

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อยพันธุ์อุทอง 3 อ้อยป่า และอ้อยเขียวพันธุ์มะลิขาท รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NFA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสายพันธุ์อ้อยและส่วนต่างๆ ของอ้อยที่ใช้ในการศึกษามีผลต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ซ) โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากการเพิ่มจำนวนในอาหาร NFB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยรวมจากส่วนใบ ลำต้นและรากมีมากที่สุดในอ้อยเขียว (C34M) และอ้อยพันธุ์อุทอง 3 (AT3) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาในแต่ละส่วนของอ้อยที่ใช้ในการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียโดยเฉลี่ยในส่วนใบและลำต้นมีมากกว่าในส่วนราก (ตาราง 2)

ตาราง 2 ปริมาณแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย หลังจากการเพิ่มจำนวนในอาหาร NFB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พันธุ์อ้อย	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Log CFU ต่อกรัมน้ำหนักสด)			เฉลี่ย
	ใบ (L)	ลำต้น (S)	ราก (R)	
อ้อยพันธุ์อุทอง 3 (AT3)	7.10	7.04	7.21	7.12a
อ้อยเขียว (C2H)	7.04	6.94	7.04	7.02abc
อ้อยเขียว (C7H)	7.17	7.11	7.03	7.10ab
อ้อยเขียว (C32M)	7.12	7.08	7.02	7.07ab
อ้อยเขียว (C34M)	7.16	7.17	7.07	7.13a
อ้อยเขียว (C13L)	7.06	7.00	6.95	7.00bc
อ้อยเขียว (C15L)	7.15	7.02	6.91	7.03abc
อ้อยป่า (W1)	6.96	6.88	6.94	6.93cd
อ้อยป่า (W2)	6.90	6.87	6.86	6.88d
เฉลี่ย	7.07a	7.02ab	7.00b	

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรชนิดเดียวไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 0.05 ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test

การแยกแบคทีเรียจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย จากตัวอย่างอ้อยพันธุ์อุทุมพร 3 อ้อยป่า และอ้อยเคี้ยวพันธุ์มะลิชาท โดยอาศัยรูปร่าง สี การสร้างเมือกและลักษณะของโคโลนีที่มีความแตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NFA สามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 89 ไอโซเลท (ตาราง 3) พบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างเมือก โคโลนีใส สีขาว ขาวขุ่น หรือเหลืองอ่อน การทดสอบด้วย 3% KOH พบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 71% และแกรมบวก 29%

ตาราง 3 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย

พันธุ์อ้อย	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียเอนโดไฟท์			รวม
	ใบ (L)	ลำต้น (S)	ราก (R)	
อ้อยพันธุ์อุทุมพร 3 (AT3)	4	3	6	13
อ้อยเคี้ยว (C2H)	3	3	4	10
อ้อยเคี้ยว (C7H)	5	4	3	12
อ้อยเคี้ยว (C32M)	3	3	3	9
อ้อยเคี้ยว (C34M)	4	3	3	10
อ้อยเคี้ยว (C13L)	3	3	2	8
อ้อยเคี้ยว (C15L)	2	2	2	6
อ้อยป่า (W1)	4	4	3	11
อ้อยป่า (W2)	3	4	3	10
รวม	31	29	29	89

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียที่เลี้ยงในโตรเจนในระดับจีโนม

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาจำแนกชนิดในระดับจีโนมโดยอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ได้แก่ การตรวจสอบลักษณะต่างๆ ของโคโลนี ที่เจริญบนอาหาร nitrogen free agar (NFA), potato dextrose agar (PDA), nutrient agar (NA) และ glucose yeast extract calcium carbonate (GYC) การดิสแกรม ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งการทดสอบ catalase test, oxidase test, indole production test, methyl red – voges proskauer test (MR-VP test), motility test, starch hydrolysis และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิด ได้แก่ น้ำตาล glucose, mannitol, rhamnose และ arabinose การตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ พบแบคทีเรียลักษณะคล้ายจีโนม *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthobacter*, *Staphylococcus* และ *Bacillus* จำนวน 9, 8, 5, 2, 2 และ 15 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตาราง 4) รวมทั้งยังไม่สามารถระบุจีโนมได้จำนวน 48 ไอโซเลต

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต C32ML2, C32MR2, C34ML2, C13LL2, C13LS1, C15LL2, C15LR1, W1L4 และ W2S4 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (ภาพ 1) สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ oxidase และ catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ ไม่สามารถย่อยแป้งได้ ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจีโนม *Pseudomonas*

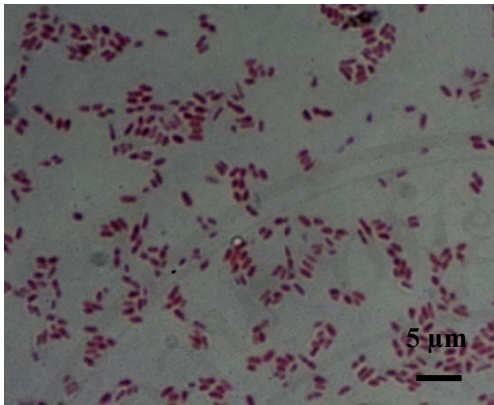
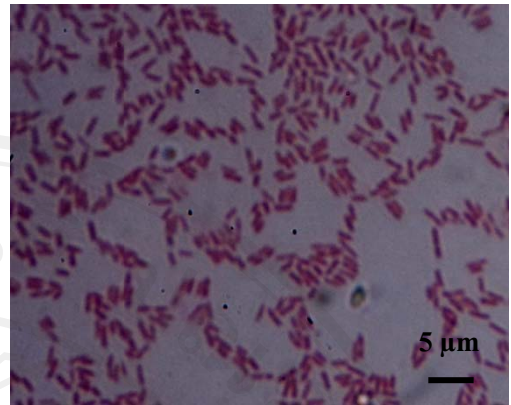
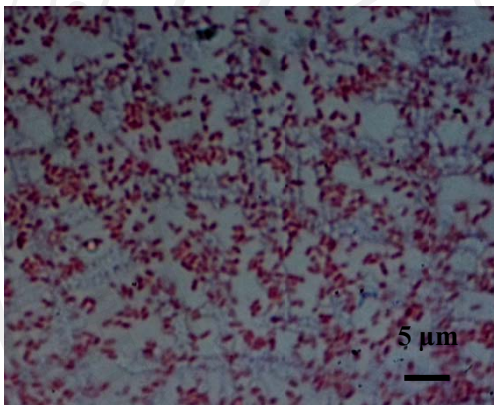
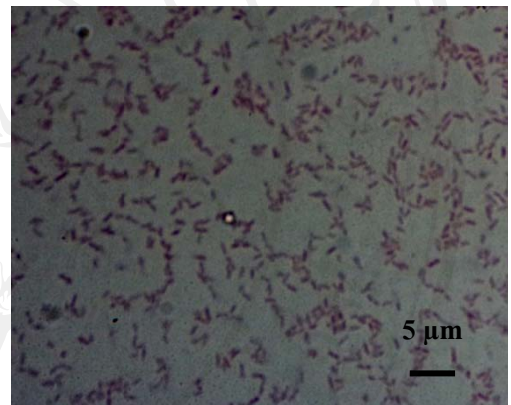
เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AT3S1, C7HR1, C32MS1, C32MR1, C34ML1, C34MS1, C34MS2 และ W2S1 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น (ภาพ 1) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ MR เป็นลบ VP เป็นบวก สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose ได้ รวมทั้งสามารถใช้น้ำตาล glucose, mannitol, rhamnose และ arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจีโนม *Klebsiella*

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต C32MS3, C13LS2, C15LS2, W1R2 และ W2R1 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (ภาพ 1) สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ และ catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ MR เป็นลบ VP เป็นบวก สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล glucose ได้ รวมทั้งสามารถใช้น้ำตาล glucose, mannitol, rhamnose และ arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจีโนม *Enterobacter*

