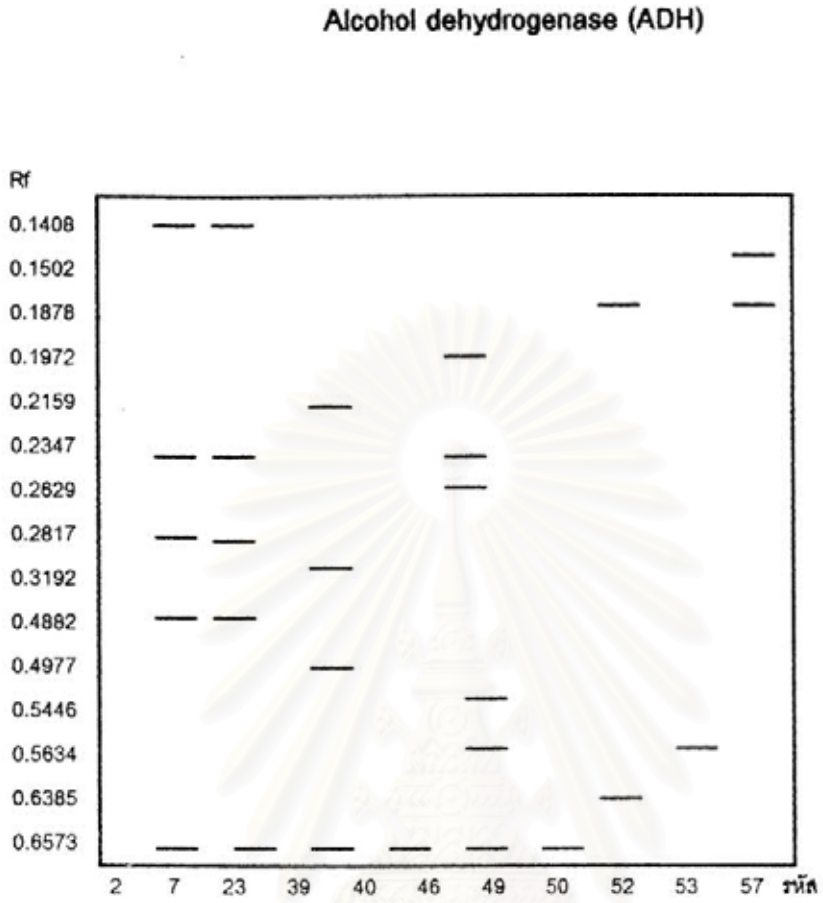
หาระบบไอโซไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของ *Streptomyces spp* ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยศึกษาเอนไซม์ 5 ระบบ คือ Esterase (EST), Alcohol dehydrogenase (ADH), Malate dehydrogenase (MDH), Peroxidase (PER), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) เอนไซม์แต่ละระบบให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนี้ เอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) ไม่ปรากฏแถบเอนไซม์ เอนไซม์ PER (ภาพที่ 48) ปรากฏแถบเอนไซม์บางไอโซเลท ส่วนเอนไซม์ EST (ภาพที่ 47), ADH (ภาพที่ 48) และ MDH (ภาพที่ 49) มีแถบเอนไซม์ต่างกันทุกไอโซเลท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



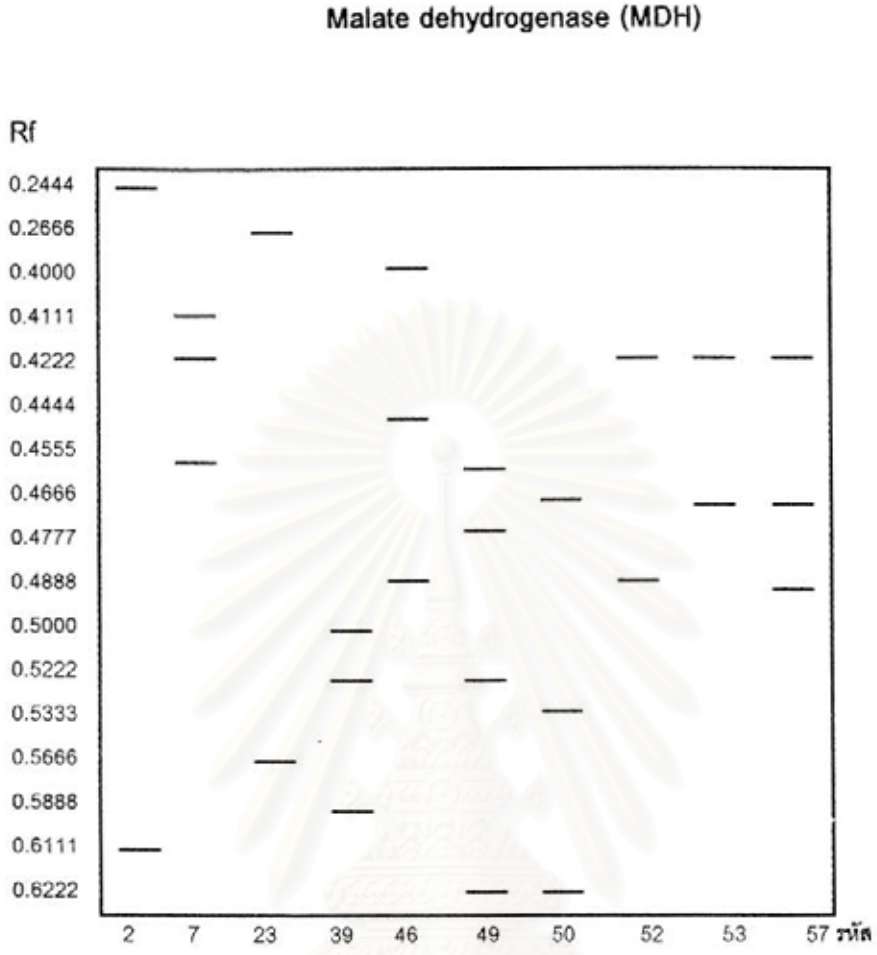
ภาพที่ 47 ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ EST ของแอคติโนมัยซีส ทั้ง 10 ไอโซเลท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



