

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 คัดเลือกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

4.1.1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

4.1.1.1 เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสายสามสี โดยบดตัวอย่างกล้วยไม้ผสมกับน้ำเกลือ 0.85 % (ผสมในอัตราส่วน 1 : 10) เลี้ยงในอาหาร RM หลังจากบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 7 วันพบว่ามีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำหลอดที่มีการเจริญของเชื้อตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN) และวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เอนโคไฟท์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนประมาณ $3.6 \times 10^2 - 9.2 \times 10^2$ เซลล์/กรัมน้ำหนักสดต้นกล้วยไม้ (ตารางที่ 6) ปริมาณเชื้อที่พบในครั้งนี้นับว่ามีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในเชื้อเอนโคไฟท์ที่พบในอ้อยซึ่งเป็นเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* โดยพบประมาณ 10^6 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด (Gillis และคณะ, 1989) ในขณะที่ Teaumroong และคณะ (2001) พบเชื้อเอนโคไฟท์ในเนื้อเยื่อบริเวณรากและใบของข้าว ประมาณ 10^6 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด และในเนื้อเยื่อส่วนลำต้นประมาณ 10^4-10^5 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด และในข้าวป่าพบเชื้อเอนโคไฟท์ประมาณ 2.57×10^6 ถึง 7.94×10^7 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด (Prasad และคณะ, 2001 และ Barraquio และคณะ, 1997) สำหรับในพืชอื่น เช่น *Pennisetum purpureum* ซึ่งปลูกในประเทศบราซิล พบเชื้อเอนโคไฟท์ประมาณ 10^5-10^6 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด (Kichhof และคณะ, 1997)

อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อที่พบในเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีปริมาณใกล้เคียงกับที่ Prasad และคณะ (2001) พบในเนื้อเยื่อข้าวในส่วนรากและลำต้น และในพืชอื่นเช่น *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* และ *Spartina pectinata* ซึ่งพบเชื้อเอนโคไฟท์ในปริมาณประมาณ 10^2-10^3 เซลล์/กรัมน้ำหนักสด (Kichhof และคณะ, 1997)

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายสามสี ด้วยเทคนิค Most Probable Number (MPN)

เอื้องสายสามสี (ซ้า)	ปริมาณเชื้อ (เซลล์/กรัมน้ำหนักสด) ¹
1	3.6×10^2
2	9.2×10^2
3	7.4×10^2
เฉลี่ย	6.7×10^2

¹ใช้ปริมาณเชื้อทั้งหมด 3 ซ้า ซ้าละ 5 หลอด

4.1.1.2 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล

หวาย

จากการแยกเชื้อเอนโคไฟท์ข้างต้น สามารถรวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แบ่งเป็น aerobic bacteria 7 ไอโซเลท และ anaerobic bacteria 3 ไอโซเลท ในงานวิจัยนี้เน้นศึกษาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic bacteria จึงได้นำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง RM (semi-solid RM) ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ตารางที่ 7) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง $0.0045-6.2340 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/10^6 \text{ cells/hr}$ โดยเชื้อ ESS 3 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุดประมาณ $6.747 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/10^6 \text{ cells/hr}$ รองลงมาคือเชื้อ ESS 2 และ ESS 4 และเชื้อที่มีประสิทธิภาพรองลงมาอีก คือ เชื้อ ESS 5 และ ESS 1 และกลุ่มสุดท้ายคือเชื้อที่ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนน้อยสุด คือ เชื้อ ESS 6 และ ESS 7

เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเอนโคไฟท์ที่มีการศึกษาในพืชอื่นพบว่า เชื้อ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ในอ้อย มีอัตราการตรึงไนโตรเจนประมาณ $1.3-3.1 \text{ nmol}/10^{10} \text{ cells/hr}$ (Loiret และคณะ, 2004) ในข้าว พบเชื้อ *Serratia marcescens* ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนประมาณ $65 \pm 15 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{mg of protein}$, เชื้อ *Klebsiella planticola* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนประมาณ $150 \pm 24 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{mg of protein}$, เชื้อ *Enterobacter cloacae* ตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ $135 \pm 30 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{mg of protein}$. (Prasad และคณะ, 2001)

เชื้อเอนโคไฟท์ในข้าวป่าและข้าวที่มาจากกาเพาะปลูกหลายสายพันธุ์ มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนค่อนข้างสูง ประมาณ $66.24-753.94 \text{ nmolC}_2\text{H}_4/10^6 \text{ cells/day}$ (Teaumroong และคณะ, 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้กับเชื้อที่พบในข้าว พบว่ามี

ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบอาจเห็นผลไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากหน่วยที่ใช้ในการคำนวณแตกต่างกัน หากจะเปรียบเทียบชัดเจน ควรเปรียบเทียบในหน่วยเดียวกัน

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากเถียงสายสามสี

Isolate	อัตราการตรึงไนโตรเจน ($\text{nmolC}_2\text{H}_4/ 10^6 \text{ cells/ hr}$)
ESS 1	0.0549cd**
ESS 2	0.6747b
ESS 3	6.2340a
ESS 4	0.7785b
ESS 5	0.2437c
ESS 6	0.0072d
ESS 7	0.0045d
Mean	1.1440
F-test	*
%CV	10.26

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

4.1.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในเนื้อเยื่อกล้วยไม้พันธุ์เถียงสายสามสี

4.1.2.1 ลักษณะโคโลนี

นำหลอดทดลองที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาทำการตรวจสอบ โดยการเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจน เพื่อคัดเลือกรูปร่างของ aerobic bacteria และเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อคัดเลือกรูปร่างของ anaerobic bacteria จากการทดลองสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย aerobic bacteria ทั้งหมด 7 ไอโซเลท และเชื้อ anaerobic bacteria 3 ไอโซเลท ดังตารางที่ 8 และ 9 ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) จึงรายงานผลการศึกษาลักษณะของเชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria เฉพาะข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม aerobe bacteria บางไอโซเลทมีลักษณะ

ค่อนข้างใกล้เคียงกัน เช่น เชื้อไอโซเลท ESS 4 และเชื้อไอโซเลท ESS 6 มีลักษณะโคโลนีที่ใกล้เคียงกัน เชื้อไอโซเลท ESS 1 มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกับโคโลนีอื่นอย่างชัดเจน คือ มีโคโลนีสีชมพู รูปร่าง กลมขนาดเล็ก การเจริญเติบโตช้า เชื้อไอโซเลท ESS 2 มีโคโลนีสีเหลือง รูปร่างไม่แน่นอน เจริญเติบโตช้า เชื้อไอโซเลท ESS 3 มีโคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก เจริญเติบโตเร็ว เชื้อไอโซเลท ESS 5 มีลักษณะคล้ายไขดาว คือตรงกลางนูน โคโลนีสีส้มอ่อน และสุดท้ายเชื้อไอโซเลท ESS 7 ลักษณะโคโลนีสีเหลือง รูปร่างไม่แน่นอน ตัวอย่างลักษณะเชื้อที่แยก ดังแสดงในรูปที่ 5 ส่วนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ anaerobe มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 6

ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายสามสี ชนิด aerobic bacteria

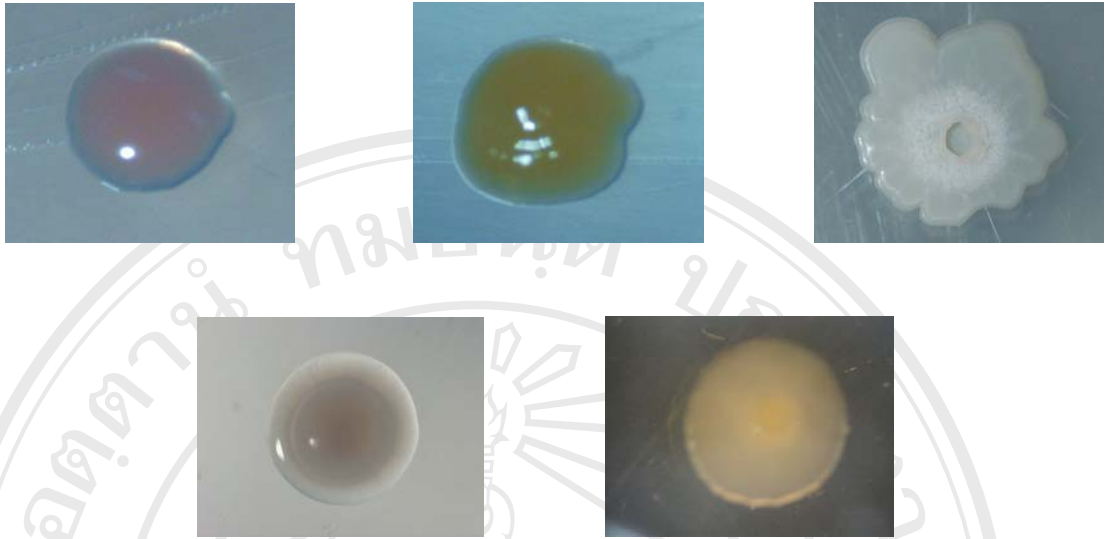
Isolate No.	ลักษณะโคโลนี					
	สี	รูปร่าง	ความนูน	ผิวหน้า	ขอบ	ความเข็ม
ESS 1	ชมพู	กลม ขนาดเล็ก	นูน ^{L₁}	มัน, เก๋ี้ยง	ขอบเรียบ	-
ESS 2	เหลือง	ไม่แน่นอน	นูน ^{L₂}	มัน, เก๋ี้ยง	ขอบเรียบ	+
ESS 3	ขาว	ไม่แน่นอน ^{S₁}	แบน	ไม่เก๋ี้ยง	ขอบหยัก ^{L₄}	+
ESS 4	ขาว	กลม	นูน ^{L₁}	เก๋ี้ยง	ขอบเรียบ	-
ESS 5	ส้มอ่อน	กลม	นูน ^{L₃}	เก๋ี้ยง	ขอบเรียบ	-
ESS 6	ขาวปนเหลือง	กลม	นูน ^{L₁}	เก๋ี้ยง	ขอบเรียบ	-
ESS 7	เหลืองอ่อน	ไม่แน่นอน ^{S₁}	แบน	ไม่เก๋ี้ยง	ขอบหยัก ^{L₅}	-