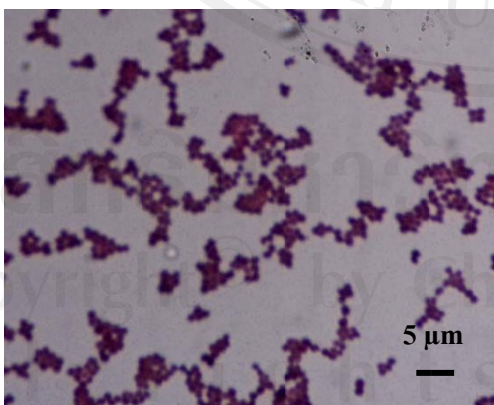
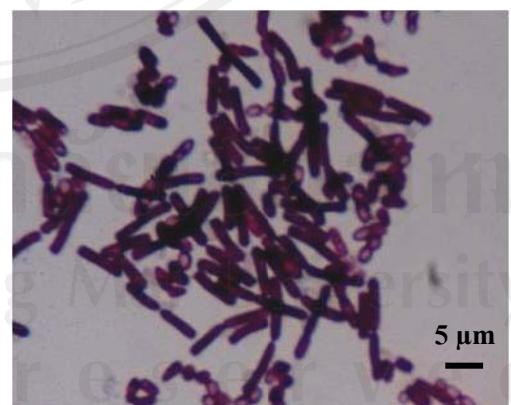
เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท AT3L3 และ W1S4 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (ภาพ 1) โคโลนีเป็นสีเหลืองเข้ม มีเมือก สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ oxidase เป็นบวก catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจินัส *Xanthobacter*

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C2HS3 และ C2HR1 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม (ภาพ 2) ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจินัส *Staphylococcus*

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท AT3L4, AT3R6, C7HL2, C32ML3, C34ML4, C34MR3, C13LL1, C13LS3, C13LR1, C15LL1, C15LS1, W1L1, W1S2, W2S2 และ W2R2 จากการทดสอบด้วย 3% KOH และการย้อมสีแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่งขนาดใหญ่ (ภาพ 2) โคโลนีบนอาหาร NFA เป็นสีขาว แต่เป็นสีน้ำตาลบนอาหาร NA ผลการทดสอบ oxidase เป็นลบและ catalase เป็นบวก indole production เป็นลบ สามารถย่อยแป้งได้ ลักษณะคล้ายแบคทีเรียในจินัส *Bacillus*

*Pseudomonas**Klebsiella**Enterobacter**Xanthobacter*

ภาพ 1 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียแกรมลบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

*Staphylococcus**Bacillus*

ภาพ 2 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ตาราง 4 จินัสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบบริเวณตำแหน่งใบ ลำต้น และรากของอ้อย

พันธุ์อ้อย	จินัสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์		
	ใบ (L)	ลำต้น (S)	ราก (R)
อ้อยพันธุ์อุทอง3 (AT3)	<i>Xanthobacter</i> <i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus</i>
อ้อยเคี้ยว (C2H)		<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
อ้อยเคี้ยว (C7H)	<i>Bacillus</i>		<i>Klebsiella</i>
อ้อยเคี้ยว (C32M)	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas</i>
อ้อยเคี้ยว (C34M)	<i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus</i>
อ้อยเคี้ยว (C13L)	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
อ้อยเคี้ยว (C15L)	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
อ้อยป่า (W1)	<i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthobacter</i> <i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
อ้อยป่า (W2)	<i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Bacillus</i>

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร NFA ทั้งหมด 89 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) และตรวจสอบด้วยเครื่อง Gas chromatograph series 750 Flame Ionization Detection พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกัน (ภาคผนวก ก) และได้คัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสค่อนข้างสูงในการทดลองนี้ โดยคัดเลือกได้จากجينัส *Pseudomonas* จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ *Pseudomonas* (C32ML2) และจากไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุجينัสได้จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 สำหรับศึกษาต่อไป

4. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยวิธี acetylene reduction assay เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่คัดเลือก

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก ได้แก่ *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 ไปทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยเปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01 และ 0.05% หลังจากฉีดก๊าซ acetylene (C_2H_2) และบ่มที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ที่เกิดขึ้นโดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) และคำนวณประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในหน่วย nmol C_2H_4 /mg protein/h พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท C2HL2 ที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มี yeast extract ปริมาณ 0.005% มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุดเท่ากับ 403.8 nmol C_2H_4 /mg protein/h รองลงมาคือ ไอโซเลท C2HL2 ที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.01% ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเท่ากับ 354.1 และ 320.9 nmol C_2H_4 /mg protein/h ตามลำดับ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มี yeast extract ปริมาณ 0.05% จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยลง (ตาราง 5)

ตาราง 5 กิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีนีสที่ความเข้มข้นของ yeast extract ในระดับที่แตกต่างกัน

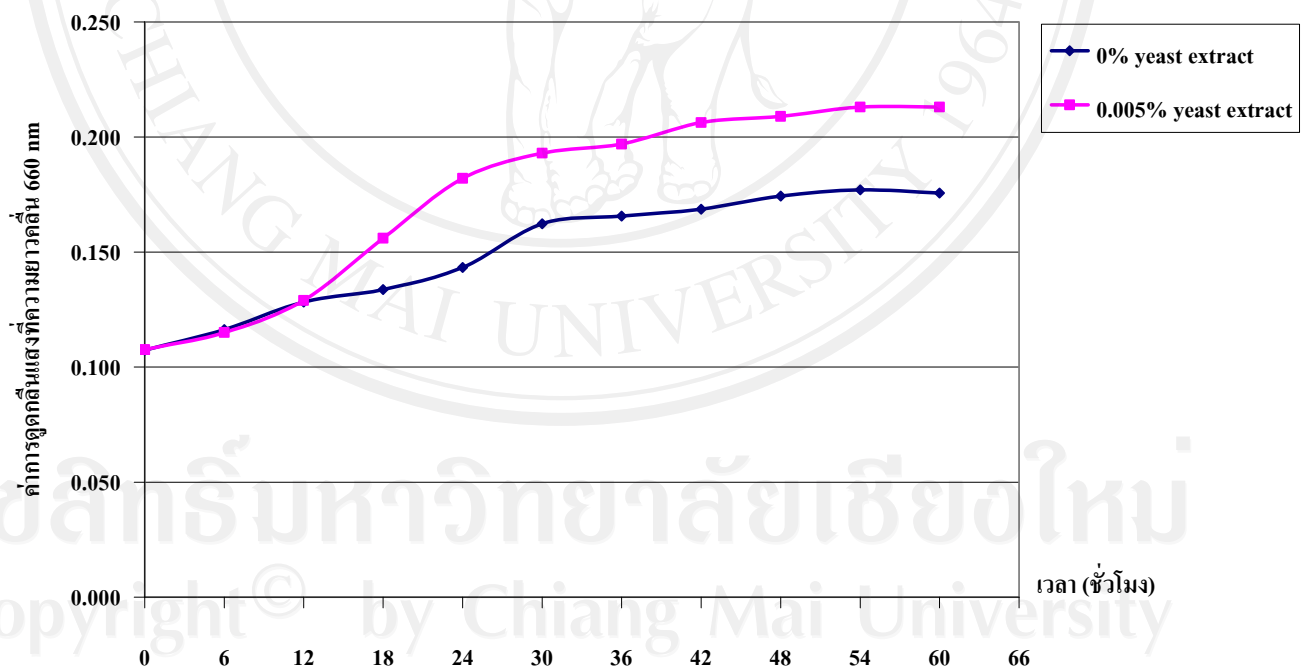
ไอโซเลต	ARA (nmol/mg protein/h) ที่ความเข้มข้นของ yeast extract 4 ระดับ			
	0%	0.005%	0.01%	0.05%
C32ML2	81.8e	69.3ef	13.2g	8.8g
AT3R1	52.9f	22.1g	15.1g	6.5g
C2HL2	354.1b	403.8a	320.9c	23.6g
C7HL1	22.5g	208.7d	9.6g	9.4g
C34MR1	23.0g	24.1g	15.4g	5.6g

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรชนิดเดียวไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 0.05 ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test