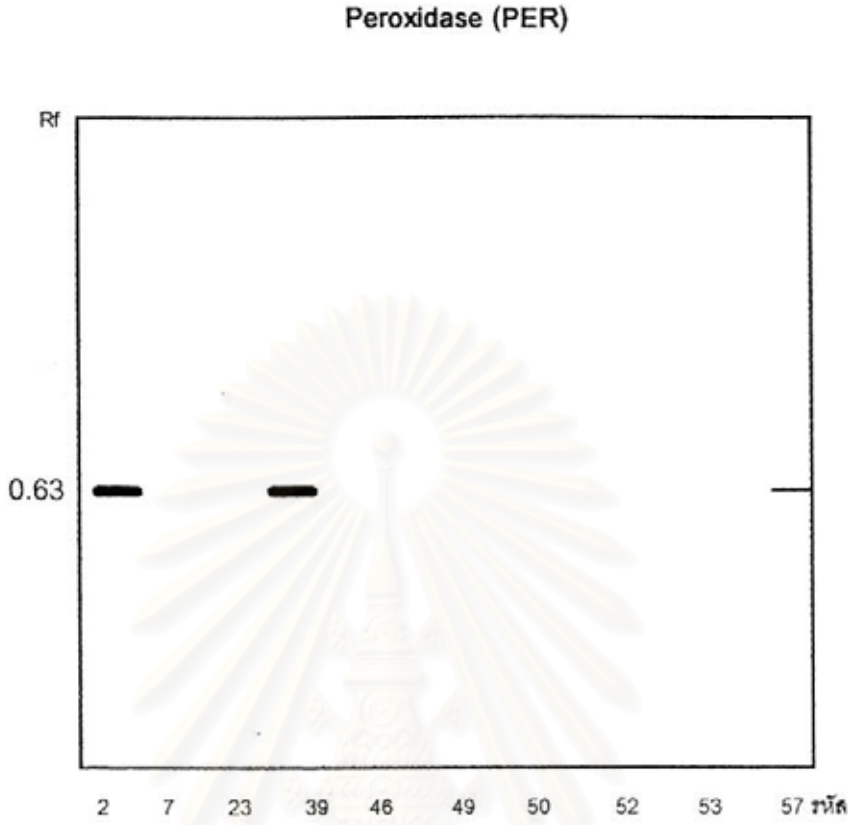
ภาพที่ 48 ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ ADH ของแอคติโนมัยซีสทั้ง 10 ไอโซเลท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 49 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ MDH ของแอคติโนมัยซีสทั้ง 10 ไอโซเลท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 50 ไดอะแกรมแสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ PER ของแอคติโนมัยซีสทั้ง 10 ไอโซเลท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

อภิปรายผลการศึกษา

1. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุสูงในเดือน กันยายน 2541 และธันวาคม 2540 เป็นช่วงปลายฤดูฝน และกลางฤดูหนาว ความชื้นในดินเหมาะในการเกิดกิจกรรมย่อยสลายซากพืชซากสัตว์โดยจุลินทรีย์ดินให้ได้โมเลกุลของเศษซากพืชที่เล็กลง (Alexander, 1967) กลายเป็นอินทรีย์วัตถุในดิน (สมศักดิ์ วังใน, 2528) พบว่าจุลินทรีย์ชนิดแรกที่ย่อยสลายเศษซากอินทรีย์วัตถุเหล่านั้นคือแบคทีเรีย (ประกิตติ์ลิน สีหนนท์, 2540) เพราะฉะนั้นในช่วงเดือน ธันวาคม 2540 และ กันยายน 2541 พบปริมาณของแบคทีเรียสูง ทุกพื้นที่พบปริมาณอินทรีย์วัตถุมีค่าใกล้เคียงกัน

เปอร์เซ็นต์ความชื้น จากผลการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ความชื้นมีปริมาณน้อยในพื้นที่ทางที่ใช้สัญจร เดือน ธันวาคม 2540 และมีนาคม 2541 เนื่องจากพื้นที่ทางที่ใช้สัญจรเป็นพื้นที่โล่งเตียนไม่มีพืชปกคลุมการระเหยของน้ำในดินจึงมีมากกว่าบริเวณพื้นที่ทุ่งหญ้า เปอร์เซ็นต์ความชื้นในทุ่งหญ้าทุกพื้นที่ทุกเดือนมีปริมาณใกล้เคียงกัน

ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่จะอยู่ในช่วง 5.8 - 7.9 ซึ่งเป็นช่วงที่เป็นกลาง โดยทั่วไปแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะมีค่าประมาณ 6.8 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรด - ด่างในพื้นที่ยังเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลลินทรีย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาปริมาณแบคทีเรีย

ปริมาณแบคทีเรียดินในพื้นที่มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 5.42 x 10^6CFU/g soil ถึง 3.9x10^9 CFU/g soil ซึ่งตรงกันกับค่าเฉลี่ยที่ตั้งเป็นเกณฑ์ว่าแบคทีเรียในดินส่วนใหญ่จะพบอยู่ในช่วง 10^8 CFU/g soil ในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) พบปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าเกณฑ์ดังกล่าวเนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีการฟื้นฟูและปรับปรุงสภาพของดินอยู่เสมอ ทำให้ดินบริเวณนี้มีความสมบูรณ์ เนื่องจากพื้นที่เป็นทุ่งหญ้าระบบรากในทุ่งหญ้าเป็นระบบรากฝอยทำให้มีแบคทีเรียอาศัยอยู่รอบรากพืชอยู่เป็นจำนวนมาก (Moore, 1966) อย่างไรก็ตาม ปริมาณของแบคทีเรียในดินไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดิน (สมศักดิ์ วังใน, 2528) เนื่องจากการดำรงชีวิตของแบคทีเรียมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่นถ้าบริเวณนั้นมีปริมาณของรามากก็จะพบปริมาณของแบคทีเรียจะน้อยลง หรือ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยภายนอกเพียงเล็กน้อยเช่นการกัดเซาะหน้าดิน ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหรือฝนตกในระหว่างที่ทำการเก็บตัวอย่างอาจมีผลต่อปริมาณแบคทีเรีย (Alexander, 1967)

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อสภาพแวดล้อมเนื่องจากการดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายเซลลูโลสในซากพืช ในงานวิจัยนี้พบปริมาณมากที่สุดในเดือน ธันวาคม 2540 และมีน้อยที่สุดในเดือน มีนาคม 2541 พื้นที่ที่พบแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสน้อยคือพื้นที่เส้นทางที่ใช้สัญจร (C) พื้นที่ที่พบมาก คือ ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการย่อยสลายเศษซากพืชดังนั้นในผลการทดลองพบว่าปริมาณของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินจากการคำนวนโดยใช้ microsoft exel function ได้ค่า ความสัมพันธ์เท่ากับ r = 0.6753 แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีปริมาณมากหรือน้อยยังขึ้นอยู่อีกหลายปัจจัย เช่นความชื้น ค่าความเป็นกรด - ด่าง จากผลการทดลองปริมาณความชื้นมีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้ดังนั้น จึงพบว่าใน ช่วงเดือนกันยายน 2541 และ ธันวาคม 2540 ซึ่งเป็นช่วงหลังหน้าฝนปริมาณความชื้นในดินยังมีอยู่มากปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีเพิ่มขึ้นด้วย (นวลพรรณ ณ ระนอง, 2524)

แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนได้โดยอิสระเนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ตรวจหา *Azotobacter spp. Baijerinkia spp. Derzia spp.* อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจสอบ คืออาหารที่ใช้สำหรับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยตรง หลักการใช้อาหารสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้คืออาหารเลี้ยงเชื้อนั้นต้องไม่มีส่วนผสมของไนโตรเจน ฉะนั้นแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ได้จะมีความสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เอง ผลการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มนี้ในพื้นที่โครง