S₁ รูปร่างแบบ Irregular

L₁ นูนแบบ raised, L₂ นูนแบบ convex, L₃ นูนแบบ umbonate

L₄ ขอบแบบ undulate, L₅ ขอบแบบ filiform

+ เข็มเล็กน้อย, - ไม่เข็ม



รูปที่ 5 ลักษณะตัวอย่างของโคโลนีบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ ESS 1, ESS 2, ESS 3, ESS 4 และ ESS 5 (ตามลำดับ)

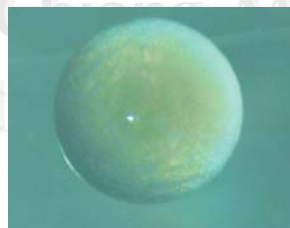
ตารางที่ 9 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายสามสี ชนิด anaerobic bacteria

Isolate No.	ลักษณะโคโลนี					
	สี	รูปร่าง	ความนูน	ผิวหน้า	ขอบ	ความเข็ม
ESS 8	ขาว	ไม่แน่นอน ^{S₁}	นูน ^{L₁}	ขรุขระ	ขอบหยัก ^{L₄}	-
ESS 9	เหลืองอ่อน	กลม	นูน ^{L₁}	มัน, เกือบ	ขอบเรียบ	-
ESS 10	ขาว	ไม่แน่นอน ^{S₁}	แบน	ขรุขระ	ขอบหยัก ^{L₅}	-

^{S₁} รูปร่างแบบ Irregular

^{L₁} นูนแบบ raised

^{L₄} ขอบแบบ undulate, ^{L₅} ขอบแบบ filiform



รูปที่ 6 ลักษณะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม anaerobe ที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี (ไอโซเลท ESS 8, ESS 9 และ ESS 10 ตามลำดับ)



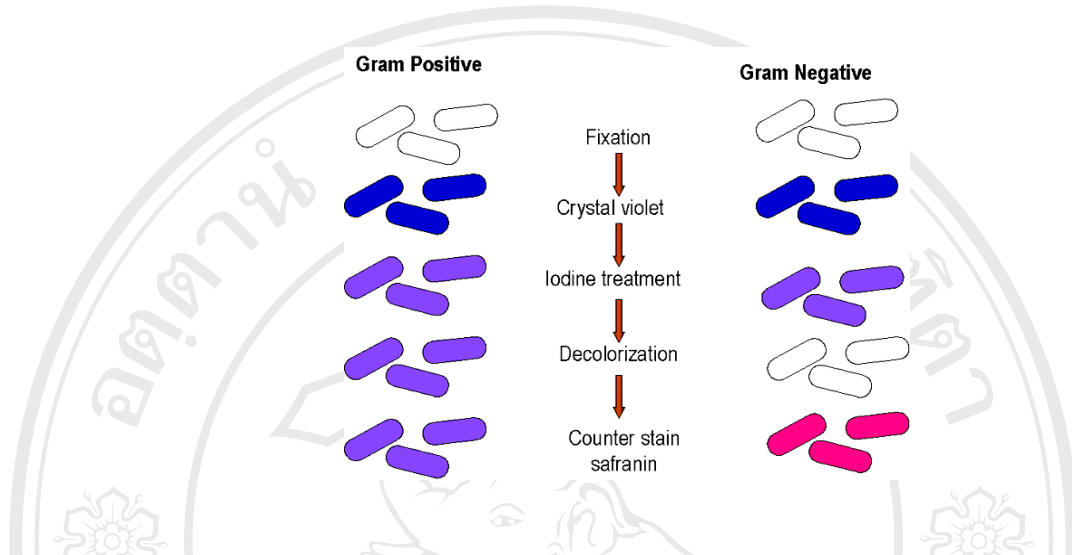
รูปที่ 7 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียเมื่อแยกให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate (แสดงลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA เชื้อไอโซเลท ESS 1 และ ESS 7 ตามลำดับ)

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดที่ให้ผลบวกในการตรึงไนโตรเจน สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากอาหาร semi-solid Modified Rennie medium (RM) การใช้อาหารชนิดนี้สามารถที่จะคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งอาจเพราะในสูตรอาหารมีปริมาณไนโตรเจนน้อยมาก จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารชนิดนี้ได้จำเป็นต้องมีความสามารถในการปรับตัวเพื่ออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีไนโตรเจนต่ำหรือสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเพื่อดำรงชีพได้ ในช่วงปี ค.ศ. 1980 Dobereiner ได้รายงานการใช้อาหารในการเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ว่าอาหารที่ใช้ควรเป็นอาหารที่เชื้อตรึงไนโตรเจนนั้นตอบสนองได้ อาหารที่แยกเชื้อชนิดนี้จะเป็นอาหารที่จำลองสภาพแวดล้อมภายในดินไม้ และมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ หรือไม่มีเลย เพื่อใช้ในการคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้น ผู้ทำการทดลองส่วนมากทำการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยใช้ N-free medium เช่น อาหาร NFb เป็นต้น แต่อาหาร Rennie medium เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพดี และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ โดยในการศึกษาของ Elbeltagy (2001) ใช้ Rennie medium ในการทดลองแยกเชื้อเอนโดไฟท์ในอ้อย พบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนตัวใหม่ เช่น *Herbaspirillum* และ *Ideonell* ซึ่ง *Ideonell* มีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Ideonell dechloratans* ซึ่งเชื้อตัวนี้สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน และจะใช้ Chlorate เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน

4.1.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทดสอบปฏิกิริยาการติดสีแกรม และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรีย โดยปกติสามารถแบ่งการติดสีของแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ติดสีม่วงของ crystal violet เรียกว่า ‘Gram-positive bacteria’ และพวกที่ติดสีแดงของ safranin ที่เรียกว่า ‘Gram-negative bacteria’ เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น Gram-positive bacteria บางชนิดมีการ

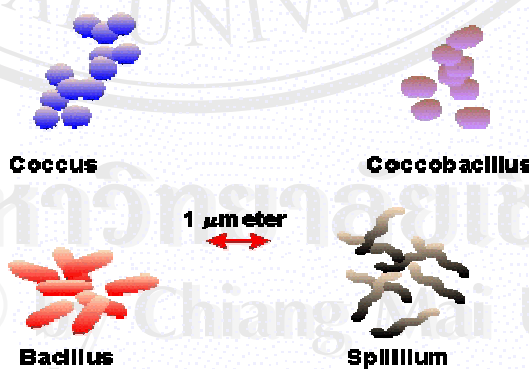
เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของการติดสี Gram-stain เป็นติดสีของ Gram-negative จัดอยู่ในกลุ่ม 'Gram-variable' (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงลักษณะการติดสีของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อย้อมสีแกรม (<http://dl.clackamas.cc.or.us/wqt111/unit-8-gramstain.htm>)

แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปกลม (coccus/cocci) รูปแท่ง (bacillus/bacilli) อาจมีทั้งแท่งตรง อาจมีปลายมน บางชนิดเป็นรูปแท่งกลมสั้นคล้ายรูปไข่ (cocci bacilli) หรืออาจเป็นแบคทีเรียรูปเกลียว (ศุภยางค์, 2547) (รูปที่ 9)

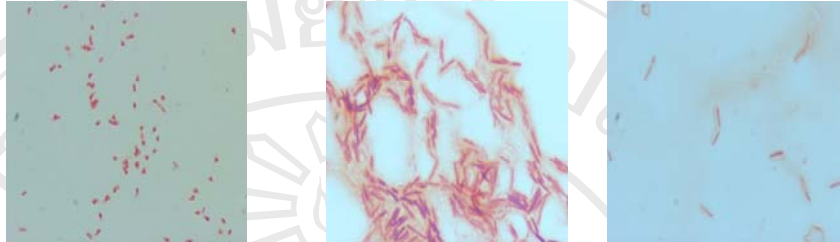
Common Bacteria Shapes



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 9 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (<http://dl.clackamas.cc.or.us/wqt111/unit-8-gramstain.htm>)

จากการทดลอง สรุปผลดังตารางที่ 10 พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 7 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเซลล์มีทั้งที่เป็นแท่ง, แท่งค่อนข้างกลมคล้ายไข่ และรูปร่างกลม แตกต่างกันไป ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเซลล์แบคทีเรียเมื่อย้อมติดสีแกรมลบ มีทั้งลักษณะที่เป็น รูปกลม และรูปแท่ง (เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา)

เชื้อไอโซเลท ESS 1 มีรูปร่างแท่งกลมสั้นคล้ายรูปไข่ (coccobacilli) ส่วนไอโซเลท ESS 2 และ ESS 7 มีรูปร่างลักษณะเป็นรูปกลม ส่วนไอโซเลท ESS 3, ESS 4, และ ESS 5 มีลักษณะเป็นแท่งตรง ไอโซเลท ESS 6 เป็นแท่งตรงค่อนข้างสั้น เชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในข้าวส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Teaumroong และคณะ, 2001) Teresita และคณะ (1997) พบเชื้อ *Acetobacter* ในกาแฟซึ่งเป็นเชื้อเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน เชื้อที่พบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ, เชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum* spp. ที่พบในอ้อยพันธุ์อินเดีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Muthukumarasamy และคณะ, 1999) ในข้าวป่า มีรายงานการพบเชื้อเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน ในกลุ่ม *Herbasirillum* 3 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด (Ellbeltagy และคณะ, 2001)

จากข้อมูลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์มีทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก แตกต่างกันในพืชอาศัย กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่พบ เช่นเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ที่แยกได้ในลำต้นของอ้อย จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อ *Burkholderia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเซลล์มีลักษณะรูปแท่ง เป็นต้น

4.1.2.3 ลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี (Biochemical characteristics)

4.1.2.3.1 ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน โดยใช้อาหาร Ammonium Mineral Salt Agar โดยทำให้มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ กลูโคส

(glucose), แมนนิทอล (manitol), มาเลท (malate) และอาราบินอส (arabinose) คาร์โบไฮเดรตที่พบมากในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด คือ กลูโคส ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างที่ง่ายที่สุดจัดเป็นพวกโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ซึ่งกลูโคสเป็นคาร์บอนที่สำคัญที่สุดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต

ผลการทดสอบ (ตารางที่ 10) พบว่าเชื้อไอโซเลท ESS 1, ESS 2 และ ESS 4 ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสได้ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท ESS 3, ESS 5, ESS 6 และ ESS 7 สามารถใช้คาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารที่ใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อไอโซเลท ESS 1, ESS 3, ESS 5, ESS 6 และ ESS 7 สามารถเจริญบนอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่เชื้อไอโซเลท ESS 2 และ ESS 4 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนการใช้ malate และ arabinose เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นได้ผลเหมือนกัน คือ เชื้อไอโซเลท ESS 1, ESS 3, ESS 5 และ ESS 7 สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำตาลทั้งสองชนิดเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท ESS 2, ESS 4 และ ESS 6 ไม่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้

จากรายงานของ Ureta และคณะ (1995) ที่ได้ทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* และ *H. seropedicae* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน แบ่งเป็นน้ำตาลกลุ่ม Disaccharides (sucrose และ maltose), Hexoses (glucose และ fructose), Pentoses (arabinose และ ribose), Carboxylates (Na gluconate), Polyols (mannitol และ myo inositol) และ Dicarboxylates (Na succinate, Na malate และ Na fumarate) พบว่า เชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาล Disaccharides, Hexoses, Pentoses, Carboxylates และ Polyols ยกเว้นจากสารตั้งต้น Dicarboxylates ส่วนเชื้อ *Herbaspirillum seropedicae* สามารถเจริญได้บนแหล่งคาร์บอนเกือบทุกตัว ยกเว้น แหล่งคาร์บอนที่มาจากน้ำตาล maltose ส่วนเชื้อ *H. rubrisubalbicans* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี น้ำตาล sucrose, maltose ribose และ myo inositol ได้ แต่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากตัวอื่นๆ ในการเจริญเติบโต

เชื้อ *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* และเชื้อในกลุ่ม *Herbaspirillum* อีก 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญบนอาหารที่มี N-actylglucosamine, arabinose, caprate, citrate, glucose, gluconate, malate, mannose, mannitol และ phenylacetate เป็นแหล่งคาร์บอน ในทางกลับกันเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี maltose และ adepate เป็นแหล่งคาร์บอน (Kirchhof และคณะ, 1997) เชื้อเอนโคไฟท์ 69 ไอโซเลทที่แยกได้

จากข้าวป่า และข้าวปลูก ไม่สามารถใช้ malate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เชื้อส่วนใหญ่สามารถใช้ rhamnose, manitol, glucose และ arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน (Teaumroong และคณะ, 2001)

จากการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากข้าวป่า กับเชื้อ *Herbaspirillum* spp. พบว่าเชื้อเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากข้าวป่า ส่วนใหญ่สามารถใช้ น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Elbeltagy และคณะ, 2001) คล้ายกับเชื้อ ESS 3, ESS 5, ESS 6 และ ESS 7 ที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสีกับเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* และ เชื้อ *Burkholderia* spp. ดังตารางที่ 11 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ ESS 3, ESS 5 และ ESS 7 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *Herbaspirillum rubrisubalbicans* แต่ไม่ได้หมายความว่าเชื้อในกลุ่มเดียวกัน เพราะการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เป็นเพียงส่วนหนึ่งของข้อมูลเบื้องต้นในการเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม การบ่งชี้ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อชนิดเดียวกันหรือไม่ ต้องมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลด้านอื่นเปรียบเทียบต่อไป อาทิ เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา, ลักษณะโคโลนี, ลักษณะเฉพาะของส่วนประกอบทางเคมี และลักษณะเฉพาะทางด้านพันธุกรรม เป็นต้น

ตารางที่ 10 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสายสามสี

ลักษณะ (Characteristic)	Isolate						
	ESS 1	ESS 2	ESS 3	ESS 4	ESS 5	ESS 6	ESS 7
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-
Shape	coccobacillus	coccus	rod	rod	rod	rod	coccus
Carbon source utilization							
Arabinose	+	-	+	-	+	-	+
Glucose	-	-	+	-	+	+	+
Malate	+	-	+	-	+	-	+
Manitol	+	-	+	-	+	+	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	-	+	+	+	-	-	+

- negative

+ positive

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี เทียบกับเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* และ เชื้อ *Burkholderia* spp.

Carbon source	Isolate							<i>Acetobacter</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Burkholderia</i>
	ESS 1	ESS 2	ESS 3	ESS 4	ESS 5	ESS 6	ESS 7			
Arabinose	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Glucose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	ND
Malate	+	-	+	-	+	-	+	ND	+	ND
Mannitol	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

ND, not determined

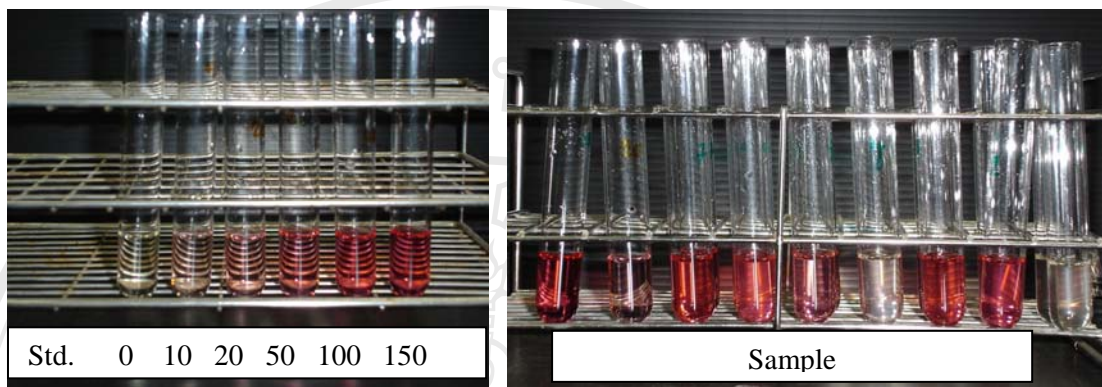
4.1.2.3.2 ความสามารถในการสร้างสาร Indole-3-acetic acid (IAA)

IAA เป็นฮอร์โมนธรรมชาติในกลุ่ม ออกซิน(Auxin) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่สามารถชักนำให้เกิดการยืดตัวของเซลล์ของลำต้น ออกซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นกรด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated ring) คำว่า auxin มาจากภาษากรีกว่า auxein หมายถึงการเจริญเติบโต พืชสังเคราะห์ออกซินเพื่อควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรีย เชื้อราและสาหร่ายบางชนิดก็สามารถสังเคราะห์ออกซินได้ โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มเอนโดไฟท์ พบว่านอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว ยังมีความสามารถในการผลิต IAA เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย ดังรายงานการศึกษาของ Teaumroong และคณะ (2001) พบว่าเชื้อเอนโดไฟท์จำนวน 3 ใน 4 ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว นั้น สามารถผลิต IAA ได้ โดยเฉพาะแต่เชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในข้าว ในพืชอื่นเช่น ถั่วเหลืองพบว่า 34% ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในถั่วเหลือง 2 พันธุ์ (Forcarin และ Cristalina) มีความสามารถในการผลิต IAA ความถี่ของการผลิต IAA เกิดขึ้นในช่วงใกล้เก็บเกี่ยว (Julia และคณะ, 2004)

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในการสังเคราะห์ออกซิน เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนทริปโตเฟน(Tryptophan) เป็น indole ได้หรือไม่ (กรดอะมิโน tryptophan คือ สารตั้งต้นกำเนิดของ IAA) โดยปกติแบคทีเรียจะเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น indoleethanol แล้วพืชจะเปลี่ยนสารนี้เป็น IAA อีกครั้ง ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารกึ่งแข็ง RM ที่มีทริปโตเฟนเป็นส่วนประกอบเพิ่มเติม ทดสอบความสามารถในการสร้าง indole โดยตรวจสอบการพัฒนาสีของอาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง เมื่อเติม salkovskii reagent จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง และนำไปวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร พบว่า เชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิต IAA ระหว่าง 0.00047-0.04509 $\mu\text{mol IAA}/10^6\text{cell}$ โดยไอโซเลท ESS 6 มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือเชื้อไอโซเลท ESS 5 และ ESS 2 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท ESS 3 และ ESS 4 มีความสามารถในการผลิตได้ใกล้เคียงกัน และเชื้อไอโซเลท ESS 1 และ ESS 7 สามารถผลิต indole ได้น้อยที่สุดกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อไอโซเลทอื่น (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก ข)

เชื้อเอนโดไฟท์บางสายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการผลิต IAA ดังในการทดลองของ Loiret และคณะ (2004) ซึ่งแยกเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากอ้อย เชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อ *Pantoea* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิต H_2 สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างกว้าง แต่ไม่สามารถผลิต IAA ได้

จะเห็นได้ว่าเชื้อเอนโคไฟท์ที่พบบางสายพันธุ์สามารถผลิต IAA แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตได้



รูปที่ 11 การพัฒนาสีของตัวอย่างที่มีการสร้างสาร indole เมื่อเทียบกับตัวมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 $\mu\text{M/L}$ (ภาพด้านซ้าย) ด้านขวาเป็นภาพของตัวอย่างที่นำมาตรวจวัด

การตรวจสอบความสามารถในการผลิต IAA นั้น นอกจากจะทดสอบด้วยการพัฒนาสีแล้ว ยังสามารถตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Fuentes และคณะ (1993) ตรวจสอบความสามารถในการผลิต IAA ของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* พบว่าเชื้อ *A. diazotrophicus* สามารถผลิต IAA ได้ประมาณ $0.14\text{--}2.42 \mu\text{gIAA mL}^{-1}$ ซึ่งเชื้อ *A. diazotrophicus* ที่พบในเนื้อเยื่อของอ้อยนี้นอกจากจะผลิต IAA เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชอาศัย

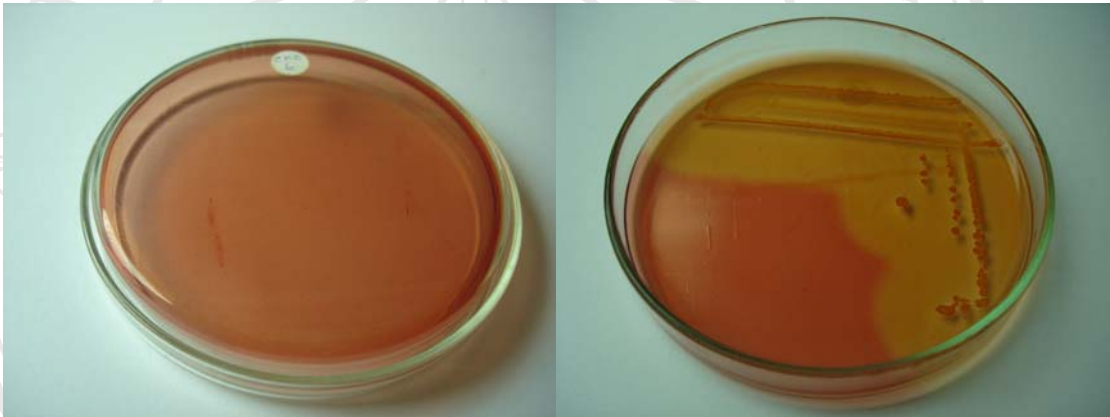
เชื้อเอนโคไฟท์ที่พบในกล้วยไม้ นั้น มีความสามารถในการผลิต IAA ได้น้อยกว่าที่พบในอ้อย และเนื่องจากข้อมูลที่ทำการศึกษาทดลองในไม้ดอกยังไม่มีผู้บันทึกไว้ จึงไม่ได้นำมาเปรียบเทียบในที่นี้ อย่างไรก็ตามการที่เชื้อมีความสามารถในการผลิต IAA มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นจุดที่น่าสนใจหากจะขยายผลการศึกษา เพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์ต่อไป

4.1.2.3.3 ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสจัดเป็นโพลีแซคคาไรด์แบบโครงสร้าง โดยส่วนใหญ่สารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ จะอยู่ในรูปของเซลลูโลส ซึ่งมีมากที่สุดในพืช ซึ่งในเนื้อไม้ประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 50 % เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์นี้สามารถผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งพืชและจุลินทรีย์ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลส ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย เช่นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะของวัว หรือควาย เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินท

รียเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งนับได้ว่าเป็นแหล่งที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดสำหรับนำมาใช้ เพราะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทำได้ง่ายและประหยัดต้นทุนในการผลิต

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส นั้นทำได้โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (CMC) นาน 7 วัน แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยย้อมด้วย congo red เข้มข้น 0.1 % และ NaCl 1 M หากมีการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อทำตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาข้างต้น จะเกิดวงใส (clear zone) รอบๆ โคลินิของเชื้อ แต่หากไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้นั้นจะไม่มีวงใสเกิดขึ้น ดังเปรียบเทียบในรูปที่ 12



รูปที่ 12 ลักษณะการย้อมสีเพื่อตรวจสอบเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ลักษณะของเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (ซ้าย) ลักษณะการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร(ขวา)

จากการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสกับเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท ESS 2, ESS 3, ESS 4 และ ESS 7 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยเชื้อไอโซเลท ESS 3 และ ESS 7 เกิด clear zone (วงใส) ในบริเวณที่กว้าง เมื่อเทียบกับขนาดของโคโลนิของเชื้อ อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone กับโคโลนิ (clear zone : colony) ของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทประมาณ 10 ในขณะที่เชื้อไอโซเลท ESS 2 และ ESS 4 มีอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone กับ โคโลนิ ประมาณ 5 แสดงว่าเชื้อไอโซเลท ESS 3 และ ESS 7 มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าเชื้อ ESS 2 และ ESS 4 ส่วนเชื้อไอโซเลท ESS 1, ESS 5 และ ESS 6 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ในการย่อยสลายได้ จึงไม่เกิดวงใสรอบๆ โคลินิของเชื้อ

เชื้อเอนโดไฟท์ที่รวบรวมได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Teaumroong และคณะ (2001) ที่พบว่าเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าว สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และเชื้อ *Herbaspirillum*

seropedicae, *H. Rubrisubalbicans*, *Indonella dechloratans*, *Azospirillum lipoferum*, *A. Brasilense* และเชื้อ *Enterobacter cancerogenus* ที่แยกได้ในข้าวป่าก็สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เช่นเดียวกัน (Elbeltagy และคณะ, 2001) เอนไซม์เซลลูเลสมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระจายตัวของเชื้อเอนโดไฟท์ เนื่องจาก สามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืชทำให้เชื้อสามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชส่วน intracellular เช่น เชื้อ *Azoarcus* ที่พบในข้าว สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเข้าอาศัยในพืช (Hurek and Reinhold and Hurek, 1994) นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังอาจเกี่ยวข้องกับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค ต้องอาศัยการเกิดแผลของพืชจึงจะเกิดการเข้าทำลาย อาจกล่าวได้ว่า หากเชื้อสาเหตุของโรคมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช จะสามารถเกิดโรคให้กับพืชได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุของโรคที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

แต่ในด้านการใช้ประโยชน์นั้นเอนไซม์เซลลูเลสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้หลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลผลิตทางการเกษตร อุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี เช่น ช่วยผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อสั้ม, ช่วยในการคัดแปลงเนื้อเยื่ออาหารของพืชผัก ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว หรือ ช่วยในการย่อยสลายซากเซลลูโลสในสิ่งปฏิกูล เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในขบวนการเปลี่ยนกากเซลลูโลสในรูปวัสดุเหลือทิ้ง กระดาษหนังสือพิมพ์ เพื่อนำมาผลิตสารประกอบที่ต้องการ เช่น น้ำตาล และแอลกอฮอล์ (ชนธร, 2538) นอกจากนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก ในเศษวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบอยู่มาก สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและสามารถนำมาแปรรูปผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ได้ เซลลูโลสหากได้รับการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้เป็นกลูโคสซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญในการผลิตแอลกอฮอล์, วิตามิน, กรดอินทรีย์, ยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ต่างๆ ในการย่อยสลายเพียงบางส่วนโดยการหมัก จะได้ปุ๋ยหมักที่มีประโยชน์ทางการเกษตร เป็นต้น

จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นเรื่องน่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถของเชื้อและประสิทธิภาพของเอนไซม์เพื่อพัฒนาในการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

4.1.2.4 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rDNA

จากการนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้ง 7 ไอโซเลทไปตรวจสอบและวิเคราะห์จำแนกชนิดด้วยเทคนิค 16S rDNA Sequencing เมื่อได้ลำดับเบสที่ต้องการ นำไปเข้าโปรแกรม Blast เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Gene Bank ว่าใกล้เคียงกับเชื้อชนิดใด แต่ก่อนที่จะนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับใน Gene Bank ควรทำการตรวจสอบก่อนว่า ลำดับเบสที่ได้มีความถูกต้องอย่างน้อย

เพียงใด โดยใช้โปรแกรม Chromas ร่วมกับ BioEdit ในการตรวจสอบ เมื่อได้ลำดับเบสที่ถูกต้องเหมาะสม จึงนำไปเข้าโปรแกรม Blast ได้ผลดังนี้

- (1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 1 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Methylobacterium fujisawae* (98.75% identity) (รูปที่ 13)
- (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Friedmanniella spumicola* (Identities = 97.36%) (รูปที่ 14)
- (3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 3 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* strain YJ001 16S ribosomal RNA gene (Identities = 99.80%) (รูปที่ 15)
- (4) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 4 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans* (Identities = 97.64%) (รูปที่ 16)
- (5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 5 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans* (Identities = 97.72%) (รูปที่ 17)
- (6) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 6 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans* (Identities = 97.85%) (รูปที่ 18)
- (7) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ESS 7 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Cellulosimicrobium sp.* (Identities = 99.32%) (รูปที่ 19)

จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอื้องสายสามสี ทั้งหมด 7 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้ดังนี้ คือเชื้อ ESS 1 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Methylobacterium fujisawae*, เชื้อ ESS 2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Friedmanniella spumicola*, เชื้อ ESS 3 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis*, เชื้อ ESS 4, ESS 5 และ ESS 6 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans* และเชื้อ ESS 7 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Cellulosimicrobium sp* แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการรายงาน พบว่าไม่อยู่ในกลุ่มของเชื้อที่มีผู้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ กล่าวคือ ส่วนมากเชื้อเอนโดไฟต์ที่เรียงในโตรเจน มักจะเป็นเชื้อในกลุ่ม *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Burkholderia* เป็นต้น แต่เชื้อที่แยกได้ไม่อยู่ในกลุ่มที่กล่าวมา อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อใหม่ที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน หรือมีข้อผิดพลาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ลำดับเบสที่ได้มีความคลาดเคลื่อน อย่างเช่น มี N มากเกินไป คือไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นลำดับเบสชนิดใด เมื่อเข้าโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์จึงมีความคลาดเคลื่อน อย่างไรก็ตาม สามารถวิเคราะห์ความใกล้เคียงกับเชื้อเอนโดไฟท์ว่ามีความใกล้ชิดกันมากน้อยเพียงใด

Isolate : ESS 1

>gi|38195103|gb|AY360526.1| Uncultured Methylobacteriaceae bacterium clone 10-3Ba02 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1445

Score = 2759 bits (1392), Expect = 0.0
Identities = 1407/1411 (99%), Gaps = 1/1411 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 34  AGTCGCTGACCCTACCGTGGTCGCTGCCTCCTTGCGGTTGGCGCAGCGCCGTCNGGTAA 93
          |||
Sbjct 1420 AGTCGCTGACCCTACCGTGGTCGCTGCCTCCTTGCGGTTGGCGCAGCGCCGTCGGGTAA 1361

Query 94  GACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGG 153
          |||
Sbjct 1360 GACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGG 1301

Query 154  CATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAAT 213
          |||
Sbjct 1300 CATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAAT 1241