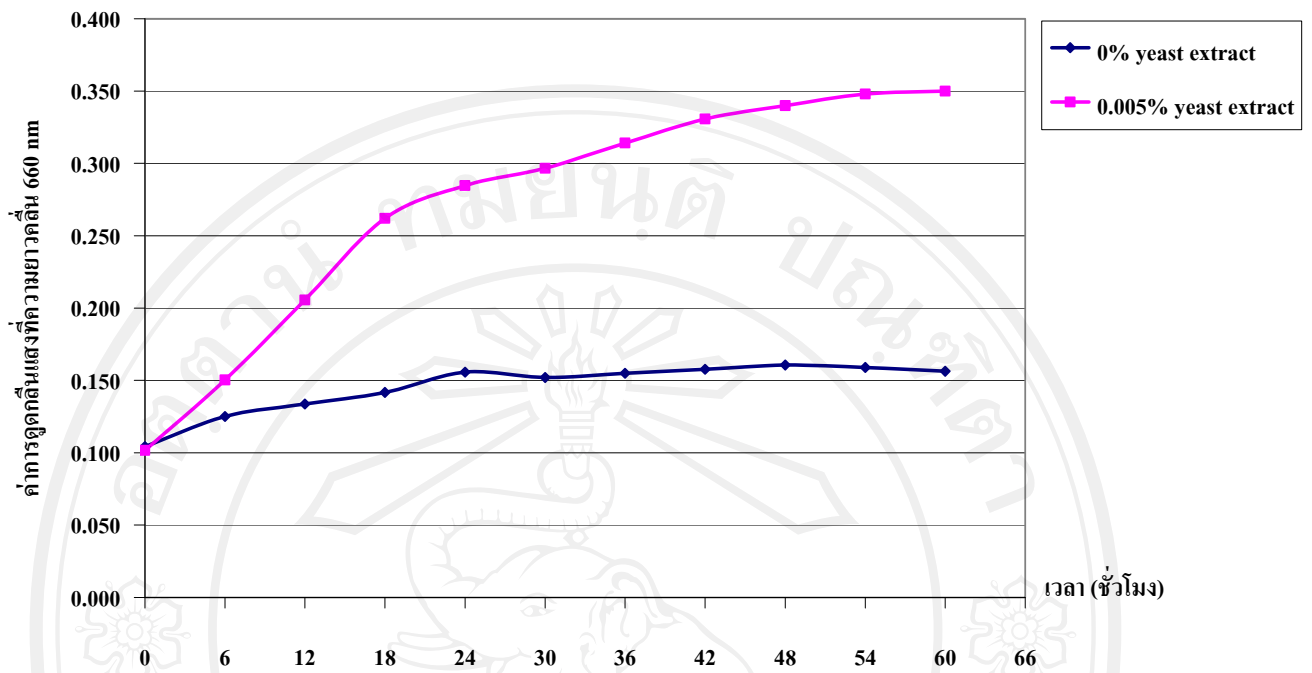
AT3R1	แบคทีเรียไอโซเลตที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนรากของอ้อยพันธุ์อุทอง 3
C2HL2	แบคทีเรียไอโซเลตที่ 2 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณสูงเท่ากับ 21.1 SPAD units
C7HL1	แบคทีเรียไอโซเลตที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณสูงเท่ากับ 26.2 SPAD units
C32ML2	แบคทีเรียไอโซเลตที่ 2 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณปานกลางเท่ากับ 18.7 SPAD units
C34MR1	แบคทีเรียไอโซเลตที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนรากของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณปานกลางเท่ากับ 18.1 SPAD units

5. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจน

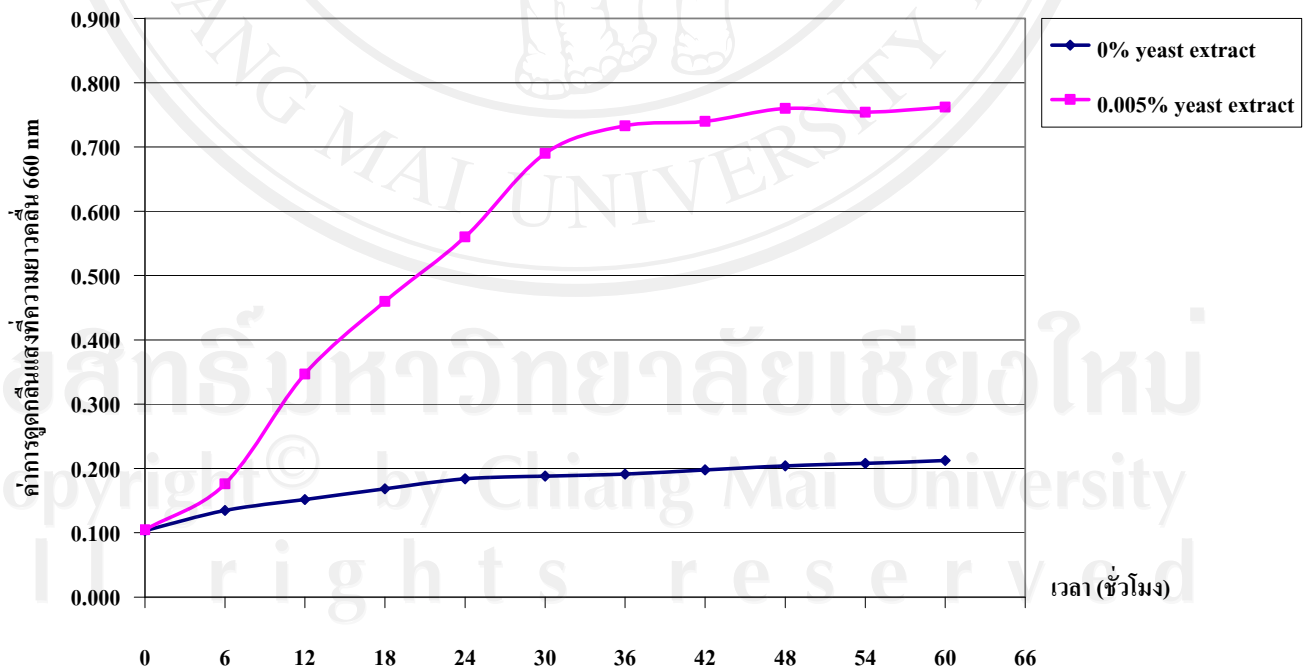
จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 ในอาหาร NFB ที่มีปริมาณ yeast extract สองระดับ คือ 0% และ 0.005% โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 60 พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทเจริญเติบโตค่อนข้างช้าในอาหาร NFB ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลท C34MR1 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลท C2HL2, *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1 และ C7HL1 รวมทั้งพบว่า yeast extract ปริมาณ 0.005% ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทุกไอโซเลท เนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NFB ที่เติม yeast extract ปริมาณ 0.005% มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NFB ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลท C2HL2 และ C34MR1 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ ไอโซเลท AT3R1, C7HL1 และ *Pseudomonas* (C32ML2) แบบแผนการเจริญเติบโต (ภาพ 3 - 7)



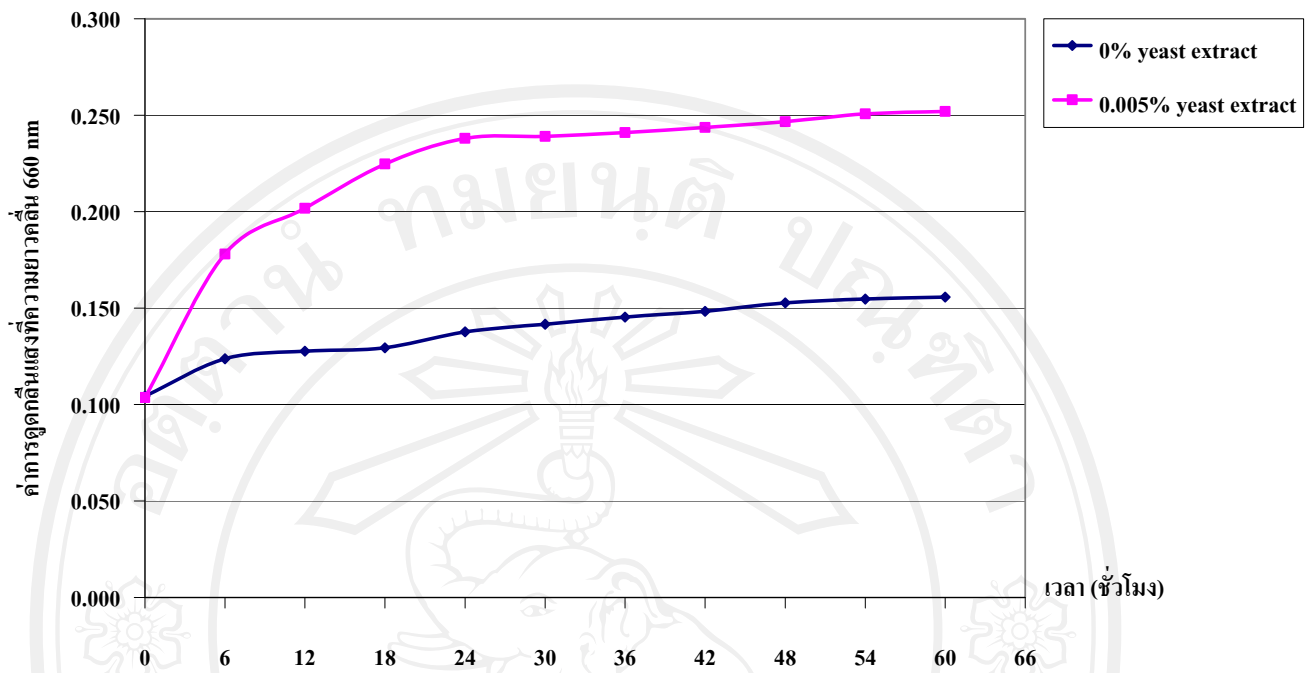
ภาพ 3 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2) ในอาหาร nitrogen free broth ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%



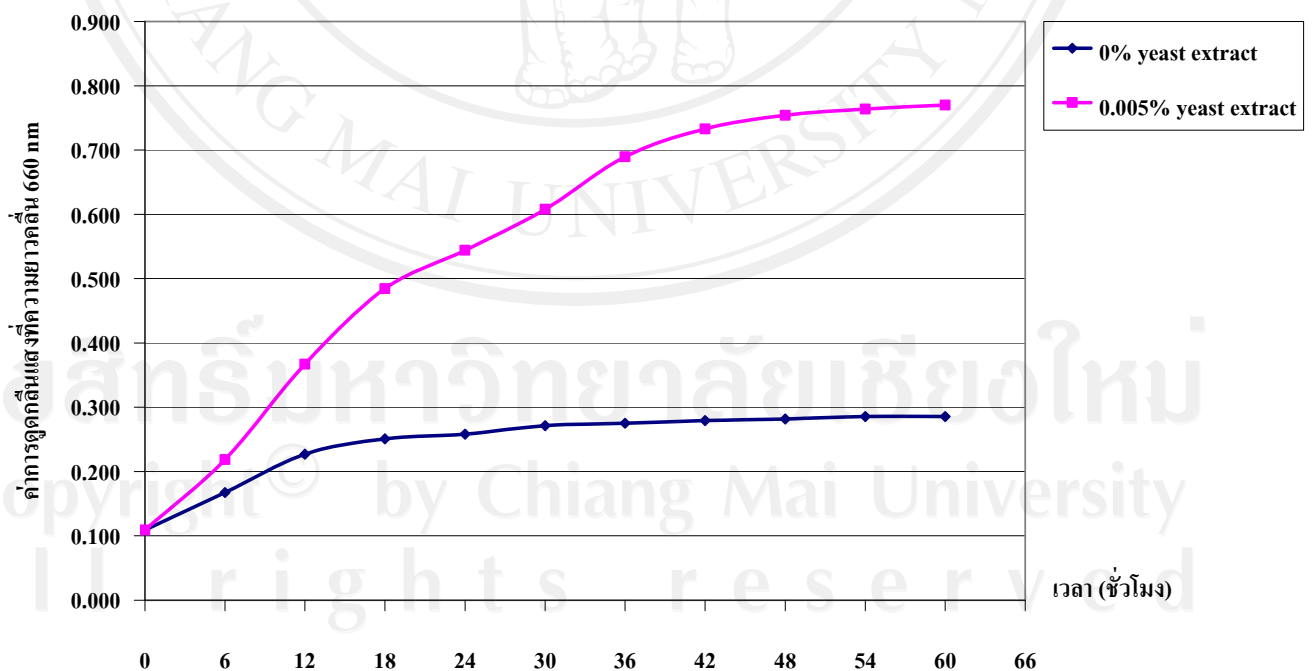
ภาพ 4 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต AT3R1 ในอาหาร nitrogen free broth ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%



ภาพ 5 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต C2HL2 ในอาหาร nitrogen free broth ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%



ภาพ 6 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต C7HL1 ในอาหาร nitrogen free broth ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

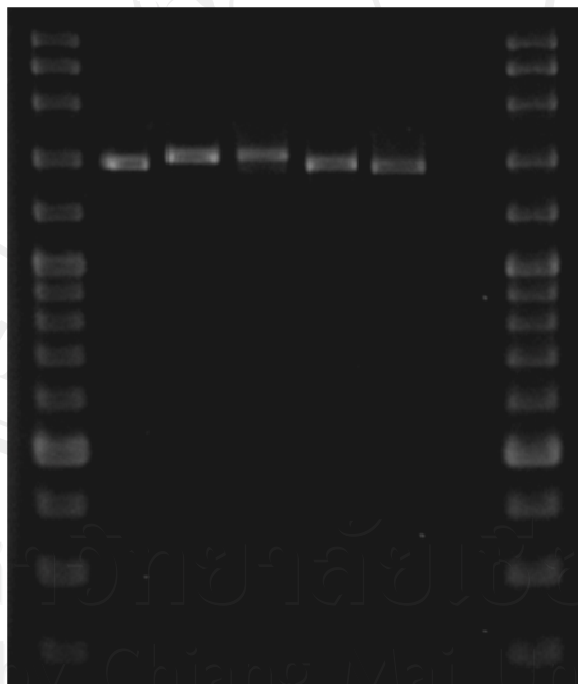


ภาพ 7 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต C34MR1 ในอาหาร nitrogen free broth ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.005%

6. การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา

จากการสกัด DNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกและเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 โดยใช้ primer 27f และ 1525r แสดงผลของ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ PCR product ขนาดประมาณ 1500 bp (ภาพ 8) จากการตรวจสอบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรม Identify ในฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 มีแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด คือ *Pseudomonas psychrotolerans* C36^T, *Ancylobacter dichlorometanicus* DM16^T, *Novosphingobium sediminicola* HU1-AH51^T, *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301^T และ *Novosphingobium capsulatum* GIFU11526^T ตามลำดับ (ตาราง 6)

1500 bp →



ภาพ 8 ผลของปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis

Lane M = 100 bp DNA Ladder Lane 1 = ไอโซเลต C2HL2 Lane 2 = ไอโซเลต C32ML2
 Lane 3 = ไอโซเลต C34MR1 Lane 4 = ไอโซเลต C7HL1 Lane 5 = ไอโซเลต AT3R1
 Lane 6 = Negative control

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) ของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงจากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ไอโซเลท	ความยาวของ นิวคลีโอไทด์ (bp)	สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด	% similarity
C32ML2	1493	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (Accession: GQ250598)	99.72
		<i>Pseudomonas oryzae</i> IAM 1568 ^T (Accession: AM262973)	99.38
AT3R1	1391	<i>Ancylobacter dichlorometanicus</i> DM16 ^T (Accession: EU 589386)	97.76
C2HL2	1426	<i>Novosphingobium sediminicola</i> HU1-AH51 ^T (Accession: AY741145)	97.18
C7HL1	1487	<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301 ^T (Accession: EU439404)	86.95
C34MR1	1409	<i>Novosphingobium capsulatum</i> GIFU11526 ^T (Accession: AJ001051)	98.29

หมายเหตุ

AT3R1	แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนรากของอ้อยพันธุ์อุทอง 3
C2HL2	แบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ ในใบปริมาณสูงเท่ากับ 21.1 SPAD units
C7HL1	แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ใน ใบปริมาณสูงเท่ากับ 26.2 SPAD units
C32ML2	แบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ที่แยกได้จากส่วนใบของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ใน ใบปริมาณปานกลางเท่ากับ 18.7 SPAD units
C34MR1	แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่แยกได้จากส่วนรากของกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ใน ใบปริมาณปานกลางเท่ากับ 18.1 SPAD units

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ (ตาราง 8) ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2) ที่เจริญบนอาหาร NFA และ NA มีโคโลนีสีเหลือง ดิสก์แกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ (ภาพ 9) สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ catalase test เป็นบวก indole production test, oxidase test, urease test, methyl red และ voges–proskauer test เป็นลบ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas psychrotolerans* C36^T และ *P. oryzihabitans* IAM 1568^T ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.72% และ 99.38% ตามลำดับ จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2) พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ *P. psychrotolerans* C36^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 89% (ภาพ 14)

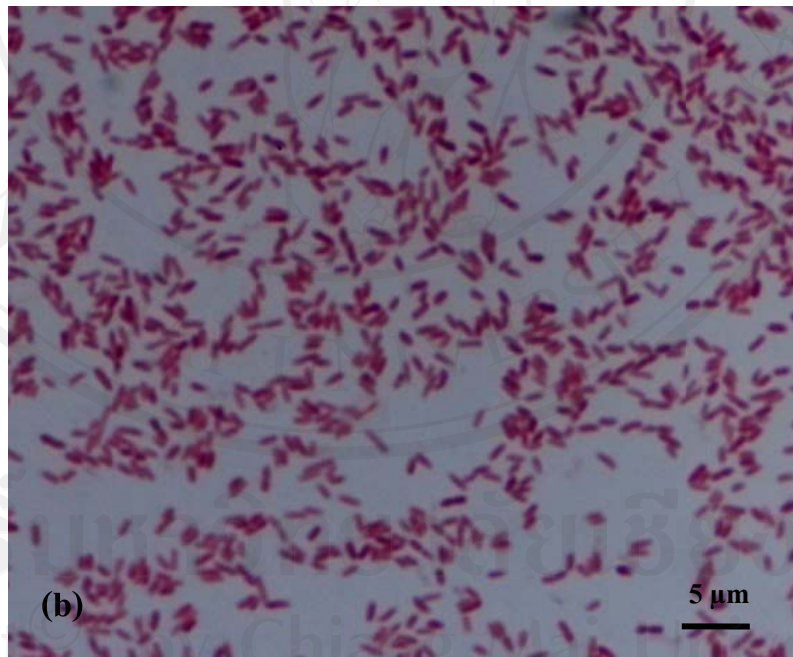
แบคทีเรียไอโซเลท AT3R1 ที่เจริญบนอาหาร NFA มีโคโลนีสีขาวขุ่น และเมื่อเจริญบนอาหาร NA มีโคโลนีสีขาว ดิสก์แกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (ภาพ 10) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ catalase test, oxidase test และ urease test เป็นบวก indole production test, methyl red test และ voges–proskauer tests เป็นลบ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Ancylobacter dichlorometanicus* DM16^T ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึง (% similarity) เท่ากับ 97.76 % จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพ 15) สามารถระบุได้ว่าไอโซเลท AT3R1 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Ancylobacter*

แบคทีเรียไอโซเลท C2HL2 ที่เจริญบนอาหาร NFA มีโคโลนีสีขาวขุ่น และเมื่อเจริญบนอาหาร NA มีโคโลนีสีเหลือง ดิสก์แกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (ภาพ 11) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ catalase test และ oxidase test เป็นบวก indole production test, urease test, methyl red test และ voges–proskauer tests เป็นลบ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Novosphingobium sediminicola* HU1-AH51^T ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 97.18% จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท C2HL2 พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ *Novosphingobium sediminicola* HU1-AH51^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 74% (ภาพ 16)

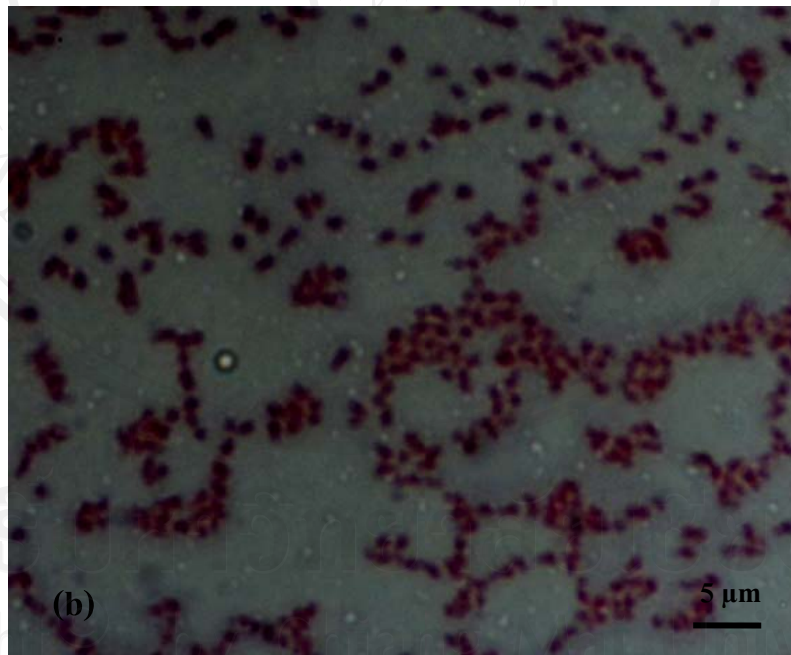
แบคทีเรียไอโซเลท C7HL1 ที่เจริญบนอาหาร NFA มีโคโลนีสีขาวขุ่น และเมื่อเจริญบนอาหาร NA โคโลนีมีสีขาว ดิสก์แกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (ภาพ 12) สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ catalase test, oxidase test, urease test , methyl red test และ voges–proskauer test เป็นบวก indole production เป็นลบ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301^T ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึง

เท่ากับ 86.95% จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพ 17) สามารถระบุได้ว่าไอโซเลต C7HL1 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Ochrobactrum*

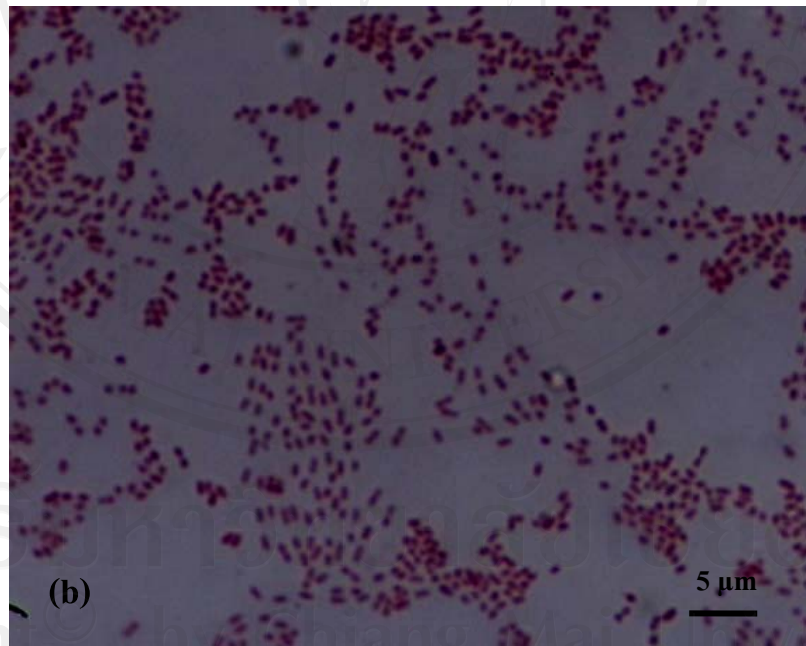
แบคทีเรียไอโซเลต C34MR1 ที่เจริญบนอาหาร NFA มีโคโลนีสีเหลืองอ่อน และเมื่อเจริญบนอาหาร NA มีโคโลนีสีเหลืองเข้ม ติดสีแกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (ภาพ 13) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลการทดสอบ catalase test และ oxidase test เป็นบวก indole production test, urease test, methyl red และ voges–proskauer test เป็นลบ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่ามีสถานะทางอนุกรมวิธานใกล้เคียงกับเชื้อ *Novosphingobium capsulatum* GIFU11526^T ซึ่งมีความคล้ายคลึงเท่ากับ 98.29% จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลต C34MR1 พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ *Novosphingobium capsulatum* GIFU11526^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 96% (ภาพ 16)



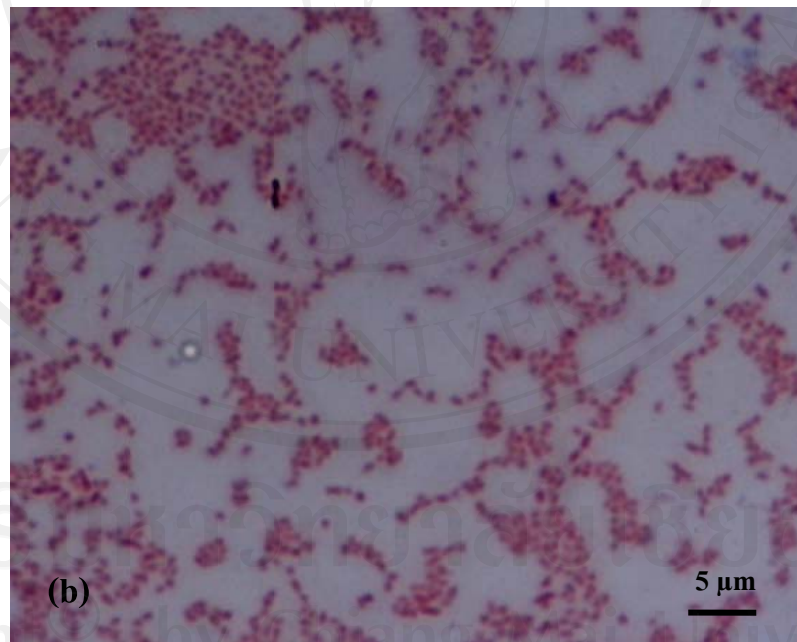
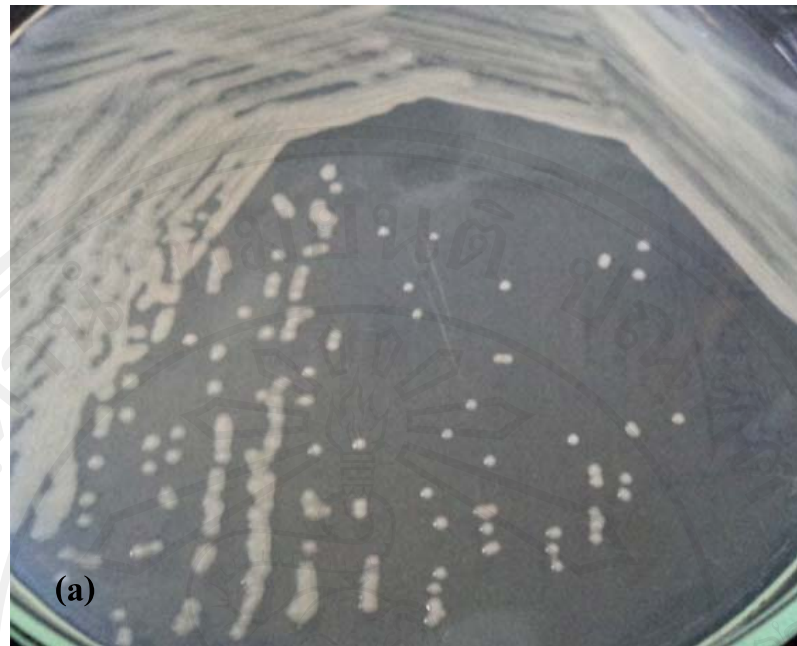
ภาพ 9 (a) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต *Pseudomonas* (C32ML2) ที่เจริญบนอาหาร NA
(b) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพ 10 (a) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต AT3R1 ที่เจริญบนอาหาร NA และ
(b) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

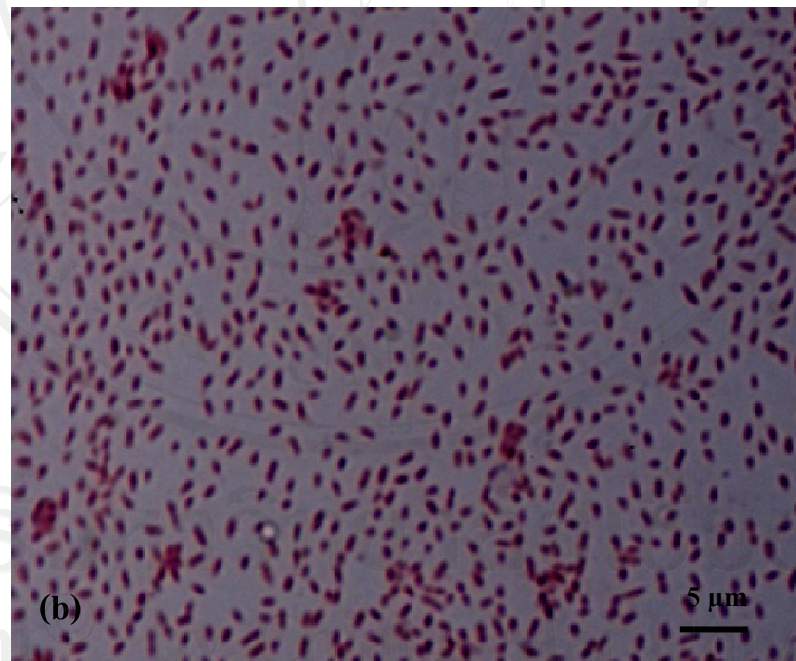
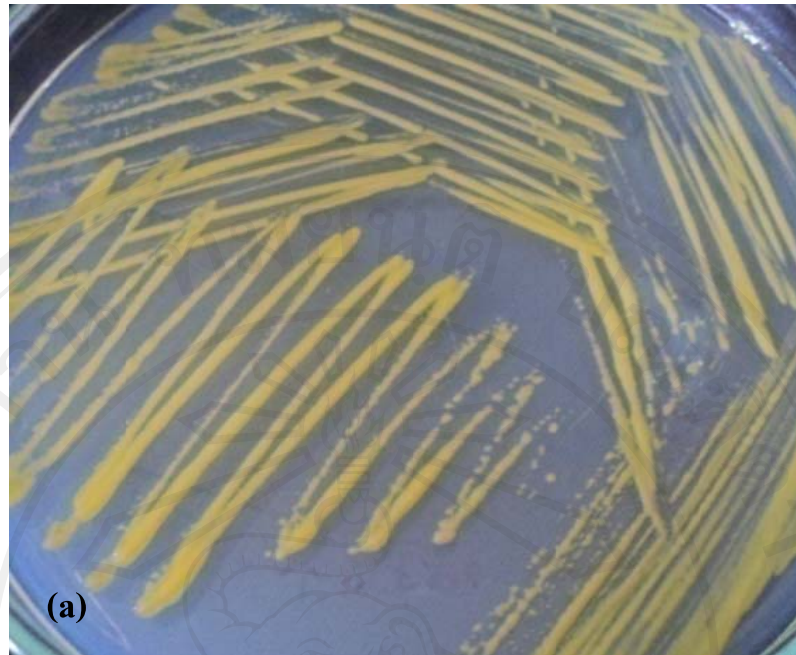


ภาพ 11 (a) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต C2HL2 ที่เจริญบนอาหาร NA และ
(b) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพ 12 (a) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต C7HL1 ที่เจริญบนอาหาร NA และ

(b) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



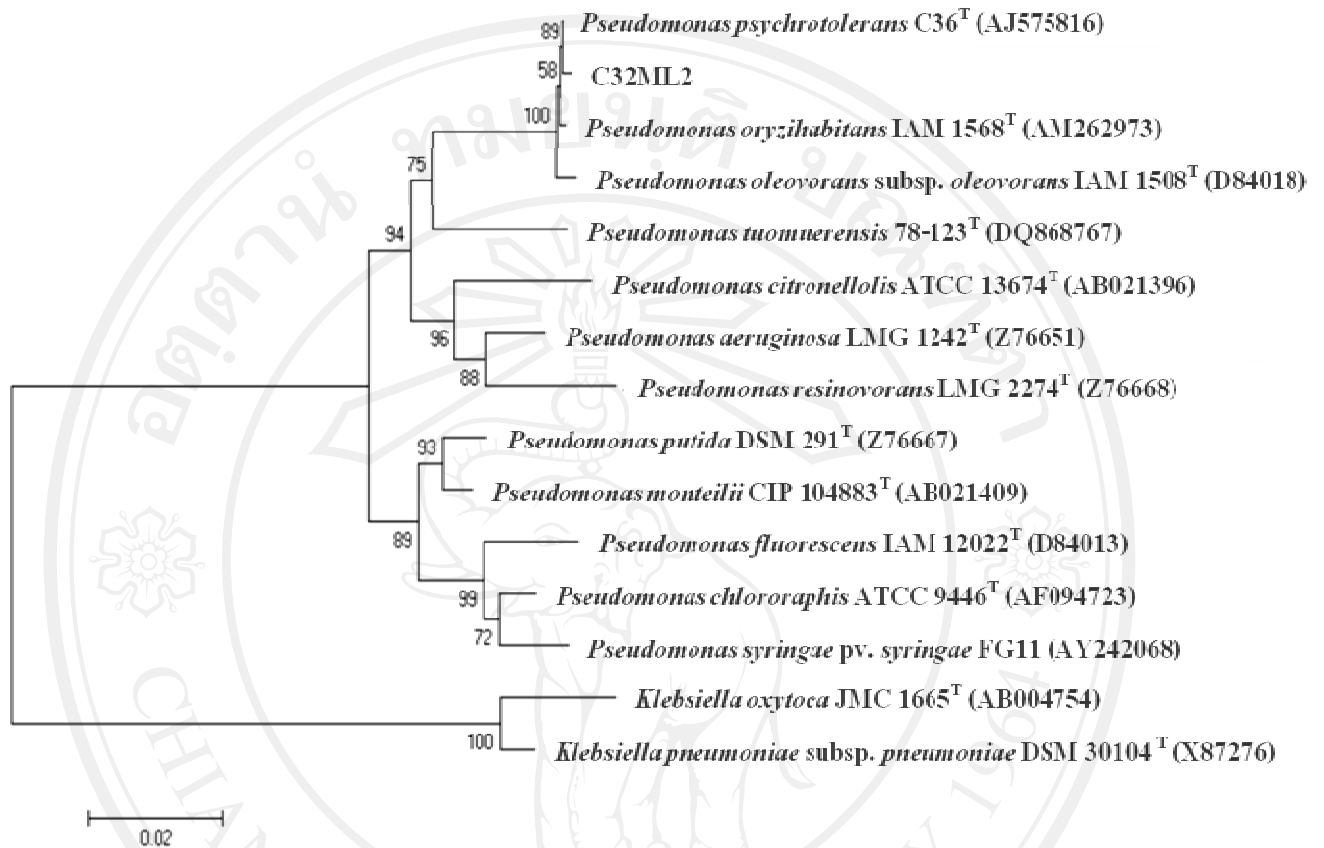
ภาพ 13 (a) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต C34MR1 ที่เจริญบนอาหาร NA และ
 (b) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ตาราง 7 ผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

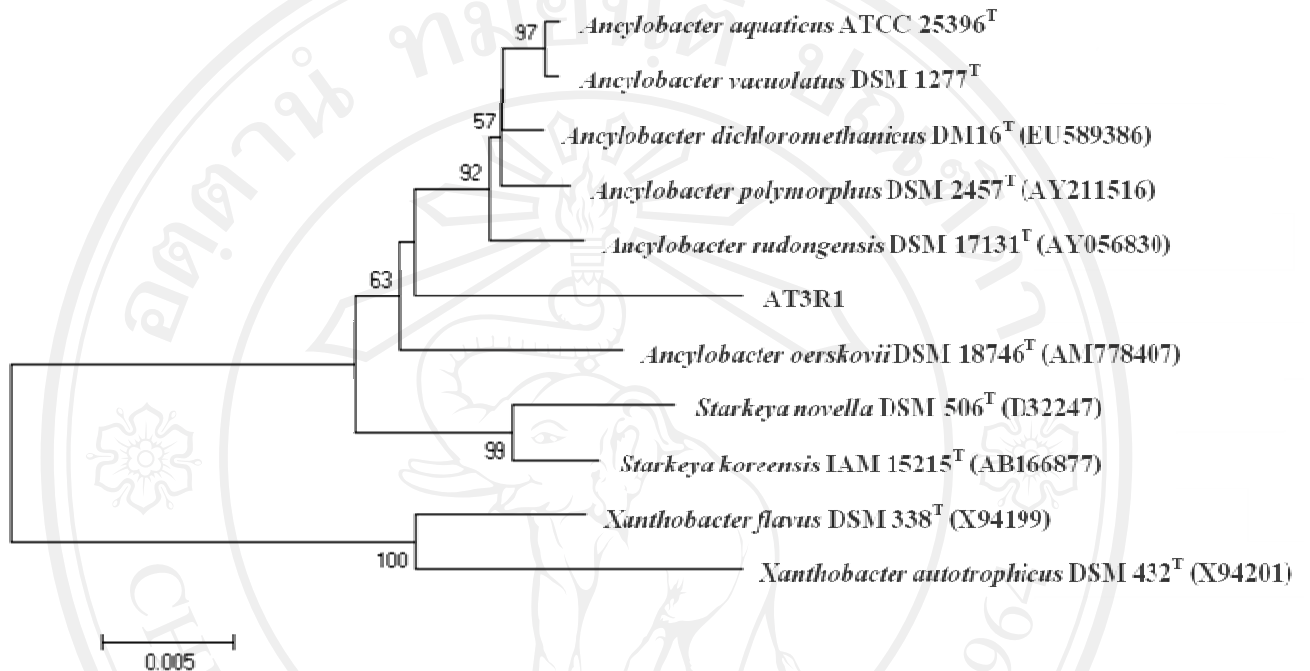
ไอโซเลท	C32ML2	AT3R1	C2HL2	C7HL1	C34MR1
การทดสอบ					
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร					
Nitrogen free agar					
ขนาด (mm)	1 – 3	2 – 3	3 – 5	1 – 3	3 – 5
สีของโคโลนี	เหลือง	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	เหลืองใส
ลักษณะเกี่ยวกับแสง	ทึบแสง	โปร่งแสง	ทึบแสง	โปร่งแสง	ทึบแสง
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
ขอบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
การยกตัวของโคโลนี	Umbonate	Raised	Convex	Raised	Convex
ผิวหน้า	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์					
Gram' s stain	-	-	-	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (µm)	0.5x1	0.5x1	0.5x1.5	0.5x1	0.5x1
การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี					
3% KOH test	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+
Indole productin test	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	-	+	-
Motility test	+	-	-	+	-
Oxidase test	-	+	+	+	+
Starch hydrolysis test	-	-	-	-	-
Voges – Proskauer test	-	-	-	+	-
Urease test	-	+	-	+	-
Citrate test	+	-	-	+	-
Triple sugar iron test	K/A	N/N	N/N	K/A	N/N

ตาราง 7 (ต่อ)

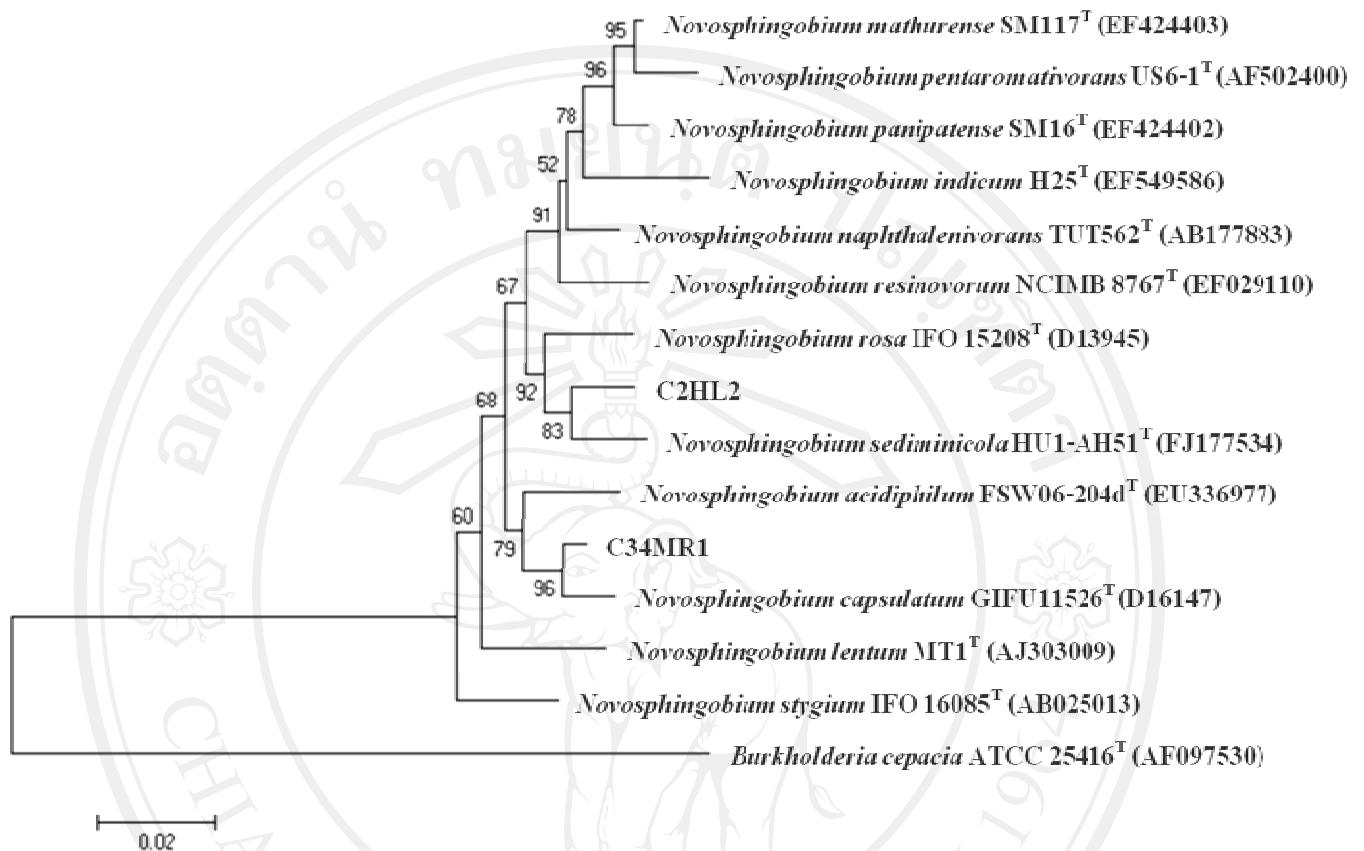
	ไอโซเลท	C32ML2	AT3R1	C2HL2	C7HL1	C34MR1
การทดสอบ						
ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอน						
Mannitol		+	-	+	-	-
Rhamnose		+	-	+	+	+
Arabinose		+	-	+	+	+
Glucose		+	-	+	+	+
สีของโคโลนีบนอาหาร						
NA		เหลือง	ขาว	เหลือง	ขาว	เหลือง
PDA		เหลือง	ขาว	เหลือง	ขาว	เหลือง
GYC		เหลือง	เหลือง	ครีม	ขาว	เหลือง



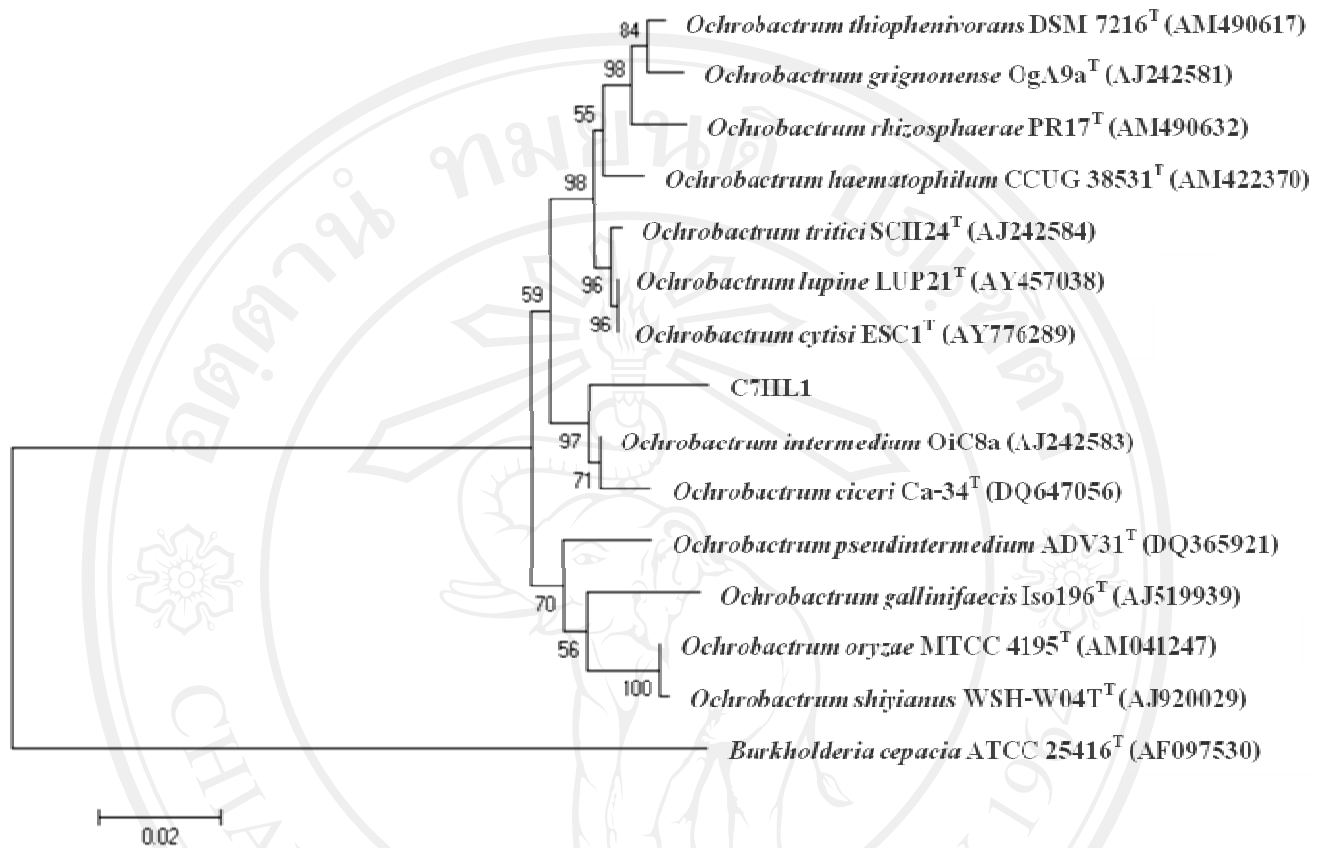
ภาพ 14 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต *Pseudomonas* (C32ML2) กับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4



ภาพ 15 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลท AT3R1 กับแบคทีเรียในสกุล *Ancylobacter* วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4



ภาพ 16 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต C2HL2 และ C34MR1 กับแบคทีเรียในสกุล *Novosphingobium* วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4



ภาพ 17 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลท C7HL1 กับแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4