

สารบัญ

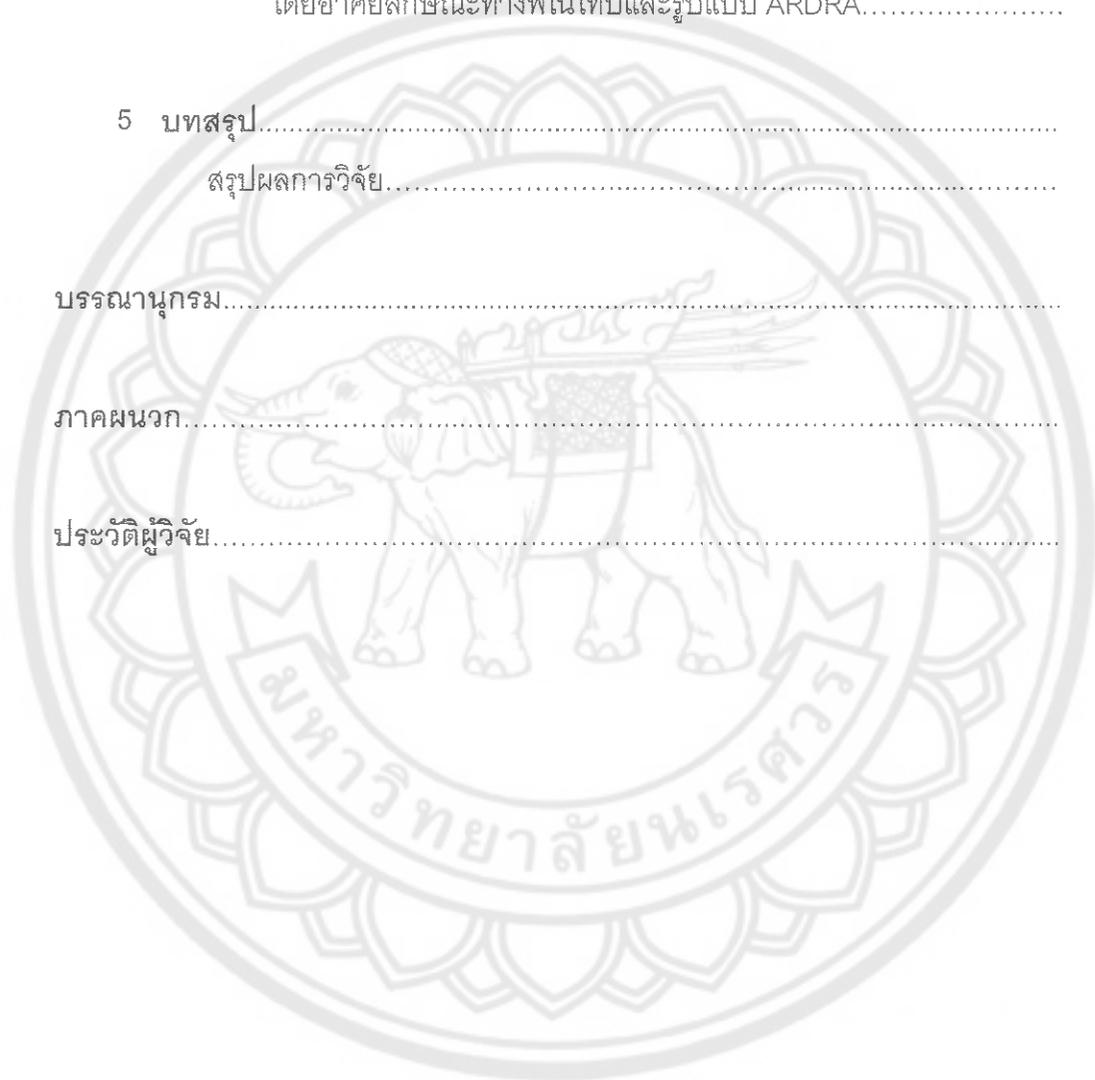
บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ชีววิทยาของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก...	3
การจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์	
เจริญในสภาวะแอโรบิก.....	4
การจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก	6
การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม.....	7
การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและไฟโลจีนี.....	14
การจัดจำแนกโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S	
rRNA genes หรือ SSU rDNA.....	14
การจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค Amplified Ribosomal DNA	
Restriction Analysis.....	17
การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิกอุทธาน	
แห่งชาติแก่งกระจาน.....	24
อุทธานแห่งชาติแก่งกระจาน.....	25
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	26
แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง.....	27
ระเบียบวิธีวิจัย.....	27

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
	การเก็บตัวอย่างดิน (Soil sampling)..... 28
	การตรวจนับจำนวน และการคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก..... 28
	การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม หรืออนุกรมวิธาน แบบนิวมเมอริคัล (Numerical taxonomy)..... 29
	การจัดกลุ่มและจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญใน สภาวะแอโรบิก โดยใช้เทคนิค Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)..... 34
	การสร้างรูปแบบ ARDRA จากการทดลอง..... 36
	การสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี..... 38
	การทดสอบความใช้ได้ของเทคนิค ARDRA..... 39
4	ผลการวิจัย..... 41
	การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดิน..... 41
	การคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก..... 42
	การจัดจำแนกแบคทีเรียตามหลักอนุกรมวิธานแบบนิวมเมอริคัล 49
	การจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค ARDRA..... 61
	การเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบ ARDRA จากการทดลองกับรูปแบบ ARDRA (Comparison between experimental and theoretical ARDRA patterns)..... 61
	การทำซ้ำได้ของเทคนิค ARDRA (Reproducibility of the combined ARDRA technique)..... 65
	การจัดกลุ่มสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ที่เจริญใน สภาวะแอโรบิก โดยอาศัยรูปแบบ ARDRA (Applicability of combined ARDRA profiles in bacterial phylogeny and taxonomy)..... 69

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัยลักษณะทางพีโนไทป์และรูปแบบ ARDRA.....	82
5 บทสรุป.....	94
สรุปผลการวิจัย.....	94
บรรณานุกรม.....	95
ภาคผนวก.....	102
ประวัติผู้วิจัย.....	111



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะ แอโรบิก.....	4
2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญใน สภาวะแอโรบิก.....	9
3 แสดงการพัฒนาวิธีจัดจำแนกและการจัดหมวดหมู่ที่มีการเปลี่ยนแปลง ของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก.....	22
4 แสดงจำนวนแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ในดินค่าพีเอชและความชื้นของดิน.....	41
5 จุดเก็บและการกำหนดชื่อตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัย.....	42
6 แสดงรหัสและจำนวนของสายพันธุ์แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญ ในสภาวะแอโรบิก คัดแยกจากดินป่าดิบแล้ง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน....	43
7 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี เซลล์และเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย รูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกที่คัดแยกจากดิน ป่าดิบแล้ง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน.....	45
8 แสดงข้อมูลของการทดสอบ test error.....	51
9 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก 13 กลุ่ม.....	52
10 แสดงผลการจัดกลุ่มแบคทีเรีย เป็นกลุ่มพีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี.....	59
11 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA ตามทฤษฎี กับผลจากการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง.....	64
12 แสดงจำนวนและขนาด DNA fragment ของ 16S rDNA ของ <i>B. cereus</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HhaI</i> จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis ในเวลาแตกต่างกัน.....	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
13 แสดงกลุ่มรูปแบบ ARDRA ที่แตกต่างกันจากการตัดชิ้นส่วนของ 16S rDNA ขนาด 1500 bp ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด.....	73
14 แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบในแต่ละกลุ่มรูปแบบ ARDRA.....	74
15 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบที่ได้จากการทดลอง กับ restriction fragment ของ <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> และ <i>B. simplex</i> type strain ตามทฤษฎี.....	74
16 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA จากการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับ restriction fragment ของ <i>P. polymyxa</i> และ <i>L. fusiformis</i> ตามทฤษฎีที่ได้จากฐานข้อมูล ออนไลน์.....	77
17 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ที่แยกได้จากดินตัวอย่างของอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน โดยอาศัย ลักษณะทางพีโนไทป์และรูปแบบ ARDRA.....	84

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงลำดับขั้นของพัฒนาการด้านอนุกรมวิธานของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก.....	7
2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะ แอโรบิก ตามหลักการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม; (a), แผนผังการจัด จำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย; (b), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย I; (c), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย II/1; (d), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่ม ย่อย II/2 ที่ให้ผล nitrate reduction เป็นบวก; (e), แผนผังการจัดจำแนก กลุ่มย่อย II/2 ที่ให้ผล nitrate reduction เป็นลบ.....	11
3 แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA genes หรือ SSU rDNA.....	15
4 แสดงการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์เจริญได้ในสภาวะ แอโรบิก โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	16
5 แสดงประสิทธิภาพของเทคนิค DNA fingerprints ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ในลำดับอนุกรมวิธานที่แตกต่างกัน.....	18
6 แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยเทคนิค ARDRA.....	20
7 แสดง dendrogram ของการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก สกุล <i>Aneurinibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> และ <i>Paenibacillus</i> โดยใช้เทคนิค ARDRA ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HaeIII</i> , <i>DpnII</i> , <i>RsaI</i> , <i>BfaI</i> และ <i>Tru9I</i>	21
8 แสดง phylogenetic tree ของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์เจริญใน สภาวะแอโรบิก.....	22
9 ระเบียบวิธีวิจัยโดยสรุป.....	27
10 แสดงขั้นตอนการวัดค่าพีเอชของตัวอย่างดินโดยใช้เครื่องวัดพีเอช.....	28
11 กระบวนการในการทดสอบ Test error.....	31
12 แสดงตัวอย่างการป้อนข้อมูลดิบลงในโปรแกรมสถิติ SPSS.....	32

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
13	แสดงตัวอย่างการเลือกค่าในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนด้วยค่าสัมประสิทธิ์ S_{SM} และจัดกลุ่มด้วย UPGMA.....	33
14	แสดง proximity matrix และ dendrogram ที่ใช้เทียบเคียงและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยอาศัยคุณสมบัติทางพีโนไทป์.....	33
15	แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค ARDRA.....	35
16	แสดงขั้นตอนการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA ด้วยโปรแกรม GelCompar และโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS.....	38
17	แสดงขั้นตอนการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป RestrictionMapper ในการสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี การจัดเก็บข้อมูลรวมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS.....	39
18	แสดงขั้นตอนในการทดสอบการทำซ้ำได้ของเทคนิค ARDRA.....	40
19	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน จากการใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_{SM} ของการจัดกลุ่มลักษณะทางพีโนไทป์ด้วย UPGMA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับข้อมูลอ้างอิงที่เกี่ยวข้องจาก Priest, et al.....	53
20	แสดงผลการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก แยกจากดินป่าดิบแล้งอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน.....	54
21	แสดงการจัดจำแนกชนิด <i>L. fusiformis</i> และ <i>L. sphaericus</i> ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนร่วมกับแผนผังการจัดจำแนกของ Reva, et al.....	55
22	แสดงการจัดจำแนกชนิด <i>B. cereus</i> & related sp. ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนร่วมกับแผนผังการจัดจำแนกของ Reva, et al.....	56
23	แสดงรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (a) <i>A</i> ₁ <i>u</i> ₁ restriction profiles (b) <i>H</i> _h <i>a</i> ₁ restriction profiles (c) <i>M</i> _b <i>o</i> ₁ restriction profiles (d) <i>M</i> _s <i>p</i> ₁ restriction profiles (e) <i>R</i> _s <i>a</i> ₁ restriction profiles; lane M, 50 bp; lane 1, <i>B. cereus</i> ; lane 2, <i>B. megaterium</i> ; lane 3, <i>B. subtilis</i> ; land 4, <i>Ps. Aeruginosa</i>	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ

หน้า

- 24 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ combined ARDRA โดยใช้ค่า
สัมประสิทธิ์ S_0 และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป
SPSS จากการ match band type; 1, *B. cereus* ตามทฤษฎี;
2, *B. cereus* จากการทดลอง1; 3, *B. cereus* จากการทดลอง2;
4, *B. megaterium* ตามทฤษฎี; 5, *B. megaterium* จากการทดลอง1;
6, *B. megaterium* จากการทดลอง2; 7, *B. subtilis* ตามทฤษฎี; 8, *B.*
subtilis จากการทดลอง1; 9, *B. subtilis* จากการทดลอง 2..... 65
- 25 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ combined ARDRA โดยใช้
ค่าสัมประสิทธิ์ S_0 และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar
จากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียโดยการต้มและการสกัดดีเอ็นเอ
โดยใช้ชุด kit; 1, *B. cereus* (boil1); 2, *B. cereus* (boil2); 3, *B. cereus*
(kit); 4, *B. megaterium* (boil1); 5, *B. megaterium* (boil2); 6, *B.*
megaterium (kit); 7, *B. subtilis* (boil1); 8, *B. subtilis* (boil2); 9, *B.*
subtilis (kit); 10, *Ps. aeruginosa*; 11, *E. Coli*..... 66
- 26 แสดง Dendrogram ของรูปแบบ combined ARDRA จากการรวมกันของ
restriction pattern ที่ได้จากเอนไซม์ *AluI*, *HhaI*, *MboI*, *MspI* และ *RsaI*
คำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_0 และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วย
โปรแกรม GelCompar; lane M, 50 bp DNA leader..... 67
- 27 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์
 S_0 และจัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS จาก
การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ *B. cereus* โดยการต้ม ซึ่งทำการวิเคราะห์โดย
เทคนิค gel electrophoresis ในเวลาที่แตกต่างกัน; 1-4 แสดงหมายเลข
เจล ที่กำหนดการวิเคราะห์ในเวลาที่แตกต่างกัน..... 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
28 แสดงรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบจากตัวแทนของกลุ่มต่างๆ (a) กลุ่มของรูปแบบ combined ARDRA ทั้ง 6 กลุ่มที่แตกต่างกัน (b) <i>AluI</i> restriction profiles (c) <i>HhaI</i> restriction profiles (d) <i>MboI</i> restriction profiles (e) <i>MspI</i> restriction profiles (f) <i>RsaI</i> restriction profiles; lane M, 50 bp; lane 1, G1/1; lane 2, G1/2; lane 3, G2; lane 4, G4; lane 5, G9; lane 6, G3; lane 7, G5; lane 8, G6/1; lane 9, G6/2; lane 10, G10; lane 11, G11; lane 12, G8; lane 13, G7	70
29 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนจากการ combine ของรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS.....	79
30 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน จาก combination ของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar จากตัวแทนของกลุ่มสายพันธุ์ทดสอบต่าง; 1, G1/1; 2, G1/2; 3, G2; 4, G4; 5, G9; 6, G3; 7, G5; 8, G6/1; 9, G6/2; 10, G10; 11, G11; 12, G8; 13, G7; 14, <i>Ps. aeruginosa</i> ; 15, <i>E. coli</i>	80
31 แสดง Dendrogram จากcombination ของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar จากตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบต่างๆ.....	81
32 การจัดหมวดหมู่ด้วย combined รูปแบบ ARDRA และ phylogenetic tree จาก 16S rDNA sequencing.....	88
33 การจัดหมวดหมู่ด้วย phylogenetic tree จาก 16S rDNA sequencing ของ <i>Bacillus cereus</i> & related sp.....	89
34 แสดงตัวอย่างโครงร่างวิธีการในการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> กลุ่มชนิดที่จำแนกยากด้วย unique nucleotide signatures.....	90

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพ

หน้า

- 35 แสดง Dendrogram การจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อน
สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัยลักษณะทางพีโน
ไทป์และ combined รูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_0 และจัด
กลุ่มด้วย UPGMA..... 91
- 36 แสดง Dendrogram การจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อน
สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัยลักษณะทางพีโน
ไทป์และ combine ของ ARDRA profiles ทั้ง 5 เอนไซม์ โดยใช้ค่า
สัมประสิทธิ์ S_0 และจัดกลุ่มด้วย UPGMA อ้างอิงตามกลุ่ม *Bacillus*
rRNA groups ของ Ash, et al. (a) สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลอง (b)
ARDRA profiles จาก Heydrickx, et al..... 92