Query 214  CCGAACTGAGACGGCTTTTGGGGATTGCTCCAGATCGCTCCTTCGCGTCCCCTACTGTCAC 273
          |||
Sbjct 1240 CCGAACTGAGACGGCTTTTGGGGATTGCTCCAGATCGCTCCTTCGCGTCCCCTACTGTCAC 1181

Query 274  CGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCATCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCA 333
          |||
Sbjct 1180 CGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCATCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCA 1121

Query 334  CACCTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAA 393
          |||
Sbjct 1120 CACCTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAA 1061

Query 394  CTAAGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA 453
          |||
Sbjct 1060 CTAAGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA 1001

Query 454  CGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCGCGCCACCGAAGTGACCCCAATCTCTCTGGGTA 513
          |||
Sbjct 1000 CGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCGCGCCACCGAAGTGACCCCAATCTCTCTGGGTA 941

Query 514  ACACGCCATGTCAAAGGATGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTC 573
          |||
Sbjct 940  ACACGCCATGTCAAAGGATGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTC 881

Query 574  CACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCC 633
          |||
Sbjct 880  CACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCC 821

Query 634  AGGCGGAATGCTCAAAGCGTTAGCTGCGCTACTGCGGTGCAAGCACCCCAACAGCTGGCA 693
          |||
Sbjct 820  AGGCGGAATGCTCAAAGCGTTAGCTGCGCTACTGCGGTGCAAGCACCCCAACAGCTGGCA 761

Query 694  TTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCG 753
          |||
Sbjct 760  TTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCG 701

```


Isolate : ESS 2

> [gi|3941406|gb|AF062535.1|AF062535](#) Friedmanniella spumicola 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1475

Score = 2599 bits (1311), Expect = 0.0
Identities = 1432/1464 (97%), Gaps = 7/1464 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 12  TACGACTTACTCCTAATCGCCNGNCCCACCTTAGACGGCTCCCTCCCACAAGGGTGGG 71
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1467 TACGACTTAGTCTTAATCGCCAGTCCCACCTTAGACGGCTCCCTCC-ACAAGGG-TTGGG 1410

Query 72  CCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 131
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1409 CCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATG-ACTTG-ACGGGCGGTGTGTACAACGCC 1352

Query 132  GGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGG 191
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1351 GGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGG 1292

Query 192  GTCGAGTTCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTTGC 251
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1291 GTCGAGTTCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTTGC 1232

Query 252  GGTATCGCAGCCCTTTGTACCGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCTGGACTTAAGGGGC 311
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1231 GGTATCGCAGCCCTTTGTACCGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCTGGACTTAAGGGGC 1172

Query 312  ATGATGACTTGACGTCATCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCTATGAGT 371
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1171 ATGATGACTTGACGTCATCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCTATGAGT 1112

Query 372  CCCCACCATTACGTGCTGGCAACATAGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC 431
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1111 CCCCACCATAACGTGCTGGCAACATAGAACGAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC 1052

Query 432  AACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCTTGCAGGG 491
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1051 AACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCTTGCAGGG 992

Query 492  CCTACATCTCTGCAGGTTTCCGGNGTATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT 551
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 991  GCTACATCTCTGCAGGTTTCCGGTGTATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT 932

Query 552  CGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAG 611
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 931  CGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAG 872

Query 612  CTTGCGGCCGTA CTCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTTCGGCACGGAGAACGT 671
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 871  CTTGCGGCCGTA CTCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTTCGGCACGGAGAACGT 812

Query 672  GGAATGTCCCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAGC 731
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 811  GGAATGTCCCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAGC 752

Query 732  CTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTTTCTCAGCGTCAGGTGATGCCAGAGAACCGCCTTCG 791
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 751  CTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTTTCTCAGCGTCAGGTGATGCCAGAGAACCGCCTTCG 692

```

Query 792 CCACCGGTGTTCTCCTCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTCCACCAGGAATTCCGTTCTCC 851
 |||
 Sbjct 691 CCACCGGTGTTCTCCTCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTCCACCAGGAATTCCGTTCTCC 632

 Query 852 CCTGCATCCCTCTAGTCCGCCCGTATCAAAGCAGGCTCGGGGTTAAGCCCCGAGTTTTC 911
 |||
 Sbjct 631 CCTGCATCCCTCTAGTCCGCCCGTATCAAAGCAGGCTCGGGGTTAAGCCCCGAGTTTTC 572

 Query 912 ACTCCTGACGCGACGAACCGCCTACAAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTC 971
 |||
 Sbjct 571 ACTCCTGACGCGACGACCGCCTACAAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTC 512

 Query 972 GGACCCTACGTATCACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTA 1031
 |||
 Sbjct 511 GGACCCTACGTATCACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTA 452

 Query 1032 CCGTCAC-TTGC GTTCGTCCCTACTGAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCGC 1090
 |||
 Sbjct 451 CCGTCACGTTAGCTTCGTCCCTACTGAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCGC 392

 Query 1091 ACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCC 1150
 |||
 Sbjct 391 ACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCC 332

 Query 1151 GTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTAC 1210
 |||
 Sbjct 331 GTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTAC 272

 Query 1211 CCGTCGAAGCCTTGGTGAGCCATCACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCC 1270
 |||
 Sbjct 271 CCGTCGAAGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCC 212

 Query 1271 CTGACCGCCGAGCTTTCACACCCACCCATGCAGG-TGAGTGCATATCCGGTATTAGC 1329
 |||
 Sbjct 211 TTGACCGCCGAGCTTTCACCCCAACCCATGAGGGCCGAG-GTCATATCCGGTATTAGC 153

 Query 1330 AGCTGTTTCCAGCTGGTATCCCGAAGTCAAGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGT 1389
 |||
 Sbjct 152 AGCTGTTTCCAGCTGGTATTCCGAAGTCAAGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGT 93

 Query 1390 TCGCCACTCGTGTACTCCCGAAGGAGCCTTACCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCC 1449
 |||
 Sbjct 92 TCGCCACTCGTGTACTCCCGAAGGGGCTTACCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCC 33

 Query 1450 GCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGA 1473
 |||
 Sbjct 32 GCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGA 9

รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท ESS 2 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Friedmanniella spumicola*

Isolate : ESS 3

> [gi|90812253|gb|DQ444283.1|](#) Bacillus subtilis strain YJ001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1511

Score = 2934 bits (1480), Expect = 0.0
Identities = 1482/1483 (99%), Gaps = 0/1483 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  CACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTT 60
          |||
Sbjct 1492 CACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTT 1433

Query 61  CGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC 120
          |||
Sbjct 1432 CGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC 1373

Query 121 ACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA 180
          |||
Sbjct 1372 ACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA 1313

Query 181  CTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCC 240
          |||
Sbjct 1312 CTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCC 1253

Query 241  TTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC 300
          |||
Sbjct 1252 TTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC 1193

Query 301  GTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATG 360
          |||
Sbjct 1192 GTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATG 1133

Query 361  CTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC 420
          |||
Sbjct 1132 CTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC 1073

Query 421  GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCGGAAGGGGACGTCCTATCTCT 480
          |||
Sbjct 1072 GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCGGAAGGGGACGTCCTATCTCT 1013

Query 481  AGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA 540
          |||
Sbjct 1012 AGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA 953

Query 541  CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGT 600
          |||
Sbjct 952  CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGT 893

Query 601  ACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA 660
          |||
Sbjct 892  ACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA 833

Query 661  CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCC 720
          |||
Sbjct 832  CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCC 773

```

Query 721 ACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC 780
 |||
 Sbjct 772 ACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC 713

 Query 781 TCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCA 840
 |||
 Sbjct 712 TCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCA 653

 Query 841 AGTTCCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAA 900
 |||
 Sbjct 652 AGTTCCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAA 593

 Query 901 GAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTAT 960
 |||
 Sbjct 592 GAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTAT 533

 Query 961 TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCC 1020
 |||
 Sbjct 532 TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCC 473

 Query 1021 GCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTT 1080
 |||
 Sbjct 472 GCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTT 413

 Query 1081 CATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGCTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGC 1140
 |||
 Sbjct 412 CATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGCTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGC 353

 Query 1141 TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG 1200
 |||
 Sbjct 352 TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG 293

 Query 1201 TCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGTAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGG 1260
 |||
 Sbjct 292 TCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGTAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGG 233

 Query 1261 GTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTATGTCTGAACCATGCGGTTAGACAA 1320
 |||
 Sbjct 232 GTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTATGTCTGAACCATGCGGTTAGACAA 173

 Query 1321 CCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCAC 1380
 |||
 Sbjct 172 CCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCAC 113

 Query 1381 GTGTTACTACCCGTCGCGGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACT 1440
 |||
 Sbjct 112 GTGTTACTACCCGTCGCGGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACT 53

 Query 1441 TGCATGTATTAGGCACGCCGCCNGCGTTCGTCTGAGCCAGGA 1483
 |||
 Sbjct 52 TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGA 10

รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท ESS 3 เปรียบเทียบกับ เชื้อ *Bacillus subtilis*

Isolate : ESS 4

> [gi|57996741|emb|AJ871433.1](#) Chelatococcus asaccharovorans partial 16S rRNA gene, isolate CP141b
Length=1454

Score = 2583 bits (1303), Expect = 0.0
Identities = 1399/1429 (97%), Gaps = 9/1429 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1   GTTACGACTTCCCCCAGTCGCTGACCCTACCGTGGTCGCCTGCCTCCTTGC GGTGGCG 60
          |||
Sbjct 1441 GTTACGACTTCCCCCAGTCGCTGACCCTACCGTGGTCGCCTGCCTCCTTGC GGTGGCG 1382

Query 61   CAGCGCCGTCGGGTAAGACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG 120
          |||
Sbjct 1381 CAGCGCCGTCGGGTAAGACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG 1322

Query 121  AACGATTACCGTGGCGTTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCACTCG 180
          |||
Sbjct 1321 AACGATTACCGTGGCGTTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGCACTCG 1262

Query 181  AGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTGAACGAGGTTTGGAGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTT 240
          |||
Sbjct 1261 AGTTGCAGAGTGCAATCTGAAGTGAACGAGGTTTGGAGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTT 1202

Query 241  CGCTGCCCTTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGGA 300
          |||
Sbjct 1201 CGCTGCCCTTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGCCATG-A 1143

Query 301  GGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCC 360
          |||
Sbjct 1142 GGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCC 1083

Query 361  CAACCAATGATGGCAACTAGGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT 420
          |||
Sbjct 1082 CAACTGAATGATGGCAACTAGGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT 1023

Query 421  CTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCCGCCAGCCGAAGTGAAG 480
          |||
Sbjct 1022 CTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCCGCCAGCCGAAGTGAAG 963

Query 481  GATCCTGTCTCCAGAACCATACGGGACATGTCAAAGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGC 540
          |||
Sbjct 962  AGCAGTGTCTCCACTGCCATACCGGACATGTCAAAGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGC 903

Query 541  TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTT 600
          |||
Sbjct 902  TTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTT 843

Query 601  AATCTTGGACCGTACTCCCAGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTGACGAG 660
          |||
Sbjct 842  AATCTTGGACCGTACTCCCAGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTGACGAG 783

Query 661  CAAGCTCGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC 720
          |||
Sbjct 782  CAAGCTCGCCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC 723

```


Query 728 ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGATCCGGACCAGTCAGCCGCT 787
 |||
 Sbjct 726 ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGAACCGGACCAGTCAGCCGCT 667

Query 788 TCGCCACTGGTGTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTA 847
 |||
 Sbjct 666 TCGCCACTGGTGTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTA 607

Query 848 ACCTCTCCGGTCTCAAGCCATGCAGTATCGAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGGCT 907
 |||
 Sbjct 606 ACCTCTCCGGTCTCAAGCCATGCAGTATCGAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGGCT 547

Query 908 TTCACCCCGGACTTACAAAGCCGCCTACGCGCCTTTACGCCAGTGATTCCGAACAAC 967
 |||
 Sbjct 546 TTCACCCCGG-ACTTACAAAGCCGCCTACGCGCCTTTACGCCAGTGATTCCGAACAAC 488

Query 968 GCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCC 1027
 |||
 Sbjct 487 GCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCC 428

Query 1028 GGTACCGTCATTATCGTCCCGGACGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCGTCATCACTCA 1087
 |||
 Sbjct 427 GGTACCGTCATTATCGTCCCGGACGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCGTCATCACTCA 368

Query 1088 CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCG 1147
 |||
 Sbjct 367 CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCG 308

Query 1148 TAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACT 1207
 |||
 Sbjct 307 TAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACT 248

Query 1208 GATCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACCAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCCT 1267
 |||
 Sbjct 247 GATCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACCAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCCT 188

Query 1268 TCAGCGATAAATCTTTCTGCTCTCGCACGTATCCGGTATTAGCCCAAGTTTCCCTGGGT 1327
 |||
 Sbjct 187 TCAGCGATAAATCTTTCTGCTCTCGCACGTATCCGGTATTAGCCCAAGTTTCCCTGGGT 128

Query 1328 ATTCCGAAGTGAAGGGCAGTTCACCGCTTACTCACCCTGCTGCCACTCACCCTGAAG 1387
 |||
 Sbjct 127 ATTCCGAAGTGAAGGGCAGTTCACCGCTTACTCACCCTGCTGCCACTCACCCTGAAA 68

Query 1388 GATGCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGCCAG 1441
 |||
 Sbjct 67 GGTGCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGCCAG 14

รูปที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท ESS 5 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans*

Query 734 GTTTGCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGAACC GGACCAGTCAGCCGCCTTCGCC 793
 |||
 Sbjct 721 GTTTGCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGAACC GGACCAGTCAGCCGCCTTCGCC 662

 Query 794 ACTGGTGTCTTTCGGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTAACCTC 853
 |||
 Sbjct 661 ACTGGTGTCTTTCGGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTAACCTC 602

 Query 854 TTCCGGTCTCAAGCCATGCAGTATCCAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGGCTTTCAC 913
 |||
 Sbjct 601 TTCCGGTCTCAAGCCATGCAGTATCCAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGGCTTTCAC 542

 Query 914 CCCCAGCTTACAAAGCCGCCTACGCGCCCTTACGCCAGTGATTCCGAACAACGCTAGC 973
 |||
 Sbjct 541 CCCCAGCTTACAAAGCCGCCTACGCGCCCTTACGCCAGTGATTCCGAACAACGCTAGC 482

 Query 974 CCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGTACC 1033
 |||
 Sbjct 481 CCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGTACC 422

 Query 1034 GTCATTATCGTCCCGGACGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTACGCGGC 1093
 |||
 Sbjct 421 GTCATTATCGTCCCGGACGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTACGCGGC 362

 Query 1094 ATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG 1153
 |||
 Sbjct 361 ATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG 302

 Query 1154 TTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGT 1213
 |||
 Sbjct 301 TTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGT 242

 Query 1214 CGCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCCTTCANNG 1273
 |||
 Sbjct 241 CGCCTTGGTGGGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCCTTCAGCG 182

 Query 1274 ATAAATCTTCTGCTCTCGCACGTATCCGGTATTAGCCCAAGTTCCCTGGGTTATTCCG 1333
 |||
 Sbjct 181 ATAAATCTTCTGCTCTCGCACGTATCCGGTATTAGCCCAAGTTCCCTGGGTTATTCCG 122

 Query 1334 AACTGAAGGGCACGTTCCACGCGTACTCACCCGTCTGCCACTCACCTTG--CGGTGCG 1391
 |||
 Sbjct 121 AACTGAAGGGCACGTTCCACGCGTACTCACCCGTCTGCCACTCACCCGAAAGGTGCG 62

 Query 1392 TTCGACTTGATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGCCAG 1439
 |||
 Sbjct 61 TTCGACTTGATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGCCAG 14

รูปที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท ESS 6 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Chelatococcus asaccharovorans*

Isolate : ESS 7

> [gi|51491467|dbj|AB188222.1](#) Cellulosimicrobium sp. TUT1242 gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=1514

Score = 2837 bits (1431), Expect = 0.0
Identities = 1460/1470 (99%), Gaps = 0/1470 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 23  ACGACTTACTCNAATCGCCTGACCCACCTTCGACCACTCCCCCGGAACGGTTGGGCC 82
          |||||  ||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1471 ACGACTTAGTCCAATCGCCAGTCCCACCTTCGACCACTCCCCCGGAACGGTTGGGCC 1412

Query 83  ATGGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGA 142
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1411 ATGGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGA 1352

Query 143 ACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCCG 202
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1351 ACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCCG 1292

Query 203 AGTTGCAGACCCCAATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTTGGGATTGCTCCACCTTACGGTA 262
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1291 AGTTGCAGACCCCAATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTTGGGATTGCTCCACCTTACGGTA 1232

Query 263 TCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGA 322
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1231 TCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGA 1172

Query 323 TGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCCATGAGTCCCC 382
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1171 TGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCCATGAGTCCCC 1112

Query 383 GGCATAACCCGCTGGCAACATGGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA 442
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1111 GGCATAACCCGCTGGCAACATGGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA 1052

Query 443 TCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGCACGAGTGCCAAAGAGACC 502
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1051 TCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGCACGAGTGCCAAAGAGACC 992

Query 503 ACCATCTCTGGTGGCTTCCCGTGCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG 562
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 991  ACCATCTCTGGTGGCTTCCCGTGCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG 932

Query 563 AATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCC 622
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 931  AATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCC 872

Query 623 TTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTTGCTGCGGCACGGAACCTCGTGG 682
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 871  TTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTTGCTGCGGCACGGAACCTCGTGG 812

Query 683 AATGAGCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCT 742
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 811  AATGAGCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCT 752

```

Query 743 GTTCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTGCGGCCAGAGACCTGCCTTCGCC 802
 |||
 Sbjct 751 GTTCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTGCGGCCAGAGACCTGCCTTCGCC 692

 Query 803 ATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCC 862
 |||
 Sbjct 691 ATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCC 632

 Query 863 TACCGCACTTAGTCTGCCGTACCCGATGCAAGCTCGAGGTTGAGCCTCGAGTTTTTAC 922
 |||
 Sbjct 631 TACCGCACTTAGTCTGCCGTACCCGATGCAAGCTCGAGGTTGAGCCTCGAGTTTTTAC 572

 Query 923 ACCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGC 982
 |||
 Sbjct 571 ACCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGC 512

 Query 983 GCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACC 1042
 |||
 Sbjct 511 GCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACC 452

 Query 1043 GTCAC TTGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCAC 1102
 |||
 Sbjct 451 GTCAC TTGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCAC 392

 Query 1103 GCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGT 1162
 |||
 Sbjct 391 GCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGT 332

 Query 1163 AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCC 1222
 |||
 Sbjct 331 AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCC 272

 Query 1223 GTCGTCGCCTTGGTAGGCCATACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCT 1282
 |||
 Sbjct 271 GTCGTCGCCTTGGTAGGCCATACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCT 212

 Query 1283 GTCCGAAAACTTTCCAACCACCCCATGCGAAGGTAGCTCATATCCGGTATTAGCCCCG 1342
 |||
 Sbjct 211 GACCGAAAACTTTCCAACCACCCCATGCGAAGGTAGCTCATATCCGGTATTAGCCCCG 152

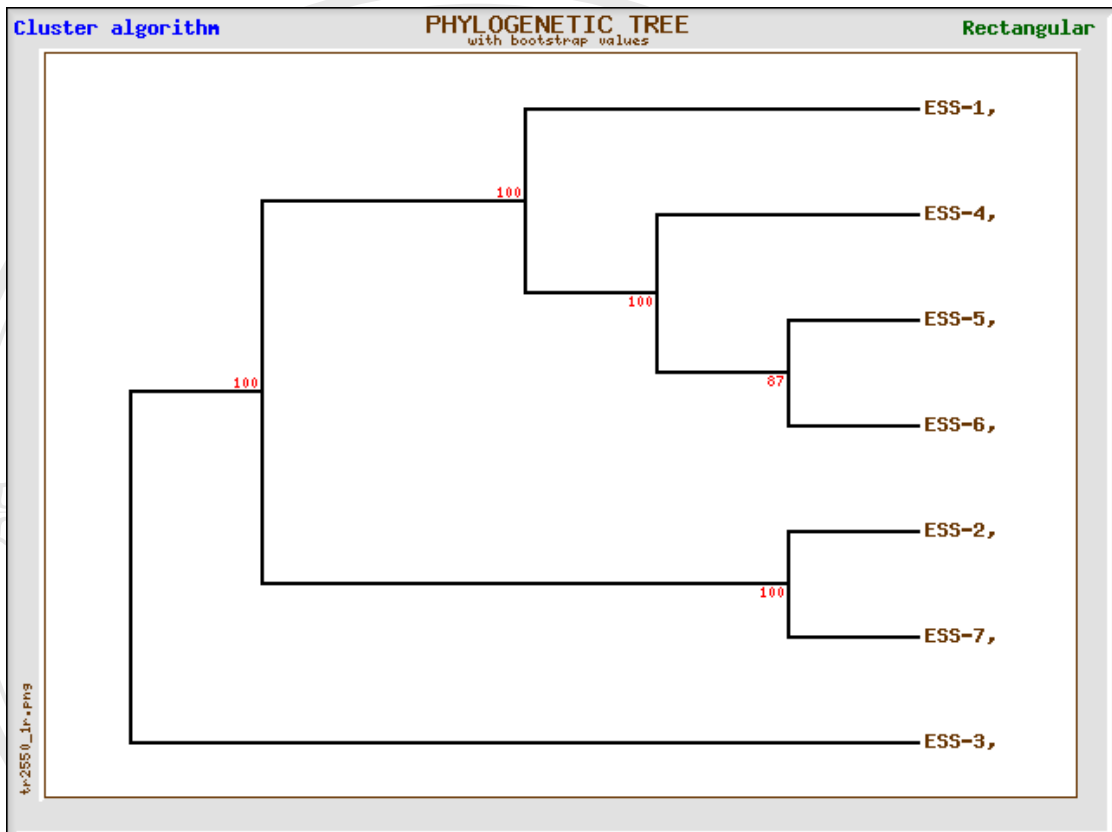
 Query 1343 GTTTCGGGAGTTATCCCGAAGTCAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTTCGC 1402
 |||
 Sbjct 151 GTTTCGGGAGTTATCCCGAAGTCAAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTTCGC 92

 Query 1403 CACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCATCATCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGC 1462
 |||
 Sbjct 91 CACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCATCATCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGC 32

 Query 1463 CAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAATC 1492
 |||
 Sbjct 31 CAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAATC 2

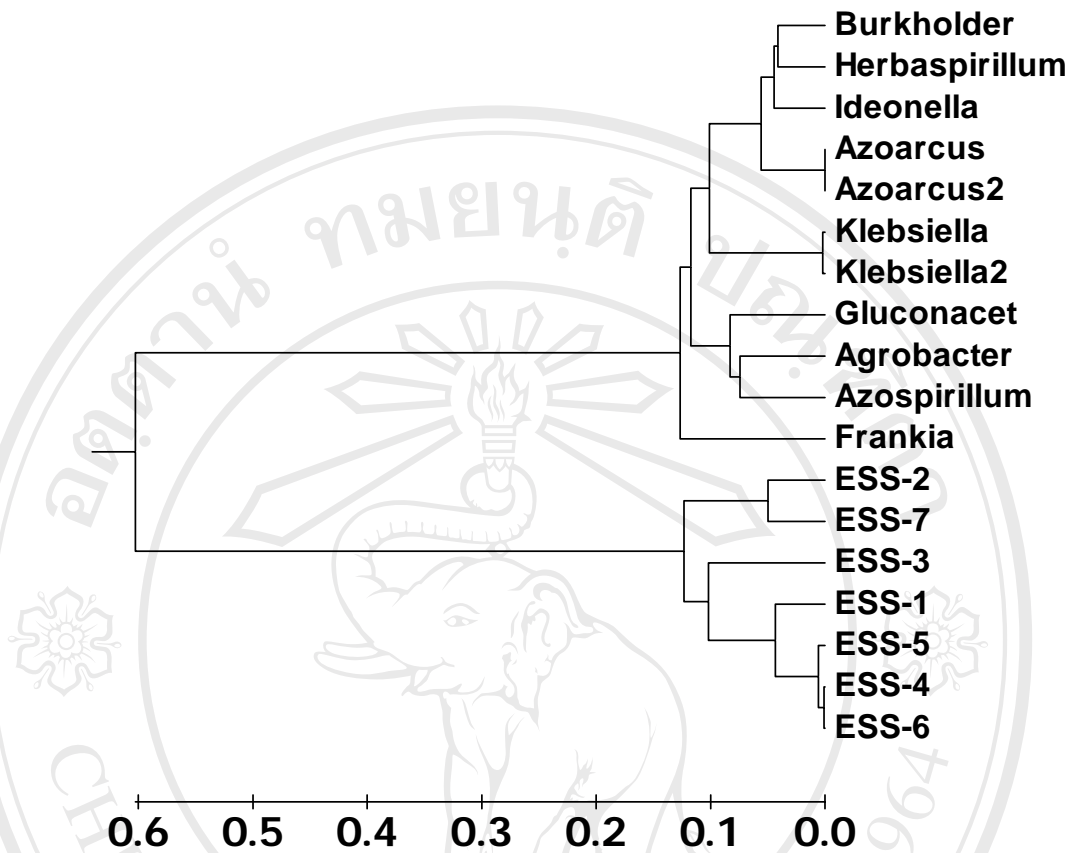
รูปที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท ESS 7 เปรียบเทียบกับ เชื้อ *Cellulosimicrobium*
sp

นำลำดับเบสของเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท ที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เทียบเป็นแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ได้ความสัมพันธ์ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสระหว่างเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท

พบว่า เชื้อ ESS 5 และ ESS 6 มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด รวมทั้งเชื้อ ESS 2 และ 7 ส่วนเชื้อ ESS 3 จัดว่าอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่แยกได้ทั้ง 7 ไอโซเลทกับลำดับเบสของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีรายงานว่า เป็นเชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยทำแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดของเชื้อ พบว่า เชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่มีการค้นพบ (รูปที่ 21) อาจเป็นได้ว่า เชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นเชื้อชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการระบุที่แน่นอน หรือเชื้อที่แยกได้ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาที่กล่าวถึง การทดลองนี้เป็นงานทดลองที่ค่อนข้างใหม่ ข้อมูลที่ใช้เปรียบเทียบจึงใช้เปรียบเทียบกับเอนโดไฟท์ในพืชอื่นๆที่มีการรายงานในฐานข้อมูล อาจเปรียบเทียบกันได้ไม่ได้นัก นอกจากนี้ข้อมูลลำดับเบสส่วนใหญ่ที่มีบันทึกไว้ อาจไม่ครอบคลุมงานที่ทำการศึกษา ผลที่ได้เมื่อนำมาทำแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์จึงแตกต่างออกไป



รูปที่ 21 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสระหว่างเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียเอนโคไฟท์ตรึงไนโตรเจน

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในกล้วยไม้และตรวจหาการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช

4.2.1 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

4.2.1.1 กล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี

จากการปลูกเชื้อ ESS 2 และ ESS 3 ซึ่งเป็นเชื้อเอนโคไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงให้กับกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี ซึ่งเป็นกล้วยไม้สายพันธุ์เดิมที่แยกเชื้อออกมาได้ เพื่อทดสอบการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อกล้วยไม้และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนหลังจากเชื้อเอนโคไฟท์เข้าอยู่อาศัยแล้วด้วยการปลูกเชื้อให้กับเนื้อเยื่อกล้วยไม้ส่วนรากและส่วนเหนือรากซึ่งเป็นส่วนใบรวมกับลำต้น ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA ตามตารางที่ 12 พบว่า การปลูกถ่ายเชื้อในส่วนของรากและส่วนเหนือรากให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเชื้อสามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้ทั้งทางราก, ลำต้น

และใบ แต่อัตราการตรึงไนโตรเจนในกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท กับชุดควบคุมที่ไม่มีปลูกเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล้วยไม้ที่ปลูกถ่ายด้วยเชื้อ ESS 3 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด รองลงมาคือกล้วยไม้ที่ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 2 กล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีอัตราการตรึงไนโตรเจนที่สูงกว่ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ (ชุดควบคุม) เนื่องจากเชื้อเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อและช่วยเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชอาศัย อย่างไรก็ตามกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ ESS 3 จะมีลักษณะต้นคล้ายเป็นโรค อาจเพราะปริมาณเชื้อที่ปลูกถ่ายมีมากเกินไป เนื่องจากเชื้อ ESS 3 เป็นเชื้อเจริญเร็วอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเข้าอาศัยสามารถกระจายตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดี เพราะเชื้อไอโซเลทนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช จึงทำลายเซลล์ทำให้พืชอาศัยมีลักษณะคล้ายเกิดโรค แต่เพราะเชื้อนี้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนค่อนข้างดี เมื่อนำมาตรวจสอบอัตราการตรึงไนโตรเจนจึงให้ผลที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ ESS 2 แต่ถึงแม้ว่าเชื้อ ESS 2 เป็นเชื้อเจริญช้า และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนน้อย แต่ก็ไม่ได้ต้นกล้วยไม้แสดงอาการคล้ายเป็นโรค

ตารางที่ 12 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่ปลูกถ่ายให้กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอื้องสายสามสี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยอัตราการตรึงไนโตรเจน (nmolC ₂ H ₄ / hr/ กรัมน้ำหนักสด)
ชุดควบคุมส่วนเหนือราก	0.000d**
เอื้องสาย+เชื้อ ESS 2 บริเวณส่วนเหนือราก	5.485c
เอื้องสาย+เชื้อ ESS 3 บริเวณส่วนเหนือราก	11.900a
ชุดควบคุมส่วนราก	0.000d
เอื้องสาย+เชื้อ ESS 2 บริเวณส่วนราก	4.402c
เอื้องสาย+เชื้อ ESS 3 บริเวณส่วนราก	8.455b
Mean	5.040
F-test	*
%CV	20.05

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P_{0.05}

** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P_{0.05}

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อเอนโดไฟท์กับตำแหน่งการปลูกถ่ายเชื้อให้กับกล้วยไม้