การฯ พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มนี้ทุกพื้นที่ ทุกฤดูกาล ดังรายงานการศึกษาของ Moore (1966) ที่พบว่าในสภาพของทุ่งหญ้าอัตราการตรึงไนโตรเจนจะสูง และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็พบเป็นปริมาณมาก

ปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีสมีมากที่สุดในปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 4.50 x10^{5} CFU/g soil ปริมาณแอคติโนมัยซีสที่พบน้อยที่สุดในเดือนมิถุนายน 2541 มีค่าเท่ากับ 101 CFU/g soil เดือนธันวาคม 2540 เป็นช่วงที่ความชื้นในดินสูงจะพบปริมาณแอคติโนมัยซีสมาก เมื่อศึกษาปริมาณอินทรีย์วัตถุพบในเดือนเดียวกันนี้ปริมาณอินทรีย์วัตถุมีเปอร์เซ็นต์ที่สูง และความชื้นสัมพัทธ์ก็มีค่าสูงด้วย ซึ่งจะสอดคล้องกับการค้นพบของ Alexander (1978) ที่พบว่าแหล่งที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูงปริมาณแอคติโนมัยซีสมักมากกว่าแหล่งที่มีอินทรีย์วัตถุต่ำ สำหรับปริมาณแอคติโนมัยซีสที่แยกได้ที่พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLPD) มีค่าสูงที่สุด (4.50 x 10^{5} CFU/g soil) พื้นที่ที่พบปริมาณ แอคติโนมัยซีสน้อยคือพื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) (1.0 x 10^{3} CFU/g soil) ผลการทดลองได้สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ จากการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์โดยใช้ microsoft exel function ได้ค่า ความสัมพันธ์ r = 0.5439 (ภาคผนวก ฉ) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นพบว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะต่อการเจริญของแอคติโนมัยซีส ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินจึงไม่สามารถแยกและบ่งชี้ปริมาณแอคติโนมัยซีสในพื้นที่ได้ ซึ่ง Waksman (1967) และ Alexander (1978) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณอินทรีย์วัตถุต่างก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณแอคติโนมัยซีสในดินทั้งสิ้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสเป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส และกลุ่มตรึงไนโตรเจนโดยอิสระ จึงได้นำแอคติโนมัยซีสคัดแยก จัดเก็บ และนำมาตรวจสอบความแตกต่างของลักษณะรูปร่างสัณฐาน (morphology) ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในการผลิตสารปฏิชีวนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสจากดินตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะต่อการเจริญของแอคติโนมัยซีสสามารถคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ 60 ไอโซเลท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ทดสอบความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยซีส

นำแอคติโนมัยซีสทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 สายพันธุ์ พบว่าสร้างสาร aminoglycoside / sulphonamide ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 11778 จำนวน 29 ไอโซเลท (48.33 %) สามารถสร้างสาร tetracyclines ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 6633 จำนวน 25 ไอโซเลท (41.67 %) สามารถสร้างสาร betalactams / sulphonamide ยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341จำนวน 24 ไอโซเลท (40 %) และยับยั้งการเจริญของเชื้อ*E. coli* ATCC 1237 จำนวน 10 ไอโซเลท (16.67 %) ส่วนเชื้อที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์มีจำนวน 30 ไอโซเลท คิดเป็น 50 % อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ (Barca, 1974) และ MY agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรวจสารปฏิชีวนะ (ภูริพันธ์ ลีลศุลีธรรม, 2526) อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะมีอยู่หลายชนิด การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นอาจให้ผลที่แตกต่างกัน นอกจากชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว การคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบก็เป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง Routien และ Finlay (1952) กล่าวว่าถ้าใช้แบคทีเรียที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะก็สามารถตรวจสอบหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น ส่วนความกว้างของ inhibition zone ไม่ใช่เป็นดัชนีบ่งถึงความไวของปฏิกิริยาที่ยับยั้ง บริเวณยับยั้งที่กว้างอาจหมายถึงการสร้างสารปฏิชีวนะที่อ่อนเป็นปริมาณมาก ส่วนบริเวณยับยั้งที่แคบอาจหมายถึงการสร้างสารปฏิชีวนะที่แรงในปริมาณน้อย (Barca, 1974) เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะในงานวิจัยนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความไว (sensitive) ต่อสารปฏิชีวนะและยังสามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบนั้นไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดใด แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิดนั้นจะสร้างสารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่นำมาทดสอบเท่านั้น อาจจะให้ผลกับการทดสอบกับจุลินทรีย์อื่นเช่น รา หรือแบคทีเรียชนิดอื่นอีก

เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีสหนึ่งชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน (Barca, 1974) ในงานวิจัยนี้พบว่ามีแอคติโนมัยซีสอยู่หลายสายพันธุ์ที่พบว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อหลายชนิดเช่น AC2, AC7, AC9, AC13, AC16, AC17, AC19, AC20,AC23, AC33, AC34, AC35, AC38, AC39, AC42, AC44, AC46, AC47, AC49, AC50, AC51, AC52, AC53, AC56, AC57 ส่วนแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวคือ AC25, AC31, AC36, AC37 ส่วนเชื้อ แอคติโนมัยซีสที่ไม่ให้ผลการ

ยับยั้งกับแบคทีเรียชนิดใดเลยเช่น AC1, AC3, AC4, AC5, AC6, AC8, AC10, AC11, AC12, AC14, AC15, AC18, AC21, AC22, AC24, AC26, AC27, AC28, AC29, AC30, AC32, AC41, AC43, AC45, AC48, AC54, AC55, AC58, AC59, AC60 สำหรับแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบมากที่สุด 10 อันดับดังนี้ AC2, AC7, AC23, AC39, AC46, AC49,AC50, AC52, AC53 และ AC57 ทั้งนี้แอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกเป็น 10 อันดับในการยับยั้งเชื้อมากที่สุดจะเป็นทั้งเชื้อที่ยับยั้งให้ inhibition zone กว้างมากที่สุดและให้ผลต่อการยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมากชนิด

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานเพื่อการจัดจำแนก

การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 10 ไอโซเลทเพื่อการจัดจำแนก โคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็ก (ระหว่าง 1- 10 มิลลิเมตร) ลักษณะสีโคโลนีต่างกัน เช่น สี เทา สีแดง สีเขียว สีขาวบางไอโซเลทสร้างเม็ดสี (pigment) ได้ ลักษณะสายสปอร์ที่พบมีหลายแบบ เช่น สายสปอร์ตรง (straight) AC 49 AC 50 หรือสายสปอร์แบบ flexuous AC 2 AC 57 สายสปอร์มีลักษณะงอ (hook) AC.7 AC 39 หรือมีลักษณะบิดเป็นเกลียว (spira) AC 7 AC 23 AC 39 AC 49 AC 52 AC53 ส่วนใหญ่พบสายสปอร์เกิดเป็นเดี่ยวๆจากเส้นใย (spore not born on verticillate sporophores) ลักษณะของโคโลนี และสปอร์ที่กล่าวมานั้นอาจจัดเชื้อไอโซเลทที่ AC 2 AC 7 AC 23 AC 39 AC 49 AC 50 AC 52 AC53 และAC 57 อยู่ในจีนัส *Streptomyces* สำหรับ AC 46 ลักษณะโคโลนีมีสีแดงที่มีลักษณะการเกิดของสปอร์เกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวของเส้นใย (spore born on verticillate sporophores) ลักษณะของโคโลนี และสปอร์อาจจัดเข้าไปในจีนัส *Streptoverticillium* อย่างไรก็ตามเพื่อจัดจำแนกได้ชัดเจนยิ่งขึ้นต้องดูลักษณะของผิวสปอร์เพิ่มเติมซึ่งสามารถดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การวิเคราะห์ DAP-isomer

ผลการวิเคราะห์ DAP-isomer ทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่า มี DAP-isomer อยู่ในรูป LL-DAP ซึ่งลักษณะนี้มักพบในจีนัส *Streptomyces* และ *Streptoverticilium* ประกอบกับผลของการศึกษาทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Streptomyces* จึงคาดว่าทั้ง 10 ไอโซเลท อาจเป็นจุลินทรีย์ในจีนัส *Streptomyces* อย่างไรก็ตามเพื่อการจัดจำแนกได้ถูกต้องชัดเจนยิ่งขึ้นควรมีผลการศึกษาอื่นประกอบด้วย เช่น ลักษณะของผิวและสายสปอร์เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การศึกษาลักษณะทางกายภาพ เช่นการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นต้น

6. การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์

การใช้ระบบไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีส ทั้ง 10 สายพันธุ์ระบบเอนไซม์ที่เห็นความแตกต่างของแถบไอโซไซม์มีอยู่ 3 ระบบ คือ EST ADH MDH ในรายงานของ Oh, Ahnc และKim (1998) พบแถบเอนไซม์ต่างกันคือระบบเอนไซม์ EST ADH ซึ่งตรงกันกับงานวิจัยนี้ ส่วนระบบเอนไซม์ MDH นั้นพบว่าในรายงาน Oh, Ahnc และKim (1998) ไม่พบความแตกต่างของแถบเอนไซม์ แต่ในงานวิจัย นี้พบว่าเอนไซม์ MDH มีความแตกต่างของแถบเอนไซม์ใน 10 ไอโซเลท สำหรับเอนไซม์ PER นั้นบอกความต่างของแถบเอนไซม์ไม่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7
สรุปผลการทดลอง

การสำรวจข้อมูลทางกายภาพ และข้อมูลปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส กลุ่มตรึงไนโตรเจน และแอคติโนมัยซีส จากดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช จ.นครราชสีมา สรุปได้ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในพื้นที่ต่างกัน โดยเดือน ธันวาคม 2540 และ เดือน กันยายน 2541 ปริมาณอินทรีย์วัตถุสูงกว่าเดือน มีนาคม 2541 และ มิถุนายน 2541 ในเส้นทางใช้สัญจรมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นน้อยกว่าพื้นที่อื่น ใน พื้นที่ทุ่งหญ้าเปอร์เซ็นต์ความชื้นไม่ต่างกันมาก ค่าความเป็น กรด-ด่าง มีค่าใกล้เคียงกันทุกพื้นที่

2. ปริมาณแบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำและการปลูกกล้าไม้ (GLPD) ในเดือนกันยายน 2541 มีปริมาณน้อยที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) ในเดือน มิถุนายน 2541

3. แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสมีปริมาณมากที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) ในเดือนธันวาคม 2540 มีปริมาณน้อยที่สุดในบริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร (C) เดือน มีนาคม 2541

4. แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนพบทุกพื้นที่ และทุกฤดูกาล

5. เชื้อแอคติโนมัยซีสมีปริมาณมากที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) ในเดือน ธันวาคม 2540 พบน้อยที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) ในเดือนมิถุนายน 2541

6. พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสมากที่สุด แยกแอคติโนมัยซีส ได้ 60 ไอโซเลท นำมาหาประสิทธิภาพการสร้างสารปฏิชีวนะ ในอาหาร MY agar พบแอคติโนมัยซีสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ จำนวน 30 ไอโซเลท และไม่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้

ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar 30 ไอโซเลท นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุด 10 อันดับแรก มาจัดจำแนกในระดับจีนัส และศึกษา แบบแผนไอโซไซม์

7. ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีสทั้ง 10 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ ตรวจดูลักษณะโคโลนี เส้นใย สปอร์ และDAP-isomer คาดว่าเป็นจีนัส *Streptomyces* ทั้ง 10 ไอโซเลท

8. การหาระบบเอนไซม์เพื่อดูความต่างของแบบแผนไอโซไซม์ใน *Streptomyces spp.*ทั้ง 10 ไอโซเลท มีเอนไซม์ที่ให้แบบแผนไอโซไซม์ที่แตกต่างกันใน *Streptomyces spp* ทั้ง 10 ไอโซเลท 3 ระบบเอนไซม์ จากการตรวจวิเคราะห์ระบบเอนไซม์ 5 ระบบ เอนไซม์ที่ให้ผลการทดสอบว่ามีแถบของเอนไซม์ที่ต่างกัน คือเอนไซม์ EST, ADH และ MDH ส่วนเอนไซม์ที่ปรากฏแถบไอโซไซม์บางไอโซเลทคือเอนไซม์ PER สำหรับ G-6-PD ไม่ปรากฏแถบเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาน. ผลกระทบทางจุลชีววิทยาของดินในป่าเบญจพรรณที่ผ่านการทำไม้ในบริเวณห้วยลิ่นถิ่น จังหวัดกาญจนบุรี วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536.

กัลยา ปรีชานุกูล. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองจากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา.บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2528.

นวลพรรณ ณ ระนอง. บัคเตรีพวกเฮเทอโรโทรปที่ต้องการอากาศ และบัคเตรีที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลสในป่าชายเลน อ. คลองขลุง จ. จันทรบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา.บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2524.

บัญญัติ สุขศรีงาม.จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 2538. 162 - 207.

ประกิตต์สิน สีหนนท์. จุลินทรีย์ดิน เอกสารไม่ตีพิมพ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2540.

ภูริพันธ์ ลีละศุลีธรรม.การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารปฏิชีวนะจากดินจอมปลวก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6 (มกราคม 2541): 23-33.

ลาวัลย์ ฟุ้งขจร.การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนโดยอิสระ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2528.

วารุณี ศรีประเสริฐกุล.การศึกษาและการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2526.

วิไลลักษณ์ ศัตรูลี้. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter ในดินป่าสะแกราช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชา จุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2522.

สมศักดิ์ วังใน. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. 2528.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช. ไอโซไซม์. เอกสารใช้สำหรับการเรียนการสอนสำหรับนิสิตภาควิชาพันธุศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจิตรา จางตระกูล. หลักการและเทคนิคพื้นฐานในการศึกษา Isozyme analysis เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้. เอกสารประกอบคำบรรยาย การฝึกอบรมการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า. กรมป่าไม้. กรุงเทพ (2535). 31หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อบักเตรีศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตและคุณสมบัติบางประการของสารที่ผลิตได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2527.

สุวรรณา ภูวนวิทยาคม. แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเศษพืช วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2528.

เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ. 2 nd culture collection curator' s meeting and ANMR/ TISTR JOINT workshop on culture collection Techniqus. Bangkok: MIRCEN, 1996.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, M. Introduction to soil Microbiology. New york: John Wiley and sons, 1967.

Allinson, F. E. Azotobacter inoculation of crop. Historical. Soil sci. 64(1947): 413 - 425.

Aquate, A. D., and Bhat, J. V. Use of antibiotics for selective isolation of Atinomycetes in soil. J. Gen. Microbiol. 38 (1965): 251 - 261.

Bagdasarian, E. G. Production of vitamin B12 by soil bacteria. Microbiology. 34 (1965): 520 - 505.

Barca, J. M., and Margaret, E. B. Effect on plant growth Produce by *Azotobacter paspali* relate to synthesis of plant growth regulating substances. J.Appl.Bact. 37 (1974): 583 - 593.

Breed, R. S., Murray, E. G.D., and Smith, N. R. Bergey's manual of determinative bacteriology. 6th ed. London: Bailliere, Tindall and Cox. 1979.

Brown, M.E., and Buringham, S.K. Production of plant growth substraces by *Azotobacter chroococcum*. J. Gen microbiol. 53 (1968): 135.

Brock, T. D. Microbial ecology and applied microbiology. Adv Appl. Microbiol. 8(1966): 61-75.

Burkholder, P. R. Studies on the antibiotic activity of Actinomycetes. J. Bacteriol. 52 (1946): 503 -504.

Cross, I., and Goodfellow, M. Taxonomy and classification of the Actinomycetes. London: Academic Press, 1973.

Cross, T., and MacIver, A. M. An alternative Approach to the Identification of *Streptomyces* Species : a Working system.England. 1963.

Delwiche, C. C., and Wijler, J. Nonsymbiotic nitrogen fixation in soil. Plant and soil. 7 (1956): 113 - 129.

Dobereiner, J.; Day, J. M.; and Dart , P. J. Nitrogenase activity and Oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71(1972): 103.

Gainney, P.L., and E. Fowler. Growth curve of Azotobacter at different plant. J. Agr. Research. 70(1945): 219 - 236.

Hutchinson, G.E. Nitrogen biogeodumistry of atmosphere. Amer. Science. 32(1944): 178 - 195.

Jackson., M.L. Soil chemical analysis. London: Academic Press, 1956.

Jensen, H.L. Bacterial treatment of non-labuminous seeds as an agricultural practice. Australian J. Sci. (1942): 117 - 120.

Jergensen, M.F., and Davey, C.B. Nonsymbiotic nitrogenfixing microorganism in acid soil and the rhizosphere. Soil fert. 33(1973): 435 - 446.

Komagata, Kazve., and Suzuki, Ken-Ichiro. Lipid and cell wall Analysis in bacterial systematics. Method in Microbiology. 19(1987): 162 - 207.

Kelner, A. A method for investigating large microbial population for antibiotic activity. J. Bacteriol. 56(1948): 157 - 182.

Kuster, E. and S.T. Williams. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature. 30(1964): 928 - 929.

Kuster, E., and Williams, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature. 30(1964): 928 - 929.

Landerkin, G. B. ; Smith, J. R. G., and Lochhead, A. G. Microorganisms Producing antibiotics. Bacteriol. Rev. 16 (1952): 57 - 67.

Lechavalier, H. A., and Corke, C. T. The replic a plate method for screening antibiotic-producing organism. Appl. Microbiol. (1953): 110 - 112.

Lee, M. C.; Breckenridge., and Knowles, R. Effect of some culture. Condition on the production of indole - 3 - acetic acid and a gibberrellin- like substance by *Azotobacter vinelandii*. Gen. J. Microbiol. 16(1970): 1325.

Linder, F., and Wallhausser, K. H. Arch Mikrobiol. In waksman, S.A. The Actinomycetes: A summary of current knowledge. New York: The Ronald Press Co, 1967.

Lodder, J. The yeast a taxonomic study. Amsterdams: North-Holland Publishing, 1970.

Micales, J. A. ; Bonds, M.R., and Peterson, G. L. Isozyme analysis in fungal Taxonomy and molecular genetics. Fungal Biotechnology. 4(1990): 57 - 71.

Mishustin, E. N. The importance of nonsymbiotic nitrogen fixing micro-organism in agriculture. Plant and soil. 32(1970): 545 - 554.

Moore, A. W. Nonsymbiotic nitrogen fixation in soil and soil plant systems. Soils Fert 29(1966): 113 - 129.

Nakhimovskaia, M.T. Mikrobiologiya. In Wakman, S.A., The Actinomycetes: A summary of current knowledge. New york: The Ronald Press, 1967.

Nikov, Klasil. N. A. Taxonomic principle in Actinomycetales. J. Bacteriol. 79(1960): 65 - 74.

Nimi, O., and Suzuki, M. Microorganisms Producing antibiotics J. Antibiotics. 29(1976): 587-595.

Nonomura, H., and Hayakawa, M. New methods for selective isolation of soil Actinomycetes. Tokyo: Japan scientific Societies Press, 1988.

Ocumpo, J. A. ; Barea, J. M., and Montoya, E. Interaction between Azotobacter and Phosphobacteria and their establishment in the rhizosphere as effected by soil fertility. Can. J. Microbiol. 21(1975): 1160 - 1165.

Oh, C.; Ahnc, M., and kim, J. Use of electrophoretic enzyme patterns for Stretomycetes systematic. Microbiol. 1996. (140:1): 9 -13.

Okada, A.; Yamaguchi, M., and Kobayashi, M. Nitrogen-fixing microorganism in paddy soil. Nitrogen fixation in mixed culture of Photosynthetic bacteria (Rhodopseudomonas capulatus species) with other heterotophic bacteria. Soil and Plant Food. 6 (1960): 35 -39.

Parker, C. A. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in soil. Studies on Azotobacter. Aus. J. Agric. Res. 6 (1955): 388 - 397.

Patal, J. J. and Brown, M. E. Interactions of Azotobacter with rhizosphere and root-surface microflora. Plant and Soil. 31(1962): 273 - 280.

Porter, J. N. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv.Appl. Microbiol. 14(1971): 73-92

Quisspel, A. The biology of nitrogen fixation. New york: The Ronald Press Co,1974.

Rai, B. and Srivastava, A. K. Microbial decomposition of leaf litter as influcenced by fertilizers. Plant and soil. 66(1982): 195 - 204.

Rehacels, Z. Prevalence and distribution of antibiotic produting Actinomycrtes. Adv. Appl. Microbiol. 14(1971): 73 - 92.

Routien, J. B., and Finlay, A.C. Problems in the search for microorganism producing antibiotics. Bacteriol Rev. 16(1952): 57-67.

Rovira, A. D. plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. The nature of root-exodate form ost and peas. Plant and soil. 7 (1956) 178-194.

Stansly, P. G. A bacterial apparatus useful in searching for antibioic producing microorganism. J. bacteriol. 54 (1947): 443-445.

Stewart, W. D. P. Biological and ecological aspect of nitrogen fixation by free living organism. Proc. Roy. Soc. 172 (1969): 367-388.

Trolldenier, G. Influcence of some environmental factor on nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. Plant and soil. 4 (1977): 47.

Vanek, Z.; L. Dolezilova., And Rehacek, Z. Formation of mixture of antibiotic substances including antibiotics of a polygene character by stains of Actinomycetes freshly isolated from soil samples. J. Gen. Microbiol. 18 (1958): 649-657.

Virtanen, A. I. Investigations on nitrogen fixation by the alder. Associated culture of spruce and inoculated alder without combined nitrogen. Physoil. Plant. 10 (1957): 164-169.

Waksman, S. A. Species concept amoung the Actinomycetes with special reference to the genus Streptomyces. Bacteriol: Rev. 21 (1957): 1-29.

Went, J. C. and Jong, F. Decomposition of cellulose in soil. Antonic van. Leewenhock. 32 (1966): 39-56.

Williams, S. T. and Davies, P.L. Use of antibiotics for selective isolation and emumeration of Actinomycetes in soil. J. Gen Microbiol. 38 (1965): 251-261.

Wooddruff, H. B., and Mcdanial, L.E. Symp., Soc. Gen. Microbiol. The Actinomycetes: A sumary of current knowledge. New York: The Ronald Press Co. 1967.

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sodium caseinate agar

Sodium caseinate	2 กรัม
Glucose	1 กรัม
K_2HPO_4	0.2 กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2 กรัม
$FeSO_4 .7H_2O$	[Trace]
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH	7.0

2. MY agar [Lodder , 1970]

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Glucose	10 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH	7.0

3.GMP agar [Nimi et al ., 1976]

Glucose	15 กรัม
Polypeptone	6 กรัม
Meat extract	3 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
NaCl	5 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH	7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Czapek Agar

Sucrose	30 กรัม
Sodiumcitrat	3 กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.5 กรัม
KCl	0.5 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH	7.0

5.Malt extrace - Yeast extract broth

Bacto - yeast extract	4 กรัม
Bacto - malt extract	10 กรัม
Bacto - dextrose	4 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH	7.3

6. Yeast extrace - dextrose extract broth

Yeast extrace	20 กรัม
dextrose extract	20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

ตาราง MPN วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส

Probability Table for Determination of Abundance of Organisms in Soil

Code			X	P
10	10	10	100.0	100.0
10	10	9	23.0	36.7
10	10	8	16.2	30.2
10	10	7	12.0	26.2
10	10	6	9.18	25.0
10	10	5	7.02	24.2
10	10	4	5.42	23.4
10	10	3	4.28	21.7
10	10	2	3.49	17.3
10	10	1	2.75	10.2
10	7	5	1.95	0.20
10	7	4	1.74	0.80
10	7	3	1.53	2.57
10	7	2	1.33	6.17
10	7	1	1.16	10.01
10	7	0	1.01	9.33
10	6	6	1.75	0.01
10	6	5	1.57	0.08
10	6	4	1.41	0.11
10	6	3	1.25	0.59
10	3	0	.399	17.67
10	2	4	.621	0.01
10	2	3	.534	0.12
10	2	2	.456	0.99
10	2	1	.388	5.30
10	2	0	.329	18.14
10	1	3	.442	0.04
10	1	2	.376	0.60
10	1	1	.317	3.71
10	1	0	.275	15.14
9	2	3	.316	0.03
9	2	2	.284	0.26
9	2	1	.253	2.19
9	2	0	.223	9.53
9	1	2	.249	0.19
9	1	1	.221	1.84
9	1	0	.193	9.03
9	0	2	.217	0.07
9	0	1	.191	0.79
9	0	0	.164	5.02
7	5	1	.209	0.08
7	5	0	.191	0.16
7	4	2	.208	0.01
7	4	1	.188	0.12
7	4	0	.171	0.68
7	3	2	.188	0.03
7	3	1	.169	0.35
7	3	0	.152	2.44
7	3	0	.167	0.04
7	2	1	.150	0.78
6	0	2	.106	0.04
6	0	2	.092	0.83
6	0	0	.078	9.77
5	5	0	.126	0.04
5	4	1	.127	0.02
5	4	0	.114	0.14
5	3	1	.113	0.08
5	3	0	.100	0.79
5	2	2	.113	0.01
5	2	1	.099	0.28
3	3	2	.086	0.00
3	3	1	.075	0.02
3	3	0	.064	0.23
3	2	1	.064	0.08
3	2	0	.053	1.53
3	1	2	.064	0.01
3	1	1	.053	0.31
3	1	0	.043	7.09
3	0	2	.052	0.02
3	0	1	.042	.21

Code			X	P
10	10	0	2.40	3.4
10	9	9	6.07	0.01
10	9	8	5.26	0.04
10	9	7	4.58	0.27
10	9	6	3.98	0.85
10	9	5	3.46	2.25
10	9	4	2.96	4.80
10	9	3	2.63	8.57
10	9	2	2.28	11.77
10	9	1	1.97	11.02
10	6	3	1.25	0.59
10	6	2	1.09	2.73
10	6	1	0.933	8.42
10	6	0	0.792	10.73
10	5	5	1.30	0.02
10	5	4	1.15	0.14
10	5	3	1.02	0.91
10	5	2	0.872	3.30
10	5	1	0.742	8.94
10	5	0	0.622	12.68
10	0	2	.314	0.15
10	0	2	.268	1.44
10	0	0	.231	7.95
9	8	0	.499	0.03
9	7	1	.488	0.02
9	7	0	.435	0.17
9	6	2	.474	0.06
9	6	1	.425	0.23
9	6	0	.381	0.56
9	5	2	.416	0.10
8	6	0	.279	0.11
8	5	1	.267	0.11
8	5	0	.242	0.46
8	4	2	.266	0.04
8	4	1	.240	0.33
8	4	0	.217	1.47
8	3	2	.239	0.06
8	3	1	.214	0.77
8	3	0	.193	3.73
8	2	3	.233	0.01
7	2	0	.133	5.49
7	1	2	.149	0.08
7	1	1	.132	1.10
7	1	0	.116	8.98
7	0	2	.132	0.03
7	0	1	.116	0.80
7	0	0	.101	7.92
6	5	0	.155	0.08
6	4	2	.171	0.00
6	4	1	.155	0.04
5	2	0	.086	3.36
5	1	2	.099	0.03
5	1	1	.086	0.58
5	1	0	.073	8.28
5	0	2	.085	0.01
5	0	1	.072	0.79
5	0	0	.060	12.10
4	5	0	.106	0.02
4	4	0	.093	0.06
4	3	1	.092	0.03
3	0	0	.032	18.64
2	4	0	.092	0.02
2	3	0	.051	0.11
2	2	0	.041	3.95
2	1	1	.040	0.02
2	1	0	.030	6.01
2	0	2	.040	0.01
2	0	1	.030	0.41
2	0	0	.020	24.13
1	3	0	.025	0.04

Code			X	P
10	9	0	1.70	5.30
10	8	7	3.10	0.01
10	8	6	2.78	0.14
10	8	5	2.49	0.56
10	8	4	2.21	1.64
10	8	3	1.96	4.50
10	8	2	1.71	8.46
10	8	1	1.50	10.83
10	8	0	1.30	7.21
10	7	6	2.19	0.01
10	4	5	1.073	0.01
10	4	4	0.943	0.07
10	4	3	0.818	0.48
10	4	2	0.700	2.26
10	4	1	0.589	7.97
10	4	0	0.493	14.99
10	3	4	0.773	0.02
10	3	3	0.662	0.24
10	3	2	0.561	1.60
10	3	1	0.474	6.93
9	5	1	.372	0.86
9	5	0	.334	1.78
9	4	3	.408	0.02
9	4	2	.365	0.22
9	4	1	.324	1.13
9	4	0	.290	3.58
9	3	3	.362	0.04
9	3	2	.324	0.26
9	3	1	.288	1.77
9	3	0	.255	6.23
8	2	2	.210	0.14
8	2	1	.188	1.24
8	2	0	.169	7.12
8	1	2	.187	0.11
8	1	1	.166	1.46
8	1	0	.147	9.31
8	0	2	.166	0.00
8	0	1	.146	0.88
8	0	0	.128	6.41
7	5	0	.212	0.02
6	4	0	.139	0.32
6	3	2	.153	0.01
6	3	1	.138	0.20
6	3	0	.123	1.35
6	2	2	.137	0.03
6	2	1	.122	0.45
6	2	0	.107	4.12
6	1	2	.121	0.06
6	1	1	.106	0.87
6	1	0	.092	8.73
4	3	0	.080	0.43
4	2	1	.080	0.16
4	2	0	.068	2.16
4	1	2	.080	0.01
4	1	1	.068	0.50
4	1	0	.056	7.21
4	0	2	.067	0.02
4	0	1	.056	0.76
4	0	0	.045	14.62
2	4	0	.076	0.04
1	2	1	.038	0.02
1	2	0	.029	0.53
1	1	1	.028	0.12
1	1	0	.019	4.76
1	0	1	.019	0.34
1	0	0	.110	34.58
0	2	0	.018	0.21
0	1	1	.018	0.04
0	1	0	.009	3.05
0	0	1	.009	3.26

ภาคผนวก ค

สีย้อมเอนไซม์

สีย้อมADH

ADH 1	ethanol, absolute 100 %
ADH 2	Tris- HCl buffer 0.5 โมล, PH 8'5
ADH 3	beta - nicotinamidde adenine dinucleotide (NADP) ชั่ง 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 1 มิลลิลิตร
ADH 4	Nitroblue tetrazolium 0.1 กรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร
ADH 5	Phenazine metrosulfate 0.1 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร

ผสม ADH 1 0.25 มิลลิลิตร ADH 2 5 มิลลิลิตร ADH 3 1 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร แช่เย็นไว้ เมื่อจะย้อมสีให้เติม ADH 4 และ ADH 5 นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล 40 นาที

สีย้อมPER

Stock A	3-amino-9-ethylcarbazole	0.42 กรัม
	napthyl acid phosphate	0.29 กรัม
	acetone	200 มิลลิลิตร
Stock B	Tris	1.89 กรัม
	acetic acid	2.025 มิลลิลิตร
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1,250 มิลลิลิตร
Stock C	H_2O_2	30 %

ผสม Stock A: Stock B: Stock C ในอัตราส่วน 20:80:1

สีย้อมEST

Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100 มิลลิลิตร
Fast blue BB salt	0.15 กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nepthyl acetate	3 มิลลิลิตร

สีย้อมMDH

Tris- HCl 0.0825 โมล ย์ 9	40 มิลลิลิตร
PMS 0.00326 โมล	1.3 มิลลิลิตร
NAD 0.003 โมล	5.3 มิลลิลิตร
$MgCl_2 6H_2$	0.3 กรัม
MTT 0.0096 โมล	2.5 มิลลิลิตร
DL-malic acid	60.0 มิลลิกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ค่า sample correlation coefficient (r) เป็นค่าที่วัดความสัมพันธ์แบบเส้นตรงค่า r จะมีค่าอยู่ระหว่าง -1 และ +1 ถ้า r มีค่าเท่ากับ +1 หรือเท่ากับ +1 แสดงว่าทั้งสองสัมพันธ์กันมาก คือ ถ้าข้อมูลหนึ่งเปลี่ยนอีกข้อมูลจะเปลี่ยนตาม (ในกรณีนี้คือถ้าข้อมูลกายภาพเปลี่ยนข้อมูลปริมาณจุลินทรีย์ก็เปลี่ยนตาม) แต่ถ้า r มีค่าเท่ากับ -1หรือ เกือบเท่า -1 แสดงว่าทั้งสองข้อมูลมีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกัน คือถ้าข้อมูลหนึ่งเพิ่มอีกข้อมูลหนึ่งจะลดลง ถ้า r มีค่าเท่ากับ 0 หรือใกล้ 0 แสดงว่าข้อมูล 2 ชุดนั้ไม่มีความสัมพันธ์กันเลย

ค่า sample correlation coefficient (r) คิดโดย Microsolf excel function

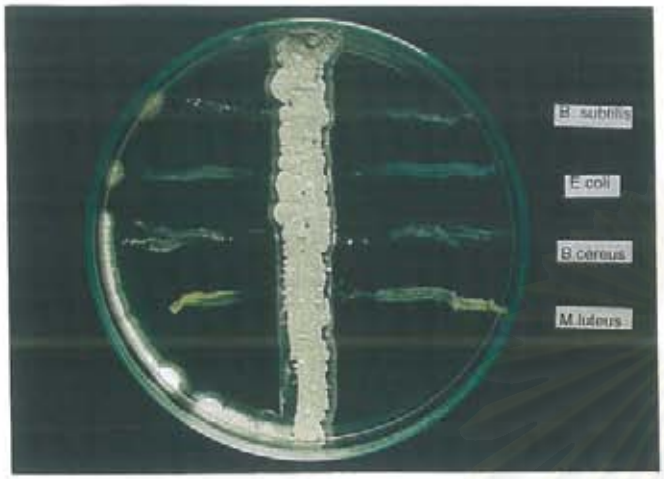
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ กับปริมาณแบคทีเรีย r=0.380139
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น กับปริมาณแบคทีเรีย r=0.089334
ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเป็นกรด-ด่าง กับปริมาณแบคทีเรีย r= -0.085121

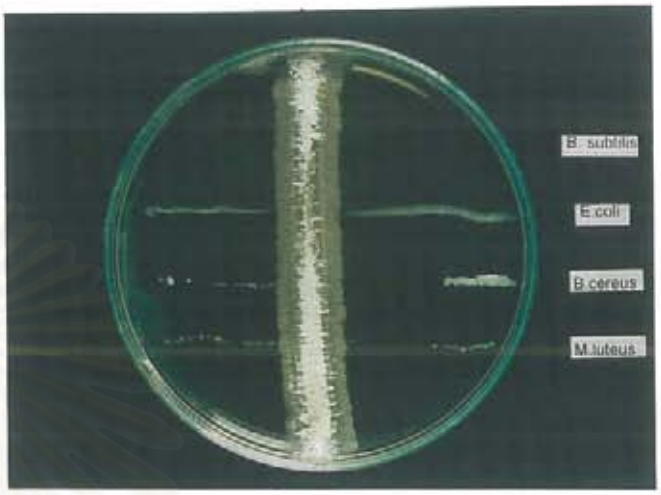
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ กับปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส r=0.675322
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น กับปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส r= - 0.400901
ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเป็นกรด-ด่าง กับปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส r= - 0.126774

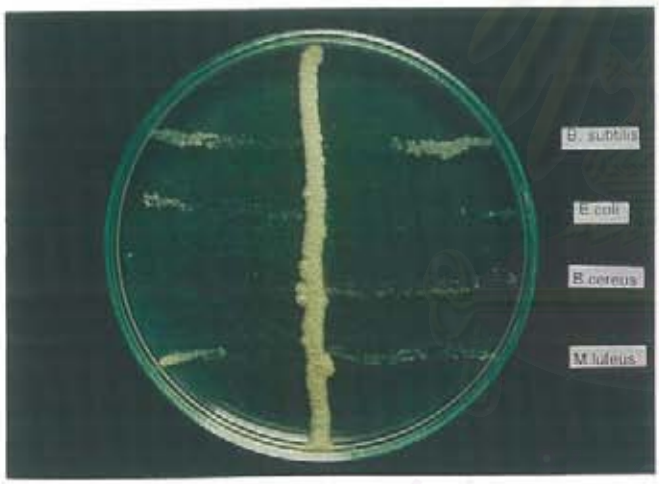
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ กับปริมาณแอคติโนมัยซีส r=0.54387
ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น กับปริมาณแอคติโนมัยซีส r=- 0.173179
ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเป็นกรด-ด่าง กับปริมาณแอคติโนมัยซีส r=- 0.53541

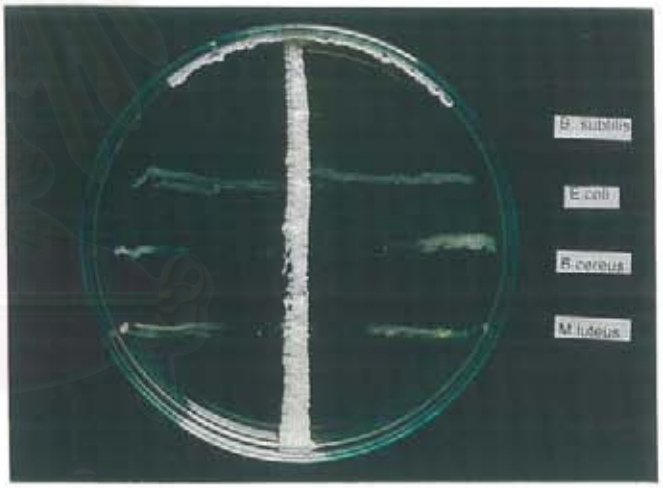
ภาคผนวก จ

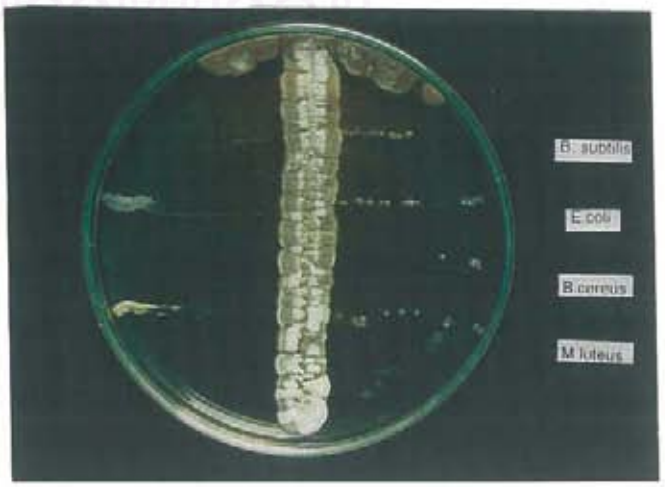
ภาพแสดงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์โดยแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากพื้นที่โครงการฯ



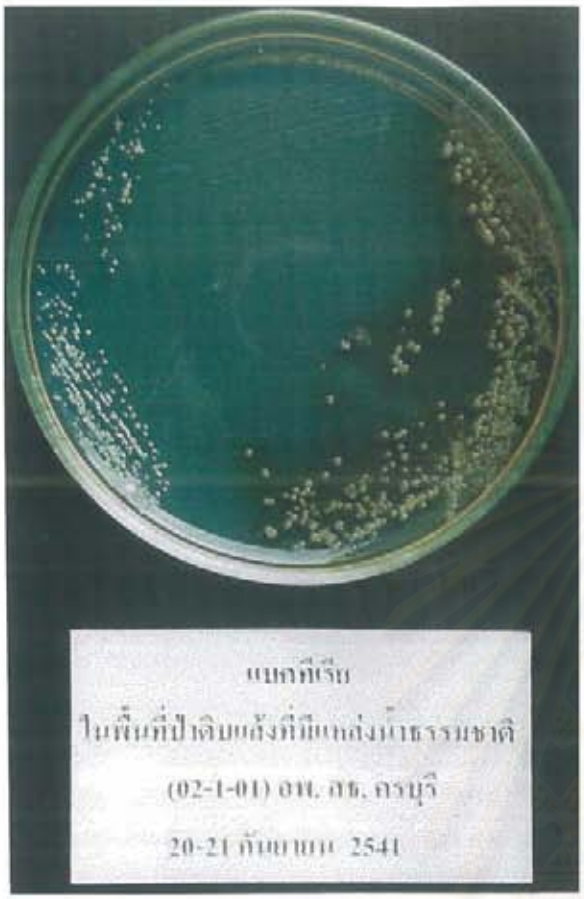








โคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากพื้นที่โครงการฯ



ประวัติผู้วิจัย

นางสาววิสา ฉิมน้อย เกิดเมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม 2511 มีภูมิลำเนาอยู่ที่ อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อในสาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 ปัจจุบันรับราชการครู โรงเรียนลำปลายมาศ อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ ในสังกัดกรมสามัญศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย