

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเฟส

จากการทดลองได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงเพาะปลูกซึ่งมีประวัติการใช้สารไกลโฟเฟสจากแหล่งต่างๆ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเฟส โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรที่มีการใช้สารไกลโฟเฟสจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ สวนลำไย สวนหอม ไร่ข้าวโพด สวนมะม่วง สวนส้ม และไร่มันฝรั่ง (ภาคผนวก ก) แล้วทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยการเจือจางเป็นลำดับแล้วเกลี่ย (spread plate) บนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่มีสารไกลโฟเฟสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินทั้งหมด 6 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลท (ตาราง 6) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารไกลโฟเฟสในระดับห้องปฏิบัติการในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 6 จำนวนแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเฟสที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน 6 แหล่ง

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ
1	สวนลำไย ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	LMC1, LMC2, LMC3, LMC4, LMC5
2	สวนหอม ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	3	OMC1, OMC2, OMC3
3	ไร่ข้าวโพด ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	4	CMC1, CMC2, CMC3, CMC4
4	สวนมะม่วง ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	5	MMC1, MMC2, MMC3, MMC4, MMC5

ตาราง 6 (ต่อ)

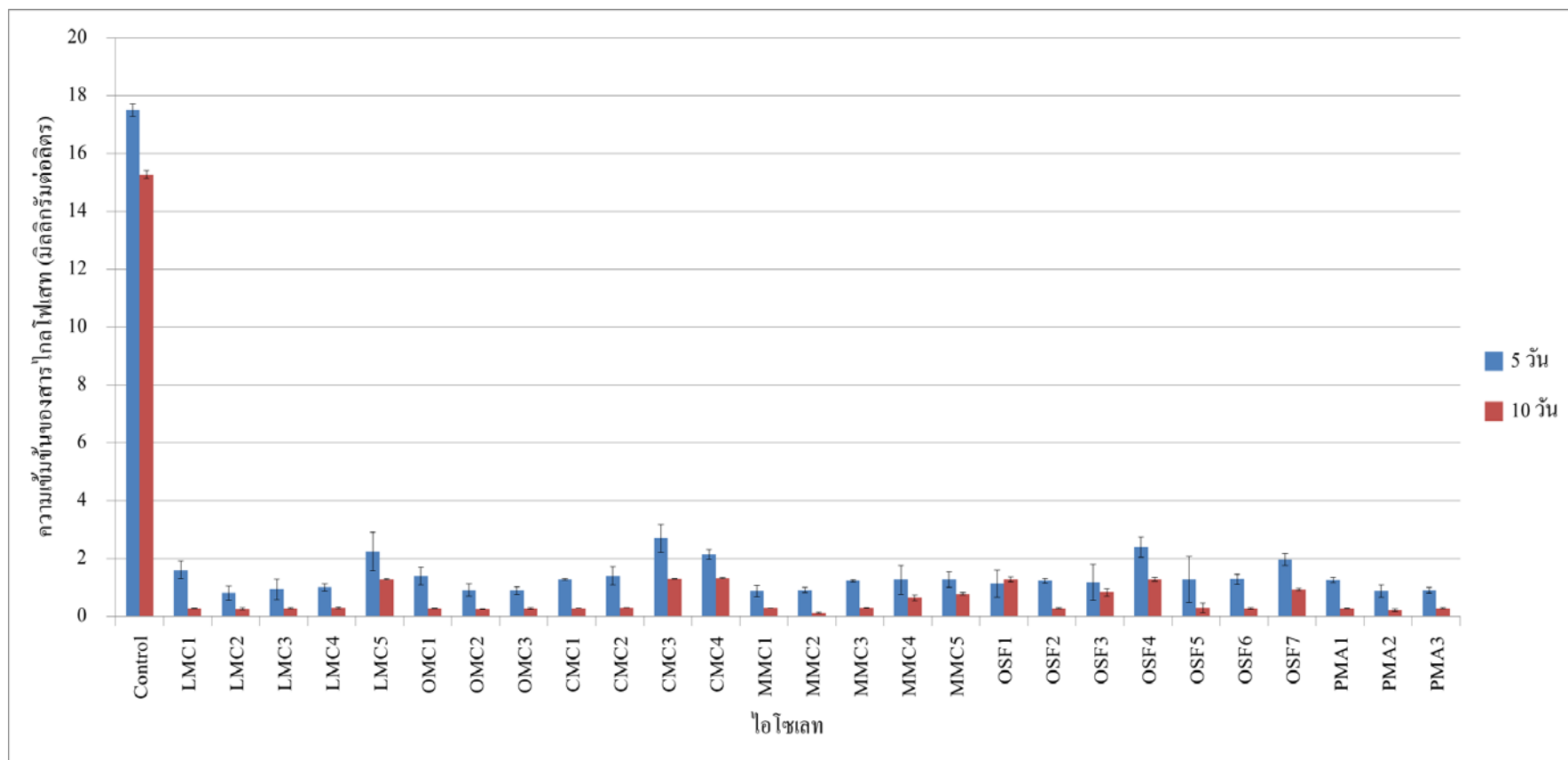
ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ
5	สวนส้ม ต.สันทราย อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	7	OSF1, OSF2, OSF3, OSF4, OSF5, OSF6, OSF7
6	ไร่มันฝรั่ง ต.แม่สาว อ.แม่อาว จ.เชียงใหม่	3	PMA1, PMA2, PMA3

นำแบคทีเรียทั้ง 27 ไอโซเลท มาทำการศึกษาลักษณะของโคโลนีเพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรีย จากการศึกษาลักษณะของโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 27 ไอโซเลท พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะขอบโคโลนี และลักษณะผิวหน้าของโคโลนีที่แตกต่างกันดังตารางผนวก 1

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรียโดยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน มีการเรียงจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว และเรียงต่อกันเป็นเส้นสายหรือโซ่ ส่วนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และจัดตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน (ตารางผนวก 2)

2. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโพลีเอทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองได้นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโพลีเอทในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเติมสารไกลโพลีเอทลงไปในอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบข้างต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเขย่าบน shaker เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารไกลโพลีเอทที่เหลือด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโพลีเอทพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโพลีเอทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ระยะเวลา 5 วัน ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 สามารถย่อยสลายสารไกลโพลีเอทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลืออยู่ 0.80 0.90 และ 0.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่ระยะเวลา 10 วัน ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 สามารถย่อยสลายสารไกลโพลีเอทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลืออยู่ 0.25 0.12 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 6) จากการศึกษาของ Bazot and Lebeau (2008) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียในธรรมชาติสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของสารไกลโพลีเอทซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายหรือลดความเป็นพิษของสารไกลโพลีเอทให้น้อยลง และได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษทางชีวภาพพบว่า *Pseudomonas* 4ASW มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโพลีเอทให้ลดลงได้ และ Shinabarger and Braymer (1984) พบว่า *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยสารไกลโพลีเอทเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้มีรายงานวิจัยของ Pipke and Amrhein (1988) ที่พบว่า *Arthrobacter atrocyaneus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งที่มีสารไกลโพลีเอทเนื่องจากแบคทีเรียใช้สารไกลโพลีเอทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ทั้งนี้สารไกลโพลีเอทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่แบคทีเรียบางสายพันธุ์ใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตได้ (Balthazor and Hallas, 1986; Quinn *et al.*, 1988)



ภาพ 6 ความเพิ่มขึ้นของสารโกลโฟเซทจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยไอโซเลท MMC2 LMC2 และ PMA2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทมากที่สุด เท่ากับ 97.44 97.37 และ 97.30 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งชุดควบคุม (control) มีสารไกลโฟเสทลดลงน้อยที่สุด เท่ากับ 18.10 เปอร์เซนต์ (ตาราง 7) จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Moneke *et al.* (2010) ที่ได้กล่าวว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถทนต่อความเป็นพิษของสารไกลโฟเสทได้และเจริญเติบโตได้โดยใช้สารไกลโฟเสทเป็นแหล่งอาหาร และจากรายงานวิจัยของ Inna *et al.* (2010) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ได้แก่ *Achromobacter* sp. และ *Ochrobactrum anthropic* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ 65.8 และ 49.5 เปอร์เซนต์

ตาราง 7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 27 ไอโซเลท (เปอร์เซนต์)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซนต์)
Control	18.10 ^G
LMC1	95.34 ^{ABC}
LMC2	97.37 ^A
LMC3	97.00 ^{AB}
LMC4	96.77 ^{AB}
LMC5	91.18 ^{EF}
OMC1	95.85 ^{ABC}
OMC2	97.14 ^{AB}
OMC3	97.11 ^{AB}
CMC1	96.14 ^{AB}
CMC2	95.80 ^{ABC}
CMC3	90.50 ^F

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)
CMC4	91.38 ^{EF}
MMC1	97.11 ^{AB}
MMC2	97.44 ^A
MMC3	96.22 ^{AB}
MMC4	95.26 ^{ABC}
MMC5	94.89 ^{BC}
OSF1	93.99 ^{CD}
OSF2	96.26 ^{AB}
OSF3	96.37 ^{AB}
OSF4	90.84 ^{EF}
OSF5	96.13 ^{AB}
OSF6	96.12 ^{AB}
OSF7	92.80 ^{DF}
PMA1	96.21 ^{AB}
PMA2	97.30 ^A
PMA3	97.08 ^{AB}
F-test	*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

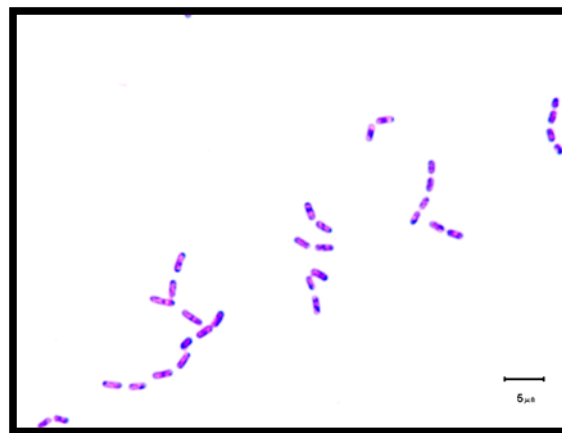
จากข้อมูลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโกลโฟเสทของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารโกลโฟเสทได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ LMC2 MMC2 และ PMA2 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 3 ไอโซเลท พบว่ามีลักษณะดังนี้

3.1 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีกลม (circular) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าเกลี้ยง (smooth) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีเป็นท่อน มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ดัดลิ่มวงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 7)



(ก)



(ข)

ภาพ 7 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิค

การย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

3.2 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ริมขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าขรุขระ (rough) เนื้อโคโลนีเป็นเมือกเหนียว (mucoid) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นท่อนยาว มีการเรียงตัวกระจายตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ติดสีม่วงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 8)



(ก)



(ข)

ภาพ 8 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิค

การย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย

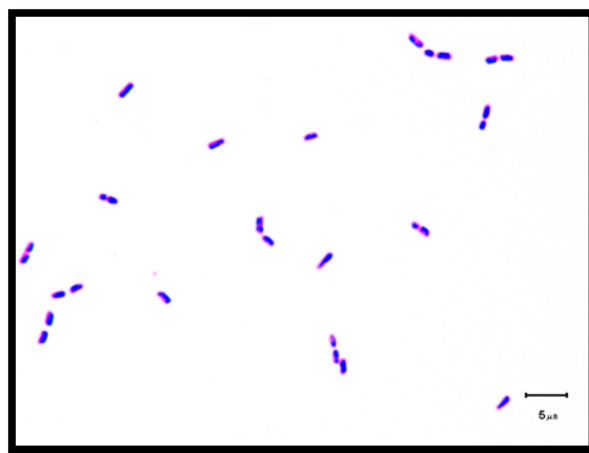
1000 เท่า

3.3 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีขุ่น (opaque) ลักษณะของโคโลนีกลม (circular) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ระดับความสูงของโคโลนีโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) ผิวหน้าเกลี้ยง (smooth) และเมื่อใช้เทคนิคการย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นท่อน มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายหรือเป็นสายโซ่ ติดสีม่วงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพ 9)



(ก)



(ข)

ภาพ 9 ลักษณะของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

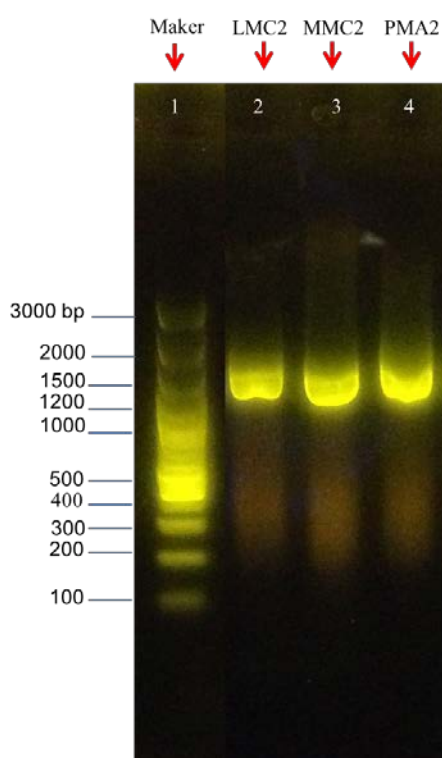
(ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 บนอาหาร tryptic soy agar (TSA)

(ข) รูปร่างการติดสีของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 อายุ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิค

การย้อมสีแบบแกรม (gram's staining) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลิโพลีเพปไทด์ดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (PureLink™ Genomic DNA Kit) และนำ genomic DNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ universal primer 1 คู่ คือ 27F และ 1522R จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พบว่า PCR product ทั้ง 3 ไอโซเลท มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส (ภาพ 10)



ภาพ 10 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA

- หมายเหตุ Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
- Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R
- Lane 3 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R
- Lane 4 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 27F และ 1522R

นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA แล้วนำลำดับเบสที่ได้จาก primer ทั้ง 1 คู่ ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 ไปสร้าง contig ในโปรแกรม BioEdit พบว่า ไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 มีลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่จะนำไปเปรียบเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้มาจากการนำ primer 1 คู่ คือ 27F และ 1522R ไปเปรียบเทียบกัน ในโปรแกรม BioEdit ดังภาพ 11 12 และ 13 ตามลำดับ

```
AACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGG
GAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGGTGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACT
GGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCCTTCGG
GGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCAT
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
ACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA
```

ภาพ 11 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACT
 GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATG
 GTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
 GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
 GCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
 ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
 ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGC
 GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
 AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCT
 TCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAT
 CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
 ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTT
 GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATT

ภาพ 12 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท MMC2

GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
 CTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCA
 TGGTTCAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT
 GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
 AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGG
 GAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGGA
 AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAA
 GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAAG
 CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
 AGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
 CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCC
 TTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA
 ACCCTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
 GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
 TTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGA
 TT

ภาพ 13 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PMA2

จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ผลดังนี้คือ แบคทีเรียไอโซเลท LMC2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus megaterium* 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 14) แบคทีเรียไอโซเลท MMC2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus subtilis* 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 15) และแบคทีเรียไอโซเลท PMA2 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Bacillus cereus* 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8 และภาพ 16) เนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิสูง และเจริญในสภาวะฟิเอช ช่วงกว้างตั้งแต่ 2-11 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (บัวสาย และคณะ, 2556)

ตาราง 8 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 และ PMA2 โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ไอโซเลท	แบคทีเรีย	accession number	identities	% homology
LMC2	<i>Bacillus megaterium</i>	KF475802.1	1422/1422	100
MMC2	<i>Bacillus subtilis</i>	KF636528.1	1422/1422	100
PMA2	<i>Bacillus cereus</i>	KF601957.1	1422/1422	99

Bacillus megaterium strain IHB B 4625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|KF475802.1](#) Length: 1519 Number of Matches: 1

Range 1: 64 to 1485		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
2627 bits(1422)	0.0	1422/1422(100%)		0/1422(0%)	Plus/Plus
Query 1		AACTGATTAGAAGCTTGTCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA			60
Sbjct 64		AACTGATTAGAAGCTTGTCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA			123
Query 61		ACCTGCCCTGTAAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTC			120
Sbjct 124		ACCTGCCCTGTAAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTC			183
Query 121		TCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCATTACAGATGGGCCCCGCGGT			180
Sbjct 184		TCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCATTACAGATGGGCCCCGCGGT			243
Query 181		GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGA			240
Sbjct 244		GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGA			303
Query 241		GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG			300
Sbjct 304		GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG			363
Query 301		GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGCTT			360
Sbjct 364		GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGCTT			423
Query 361		TCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAACCTGCTCGTACCTT			420
Sbjct 424		TCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAACCTGCTCGTACCTT			483
Query 421		GACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAG			480
Sbjct 484		GACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAG			543
Query 481		GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT			540
Sbjct 544		GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT			603
Query 541		GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCA			600
Sbjct 604		GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCA			663
Query 601		GAAGAGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC			660
Sbjct 664		GAAGAGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC			723
Query 661		AGTGGCGAAGCGCGCTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA			720
Sbjct 724		AGTGGCGAAGCGCGCTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA			783
Query 721		AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG			780
Sbjct 784		AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG			843
Query 781		TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGC			840
Sbjct 844		TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGC			903
Query 841		AAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA			900
Sbjct 904		AAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA			963
Query 901		TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAG			960
Sbjct 964		TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAG			1023
Query 961		AGCGTTCCTCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGAGCTCGTGTCTG			1020
Sbjct 1024		AGCGTTCCTCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGAGCTCGTGTCTG			1083
Query 1021		TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTA			1080
Sbjct 1084		TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTA			1143
Query 1081		GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA			1140
Sbjct 1144		GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA			1203
Query 1141		TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGATGGTACAAAGGGCTG			1200
Sbjct 1204		TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGATGGTACAAAGGGCTG			1263
Query 1201		CAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA			1260
Sbjct 1264		CAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA			1323
Query 1261		ACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC			1320
Sbjct 1324		ACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC			1383
Query 1321		GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGTCG		1422	1380
Sbjct 1384		GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGTCG			1443
Query 1381		GTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA		1422	
Sbjct 1444		GTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA		1485	

ภาพ 14 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลท LMC2

Bacillus subtilis strain BC18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF636528.1](#) Length: 1513 Number of Matches: 1

Range 1: 56 to 1483		GenBank	Graphics			Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand		
2638 bits(1428)	0.0	1428/1428(100%)		0/1428(0%)	Plus/Plus		
Query 1		GCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGT			60		
Sbjct 56		GCGGACAGATGGGAGCTTGCCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGT			115		
Query 61		AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT			120		
Sbjct 116		AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT			175		
Query 121		GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG			180		
Sbjct 176		GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG			235		
Query 181		CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG			240		
Sbjct 236		CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG			295		
Query 241		AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA			300		
Sbjct 296		AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA			355		
Query 301		GGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTATGAAGGTT			360		
Sbjct 356		GGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTATGAAGGTT			415		
Query 361		TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACC			420		
Sbjct 416		TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACC			475		
Query 421		TTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT			480		
Sbjct 476		TTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT			535		
Query 481		AGGTGGCAAGCGTTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT			540		
Sbjct 536		AGGTGGCAAGCGTTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT			595		
Query 541		CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTG			600		
Sbjct 596		CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTG			655		
Query 601		CAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA			660		
Sbjct 656		CAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA			715		
Query 661		CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG			720		
Sbjct 716		CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG			775		
Query 721		CGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTATAGGG			780		
Sbjct 776		CGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTATAGGG			835		
Query 781		GGTTTCCGCCCTTAGTGTCTGAGCTAACGCTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTC			840		
Sbjct 836		GGTTTCCGCCCTTAGTGTCTGAGCTAACGCTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTC			895		
Query 841		GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT			900		
Sbjct 896		GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT			955		
Query 901		AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGGACATCCTCTGACAACTCTAGAGAT			960		
Sbjct 956		AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGGACATCCTCTGACAACTCTAGAGAT			1015		
Query 961		AGGACGTCCTCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG			1020		
Sbjct 1016		AGGACGTCCTCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG			1075		
Query 1021		TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGAATCTTAGTTGCCAGCAITCA			1080		
Sbjct 1076		TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGAATCTTAGTTGCCAGCAITCA			1135		
Query 1081		GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA			1140		
Sbjct 1136		GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA			1195		
Query 1141		TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAG			1200		
Sbjct 1196		TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAG			1255		
Query 1201		CGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA			1260		
Sbjct 1256		CGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA			1315		
Query 1261		ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC			1320		
Sbjct 1316		ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC			1375		
Query 1321		GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGTCG			1380		
Sbjct 1376		GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGGAAGTCG			1435		
Query 1381		GTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATT		1428			
Sbjct 1436		GTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATT		1483			

ภาพ 15 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้

โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลต MMC2

Bacillus cereus strain SBTBC-008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF601957.1|](#) Length: 1557 Number of Matches: 1Range 1: 69 to 1498 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2619 bits(1418)	0.0	1427/1431(99%)	1/1431(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG	60		
Sbjct 69	GCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG	128		
Query 61	GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT	120		
Sbjct 129	GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT	188		
Query 121	TTGAACCGCATGGTTCAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC	180		
Sbjct 189	TTGAACCGCATGGTTCAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC	248		
Query 181	GTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG	240		
Sbjct 249	GTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG	308		
Query 241	AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	300		
Sbjct 309	AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	368		
Query 301	TAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAATGATGAAG	360		
Sbjct 369	TAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAATGATGAAG	428		
Query 361	CTTTCGGGTGTAAGAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCA	420		
Sbjct 429	CTTTCGGGTGTAAGAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCA	488		
Query 421	CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	480		
Sbjct 489	CCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	548		
Query 481	GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA	540		
Sbjct 549	GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA	608		
Query 541	GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG	600		
Sbjct 609	GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG	668		
Query 601	TGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATATGGAGGAA	660		
Sbjct 669	TGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATATGGAGGAA	728		
Query 661	CACCAAGTGGCGAAGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG	720		
Sbjct 729	CACCAAGTGGCGAAGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG	788		
Query 721	AGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTAG	780		
Sbjct 789	AGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTAG	848		
Query 781	AGGGTTTCGCGCCTTTAGTGTGTAAGTTAACGCAITTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG	840		
Sbjct 849	AGGGTTTCGCGCCTTTAGTGTGTAAGTTAACGCAITTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG	908		
Query 841	CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT	900		
Sbjct 909	CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT	968		
Query 901	TTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAG	960		
Sbjct 969	TTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAG	1028		
Query 961	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCAGCTCGTGT	1020		
Sbjct 1029	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCAGCTCGTGT	1088		
Query 1021	CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCAIT	1080		
Sbjct 1089	CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCAIT	1148		
Query 1081	AAGTTGGGCACICTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA	1140		
Sbjct 1149	AAGTTGGGCACICTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA	1208		
Query 1141	AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGC	1200		
Sbjct 1209	AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGC	1268		
Query 1201	TGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCCCTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG	1260		
Sbjct 1269	TGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCCCTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG	1328		
Query 1261	CAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT	1320		
Sbjct 1329	CAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT	1388		
Query 1321	ACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT	1380		
Sbjct 1389	ACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT	1448		
Query 1381	CGGTGGGGTAACTTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATT	1431		
Sbjct 1449	CGGTGGGGTAACTTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATT	1498		

ภาพ 16 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้

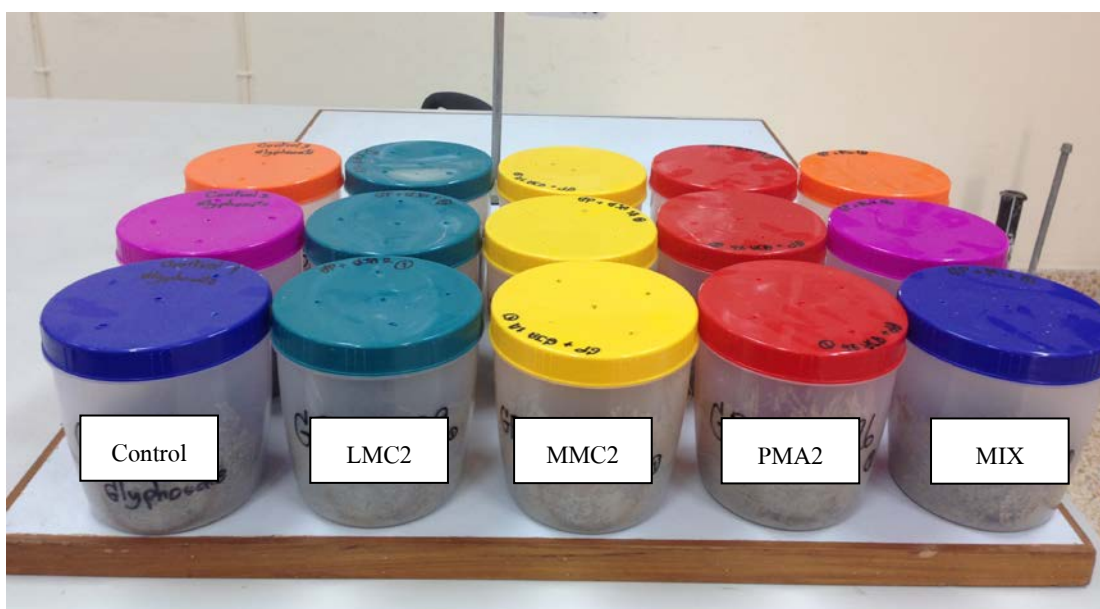
โปรแกรม BLAST ของแบคทีเรียไอโซเลต PMA2

6. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินด้วยแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ได้แก่

- ดินเติมสารไกลโฟเสท (Control)
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ LMC2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ MMC2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อ PMA2
- ดินเติมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX)

แต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างมาสกัดเพื่อหาความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เป็นระยะเวลา 0-10 วัน (ภาพ 17) ผลการทดลองพบว่า ดินที่เติมสารไกลโฟเสท (Control) มีอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทช้าเนื่องจากไม่ได้เติมแบคทีเรียเพื่อช่วยในการย่อยสลาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท LMC2 MMC2 PMA2 และดินเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผสมกัน (MIX) จะเห็นได้ว่าสารไกลโฟเสทมีอัตราการลดลงเร็วกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้



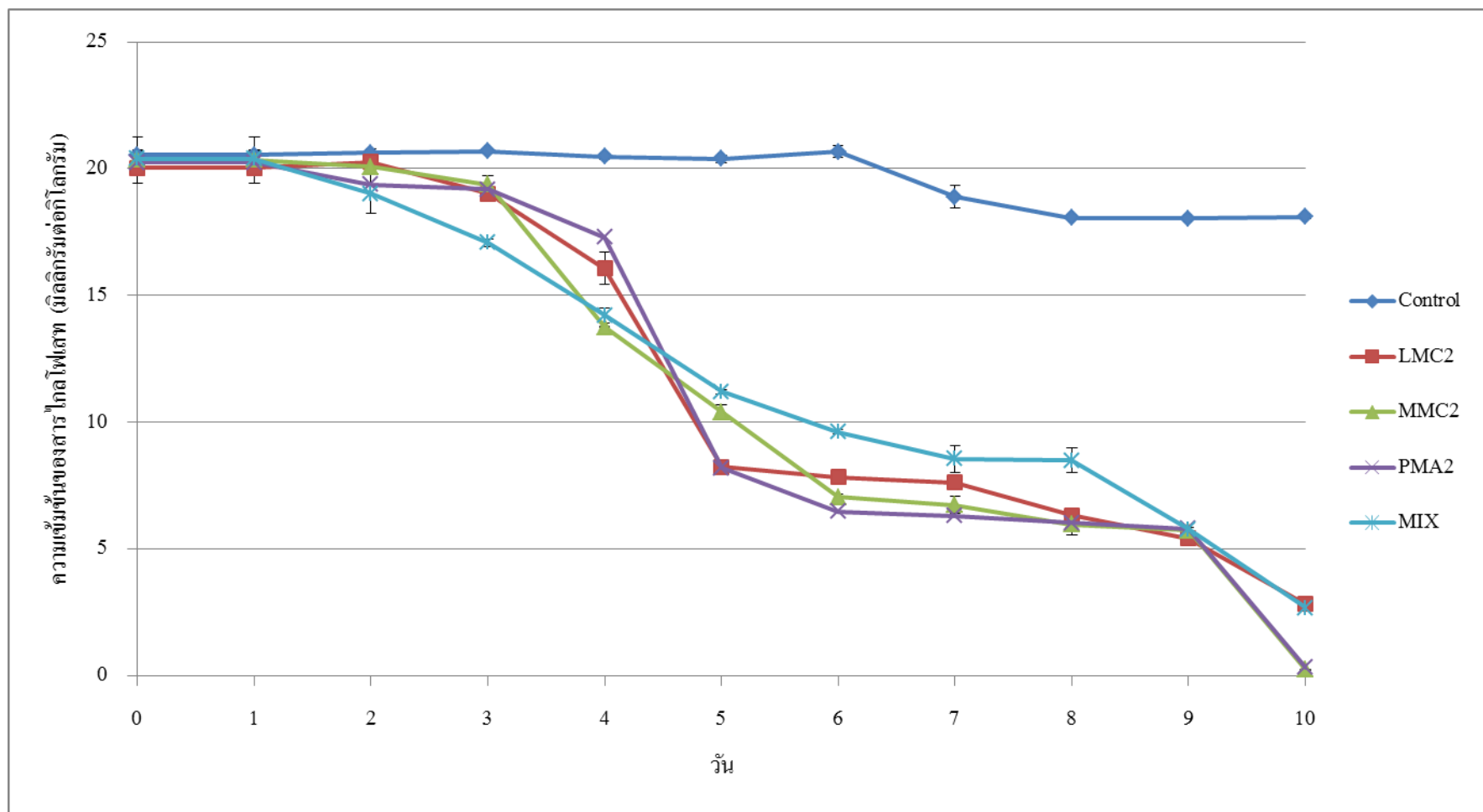
ภาพ 17 ตัวอย่างดินที่มีการเติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแบคทีเรียที่คัดแยก ได้แก่ ไอโซเลท LMC2 MMC2 PMA2 และ MIX

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดิน ทั้ง 5 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 0-10 วัน พบว่าในช่วงระยะเวลา 0-1 วัน ยังไม่พบอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทที่ชัดเจน แต่หลังจากช่วงระยะเวลา 2-10 วัน จะเห็นว่าอัตราการลดลงของสารไกลโฟเสทเริ่มชัดเจนมากขึ้นเริ่ม ซึ่งที่ระยะเวลา 10 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 1 ดินเดิมสารไกลโฟเสท (Control) สารไกลโฟเสทจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหลืออยู่ 18.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 15)

ชุดการทดลองที่ 2 ดินเดิมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท LMC2 (*Bacillus megaterium*) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 2.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 16)

ชุดการทดลองที่ 3 ดินเดิมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท MMC2 (*Bacillus subtilis*) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 0.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพผนวก 17)

ชุดการทดลองที่ 4 ดินเดิมสารไกลโฟเสทและไอโซเลท PMA2 (*Bacillus cereus*) และชุดการทดลองที่ 5 ดินเดิมสารไกลโฟเสทและเชื้อผสม (MIX) (ภาพผนวก 18 และ 19) สามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินจากความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้เหลืออยู่ 0.30 และ 2.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ภาพ 18)



ภาพ 18 ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทในดินจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test พบว่าแต่ละชุดการทดลองมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

โดยชุดการทดลองที่ 3 ดินเดมิสสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์และไอโซเลท MMC2 (*Bacillus subtilis*) และชุดการทดลองที่ 4 ดินเดมิสสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์และไอโซเลท PMA2 (*Bacillus cereus*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุดเท่ากับ 98.84 และ 98.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 5 ดินเดมิสสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์และเชื้อผสม (MIX) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 86.69 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 ดินเดมิสสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์และไอโซเลท LMC2 (*Bacillus megaterium*) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 85.94 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 1 ดินเดมิสสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ (Control) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์น้อยที่สุดเท่ากับ 9.53 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 9) จากผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Marie-Esther *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบแล้วพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากใช้สารไกลโคโพลีแซคคาไรด์เป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ รวมถึงรายงานวิจัยของ Jieyu *et al.* (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ที่ปนเปื้อนในดิน พบว่า *Bacillus cereus* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ผลการทดลองพบว่า *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ 94.47 เปอร์เซ็นต์ และ Abdel -Megeed *et al.* (2013) กล่าวว่า *Bacillus megaterium* สามารถย่อยสลายสารไกลโคโพลีแซคคาไรด์ ทั้งนี้เกิดจากการปรับตัวให้อยู่รอดโดยใช้สารไกลโคโพลีแซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

ตาราง 9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสทในดินของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ชุดทดลอง	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไกลโฟเสท (เปอร์เซ็นต์)
Control	9.53 ^D
LMC2	85.94 ^C
MMC2	98.84 ^A
PMA2	98.46 ^A
Mix	86.69 ^B
F-test	*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์