กล้วยไม้	ไม่ใส่เชื้อ	เชื้อที่ ESS 2	เชื้อที่ ESS 3	Mean (ส่วนที่ได้รับเชื้อ)
ส่วนเหนือราก	0.00*	5.48	11.90	5.80ns
ส่วนราก	0.00	4.40	8.46	4.28ns
Mean (เชื้อที่ทดลอง)	0.00c**	4.94b	10.18a	

ns = Non significance

* ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P_{0.05}$

4.2.1.2 กล้วยไม้สายพันธุ์ลูกผสม White fairy (W.F)

การปลูกถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์ให้กับกล้วยไม้ลูกผสมเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อสามารถเข้าอาศัยในพืชอาศัยต่างสายพันธุ์และมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ โดยการปลูกเชื้อ ESS 2 และ ESS 3 ในกล้วยไม้ลูกผสม W.F และทำการประเมินการตรึงไนโตรเจนหลังปลูกถ่ายเชื้อนาน 30 วัน พบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีอัตราการตรึงไนโตรเจนที่สูงกว่ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ ESS 3 มีอัตราการตรึงไนโตรเจนมากกว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ ESS 2 เช่นเดียวกันกับในกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี แสดงให้เห็นว่า การปลูกถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์ให้กับกล้วยไม้ที่ปลอดเชื้อสามารถเพิ่มอัตราการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชได้ (ตารางที่ 14)

เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาการตรึงไนโตรเจนกล้วยไม้ จึงต้องอาศัยข้อมูลจากรายงานการตรึงไนโตรเจนในพืชอื่นมาช่วยยืนยันความเป็นไปได้ของงานวิจัยนี้ กล่าวคือ Oliveira และคณะ (2002) ได้รายงานผลการปลูกถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับกล้วยไม้ อ้อย แล้วตรวจสอบโดยด้วยเทคนิค ^{15}N -isotope โดยเชื้อที่ใช้ปลูกถ่ายให้กับพืชได้แก่ เชื้อ *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* และ *Burkholderia* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่มีรายงานการศึกษาว่าเป็นเชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในอ้อย พบว่าพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระและน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับเชื้อ นอกจากนี้เมื่อทำการแยกเชื้อเอนโด

ไฟฟ้ที่ปลูกถ่ายให้กับพืช พบว่ามีปริมาณเชื้อจำนวนมากในรากพืช การวิเคราะห์การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพโดยใช้ ^{15}N -isotope แสดงให้เห็นว่าการปลูกถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชสนับสนุนให้มีการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 14 ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่ปลูกถ่ายให้กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

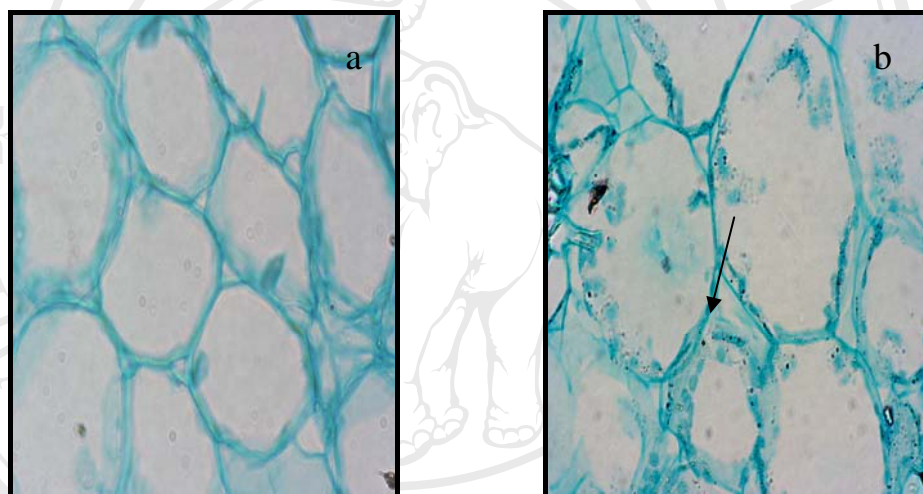
Isolate No.	ค่าเฉลี่ยอัตราการตรึงไนโตรเจน ($\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{hr/ กรัม น้ำหนักสด}$)
ชุดควบคุม	0.00
กล้วยไม้ลูกผสม + เชื้อ ESS 2	1.82
กล้วยไม้ลูกผสม + เชื้อ ESS 3	6.36
Mean	2.724
$\text{LSD}_{0.05}$	0.878
%CV	17.45

รายงานการตอบสนองในด้านการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ *H. seropedicae* และ *Burkholderia* spp. ในข้าว ข้าวฟ่าง และข้าวโพด ซึ่งทำให้พืชมีน้ำหนักรากเพิ่มมากขึ้นมากกว่า 100% และน้ำหนักต้นและใบเพิ่มขึ้น 12-20% (Baldani และคณะ, 2000 และ Teaumroong และคณะ, 2001) นอกจากนี้พบว่าการปลูกเชื้อ *Burkholderia vietnamiensis* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 19% ของไนโตรเจนทั้งหมดในข้าว (Baldani และคณะ, 2000)

เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชอายุยาวเจริญเติบโตช้า การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตจึงเห็นไม่ชัดเจน (ไม่ได้รายงานผล) แต่จากการสังเกตพบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ ESS 3 นั้น ต้นไม่ค่อยเจริญ และเหี่ยวกว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเชื้อ ESS 2 และผนังเซลล์ของต้นกล้วยไม้เป็นแผล (เหมือนถูกข่อย) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ ESS3 เป็นเชื้อเจริญเร็ว มีปริมาณมากเกินไปเมื่อเข้าอาศัยภายในต้นกล้วยไม้ อีกทั้งข้อมูลจากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสพบว่า เชื้อ ESS 3 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช เชื้ออาจย่อยสลายผนังเซลล์เพื่อเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช ยิ่งเมื่อมีปริมาณเชื้อจำนวนมากจึงเกิดอันตรายกับพืชอาศัยได้ จึงทำให้ต้นพืชเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร

4.2.2 การตรวจสอบการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อพืช จากการตัดเนื้อเยื่อพืช โดยวิธีไมโครเทคนิคทางพืช (Plant microtechnique)

ผลการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกถ่ายให้กับกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านขั้นตอนการย้อมสี ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ มีเชื้อแบคทีเรียอาศัยอยู่ ทั้งในส่วนราก ลำต้น และใบ ดังแสดงในภาพ 23 จะเห็นได้ว่าเชื้อเอนโดไฟท์สามารถเข้าอาศัยในทุกส่วนของต้นกล้วยไม้ โดยเฉพาะบริเวณราก จะพบเชื้อมากกว่าบริเวณลำต้นและใบ โดยจะกระจายทั่วไปภายในเนื้อเยื่อพืช ส่วนในกล้วยไม้ที่ไม่ได้ปลูกถ่ายเชื้อไม่พบการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช ดังรูปที่ 24



รูปที่ 22 เปรียบเทียบเนื้อเยื่อที่ไม่มีการเข้าอาศัยของเชื้อ (a) กับเนื้อเยื่อที่พบการเข้าอาศัยของเชื้อเอนโดไฟท์ (b) ส่วนลำต้นกล้วยไม้ (เซลล์แบคทีเรียที่กำลังขยาย 1000)

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเชื้อด้วย Plant microtechnique สำหรับการหาตำแหน่งการเข้าอาศัยของเชื้อจุลินทรีย์ในพืช มีข้อดีคือ ค่าใช้จ่ายไม่สูง สามารถทำได้เอง แต่มีข้อจำกัดค่อนข้างมากเช่นกัน นั่นคือ ต้องอาศัยหลายขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างพืช และใช้เวลานานในการแช่ตัวอย่างใน parafin ซึ่งต้องคอยตรวจสอบอยู่เสมอว่า parafin ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเพียงพอ สำหรับที่จะนำไปตัดได้หรือไม่ นอกจากนี้ต้องอาศัยความชำนาญในการตัด เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่สมบูรณ์ และเมื่อได้ชิ้นส่วนพืชแล้วจะต้องนำมาย้อมสีเนื้อเยื่อ เป็นขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งในขั้นตอนนี้ จะเห็นความแตกต่างของเนื้อเยื่อพืชกับเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจะย้อมติดสีของ safranin O จะเห็นเป็นสีแดง

นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจดูการเข้าอาศัยของเชื้อเอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อของพืช โดยใช้ green fluorescent protein (gfp) ซึ่ง green fluorescent protein เป็นโปรตีนที่ได้จากแมงกะพรุน มี

ลักษณะพิเศษ คือ เรื่องแสงด้วยตัวมันเองโดยไม่ต้องมีตัวกระตุ้น จึงนิยมใช้เป็นตัวติดตามเซลล์ที่ต้องการศึกษา และจะมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกล้อง scanning confocal laser microscopy (SCLM) ซึ่งจะเห็นเป็นภาพสามมิติ เทคนิคนี้จะสามารถระบุได้ชัดเจน แต่เป็นเทคนิคราคาแพงและต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจในการดำเนินงาน

การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนการผลิต IAA และความสามารถในการย่อยสลายเซลล์โลสของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ทั้งในพืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย ข้าว หรือในพืชไม้ผล จากเดิมที่มีการพบเชื้อเพียงไม่กี่สายพันธุ์ แต่จากการศึกษาที่เพิ่มมากขึ้นและขยายวงกว้าง ทำให้มีข้อมูลของเชื้อตรึงไนโตรเจนและพืชที่สนใจศึกษาเพิ่มมากขึ้น ดังที่กล่าวในตรวจเอกสาร การวิจัยที่ไม่หยุดนิ่ง มักนำประโยชน์มาสู่การพัฒนาด้านการเกษตร ยิ่งในยุคปัจจุบันที่เน้นการพัฒนาควบคู่การรักษาสภาพแวดล้อม คนหันมาสนใจเกษตรอินทรีย์ ที่ลดการใช้สารเคมีเพิ่มมากขึ้น จึงนับเป็นข้อดีด้านการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจน เพื่อใช้ควบคู่กับสารเคมี ไม่ว่าจะเป็นในด้านการลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี และลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งด้านการนำไปประยุกต์ใช้งานการเกษตรด้านชีวภาพ และปรับปรุงดิน จึงเป็นเรื่องน่าสนใจหากจะมีการขยายผลการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved