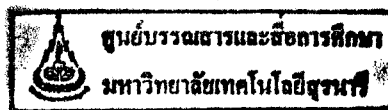
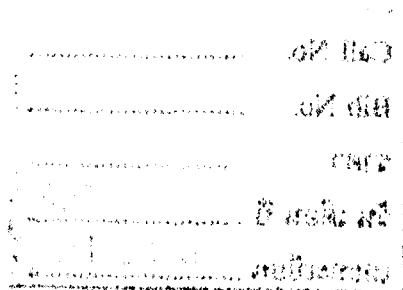


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศ  
ต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน  
(รหัสโครงการ BRT240001)

อภิธานศัพท์



ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โดยการสนับสนุนของ

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพใน  
ประเทศไทย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ  
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
(สกว./ศช.-สวทช.)

โครงการ ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน  
(รหัสโครงการ BRT240001)

คณะผู้วิจัย

1. ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด	หัวหน้าโครงการ	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง	ผู้ร่วมวิจัย	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. ดร. สมศักดิ์ โคตรพงศ์	ผู้ร่วมวิจัย	กรมวิชาการเกษตร
4. ดร. อังฉรา นันทกิจ	ผู้ร่วมวิจัย	กรมวิชาการเกษตร
5. ดร. สมพร ชุนห์ลือชานนท์	ผู้ร่วมวิจัย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6. ดร. เศรษฐา ศิริพิณฑุ์	ผู้ร่วมวิจัย	มหาวิทยาลัยแม่โจ้

โดยการสนับสนุนของ

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย  
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ  
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สกว./ศช.-สวทช.)

## สารบัญ

เรื่อง	หน้าที่
บทคัดย่อ	A-C
หลักการและผลงานที่มีมาก่อน	I
วัตถุประสงค์	V
แผนงานวิจัย	VI
ผลการดำเนินงานและการรวบรวมข้อมูลทั่วไป	XI
<b>ส่วนที่ 1 จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่มไรโซเบียม</b>	
วัตถุประสงค์ที่ 1-3	2
- อุปกรณ์และวิธีการของการตรวจวัดผล	3
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	5
- สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	29
วัตถุประสงค์ที่ 4	30
- อุปกรณ์และวิธีการ	31
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
ภาคผนวก	53
<b>ส่วนที่ 2 จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย</b>	
วัตถุประสงค์ที่ 1-3	75
- อุปกรณ์และวิธีการ	76
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	79
- สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	101
วัตถุประสงค์ที่ 4	102
- อุปกรณ์และวิธีการ	104
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	107
- สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	153
ภาคผนวก	155

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้าที่
<b>ส่วนที่ 3 แบบที่เรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ</b>	
<b>วัตถุประสงค์ที่ 1-3</b>	164
- อุปกรณ์และวิธีการ	168
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	170
- สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	183
<b>วัตถุประสงค์ที่ 4</b>	193
- อุปกรณ์และวิธีการ	194
- ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	196
- สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	205
<b>ภาคผนวก</b>	206
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	261
<b>ภาคผนวก</b>	
การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้	269
การผลิตบุคลากรของ โครงการ	270
การตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการ	271
รายละเอียดการเสนอผลงานวิจัย	271

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้าที่
1 ก.	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินภาคเหนือ	XV
2 ก.	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินภาคกลาง	XVI
3 ก.	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	XVII
4 ก.	กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคกลาง	XVIII
5 ก.	กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคเหนือ	XIX
6 ก.	กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	XX
<b>ไรโซเบียม</b>		
1.1	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางครั้งที่ 1-15	6
1.2	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15	9
1.3	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือครั้งที่ 1-15	12
1.4	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคกลางปีที่ 1-3	15
1.5	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคเหนือปีที่ 1-3	15
1.6	ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือปีที่ 1-3	15
1.7	ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคกลาง ครั้งที่ 1 – 8	21
1.8	ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคเหนือ ครั้งที่ 1 – 8	24
1.9	ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1 – 8	27
1.10	ปริมาณเฉลี่ยไรโซเบียมในตัวอย่างดินเพาะปลูกพืชและพื้นที่ป่าภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	28
1.11	The range of AA from rhizobial isolates.	38
1.12	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from highest mountain area in rainy season. M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM <sub>1</sub> -1; Lane 2, ICM <sub>1</sub> -4; Lane 3, INM <sub>1</sub> -1; Lane 4, INM <sub>1</sub> -2; Lane 5, INM <sub>1</sub> -4; Lane 5, INEM <sub>1</sub> -1, Lane 7, INEM <sub>1</sub> -2; Lane 8, INEM <sub>1</sub> -3 and Lane 9, INEM <sub>1</sub> -4.	40

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
1.13	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from highest mountain area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICM <sub>1</sub> -1; Lane 2, IIICM <sub>1</sub> -2; Lane 3, IIICM <sub>1</sub> -3; Lane 4, IIICM <sub>1</sub> -4; Lane 5, IINEM <sub>1</sub> -1; Lane 6, IINEM <sub>1</sub> -2; Lane 7, IINEM <sub>1</sub> -3 and Lane 8, IINEM <sub>1</sub> -4	40
1.14	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from middle mountain area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM <sub>2</sub> -1; Lane 2, ICM <sub>2</sub> -2; Lane 3, ICM <sub>2</sub> -3; Lane 4, ICM <sub>2</sub> -4; Lane 5, INM <sub>2</sub> -1; Lane 6, INM <sub>2</sub> -2; Lane 7, INM <sub>2</sub> -3; Lane 8, INM <sub>2</sub> -4; Lane 9, INEM <sub>2</sub> -1; Lane 10, INEM <sub>2</sub> -2; Lane 11, INEM <sub>2</sub> -3 and Lane 12, INEM <sub>2</sub> -4.	41
1.15	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from middle mountain area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICM <sub>2</sub> -1; Lane 2, IIICM <sub>2</sub> -2; Lane 3, IIICM <sub>2</sub> -3; Lane 4, IIICM <sub>2</sub> -4; Lane 5, IINM <sub>2</sub> -1; Lane 6, IINM <sub>2</sub> -2; Lane 7, IINM <sub>2</sub> -3; Lane 8, IINM <sub>2</sub> -4; Lane 9, IINEM <sub>2</sub> -2; Lane 10, IINEM <sub>2</sub> -3 and Lane 11, IINEM <sub>2</sub> -4.	41
1.16	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from foot hill of mountain area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM <sub>3</sub> -1; Lane 2, ICM <sub>3</sub> -2; Lane 3, ICM <sub>3</sub> -3; Lane, ICM <sub>3</sub> -4; Lane 5, INM <sub>3</sub> -1; Lane 6, INM <sub>3</sub> -2; Lane 7, INM <sub>3</sub> -3; Lane 8, INM <sub>3</sub> -4; Lane 9, INEM <sub>3</sub> -1; Lane 10, INEM <sub>3</sub> -2; Lane 11, INEM <sub>3</sub> -3 and Lane 12, INEM <sub>3</sub> -4.	42
1.17	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from foot hill of mountain area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICM <sub>3</sub> -1; Lane 2, IIICM <sub>3</sub> -2; Lane 3, IIICM <sub>3</sub> -3; Lane 4, IIICM <sub>3</sub> -4; Lane 5, IINM <sub>3</sub> -1; Lane 6, IINM <sub>3</sub> -2; Lane 7, IINM <sub>3</sub> -3; Lane 8, IINM <sub>3</sub> -4; Lane 9, IINEM <sub>3</sub> -2; Lane 10, IINEM <sub>3</sub> -3 and Lane 11, IINEM <sub>3</sub> -4	42
1.18	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from field crop cultivation area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICC1; Lane 2, ICC2; Lane 3, ICC3; Lane 4, ICC4; Lane 5, INC1; Lane 6, INC2; Lane 7, INC3; Lane 8, INC4; Lane 9, INEC1; Lane 10, INEC2; Lane 11, INEC3 and Lane 12, INEC4	43

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
1.19	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from field crop cultivation area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICC1; Lane 2, IIICC2; Lane 3, IIICC3; Lane 4, IIICC4; Lane 5, IIINC1; Lane 6, IIINC2; Lane 7, IIINC3; Lane 8, IIINC4; Lane 9, IIINEC1; Lane 10, IIINEC2; Lane 11, IIINEC3 and Lane 12, IIINEC4	43
1.20	PCR-RAPA patterns of rhizobial isolates from rice cultivation area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICR1; Lane 2, ICR2; Lane 3, ICR4; Lane 4, INR1; Lane 5, INR2; Lane 6, INR4; Lane 7, INER1; Lane 8, INER2; Lane 9, INER3 and Lane 10, INER4.	44
1.21	PCR-RAPA patterns of rhizobial isolates from rice cultivation area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICR1; Lane 2, IIICR2; Lane 3, IIICR3; Lane 4, IIICR4; Lane 5, IIINR1; Lane 6, IIINR2; Lane 7, IIINR3; Lane 8, IIINR4; Lane 9, IIINER1; Lane 10, IIINER3 and Lane 11, IIINER4.	44
1.22	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from rice in rotation with other crops in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICCR1; Lane 2, ICCR2; Lane 3, ICCR3; Lane 4, ICCR4; Lane 5, INCR1; Lane 6, INCR2; Lane 7, INCR3; Lane 8, INCR4; Lane 9, INECR1; Lane 10, INECR2; Lane 11, INECR3 and Lane 12, INECR4.	45
1.23	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from rice in rotation with other crops in winter season.M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICCR1; Lane 2, IIICCR2; Lane 3, IIICCR3; Lane 4, IIICCR4; Lane 5, IIINCR1; Lane 6, IIINCR2; Lane 7, IIINCR3; Lane 8, IIINCR4; Lane 9, IIINECR1; Lane 10, IIINECR2; Lane 11, IIINECR3 and Lane 12, IIINECR4.	46
1.24	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from uncultivated area in rainy season Lane 1, ICF1; Lane 2, ICF2; Lane 3, ICF3; Lane 4, ICF4; Lane 5, INF1; Lane 6, INF2; Lane 7, INF3; Lane 8, INF4; Lane 9, INEF1; Lane 10, INEF2; Lane 11, INEF3; Lane 12, INEF4 and M, 100 bp Ladder marker	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
1.25	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from uncultivated area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICF1; Lane 2, IIICF2; Lane 3, IIICF3; Lane 4, IIICF4; Lane 5, IIINF1; Lane 6, IIINF2; Lane 7, IIINF3; Lane 8, IIINF4; Lane 9, IIINEF1; Lane 10, IIINEF2; Lane 11, IIINEF and Lane 12, IIINEF4.	47
1.26	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from undisturb forest in rainy season (A) and winter season (B) A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICA1; Lane 2, ICA2; Lane 3, INA1; Lane 4, INA2; Lane 5, INEA1 and Lane 6, INEA2. B) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICA1; Lane 2, IIICA2; Lane 3, IIINA1; Lane 4, IIINA2 and Lane 5, IIINEA1	48
1.27	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years in rainy season (Lanes 1-6), and in winter season (Lanes 7-8). M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICB1; Lane 2, ICB2; Lane 3, INB1; Lane 4, INB2; Lane 5, INEB1; Lane 6, INEB2; Lane 7, IIICB1 and Lane 8, IIICB2	48
1.28	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from forest clearance for crop cultivation for 3 years in rainy season (A) and dry season (B) (A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICC*1; Lane 2, ICC*2; Lane 3, INC*1; Lane 4, INC*2; Lane 5, INEC*1 and Lane 6, INEC*2. (B) Lane 1, IIICC*1; Lane 2, IIICC*2; Lane 3, IIINC*1; Lane 4, IIINC*2; Lane 5, IIINEC*1; Lane 6, IIINEC*2 and M, 100 bp Ladder marker	49
1.29	PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers in rainy season (A,B) and dry season (C,D) A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IND1; Lane 2, IND2; Lane 3, IND3; Lane 4, INED1; Lane 5, INED2 and Lane 6, INED3 B) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIIND1; Lane 2, IIIND2 and Lane 3, IIIND3 (C) Lane 1, IIINED1 and M, 100 bp Ladder marker (D) Lane 1, IIINED3 and M, 100 bp Ladder marker.	49



## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
1.30	แสดง Phylogenetic tree ของรูปแบบ RAPD-PCR จากไรโซเบียมที่ทำการแยกได้จากแหล่งดินทุกตัวอย่างทั้ง 3 ภาคของประเทศในฤดูฝนและฤดูแล้ง	51
<b>ไซยาโนแบคทีเรีย</b>		
2.1	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15	81
2.2	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลาง ครั้งที่ 1-15	84
2.3	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บในตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-15	86
2.4	ค่าเฉลี่ยประชากรสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่ต่าง ๆ บริเวณภาคเหนือภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	88
2.5	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคเหนือครั้งที่ 1-8	93
2.6	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคกลาง ครั้งที่ 1-8	95
2.7	ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-8	97
2.8 A	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 100 bp DNA ladder marker, <i>Nostoc</i> sp, <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, <i>Calothrix</i> sp. DASH 02101, <i>Scytonema</i> sp., III NM 1-4-1, II NEM 1-4-8, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4, I NEM 3-3-11, II NEM 3-2-40 and III CM 3-1, respectively.	119
2.8 B	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-20; 100 bp DNA ladder marker, I NEA 1-2/2, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC* 1-4, II NEC* 1-20, I ND 1-3, I CD 2-2, I CD 1-14, I CD 1-1, III CD 1-17, and 100 bp DNA ladder marker, respectively.	119

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.8 C	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc sp.</i> group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-19, 100 bp DNA ladder marker, INF, INEF 4-2, III NEF 3-4, ICF 3-22, ICF 2-2, II NEC 4-12, III NEC* 1-3, III NEC 3-29, III NEC 2-13, ICC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, II NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1, III CR 2-1 and 100 bp DNA ladder marker, respectively.	120
2.8 D	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena sp.</i> group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-13; 100 bp DNA ladder marker, <i>Nostoc sp.</i> , <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon sp.</i> DASH 05101, <i>Calothrix sp.</i> DASH 02101, <i>Scytonema sp.</i> , I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-13, I NEM 3-3-1 and I CM 3-1-1, respectively.	120
2.8 E	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena sp.</i> group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-16; 100 bp DNA ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6 1/2, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, III CB 2-2, I NC* 2-6, III CC* 2-10, I ND2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III NED 2-9, respectively.	120
2.8 F	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena sp.</i> group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-23; 100 bp DNA ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, I NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 2-3.1, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, IIINECR 4-22, I CCR 3-22, III CCR 4-24, 100 bp DNA ladder marker, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.	121
2.8 G	<i>NifH</i> -PCR fingerprint patterns of other group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 100 bp DNA ladder marker, lane 2-5 (branching group); I CM3-1-2, I CM 3-4-2, I CM1-2-21, I NER 4-4, lane 6 and 7 ( <i>Nodularia sp.</i> ); I CM 3-1-5, I CA 1-10, lane 8-12 ( <i>Anabaenopsis sp.</i> ); I CF -2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1, III NEC 2-11, lane 13; 100 bp DNA ladder marker, lane 14 ( <i>Nodularia sp.</i> ); II CM 2-1-3, lane 15 (Branching group) III CC* 2-1/2 and lane 16 ( <i>Anabaena sp.</i> ) II NM3-3-22, respectively	121

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.9	Dendrograms (UPGMA) of similarities between <i>nifH</i> fragment; all cyanobacterial isolates (A), <i>Nostoc</i> sp. group (B), <i>Anabaena</i> sp. group (C), <i>Anabaenopsis</i> sp. group (D), <i>Nodularia</i> sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.	124
2.10 A	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, <i>Calothrix</i> sp. DASH 02101, <i>Scytonema</i> sp., II NM 1-4-1, II NEM 1-4-8, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, ICM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4 and INEM 3-3-11, respectively.	126
2.10 B	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-19; 1 kb ladder marker, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC* 1-4, II NEC* 1-20, I ND 1-3, I CD 2-2, I CD 1-4, I CD 1-1, 1 kb ladder marker and III CD 1-17, respectively.	126
2.10 C	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-19; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, II NEC 4-21, III NEC* 1-3, III NEC 3-29, III NEC 2-13, I CC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, II CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2 and I CR 1-1, III CR2-1 and 1kb ladder marker, respectively.	127
2.10 D	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, <i>Calothrix</i> sp. DASH 02101, <i>Scytonema</i> sp., I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-13, I NEM 3-3-1, I CM 3-1-1, and II NM 3-3-22, respectively.	127
2.10 E	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, I NC* 2-6, III CC* 2-10, I ND -2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III CB2 -2, respectively.	128

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.10 F	STRR-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-23; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, II NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 2-3.1, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NECR 4-22, I CCR 3-2, III CCR 4-22, 1 kb ladder marker, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.	128
2.10 G	STRR-PCR fingerprint patterns of other group (Table C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-5 (Branching group); I CM 3-12, ICM 1-2-21, I CM 3-4.2, I NER 4-4, lane 6 ( <i>Anabaenopsis</i> sp.); III CC* 2-1 1/2, lane 7-8 ( <i>Nodularia</i> sp.) I CM 3-1-5, I CA 1-10, lane 9-13 ( <i>Anabaenopsis</i> sp.); I CF -2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1, III NEC 2-11, respectively, and lane 14 ( <i>Nodularia</i> sp.) II CM 2-1-3, respectively.	129
2.11	Dendrograms (UPGMA) of similarities between short tandemly repeated repetitive sequence (STRR) primer; all cyanobacterial isolates (A), <i>Nostoc</i> sp. group (B), <i>Anabaena</i> sp. group (C), <i>Anabaenopsis</i> sp. group (D), <i>Nodularia</i> sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.	132
2.12 A	DAF8, 7B-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, III NM 1-4-1, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4 and III CM 3-1, respectively.	134
2.12 B	DAF8, 7b-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, INB 1-20, III NC*1-4, II NEC*1-20, I CD 2-2, I CD 1-4, I CD 1-1* and III CD 1-17, respectively.	134

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.12 C	DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, III NEC 3-20, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1 and III CR 2-1, respectively.	135
2.12 D	DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-9; 1 kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>A. cylindrica</i> , <i>Hapalopsiphon</i> sp. DASH 05101, I NM 1-1-3, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-22 and I NEM 3-3-1, respectively.	135
2.12 E	DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, III NEA 2-6 1/2, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, III CB 2-2, III CC*2-10, I ND-2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III NED 2-9, respectively.	136
2.12 F	DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-18; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, I NEC 4-1, I CC 3-1, I NCR 2-3, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NCR 4-22, III CCR 4-24, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.	136
2.12 G	DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of other group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-4 (branching group); I CM 3-1-2, I CM 3-4-2, I CM 1-2-21, III CC* 2-1 1/2, lane 5 ( <i>Nodularia</i> sp.); I NEA 1-2/2, lane 6-11 ( <i>Anabaenopsis</i> sp.); I CF-2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1 and III NEC 2-11, respectively.	137
2.13	Dendrograms (UPGMA) of similarities between DNA amplification fingerprint (DAF8.7b) primer; all cyanobacterial isolates (A), <i>Nostoc</i> sp. group (B), <i>Anabaena</i> sp. group (C), <i>Anabaenopsis</i> sp. group (D), <i>Nodularia</i> sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.	140

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.14 A	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>A. cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, <i>Calothrix</i> sp. DASH 02101, <i>Scytonema</i> sp., III NM 1-4-1, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4, I NEM 3-3-11 and III NEM 3-2-40, respectively.	141
2.14 B	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1 kb ladder marker, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC* 1-4, II NEC* 1-20, III NEC* 1-3, I CD 2-2, I CD 1-1 and III CD 1-17, respectively.	141
2.14 C	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Nostoc</i> sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, II NEC 4-21, III NEC 3-29, III NEC 2-13, I CC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1 and III CR 2-1, respectively.	142
2.14 D	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, <i>Nostoc</i> sp., <i>A. cylindrica</i> , <i>Hapalosiphon</i> sp. DASH 05101, <i>Calothrix</i> sp. DASH 02101, <i>Scytonema</i> sp., I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 3-1-3, III NM 3-3-13, II NM 3-3-22 and I CM 3-1-1, respectively.	142
2.14 E	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-2, I NC* 2-6, III CC* 2-10, I ND-2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-6 and III NED 2-9, respectively.	143

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
2.14 F	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of <i>Anabaena</i> sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-21; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, II NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NECR 4-22, I CCR 3-2, III CCR 4-24, I NR 1-6, 1 kb ladder marker, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.	143
2.14 G	DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of other sp. group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-6 (branching group); I CM 3-1-2, I CM 3-4-2, I CM 1-2-21, I NER 4-4, III CC* 2-1 1/2, lane 7 ( <i>Nodularia</i> sp.); I CM 3-1-5, lane 8 ( <i>Anabaenopsis</i> sp.); II CM 2-1-3, lane 9 ( <i>Nodularia</i> sp.); I NEA 1-2/2, lane 10-14 ( <i>Anabaenopsis</i> sp.); I CF-2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1 and III NEC 2-11, respectively.	144
2.15	Dendrograms (UPGMA) of similarities between DNA amplification fingerprinting (DAF10.6e); all cyanobacterial isolates (A), <i>Nostoc</i> sp. group (B), <i>Anabaena</i> sp. group (C), <i>Anabaenopsis</i> sp. group (D), <i>Nodularia</i> sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.	147
2.16	Dendrograms (UPGMA) of similarities between combined PCR products from three primers (STRR, DAF8.7b and DAF10.6e); all cyanobacterial isolates (A), <i>Nostoc</i> sp. group (B), <i>Anabaena</i> sp. group (C), <i>Anabaenopsis</i> sp. group (D), <i>Nodularia</i> sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.	151
2.17	Cell morphology of cyanobacterial isolate IV NR3-9 under 400X magnification microscope (A), on solid (B) and liquid BG11 medium (C)	152
2.18	18 Cell morphology of cyanobacterial isolate IV NR3-9 from 30000X magnification under Scanning Electron Microscope.	152

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
<b>แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ</b>		
3.1	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15	173
3.2	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในภาคกลาง ครั้งที่ 1-15	175
3.3	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-15	177
3.4	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคเหนือ ปีที่1-3	179
3.5	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคกลาง ปีที่1-3	180
3.6	ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปีที่1-3	181
3.7	ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคเหนือ ครั้งที่1-8	185
3.8	ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคกลาง ครั้งที่1-8	187
3.9	ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือครั้งที่1-8	189
3.10	ปริมาณcellในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคเหนือ ปีที่1-8	190
3.11	ปริมาณcell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคกลาง ปีที่1-8	191
3.12	ปริมาณcell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือปีที่1-8	192
3.13	Dendrogram of 48 groups of free-living nitrogen fixing bacteria	200
<b>ภาคผนวก</b>		
พ.3.19	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from uncultivated area	228
พ.3.20	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from uncultivated area	228
พ.3.21	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from uncultivated area	229
พ.3.22	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area	229
พ.3.23	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area	230



## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
ผ.3.24	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area	230
ผ.3.25	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from undisturb forest area	231
ผ.3.26	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from undisturb forest area	231
ผ.3.27	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from undisturb forest area	232
ผ.3.28	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and hot season in the North region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area.	232
ผ.3.29	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and hot season in the Central region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area.	233
ผ.3.30	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area	233
ผ.3.31	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area	234
ผ.3.32	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area	234
ผ.3.33	Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area	235

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
ผ.3.34	Dendrogram of group 1 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	236
ผ.3.35	Dendrogram of group 2 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	237
ผ.3.36	Dendrogram of group 3 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	237
ผ.3.37	Dendrogram of group 4 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	238
ผ.3.38	Dendrogram of group 5 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	238
ผ.3.39	Dendrogram of group 6 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	239
ผ.3.40	Dendrogram of group 7 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	240
ผ.3.41	Dendrogram of group 8 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	240
ผ.3.42	Dendrogram of group 9 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	241
ผ.3.43	Dendrogram of group 10 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	241
ผ.3.44	Dendrogram of group 11 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	242
ผ.3.45	Dendrogram of group 12 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	242
ผ.3.46	Dendrogram of group 13 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	243
ผ.3.47	Dendrogram of group 14 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	243

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
พ.3.48	Dendrogram of group 15 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	244
พ.3.49	Dendrogram of group 16 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	244
พ.3.50	Dendrogram of group 17 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	245
พ.3.51	Dendrogram of group 18 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC prime	245
พ.3.52	Dendrogram of group 19 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	246
พ.3.53	Dendrogram of group 20 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	246
พ.3.54	Dendrogram of group 20 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	247
พ.3.55	Dendrogram of group 22 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	247
พ.3.56	Dendrogram of group 23 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	248
พ.3.57	Dendrogram of group 24 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	248
พ.3.58	Dendrogram of group 25 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	249
พ.3.59	Dendrogram of group 26 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	249
พ.3.60	Dendrogram of group 27 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	250
พ.3.61	Dendrogram of group 28 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	250

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
ผ.3.62	Dendrogram of group 29 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	251
ผ.3.63	Dendrogram of group 30 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	251
ผ.3.64	Dendrogram of group 31 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	252
ผ.3.65	Dendrogram of group 32 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	252
ผ.3.66	Dendrogram of group 33 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	253
ผ.3.67	Dendrogram of group 34 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	253
ผ.3.68	Dendrogram of group 35 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	254
ผ.3.69	Dendrogram of group 35 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	254
ผ.3.70	Dendrogram of group 37 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	255
ผ.3.71	Dendrogram of group 38 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	255
ผ.3.72	Dendrogram of group 39 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	256
ผ.3.73	Dendrogram of group 40 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	256

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
ผ.3.74	Dendrogram of group 41 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	257
ผ.3.75	Dendrogram of group 42 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	257
ผ.3.76	Dendrogram of group 43 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	258
ผ.3.77	Dendrogram of group 44 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	258
ผ.3.78	Dendrogram of group 45 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	259
ผ.3.79	Dendrogram of group 46 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	259
ผ.3.80	Dendrogram of group 47 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	260
ผ.3.81	Dendrogram of group 48 separated <i>nifD</i> gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer	260

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
	<b>บทนำ</b>	
ก.1	แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคเหนือ, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ	XII
ก. 2	แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคกลาง, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ	XIII
ก. 3	แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ	XIV
ก. 4	แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคกลาง	XXI
ก. 5	แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคเหนือ	XXIII
ก. 6	แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	XXV
	<b>ไรโซเบียม</b>	
1.1	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคกลาง (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	7
1.2	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคเหนือ (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 เดือนกรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	10
1.3	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	13
1.4	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคกลางที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	20
1.5	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคเหนือที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	23
1.6	ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542	26
1.7	The percentage of some morphological and physiological aspects of rhizobia in rainy season and dry season	34
1.8	แสดงผลการกระจายตัวของไรโซเบียมในภาต่าง ๆ ที่พบในฤดูแล้งและฤดูฝน โดยแยกตามกลุ่มลักษณะ RAPD-PCR pattern ตามรูปที่ 1.30	52

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
	<b>ภาคผนวก</b>	
ผ.1.1	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	54
ผ.1.2	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	55
ผ.1.3	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	56
ผ.1.4	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	57
ผ.1.5	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	58
ผ.1.6	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน	59
ผ.1.7	Antibiotic resistant profiles of rhizobial isolates in rainy season	60
ผ.1.8	Antibiotic resistant profiles of rhizobial isolates in dry season	63
ผ.1.9	The host dependent cross-inoculation group of rhizobia in rainy season	66
ผ.1.10	The host dependent cross-inoculation group of rhizobia in dry season.	70

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
	<b>ไซยาโนแบคทีเรีย</b>	
2.1	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)	80
2.2	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากภาคกลาง จ. สระบุรี จ. นครสวรรค์ และ จ. นครนายก ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)	83
2.3	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.เลย และ จ.นครราชสีมา ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)	85
2.4	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคเหนือจากแหล่งดินที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)	92
2.5	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคกลางที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)	94
2.6	ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากแหล่งดินที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)	96
2.7	Morphology of cyanobacterial strain (modified from Desikachry, T.V. (1958) and efficiency of N <sub>2</sub> -fixing cyanobacteria by Acetylene Reduction Assay (ARA)	
	A: cyanobacteria that expected to be <i>Nostoc</i> sp.	109
	B: cyanobacteria that expected to be <i>Anabaena</i> sp.	110
	C: cyanobacteria that expected to be <i>Anabaenopsis</i> sp.	114
	D: cyanobacteria that expected to be <i>Nodularia</i> sp.	114
	E: cyanobacteria that expected to be branching group	115
	F: reference strains	115
	<b>ภาคผนวก</b>	
ผ.2.1	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน	156



สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
ผ.2.2	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน	157
ผ.2.3	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน	158
ผ.2.4	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือ, ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับคุณสมบัติทางเคมีบางประการของดิน	159
ผ.2.5	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่าและพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่อง ในภาคเหนือกับอุณหภูมิดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น	160
ผ.2.6	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่าและพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องในภาคกลางกับอุณหภูมิดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น	161
ผ.2.7	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่า และพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับอุณหภูมิดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น	162
 <b>แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ</b>		
3.1	Diversity of free-living nitrogen fixing bacteria (Dalton, 1980)	165
3.2	แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตรึงดินแห้งของภาคเหนือ	172
3.3	แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตรึงดินแห้งของภาคกลาง	174
3.4	แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตรึงดินแห้งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	176
3.5	แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตรึงดินแห้งของภาคเหนือ	184
3.6	แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตรึงดินแห้งของภาคกลาง	186

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
3.7	แสดงจำนวน โคโลนีแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	188
3.8	Biochemical characteristic of free-living N <sub>2</sub> -fixing bacteria	197
3.9	<i>nifD</i> - PCR pattern of free-living nitrogen fixing bacteria was separated into different 48 groups from 3 parts of Thailand	201
<b>ภาคผนวก</b>		
ผ.3.1	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน	207
ผ.3.2	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน	208
ผ.3.3	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับ สภาพแวดล้อมทาง กายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน	209
ผ.3.4	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน	210
ผ.3.5	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน	211
ผ.3.6	ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน	212
ผ.3.7	Characteristic of free-living mitrcgen fixing becteria isolates in each area	213

## บทคัดย่อ

ผลการศึกษากำหนดประชากร พลวัตประชากร และระบบนิเวศที่เหมาะสมรวมไปถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากตัวอย่างดินของประเทศไทยในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2540 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2542 โดยประเภทของดินที่เก็บตัวอย่างในแต่ละภาค ได้แก่ บริเวณยอดเขา กลางเขา เขิงเขา พื้นที่ทำการเกษตรที่ปลูกเพียงพืชไร่ พื้นที่นา พื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว พื้นที่รกร้างว่างเปล่า ในส่วนของวัตถุประสงค์ที่ต้องการทราบถึงเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปจะมีผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์เหล่านี้มากน้อยเพียงใด ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่า พื้นที่ที่มีการเริ่มเปิดป่าในปีที่ 1-2 พื้นที่ที่เพาะปลูกแล้ว 3 ปี และพื้นที่ที่มีการใช้ปุ๋ยและยากำจัดศัตรูพืชในอัตราสูงอย่างต่อเนื่อง (เช่นแปลงผัก) พบว่าในกลุ่มของไรโซเบียมมีประชากรเฉลี่ยสูงสุดในระบบนิเวศตามธรรมชาติบริเวณเขิงเขา และในระบบนิเวศที่ทำการเกษตรที่มีการปลูกข้าวสลับพืชไร่ตระกูลถั่วของทุกภาค ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลสำคัญต่อจำนวนประชากรของไรโซเบียม ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้น และยังพบว่าพื้นที่บริเวณที่มีพืชตระกูลถั่วจะมีประชากรไรโซเบียมสูง ในขณะที่เดียวกันพบว่าบางพื้นที่ เช่น แปลงผักที่ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณภาคกลาง บางครั้งพบว่าประชากรไรโซเบียมน้อยมากถึงไม่พบเลยในบางครั้ง ในส่วนของความหลากหลายพบว่าประชากรไรโซเบียมในดินของประเทศไทย ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มจีโนส *Bradyrhizobium* sp. ที่สามารถสร้างปมได้ในถั่วกลุ่ม cow peas มากกว่าถั่วเหลือง และพบว่าในกลุ่มดังกล่าวมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก และบางสายพันธุ์พบว่าสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตลอดทั้งปีในพื้นที่ใกล้เคียงกันในแต่ละภาคเมื่อทำการศึกษาคด้วยเทคนิค RAPD-PCR ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียพบว่าระบบนิเวศที่พบจำนวนประชากรมากที่สุดในทุกภาคคือพื้นที่ปลูกข้าวสลับพืชไร่ ปัจจัยที่มีอิทธิพลสำคัญต่อจำนวนประชากร ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นและอินทรีย์วัตถุ ในส่วนของความหลากหลายพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่ทำการแยกได้ทั้งหมด เป็นกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายและสร้าง heterocyst โดยที่กลุ่มจีโนส *Anabaena* และ *Nostoc* มีจำนวนมากที่สุดและมีความหลากหลายในระดับสปีชีส์มากที่สุด เมื่อทำการทดสอบยืนยันด้วยเทคนิคการผนวกรวม DAF8.7b, DAF10.6F และ STRR-PCR ในส่วนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระพบว่ามีการพบประชากรสูงสุดในพื้นที่ที่ทำการเกษตรและพบว่ามีมากกว่าพื้นที่บริเวณภูเขาและบริเวณรกร้างว่างเปล่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรโดยภาพรวม ไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลมากนักยกเว้นแต่จะพบมากเป็นพิเศษในช่วงฤดูฝน ในส่วนของความหลากหลายพบว่าประชากรส่วนใหญ่ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยจีโนส *Azospirillum*, *Azomonas* เป็นต้น นอก

จากนี้ ยังพบว่าทั้งสองจีโนมนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทุกฤดูกาล เมื่อทำการจัดจำแนกตามลักษณะของ ยีน *nifD* เมื่อถูกเพิ่มจำนวนพบว่าสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 48 กลุ่ม และเมื่อนำแต่ละกลุ่มของ *nifD* ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ERIC-PCR พบว่าความหลากหลายของ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีสูงมากทั้งในระดับจีโนมและสปีชีส์

## Abstract

The investigation of N<sub>2</sub>-fixing microbes was conducted in terms of population number, population dynamics and appropriated habitats as well as their genic diversity. The microbial strains were isolated from various soil samples from the North, Central and North-East of Thailand during July 1997 to November 1999. Site selections in each region were collected from the highest elevation as on the top of mountain, in the middle and at the foot hill of mountain. Soil samples also were collected from the flat area of agricultural practice as field crop cultivation, rice cultivation, rice in rotation with other crops and uncultivated area. For the purpose as what will be occurred to the population of each group of these bacteria upon changing the environment and cropping system. Soil samples were collected from undisturbed forest, forest clearance for crop cultivation for 1, 2 and 3 years and from the areas where intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers as vegetable plantation. In case of Rhizobia, it was found that highest population persisted at foot hill of mountain and under the agricultural area of rice in rotation with leguminous plants. The important main factors affecting the population were temperature and moisture. Moreover, the areas under legume plantation were also the appropriate habitat for rhizobia. However, in some areas as vegetable plantation in central was investigated that less amount or non-detectable of rhizobial population was found. It was also found that the dominant native genus was *Bradyrhizobium* sp. which mainly nodulate only cow peas not soybean. When these strains were analysed with RAPD-PCR technique, the results suggested that these group of *Bradyrhizobia* contained closely relations among the group. According to RAPD-PCR technique, some native *bradyrhizobial* strains were also confirmed the persistence ability across the season throughout the year. For cyanobacteria, the suitable ecosystem was rice in rotation with other crops. The important factors affecting the population were temperature, moisture and organic matters. Most of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterial strains found in this study were heterocystous form. The dominant genera were *Nostoc* and *Anabaena*. From the results of combination of DAF8.7b, DAF10.6F- and STRR-PCR analyses, they were presented the great diversity among the genus. For the free-living bacterial group, the most suitable area was agricultural area. The population was high under the mountain or forest area. In addition, seasonal changing did not effect to population dynamics except in the rainy season which could promote higher growth. Most of N<sub>2</sub> fixing bacteria were gram negative. The two important genera mainly found were *Azopirillum* and *Azomonas* which were able to persist across the seasons throughout this study. For the biodiversity in this group, very high divergent was found in both of genera and species levels. This was confirmed by analyses of *nif* D-PCR pattern which could be differentiated into 48 different groups. In addition, in each group of *nif* D-PCR pattern was found the high diversity when using ERIC-PCR analysis.

# บทนำ

## ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลง ประชากรของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน (BRT240001)

### 1. หลักการและผลงานที่มีมาก่อน

สิ่งที่มีชีวิตทุกชนิดต้องการไนโตรเจนเพื่อการดำรงชีวิต เพราะว่าไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโปรตีนทุกชนิด แต่ธาตุไนโตรเจนที่มีอยู่ในโลกประมาณ 98% ถูกจับอยู่ในชั้นหินที่ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ส่วนที่เหลืออีก 2% คือ unbound nitrogen ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ แต่จะอยู่ในรูปแก๊สถึง 99.96% ส่วนประกอบของฮิวมิค 0.20% ในส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่กั้นทะเล 0.01% และในสิ่งที่มีชีวิต เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์อีกประมาณ 0.005% (Aldrich, 1980)

จากตัวเลขดังกล่าวเห็นได้ว่าไนโตรเจนในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้จริง ๆ นั้นอยู่ในรูปของแก๊ส และปะปนอยู่ในอากาศรอบ ๆ ตัวเราซึ่งเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศจะมีถึง 78% และไนโตรเจนที่มีอยู่มากมายในอากาศนี้ ปกติแล้วทั้งพืชและสัตว์ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงจะต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีให้เกิดเป็นสารประกอบไนโตรเจนเสียก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ และที่ทราบกันดีก็คือในรูปของปุ๋ยไนโตรเจน ในการสังเคราะห์ปุ๋ยไนโตรเจนได้มีขึ้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1921 โดยการตรึง (fix) แก๊สไนโตรเจน ( $N_2$ ) จากอากาศเพื่อให้เกิดแอมโมเนีย ( $NH_3$ ) เป็นขบวนการรวม  $N_2$  เข้ากับแก๊ส  $H_2$  ภายใต้อุณหภูมิสูง  $400^\circ-500^\circ C$  และความดัน 100-200 บรรยากาศซึ่งการผลิตโดยกระบวนการนี้จะต้องทำในรูป โรงงานอุตสาหกรรมที่มีราคาแพงและใช้พลังงานสูงจึงทำให้มีต้นทุนการผลิตสูงจึงเป็นผลทำให้ปุ๋ยไนโตรเจนดังกล่าวมีราคาแพง

กระบวนการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนอีกกรรมวิธีหนึ่ง ที่มีลักษณะเดียวกับในรูปอุตสาหกรรม โดยใช้วิธีการตรึงแก๊สไนโตรเจนเช่นกัน แต่ใช้พลังงานต่ำ และมี enzyme ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตเป็นตัวรวม  $N_2$  กับ  $H$  ให้เป็น  $NH_3$  และใช้พลังงานในรูป ATP ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation หรือ BNF) และ enzyme ที่สามารถรวม  $N_2$  และ  $H$  ให้เป็น  $NH_3$  เรียกว่า nitrogenase enzyme และพบว่า enzyme อยู่ในจุลินทรีย์พวก prokaryote บางชนิดเท่านั้น เช่น ในพวก bacteria , cyanobacteria และ actinomycete จุลินทรีย์ดังกล่าวนี้บางชนิดสามารถอยู่ในดินโดยอิสระ และบางชนิดจะต้องอยู่ร่วมกับพืชจึงจะสามารถตรึงไนโตรเจนได้ จุลินทรีย์พวกอาศัยอยู่ในดินโดยอิสระมีทั้งพวก aerobic และ anaerobic ทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและบนบก และพวกที่อยู่ร่วมกับพืชก็มีทั้งที่เป็นพืชน้ำขนาดเล็กจนถึงพืชไร่บนบก และไม้ป่าชนิดต่าง ๆ

บทบาทของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนดังกล่าวต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในโลกนั้นมีมากมาย โดยเฉพาะในระบบนิเวศที่ยังไม่ถูกทำลาย ระบบนี้จะช่วยจัดหาไนโตรเจนให้แก่สิ่งมีชีวิตทั้งหลาย จนกระทั่งเมื่อโลกมีการพัฒนาขึ้น พื้นที่ป่าถูกบุกรุกทำลายเพื่อนำมาทำการผลิตพืชและอาหารอย่างต่อเนื่องจนไนโตรเจนในดินถูกใช้ไปหมด มนุษย์จึงต้องหาวิธีสังเคราะห์ปุ๋ยไนโตรเจนเพื่อใส่ทดแทน แต่การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างต่อเนื่องและไม่มีความรอบคอบย่อมทำให้เกิดผลเสียต่าง ๆ ต่อ

สิ่งแวดล้อมและนำกลับมาสู่มนุษย์เองได้ และนอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยก็ยังคงมีความจำเป็นเพื่อการผลิตอาหารให้พอเพียงต่อประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันเราก็คงจะคิดหาวิธีการลดการกระทำดังกล่าว เช่นการจัดการกับระบบทางชีวภาพเพื่อหาแนวทางแก้ไขวิกฤตการณ์ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต และก็มีความเป็นไปได้เพราะขบวนการ BNF เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญที่ควรให้ความสนใจอย่างยิ่งเพราะ ถ้ามีการจัดการให้ถูกต้องจะสามารถจัดหาปริมาณไนโตรเจนให้แก่สิ่งที่มีชีวิตได้อย่างเพียงพอ ซึ่งพิสูจน์ได้จากการที่ป่าดงดิบยังคงมีความอุดมสมบูรณ์โดยไม่มี การนำปุ๋ยในโตรเจนไปใส่ และเมื่อมีการตัดถางพื้นที่ป่าใหม่ ๆ เพื่อนำที่ดินมาปลูกพืชดินจึงมีไนโตรเจนและความอุดมสมบูรณ์สูง ทั้งนี้เพราะกระบวนการ BNF Burns and Hardy (1973) ได้ประเมินไว้ว่าจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนสามารถผลิตไนโตรเจนให้แก่โลกได้ถึง 170 ล้านตันต่อปี ในขณะที่กระบวนการผลิตโดยโรงงานอุตสาหกรรมผลิตได้เพียงประมาณ 50-60 ล้านตันต่อปี การผลิตไนโตรเจนโดยการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพในระบบต่าง ๆ 170 ล้านตันนั้นเกิดขึ้นในทะเล 31 ล้านตัน และบนพื้นดินถึง 139 ล้านตัน และเกิดในพื้นที่ดินต่อไปนี้

1. พื้นที่ทำการเกษตร	
ก. จากพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจ	35 ล้านตัน
ข. จากพืชอื่น ๆ	9 ล้านตัน
2. พื้นที่ทุ่งหญ้าที่ว่างเปล่า	45 ล้านตัน
3. พื้นที่ป่า	40 ล้านตัน
4. พื้นที่ไม่ใช่ประโยชน์อื่น ๆ	10 ล้านตัน

จากตัวเลขดังกล่าวจะเห็นว่าในผลรวมจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนโดยอิสระกับที่อาศัยร่วมกับพืชให้ผลใกล้เคียงกัน แต่ประสิทธิภาพเฉพาะตัวของ กลุ่มที่อยู่ร่วมกับพืชมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า

ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการตรึงไนโตรเจนโดยอิสระนั้นประกอบด้วย bacteria และ cyanobacteria ในกลุ่ม bacteria นี้มีอยู่ประมาณ 26 สกุล (genera) เป็นพวก aerobic ประมาณ 4 สกุล และ anaerobic ประมาณ 22 สกุล สำหรับในพวก cyanobacteria มีอยู่ด้วยกันต่อ 23 สกุล และส่วนใหญ่เป็น aerobic ( Burns and Hardy, 1973 ) การศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรมีการกระทำมากในกลุ่ม aerobic bacteria ได้แก่ *Azotobacter*, *Azospirillum* และ *Klebsiella*

ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้จากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่ง Wani et al., (1986) ได้ทำการทดลองกับข้าวฟ่างพบว่าบางครั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 33% แต่บางครั้งก็ไม่มี ความแตกต่างกัน ในทางตรงกันข้าม Okon and Kapulnik (1986) พบว่าในดินที่มีความสมบูรณ์ต่ำ *Azospirillum spp.* สามารถเพิ่มผลผลิตของธัญญาพืชได้อย่างแน่นอนและได้ผลทุกครั้ง ซึ่งเขาสนับสนุน



ว่าผลที่ได้คงไม่ใช่เกิดจากการตรึงไนโตรเจน แต่เนื่องจากการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตให้พืช เช่น Gibberelin, Cytokinin และ Auxin (Tien et al, 1979) แต่ Malik and Bitai (1989) ยืนยันว่าเกิดจากการตรึงไนโตรเจนแน่นอนเพราะพบว่า หญ้า Kalla เมื่อมีการ inoculate ด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 40-70% เศรษฐาและคณะ (2539) รายงานว่า ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม *Azospirillum* และ *Klebsiella* ทำให้หญ้าแฝกหอมสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี มีการสร้างปริมาณรากแขนงเพิ่มขึ้นอย่างมาก ส่งผลให้หญ้าแฝกมีการสร้างมวลชีวภาพมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ

ในสภาพดินที่ไม่มีการรบกวน เช่น ที่รกร้างว่างเปล่า สวนสาธารณะและป่าไม้ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระมีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนไนโตรเจนจากอากาศลงสู่ดิน เพราะสารอินทรีย์จากการผุพังของชิ้นส่วนของพืชจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ตรึงไนโตรเจนให้มากขึ้น (Ladha and Boonkerd, 1989) ดังนั้น ถ้าได้มีการจัดการที่ดีเพื่อเอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำงานได้ดีขึ้นก็สามารถที่จะรักษาสภาพดินให้มีความอุดมสมบูรณ์อยู่ได้ (Kundu and Ladha, 1995)

ในกลุ่ม Cyanobacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้มีการพยายามหาวิธีนำมาใช้ประโยชน์ และพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Anabaena*, *Nostoc* and *Calothrix* ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง Roger et al., (1992) รายงานว่า cyanobacteria สามารถตรึงไนโตรเจนให้แก่ข้าวได้ประมาณ 10-20 Kg N/ha และส่วนใหญ่จะเป็นสกุล *Nostoc*, *Anabaena* และ *Calothrix*

จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชในปัจจุบันนี้มีการจำแนกอยู่ 2 สกุลใหญ่ ๆ คือ *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) และในที่นี้จะเรียกรวมว่าไรโซเบียม ซึ่งแต่เดิมนั้นมีเพียงชื่อเดียว การจำแนก species ของไรโซเบียมส่วนใหญ่จะแยกตามลักษณะของความสามารถสร้างปมได้กับชนิดของพืชตระกูลถั่วที่อาศัยอยู่ เช่น *Bradyrhizobium japonicum* จะสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนร่วมเฉพาะกับถั่วเหลืองเท่านั้น โดยทั่ว ๆ ไปจะใช้ *Bradyrhizobium spp* และถ้าเฉพาะกับถั่วอะไรก็ใส่ชื่อถั่วลงไป ใน *Rhizobium* นั้นมีหลาย species เช่น *Rhizobium leguminosarum* นั้นจะรวมกลุ่มถั่วลิ้นเต้า และถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) *Rhizobium mililoti* เป็นพวกถั่วอาหารสัตว์ เช่น *alfalfa*, *Rhizobium trifolii* เป็นถั่ว *trifolium* พืชอาหารสัตว์พวกสกุล *Rhizobium* นี้ส่วนใหญ่จะเป็นพืชถั่วในเขตอบอุ่น ในแต่ละ species ของไรโซเบียม และเฉพาะแต่ละถั่วจะมีความแตกต่างกันในด้านการตรึงไนโตรเจนจึงสามารถแยกย่อยลงไปอีกเรียกว่า strain จากการวิจัยการใช้ประโยชน์พบว่าถั่วแต่ละชนิดจะมีไรโซเบียมที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่าง ๆ กัน (Boonkerd and Promsiri, 1993; Kucey et al., 1988) และในสภาพแวดล้อมต่างกันก็มีอิทธิพลต่อการเป็นอยู่ของไรโซเบียมด้วย (Boonkerd and Weaver, 1982; Weaver et al., 1987) และนอกจากนี้ Boonkerd et al., (1993) ยังพบอีกว่าอิทธิพลของระบบการปลูกพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับประชากรของไรโซเบียม และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมอีกด้วย

ใน cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับพืชพบว่ามีเพียง 2 สกุล คือ *Anabaena* และ *Nostoc* สำหรับ *Anabaena* ที่อาศัยร่วมกับพืชก็ได้แก่ แหนแดง (*Azolla*) และ *Anabaena* ได้แก่ *Anabaena azollae* สำหรับ *Nostoc* พืชที่พบขณะนี้ ได้แก่ พวกปรง (cycad) และไลเคน ซึ่งมักพบอยู่ในป่าชื้นการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรส่วนใหญ่ จะใช้แหนแดงเพื่อผลิตปุ๋ยไนโตรเจนในนาข้าว และการวิจัยส่วนใหญ่ จึงเป็นเรื่องของการตรึงไนโตรเจนกับแหนแดงซึ่งว่ามีหลาย species (Choonluchanon et al., 1988)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม actinomycete มีเพียง genus เดียวที่พบว่ามีการตรึงไนโตรเจน และเฉพาะกับพืชเท่านั้นคือ *Frankia* พืชส่วนใหญ่เป็น ไม้ยืนต้นที่เป็นป่าไม้ในเขตอบอุ่น สำหรับในเขตร้อนที่พบมีเพียงสกุลเดียวคือ *Casuarina* ได้แก่ สนประติพท์ และสนทะเล (Boonkerd and Baker, 1989)

จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงมาก และสามารถที่จะปลดปล่อยไนโตรเจนที่เหลือให้แก่พืชข้างเคียง ได้ดังจะเห็นได้จากป่าธรรมชาติที่สมบูรณ์ต้นไม้จะมีการเจริญเติบโตดีมาก เพราะประมาณ 60% ของไม้ป่าจะมีพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้ร่วมอยู่ด้วย เช่น ในเขตร้อนก็จะได้แก่พืชตระกูลถั่ว และในเขตอบอุ่นก็จะเป็นพวก actinorhizal plant คือพืชที่ *Frankia* อาศัยอยู่

ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนโดยอิสระถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเฉพาะตัวจะไม่มากนัก แต่เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีอยู่มากมายทั่วทุกแห่งการเพิ่มและลดของประชากรมีผลต่อการปลดปล่อยไนโตรเจนลงสู่ดินอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในระยะยาวก็มีการสะสมไนโตรเจนได้มากพอควร ซึ่งถ้าหากได้มีการจัดการให้จุลินทรีย์ดังกล่าวมีอยู่ในดินในปริมาณที่เหมาะสมก็ย่อมจะเกิดผลดีเป็นอย่างยิ่ง แต่การปฏิบัติในปัจจุบันนี้ไม่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ดำรงชีวิตอยู่ได้ เช่น พื้นที่เกิดความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง ขาดอินทรีย์วัตถุซึ่งเป็นอาหารสำคัญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านี้เป็นต้น

อิทธิพลของสภาพแวดล้อม เช่น ความเป็นกรด-ด่างของดิน อุณหภูมิดิน ความชื้น ความแห้งแล้งและพืชอาศัยเหล่านี้มีผลต่อการดำรงชีวิตและการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ดินเป็นอย่างมาก ในกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอิสระพบว่า พืชมีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มาก เพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการสารอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาทางราก (Okon and Kapulnik, 1986) และ Ishac et al., (1986) พบว่าอินทรีย์วัตถุในดินมีอิทธิพลต่อประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นอันมาก คือ อินทรีย์วัตถุสูง 2-4% จะสามารถทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้น และความแห้งแล้งความเป็นกรด-ด่างของดิน มีผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืช และการเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินจึงมีผลต่อจุลินทรีย์ดินดังกล่าวด้วย

จุลินทรีย์ในกลุ่ม cyanobacteria ส่วนมากชอบในที่ ๆ มีความชื้นสูง และประชากรของจุลินทรีย์ดังกล่าวจะมีอยู่ประมาณ  $1 \times 10^7$  ถึง  $8 \times 10^6$  cells ต่อดิน 1 กรัม และพบว่า pH ของดิน และ available P มีอิทธิพลต่อประชากรของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ Roger et al., (1987); Reddy and Roger (1988) ได้รายงานว่าความแห้งแล้งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ cyanobacteria ที่ตรึงไนโตรเจน บางสายพันธุ์ไม่สามารถ

ที่จะมีชีวิตอยู่ได้ แต่บางสายพันธุ์ และชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงลักษณะและศักยภาพของแต่ละสายพันธุ์

ในไรโซเบียมพบว่าความแห้งแล้งมีผลต่อประชากรของไรโซเบียมคือถ้าอุณหภูมิสูง ปริมาณของไรโซเบียมในดินจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Boonkerd and Weaver, 1982) และ Graham and Parker (1964) รายงานว่า pH ของดินมีผลต่อการมีชีวิตของไรโซเบียมในดิน กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้าจะทนกรดได้ดีกว่ากลุ่มที่เจริญเร็ว ในสภาพน้ำท่วมขังซึ่งส่วนใหญ่แล้วปริมาณไรโซเบียมจะลดลง (Weaver et al., 1987) เนื่องจากไรโซเบียมมีความผูกพันอยู่กับพืชตระกูลถั่วเป็นอย่างมากจึงพบว่าในระบบการปลูกพืชถั่วมีพืชตระกูลถั่ว หรือในที่ ๆ ไม่มีการปลูกพืช ถั่วมีพืชตระกูลถั่วอยู่ด้วยมักมีปริมาณของไรโซเบียมอยู่ในเกณฑ์สูง

**การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะหาคำตอบต่อข้อสมมติฐานดังนี้**

1. สภาพแวดล้อมหรือ ecosystem ได้ที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในกลุ่มนี้ได้มีการดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างสมบูรณ์
2. เมื่อสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เปลี่ยนไปจะมีผลกระทบต่อประชากรของจุลินทรีย์เหล่านั้นมากน้อยเพียงใด
3. พลวัตของประชากร (population dynamic) ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบการปลูกพืชต่าง ๆ หรือธรรมชาติต่าง ๆ เป็นอย่างไร

คำตอบที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ คาดว่าจะสามารถนำไปจัดการเพื่อการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ในระบบเกษตรที่ยั่งยืน (Sustainable agriculture) โดยมีต้องใช้น้อยเคมีในโตรเจน และเพื่อจัดการสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ตลอดจนการจัดการป่าไม้ หรือการปลูกป่าที่ถาวรต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ร่วมของโครงการก็เพื่อที่จะทราบถึงอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศต่อประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ ว่ามีมากน้อยเพียงใด และสภาพของระบบนิเวศที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะดังนี้

1. เพื่อให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแต่ละกลุ่ม
2. เพื่อให้ทราบถึงพลวัตของประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในระบบการปลูกพืช และในระบบธรรมชาติที่ไม่ถูกรบกวน
3. เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางระบบนิเวศมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนมากน้อยเพียงใด

4. เพื่อให้ทราบถึงความเกี่ยวเนื่องของพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันที่อยู่ในสถานะแวดล้อมต่างกันว่าเป็นอย่างไร

### 3. แผนงานวิจัย

เพื่อให้บรรลุเป้าหมายที่ตั้งไว้การดำเนินงานวิจัย จะเริ่มดำเนินงานตามวัตถุประสงค์เฉพาะที่ตั้งไว้ดังนี้คือ

**3.1 วัตถุประสงค์เฉพาะที่ 1 : เพื่อให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแต่ละกลุ่ม**

#### งานที่ 1 (Task 1) การเลือกสถานที่

เนื่องจากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนมีอยู่ทั่วทุกแห่งตั้งแต่ระดับภูเขาสูงจนถึงที่ราบลุ่ม ดังนั้น เพื่อให้ได้ตัวแทนของสภาพแวดล้อมครอบคลุมใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุดจึงแบ่งพื้นที่ศึกษาออกเป็น 3 ภาค คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

#### ภาคเหนือ

จะใช้ภูเขาและที่ราบจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อสะดวกแก่การวิจัยเพราะผู้ร่วมวิจัยอยู่ในพื้นที่นี้ โดยจะใช้เทือกเขาอินทนนท์ เพราะมียอดเขาที่สูงที่สุด โดยจะเลือกจุดศึกษาจุดหนึ่งอยู่บนยอดสูงสุด จุดที่ 2 จะเลือกกระดิวส่วนกลาง จุดที่ 3 จะเลือกพื้นที่เชิงเขาและจุดที่ 4 จะเลือกพื้นที่ ๆ มีการทำการเกษตรและที่รกร้างว่างเปล่า ในที่ทำการเกษตรจะเลือกจุดศึกษา 4 ลักษณะดังนี้

1. พื้นที่ ๆ ทำการเพาะปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่อง
2. พื้นที่ทำการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง
3. พื้นที่ ๆ มีการปลูกพืชไร่สลับข้าว
4. พื้นที่รกร้างว่างเปล่า

#### ภาคกลาง

จะเลือกพื้นที่บริเวณจังหวัดสระบุรีหรือนครสวรรค์ที่มีเทือกเขาหินปูน โดยจะกำหนดจุดที่แน่นอนเมื่อทำการออกสำรวจพื้นที่ การเลือกจุดศึกษาจะดำเนินการเช่นเดียวกับที่เชียงใหม่ คือ ภูเขาจะเลือกบริเวณสูงสุด ระดับกลาง และระดับล่าง และพื้นที่ราบลุ่มก็จะดำเนินการในลักษณะเดียวกันกับที่เชียงใหม่

#### ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จะเลือกพื้นที่เทือกเขาใหญ่ที่จังหวัดนครราชสีมา โดยพื้นที่ภูเขา และที่ราบลุ่มจะดำเนินการเช่นเดียวกันกับที่จังหวัดเชียงใหม่

การออกเลือกพื้นที่เพื่อการวิจัย นักวิจัยผู้ร่วมโครงการทุกคนมีการประชุมปรึกษาหารือกัน และออกไปเลือกพื้นที่ร่วมกันเพื่อที่จะได้ทราบแนวทางการดำเนินงานที่ถูกต้อง เพราะเมื่อแยกกันปฏิบัติงานแล้วจะได้มีการเก็บข้อมูลในลักษณะเดียวกัน

## งานที่ 2 (Task2) การเก็บตัวอย่าง

ในแต่ละจุดที่กำหนดเพื่อศึกษานั้นจะทำการเก็บตัวอย่างดิน 4 จุด แต่ละจุดจะต้องมีระยะทางที่ห่างกันพอสมควรเพื่อให้ครอบคลุมลักษณะตัวแทนของจุดเลือกนั้น ๆ และการเก็บตัวอย่างดินแต่ละจุดจะต้องใช้เสียมขุดลึกจากผิวดินลงไป 15 เซนติเมตร ทำการขุดอย่างน้อย 5 หลุม ในบริเวณพื้นที่ 25 ตารางเมตร นำดินที่ขุดได้มารวมกัน บนแผ่นพลาสติกขนาด 1x1 เมตร โดยเอาดินทั้งหมดผสมกันให้ทั่วแล้วเก็บเอาดินตัวอย่างเพียง 2 กิโลกรัม ห่อใส่ถุงพลาสติกให้แน่น ใส่ถุงน้ำแข็งเพื่อนำไปวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการ ดินทุกตัวอย่างจะต้องอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ จนกว่าจะถึงกำหนดวิเคราะห์

### สรุปตัวอย่างที่เก็บ

1. บริเวณขอบเขา	4 ตัวอย่าง
2. บริเวณส่วนกลาง	4 ตัวอย่าง
3. บริเวณเชิงเขา	4 ตัวอย่าง
4. พื้นที่ ๆ ทำการปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง	4 ตัวอย่าง
5. พื้นที่ ๆ ทำการปลูกข้าวต่อเนื่อง	4 ตัวอย่าง
6. พื้นที่ ๆ ทำการปลูกพืชไร่สลับข้าว	4 ตัวอย่าง
7. พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	4 ตัวอย่าง
รวมภาคละ	= 28 ตัวอย่าง
รวม 3 ภาค	= 84 ตัวอย่าง ต่อการเก็บ 1 ครั้ง

### การบันทึกข้อมูล

- ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยาจะใช้ข้อมูลต่อหน่วยอุตุนิยมที่ใกล้เคียงกับสถานที่วิจัยโดยจะขอข้อมูล ปริมาณฝนเฉลี่ยในรอบปี อุณหภูมิ ความชื้น
- ข้อมูลเฉพาะจุดเก็บจะต้องทำการบันทึกรายละเอียดดังต่อไปนี้
  - อุณหภูมิของดินและอากาศ ณ จุดนั้น โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่นำติดตัวไปด้วย
  - ความชื้นของดิน
  - ลักษณะของสิ่งแวดล้อม เช่นป่าทึบ ป่าโปร่ง หรือที่ราบ
  - ชนิดของพืชที่ขึ้นอยู่บริเวณนั้น ๆ

### ความถี่ของการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 เดือน จนครบ 1 ปี

ดังนั้นใน 1 ปี จะมีการเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง ๆ ละ 28 ตัวอย่างต่อภาค

จึงเป็นตัวอย่างภาคละ 168 ตัวอย่าง/ปี

รวม 3 ภาค = 504 ตัวอย่าง/ปี

### งานที่ 3 (Task 3) การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างดินที่เก็บมาแต่ละครั้งทั้ง 3 ภาค มีจำนวน 84 ตัวอย่าง ๆ ละ 2 กิโลกรัม นั้นจะแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ๆ ละ 500 กรัม โดยส่วนที่ 1 จะนำไปวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาลักษณะเนื้อดิน อินทรีย์วัตถุในดิน CEC ปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญคือ P และ K โดยการจ้างวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หรือกรมวิชาการเกษตร สำหรับดินที่เหลือจะแบ่งออกเป็นตัวอย่างละ 500 กรัม เพื่อวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม cyanobacteria และ ไรโซเบียม

#### การวิเคราะห์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ

งานนี้จะอยู่ในความรับผิดชอบของ ดร.เศรษฐา ศิริพิณฑุ สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ เชียงใหม่ โดยตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างจะดำเนินการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระทั้งกลุ่มเน้นเฉพาะพวก aerobic โดยใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ใช้ nitrogenase activity เป็นตัวชี้วัด ตามวิธีการของ Roper and Halsall, (1989) ในขณะเดียวกันก็จะทำการ isolate แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนดังกล่าวเพื่อการจำแนกหาสกุล (genus) และเก็บเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด ส่วนหนึ่งส่งไปที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการวิเคราะห์หา DNA pattern

#### การวิเคราะห์ cyanobacteria ตรึงไนโตรเจน

งานในส่วนนี้รับผิดชอบโดย ดร.สมพร ชุณหลือชานนท์ ผู้ร่วมวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เนื่องจาก cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับพืชมีจำกัดอยู่กับพืชบางชนิด เช่น แหนแดง ประง และไลเคนนั้น มักอยู่ในที่จำกัด ข้อมูลในส่วนนี้จะได้มาจากการสำรวจแหล่งพืชเหล่านี้ในระหว่างออกสำรวจการเก็บตัวอย่าง สำหรับที่อยู่โดยอิสระนั้นมีกระจายอยู่ทั่วไปทุกสภาวะแวดล้อมจึงทำการวิเคราะห์หาจำนวนจากตัวอย่างคือที่เก็บมาโดยวิธี MPN nitrogenase activity index โดยวิธีของ Grant et al., (1985) ในการบ่มตัวอย่างจะต้องทำในที่ ๆ มีแสงซึ่งออกแบบมาเพื่องานนี้โดยเฉพาะ ในขณะเดียวกันก็จะทำการ isolate cyanobacteria เพื่อหา genus และ species และนำตัวอย่างที่แยกได้ส่งไปที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเพื่อทำการจำแนก DNA pattern

### การวิเคราะห์หาปริมาณไรโซเบียม

การวิเคราะห์ในส่วนนี้จะดำเนินงานที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร รับผิดชอบโดย นายสมศักดิ์ โคตรพงศ์ และ ดร. อัจฉรา นันทกิจ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไรโซเบียมโดยวิธี MPN-plant infection technique ตามวิธีการของ Padma and Hoben (1994) โดยใช้ถั่วเซอราโตรเป็นพืช index เพราะเซอราโตรเป็น promiscuous plant ที่สามารถสร้างปมกับไรโซเบียมได้ทุกชนิด หลังจากนั้นจะทำการ isolate ไรโซเบียมจากปมของ เซอราโตรเพื่อจำแนกต่อไปเป็นไรโซเบียมสกุลไหน และรวบรวมส่งตัวอย่างเชื้อส่วนหนึ่งไปที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเพื่อทำการวิเคราะห์หา DNA pattern ของเชื้อเหล่านั้น

การวิเคราะห์ DNA ของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนทั้งหมดจะมีรายละเอียดในการดำเนินงานในวัตถุประสงค์จำเพาะที่ 4

**3.2 วัตถุประสงค์จำเพาะที่ 2 :** เพื่อให้ทราบถึงพลวัตรของประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในระบบการปลูกพืชและที่มีอยู่ในระบบธรรมชาติที่ไม่ถูกรบกวน

ข้อมูลที่ดำเนินการได้ในวัตถุประสงค์จำเพาะที่ 1 สามารถนำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ได้เพราะมีการเก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องตลอดปี

**3.3 วัตถุประสงค์จำเพาะที่ 3 :** เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางระบบนิเวศว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนมากน้อยเพียงใด

การดำเนินการเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ข้อนี้จะดำเนินการในพื้นที่ 3 ภาค เช่นเดียวกันกับในวัตถุประสงค์ที่ 1 และ 2 โดยจะทำการเลือกพื้นที่ ๆ มีการแผ้วถางเพื่อการเพาะปลูกพืชในปีที่ 1 ปีที่ 2 และปีที่ 3 ทำการเก็บดินเช่นเดียวกับที่ได้ดำเนินการในวัตถุประสงค์ที่ 1 การเก็บดินในพื้นที่ทำการเพาะปลูกปีที่ 1, 2 และ 3 นั้น จะต้องทำการเก็บดินในพื้นที่ใกล้เคียงที่ยังไม่มีการเพาะปลูกด้วย เพื่อให้ทราบถึงประชากรจุลินทรีย์ที่ยังอยู่ในสภาพเดิม นอกจากนี้จะได้ทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ ๆ ได้มีการทำการเพาะปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ย ยาปราบศัตรูพืชและวัชพืชอย่างเต็มที่ เช่น ในพื้นที่ทำการปลูกผักต่าง ๆ ภาค ละ 3 แห่ง

#### สรุปการเก็บตัวอย่างในส่วนนี้ มีดังนี้

1. ในที่ทำการเพาะปลูกปีที่ 1	2 จุด (ตัวอย่าง)
2. ในที่ทำการเพาะปลูกปีที่ 2	2 จุด
3. ในที่ทำการเพาะปลูกปีที่ 3	2 จุด
4. ในที่ทำการปลูกผัก	3 จุด
ตัวอย่างดินภาคละ	9 ตัวอย่าง
รวม 3 ภาค	27 ตัวอย่าง

### ความถี่ของการเก็บ

จะทำการเก็บตัวอย่างอย่างน้อยปีละ 3 ครั้ง คือ ในฤดูฝน ฤดูแล้ง และฤดูหนาวและทำการเก็บต่อเนื่องกัน 3 ปี

### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างจะดำเนินการเช่นเดียวกับวัตถุประสงคที่ 1

3.4 วัตถุประสงค์ที่ 4 : เพื่อให้ทราบถึงความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันว่าเป็นอย่างไร

งานวิจัยในส่วนนี้ รับผิดชอบโดยนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยจะนำจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดจากวัตถุประสงค์ที่ 1 มาทำการวิเคราะห์ DNA pattern โดยวิธีการใช้ PCR เป็นหลักโดยศึกษาควบคู่ไปกับลักษณะทางสรีระวิทยาของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มที่สำคัญบางประการ

ตัวอย่างการวิจัยที่ใช้เทคนิคเหล่านี้ได้แก่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม *Aectobacter* ที่อาศัยอยู่กับอ้อย โดยศึกษาขนาดและจำนวนของพลาสมิดที่พบ และ DNA hybridization pattern โดยใช้ nif HDK จาก *Rhizobium elti* CFN42 เป็น probe Mellado and Romeo, (1994) หรือการศึกษาความหลากหลายของประชากร *Bradyrhizobium japonicum* ในโปแลนด์ โดยใช้เทคนิค PCR และใช้ REP เป็น primer ( Madrzak et al., 1995) การศึกษาความหลากหลายของ *Rhizobia* ในปมพืช *Phaseolus vulgaris* L. ในประเทศเคนยาโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization กับ nifH gene (Anyango et al., 1995) หรือการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกลุ่มของ actinomycete *Frankia* โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ RFLP (Jamann et al.,1993) และการวิเคราะห์ phylogenetic ของกลุ่มจุลินทรีย์ในดินในแปลงถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค PCR โดยมี primer เป็น small subunitns ของ RNA gene (Veda et al., 1995) เป็นต้น

ข้อมูลของประชากรจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดจะนำมาหาความสัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น คุณสมบัติของดิน อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณฝน ระดับความสูง พืชที่ขึ้นอยู่ และระบบการปลูกพืชโดยใช้วิธีการทางสถิติ



#### 4. ผลการดำเนินงานและการรวบรวมข้อมูลทั่วไป

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณ (ดังแสดงในตารางที่ ก.1, 2 และ 3) ในภาคต่าง ๆ พร้อมกับระบุความสูงจากระดับน้ำทะเลและพืชพรรณหรือประเภทของป่าไม้ที่พบ โดยใช้เวลาในการเก็บเป็นเวลา 2 ปีครั้งตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2540 จนถึงเดือนพฤศจิกายน 2542 การเก็บตัวอย่างดินในแต่ละจุดได้ทำตามตำรับการทดลองโดยเก็บตัวอย่างดินของพื้นที่ละ 4 จุด (4 replications) แต่ละจุดมีระยะห่างกันพอสมควรเพื่อให้ครอบคลุมลักษณะตัวแทนของจุดเลือกนั้น ๆ เก็บตัวอย่างดินลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร นำดินที่ได้มาผสมกันให้ทั่วใส่ถุงพลาสติกให้แน่นบรรจุในถังน้ำแข็งเพื่อนำไปวิเคราะห์โดยที่ดินทุกตัวอย่างจะต้องอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำจนกระทั่งถึงกำหนดวิเคราะห์ การวิเคราะห์ดินได้ทำการวิเคราะห์ ค่าดังต่อไปนี้ ค่า pH ค่า electrical conductivity (EC) อินทรีย์วัตถุ (Organic matter : OM) และแร่ธาตุสำคัญ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม (ดังสรุปผลในตารางที่ ก.4, 5 และ 6) โดยความหมายของรหัสที่ระบุในตาราง ได้แก่

IN (1-4) = ภาคเหนือ	R (1-4) = พื้นที่นาข้าว
IC (1-4) = ภาคกลาง	CR (1-4) = พื้นที่ปลูกข้าวสลับพืชไร่
INE (1-4) = ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	F (1-4) = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า
M1 (1-4) = ยอดเขา	A (1-2) = พื้นที่ป่า
M2 (1-4) = กลางเขา	B (1-2) = พื้นที่ทำการเพาะปลูก 1-2 ปี
M3 (1-4) = เชิงเขา	C (1-2) = พื้นที่ทำการเพาะปลูกมากกว่า 3 ปี
C (1-4) = พื้นที่ปลูกพืชไร่	D (1-2) = พื้นที่ปลูกผัก

ในส่วนของการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแต่ละกลุ่มวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DunCan's New Multiple Range Test (DMRT) (เจริญ, 2534) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มกับคุณสมบัติของดิน โดยใช้สมการทดสอบการถดถอยพหุคูณ (Multiple regression)

รายละเอียดของงานวิจัยได้แบ่งเป็นตอนตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษานี้ โดยเริ่มจากไรโซเบียม ไชยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ โดยในแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์จะประกอบไปด้วยส่วนของการดำเนินงานตามแผนงานวิจัย เพื่อที่จะตอบคำถามตามวัตถุประสงค์ทั้งสี่ที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น

ตารางที่ ก. 1 แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคกลาง, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ

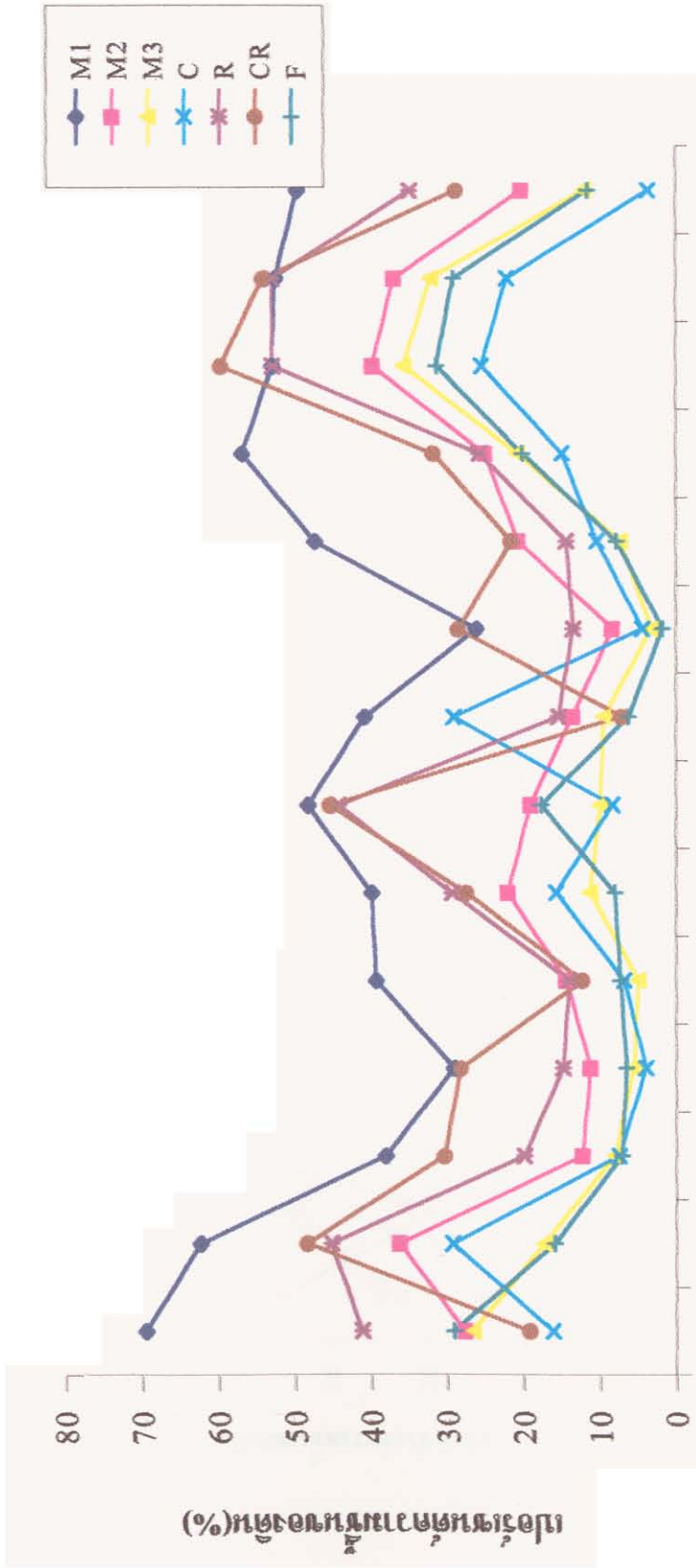
ภาค (ประเภท ของระบบนิเวศ)	สถานที่เก็บ	ระดับความสูง(เฉลี่ย) จากระดับน้ำทะเล (ม.)	พืชพรรณหรือ ลักษณะนิเวศที่พบ
2. ภาคกลาง			
- ยอดเขา	เขาเขียว จ. ปราจีนบุรี	1,700	ป่าเบญจพรรณ
- กลางเขา	เขาเขียว จ. ปราจีนบุรี	654	ป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง
- เขิงเขา	เขาเขียว จ. ปราจีนบุรี	325	ป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง
- ป่าดงดิบชื้น	สถานีทดลองพืชไร่ดงเคณฑลหลวง และ อ. สรรพยา จ. ชัยนาท	16	ข้าว, ถั่วเขียว, ข้าวโพด
- ป่าดงดิบ	สถานีทดลองพืชไร่และแปลงเกษตรกร อ. สรรพยา จ. ชัยนาท	13	นาข้าวและสถานีทดลองข้าว
- พืชไร่	สถานีพืชไร่ดงเคณฑลหลวง จ. ชัยนาท	16	ถั่วเขียว, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพดและหญ้า
- พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	จ. ชัยนาท จ. นครสวรรค์ และ อ. ปากบาง จ. สิงห์บุรี	20	ไม้ปายืนต้น
- พื้นที่ป่า	ดงเคณฑลหลวง จ. ชัยนาท	17	พื้นที่ป่าทั่วไป
- พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี	ไร่เกษตรกร ม. ดงช้างรำ ดงเคณฑลหลวง จ. ชัยนาท	18	ไม้ผล, ไม้สัก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว
- พื้นที่เพาะปลูก >3 ปี	ด. หมองขุน อ. วัดสิงห์ จ. ชัยนาท	27	ข้าวนาหว่าน มันสำปะหลัง
- พื้นที่ปลูกผัก	ด. มหาสวัสดิ์ อ. บางกรวย จ. นนทบุรี	3	ใบบวบ, ผักกาดหอม, ผักบุ้ง, ต้นหอม ต้นเบีร์ด

ตารางที่ ก. 2 แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ

ภาค (ประเภทของระบบนิเวศ)	สถานที่เก็บ	ระดับความสูง(เฉลี่ย)จากระดับน้ำทะเล (ม.)	พืชพรรณหรือลักษณะนิเวศที่พบ
3. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ			
- ยอดเขา	ยอดภูเรือ อ. ภูเรือ จ. เลย	1,310	ป่าผลัดใบ ป่าสน
- กลางเขา	ยอดภูเรือ อ. ภูเรือ จ. เลย	1,000	ป่าผลัดใบ ป่าสน
- เชนิงเขา	ยอดภูเรือ อ. ภูเรือ จ. เลย	705	ป่าเต็งรัง
- ปดุงข้าวสลับพืชไร่	อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา	238	ข้าว ถั่วเขียวและถั่วเหลือง
- ปดุงข้าว	อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา	230	นาข้าวพื้นที่เกษตรกร
- พืชไร่	อ. เมือง อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา	200	มันสำปะหลังและอ้อย
- พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา	205	ไม้ยืนต้น
- พื้นที่ป่า	อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา	250	ป่าเต็งรัง
- พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี	อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา	250	มันสำปะหลังและอ้อย
- พื้นที่เพาะปลูก >3 ปี	อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา	210	มันสำปะหลังและอ้อย
- พื้นที่ปลูกผัก	อ. เมือง จ. นครราชสีมา	222	คะน้ำและผักกาด

ตารางที่ ก. 3 แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินในภาคเหนือ, ระดับความสูงเฉลี่ยและพืชพรรณที่พบ

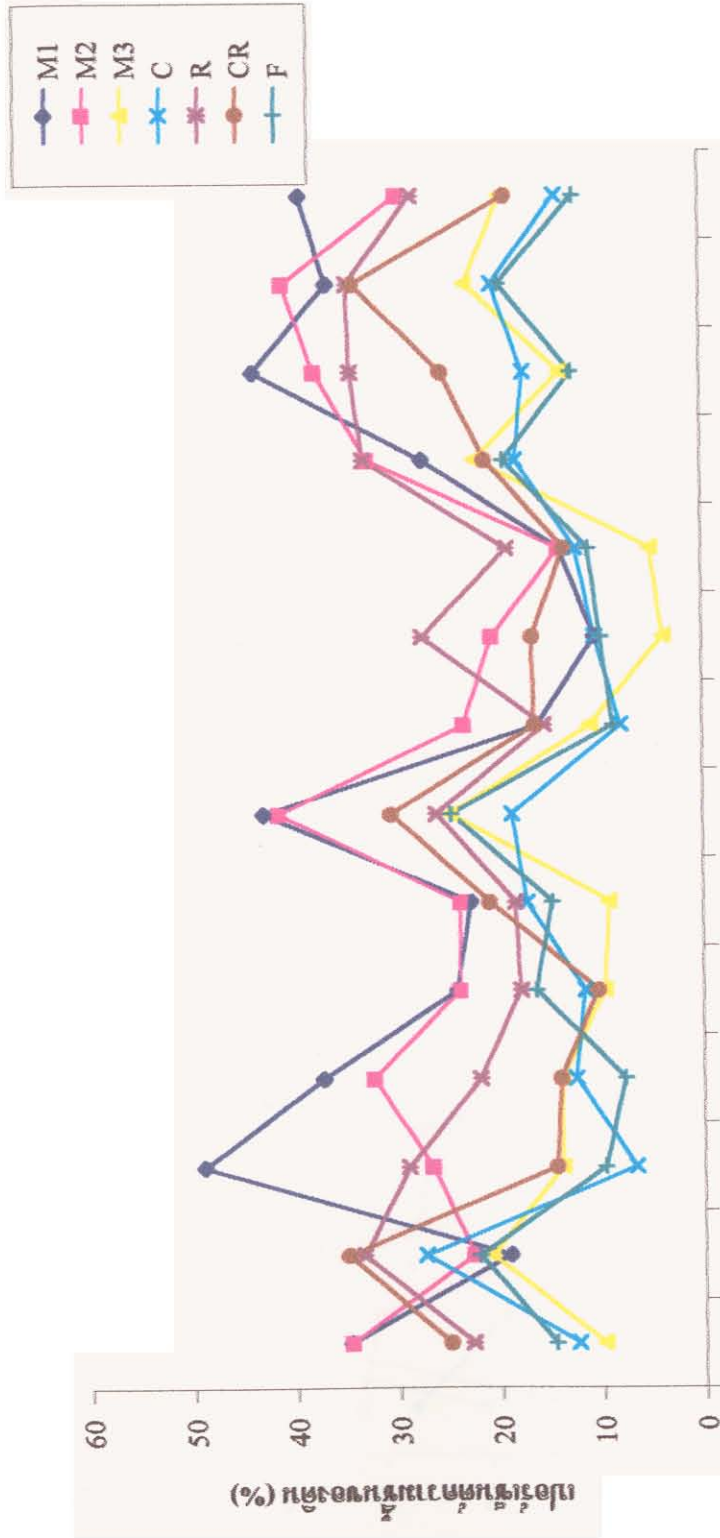
ภาค (ประเภท ของระบบนิเวศ)	สถานที่เก็บ	ระดับความสูง (เฉลี่ย) จากระดับน้ำทะเล (ม.)	พืชพรรณหรือ ลักษณะนิเวศที่พบ
1. ภาคเหนือ			
- ยอดเขา	ยอดดอยอินทนนท์ อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	2,565	ป่าดงดิบ, ป่าดิบชื้น
- กลางเขา	บริเวณ กม. ที่ 27 ดอยอินทนนท์ อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	1,018	ป่าเบญจพรรณ, ป่าเต็งรัง
- เชิงเขา	บ้านแม่ห้อย, บ้านแม่กลาง, บ้านโหล่งขอด, บ้านโป่ง อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่	705	ป่าเบญจพรรณ, ป่าเต็งรัง
- ป่าดงข้าวสลับพืชไร่	อ. จอมทอง, อ. พร้าว, อ. สันทราย จ. เชียงใหม่	235	ข้าว, ถั่วเหลืองและมันฝรั่ง
- ป่าดงข้าว	อ. สันป่าตอง, อ. สันกำแพง อ. แม่แตง, อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่	235	นาข้าวและสถานีทดลองข้าว
- พืชไร่	ต. แม่ป๋างและ ต. โหล่งขอด อ. พร้าว จ. เชียงใหม่	205	ละหุ่ง, ข้าวโพด, ถั่วเหลืองและถั่ว
- พื้นที่ป่า	ป่าสงวน บ้านแม่หอพระ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	205	ป่าเต็งรัง
- พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	ต. สันกำแพง และ ต. ร้องวัวแดง อ. สันกำแพง จ. เชียงใหม่	205	หญ้าและไม้ล้มลุก
- พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	205	พริก มะเขือ บวบ แตงกวา
- พื้นที่เพาะปลูก >3 ปี	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่	205	พริก ยาสูบ มะเขือยาว ถั่วฝักยาว ฝัก กล้วยตุง
- พื้นที่ปลูกผัก	บริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่	205	ฟักทอง ผักกาดแก้ว



รูปที่ ก. 1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินภาคเหนือ

ม.ย.40 ก.ย.40 พ.ย.40 ม.ค.41 พ.ค.41 ก.ค.41 ก.ย.41 พ.ย.41 ม.ค.42 พ.ค.42 ก.ค.42 ก.ย.42

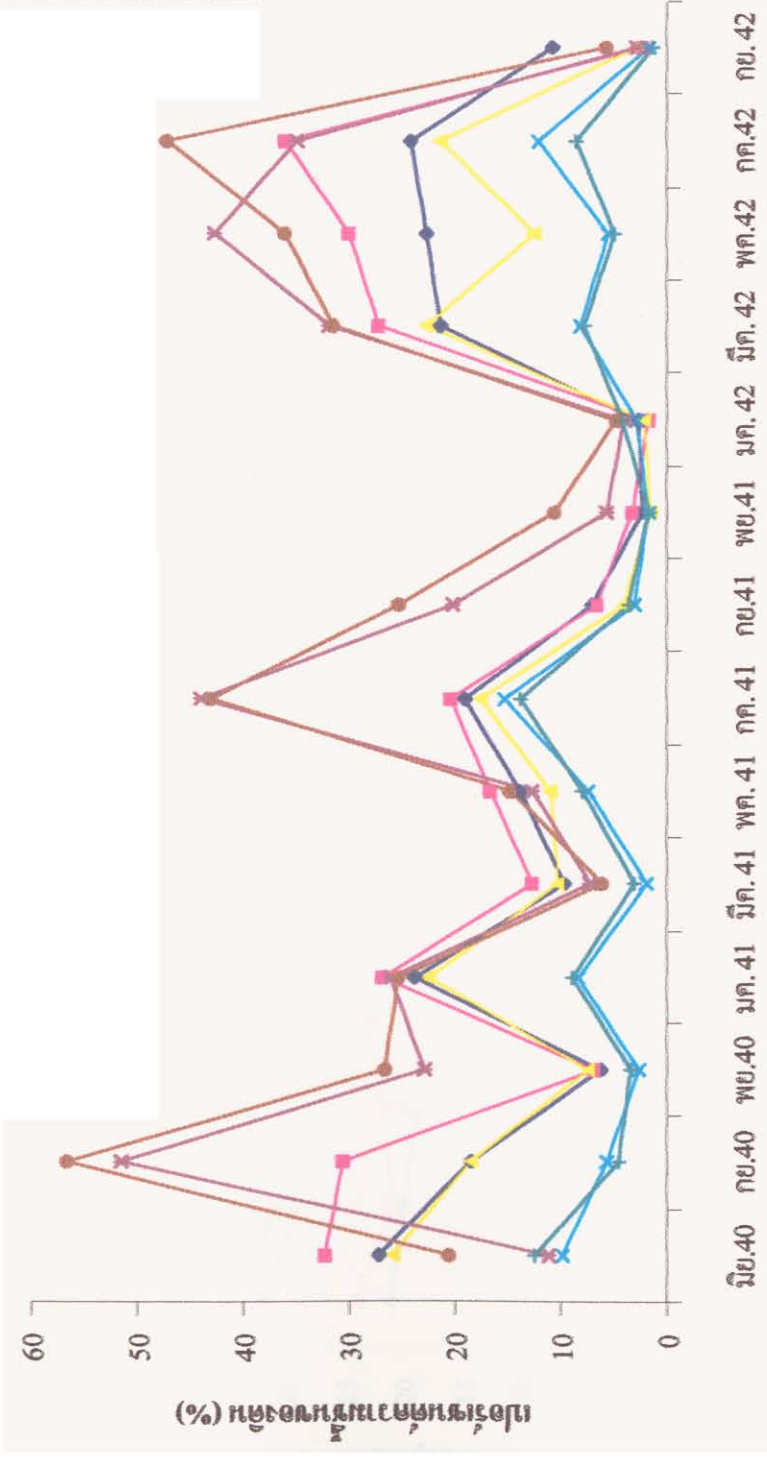
- M1 = ยอดเขา
- M2 = กลางเขา
- M3 = เจริงเขา
- C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง
- R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง
- CR = พืชไร่ตัดกับข้าว
- F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ ก. 2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของดินภาคกลาง

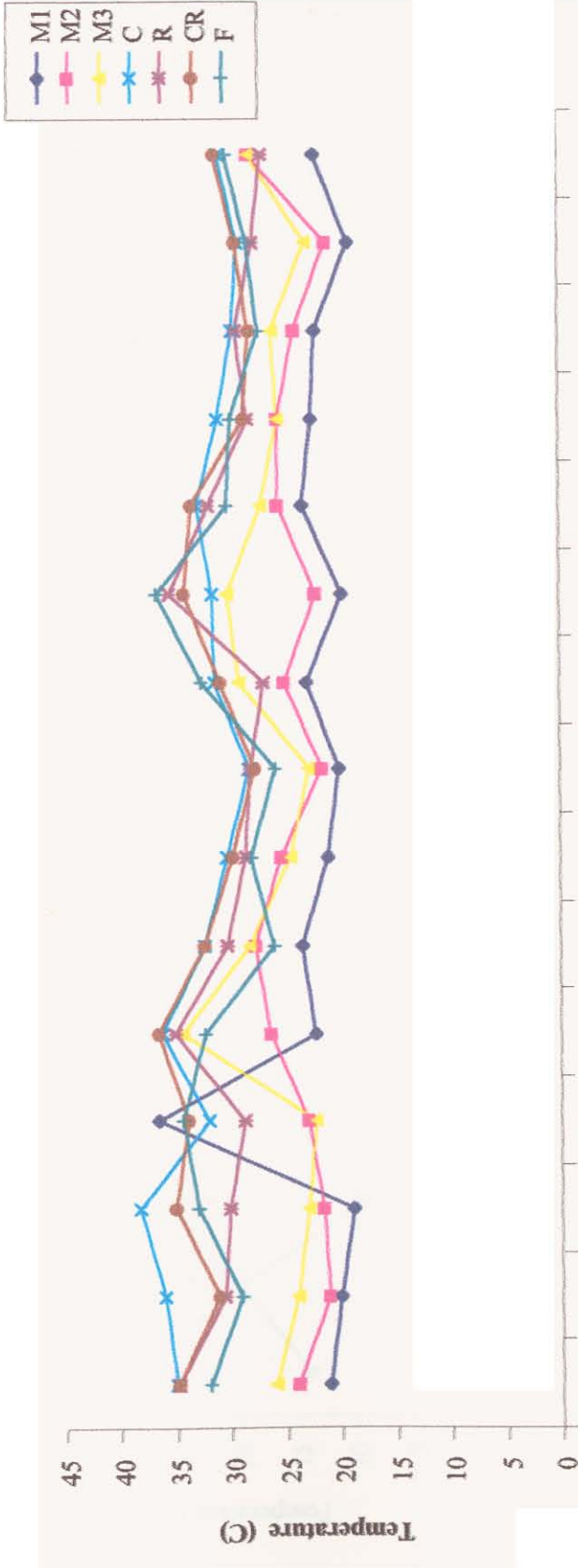
รูปที่ ก. 2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของดินภาคกลาง

M1 = ยอดเขา      M2 = กลางเขา      M3 = เจริงเขา      C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง  
 R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง      CR = พืชไร่สลับข้าว      F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ ก. 3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

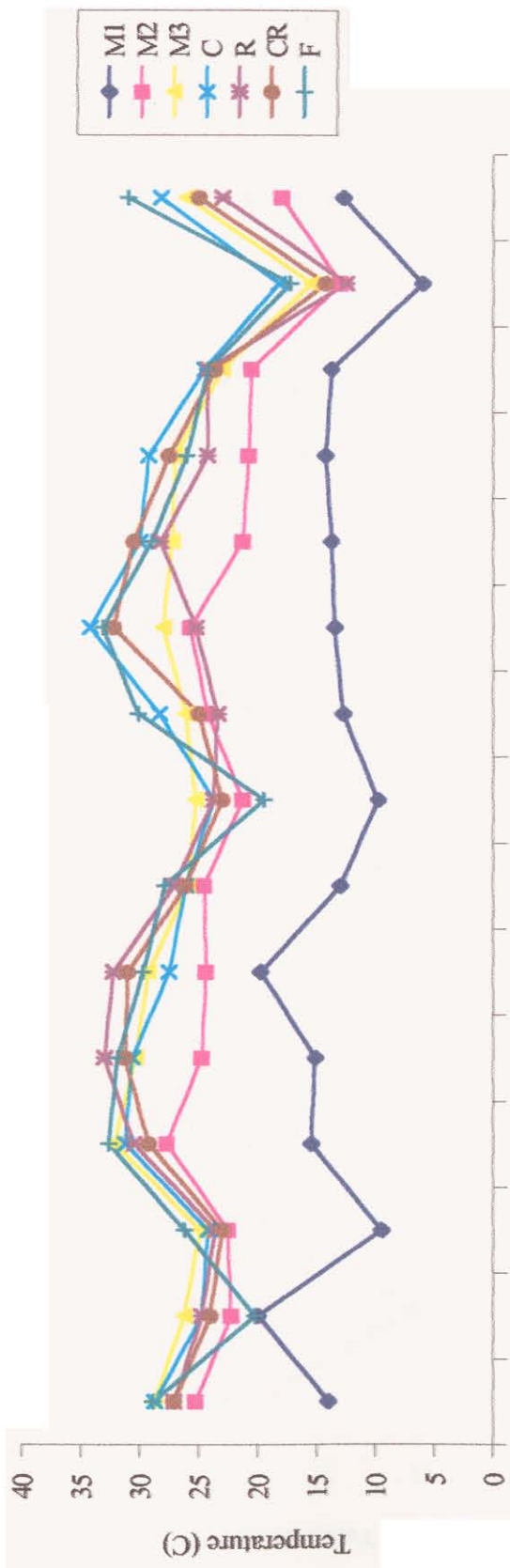
M1 = ยอดเขา      M2 = กลางเขา      M3 = เจริงเขา      C = พืชไร่อย่างต่อเนือง  
 R = ข้าวอย่างต่อเนือง      CR = พืชไร่ตัดข้าว      F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ 4 ก.กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคกลาง

M1 = ยอดเขา                      M2 = กลางเขา                      M3 = เจริงเขา                      C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง  
 R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง              CR = พืชไร่สลับข้าว              F = พื้นที่กร้างว่างเปล่า

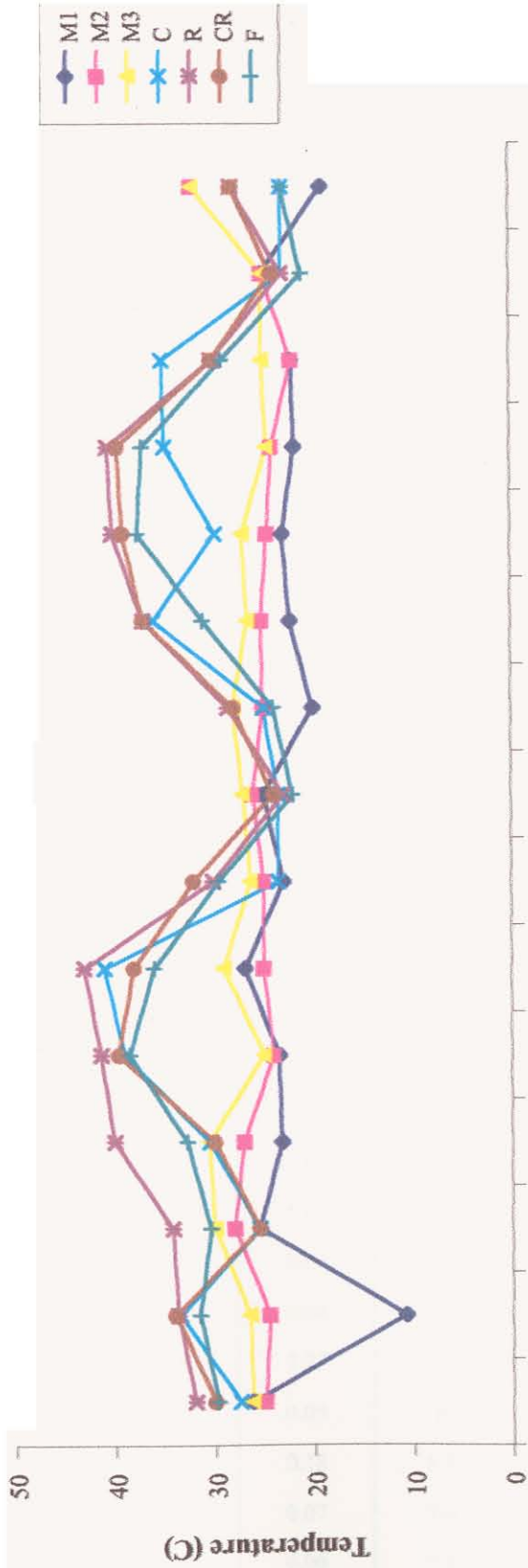




รูปที่ 5ก. กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคเหนือ

ปี 40 มค.40 พย.40 มค.41 พย.41 มค.42 พย.42 มค.42 พย.42

- M1 = ยอดเขา
- M2 = กลางเขา
- M3 = เHINGเขา
- C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง
- R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง
- CR = พืชไร่สลับข้าว
- F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ 6 ก. กราฟแสดงอุณหภูมิเฉลี่ยของดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

M1 = ยอดเขา                      M2 = กลางเขา                      M3 = เชิงเขา                      C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง  
 R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง              CR = พืชไร่สลับข้าว              F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า

ตารางที่ ก. 4 แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคกลาง

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
IC-M <sub>1</sub> -1	8.7	0.13	3.5	2	100	440	47
IC-M <sub>1</sub> -2	5.5	0.09	4.7	1	70	720	41
IC-M <sub>1</sub> -3	3.4	0.13	4.5	1	60	280	21
IC-M <sub>1</sub> -4	10.3	0.09	4.3	1	70	280	32
IC-M <sub>2</sub> -1	6.6	0.07	4.9	1	100	1000	65
IC-M <sub>2</sub> -2	5.4	0.06	4	19	80	320	49
IC-M <sub>2</sub> -3	6.8	0.1	6	10	80	3280	80
IC-M <sub>2</sub> -4	3.6	0.06	6.9	1	70	3320	70
IC-M <sub>3</sub> -1	3.2	0.25	6.9	54	220	1520	160
IC-M <sub>3</sub> -2	2.9	0.11	5.9	8	130	1000	110
IC-M <sub>3</sub> -3	2.2	0.3	6.8	13	150	1440	100
IC-M <sub>3</sub> -4	1.7	0.07	5.9	5	160	720	70
IC-C-1	0.9	0.13	7.7	36	50	2000	110
IC-C-2	1	0.12	7.8	133	60	1680	70
IC-C-3	1.8	0.08	6.6	36	110	1560	320
IC-C-4	1.6	0.08	6.1	20	100	1560	320
IC-R-1	1.1	0.18	7.3	24	60	1600	120
IC-R-2	1	0.06	4.8	4	50	360	360
IC-R-3	2.1	0.09	4.9	24	90	800	170
IC-R-4	2.6	0.07	6.2	38	200	1560	200
IC-CR-1	1.6	0.16	7.5	116	100	2320	120
IC-CR-2	0.8	0.07	5.2	66	30	400	23
IC-CR-3	1.9	0.07	6.2	9	110	1520	280
IC-CR-4	2.3	0.07	6.6	26	160	1520	260
IC-F-1	1.7	0.04	5	10	40	400	70
IC-F-2	5.3	0.22	7.3	97	200	3280	260
IC-F-3	3.2	0.09	6	9	50	1680	440
IC-F-4	4.7	0.18	5.8	66	190	1920	300
IC-A-1	3.4	0.07	7.6	36	150	3120	220
IC-A-2	1.4	0.06	7.8	38	160	3120	220

ตารางที่ ก. 4 (ต่อ)

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
IC-B-1	1	0.12	7.9	9	60	3360	160
IC-B-2	0.6	0.07	4.8	16	70	3360	180
IC-C*-1	0.7	0.1	4.7	5	50	112	11
IC-C*-2	2.1	0.09	5.8	12	70	108	19
IC-D-1	1.8	0.2	5.5	1802	220	2960	520
IC-D-2	2.2	0.18	5.1	1155	170	2800	580
IC-D-3	2	0.13	4.8	1752	180	2960	550

ตารางที่ ก. 5 แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคเหนือ

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
IN-M <sub>1</sub> -1	5.5	0.23	5.1	48	200	760	100
IN-M <sub>1</sub> -2	9	0.26	5.8	10	320	1920	210
IN-M <sub>1</sub> -3	15.7	0.33	4.1	26	260	760	150
IN-M <sub>1</sub> -4	4.9	0.2	5	103	230	800	100
IN-M <sub>2</sub> -1	4.1	0.15	5.8	46	210	1080	100
IN-M <sub>2</sub> -2	4.5	0.16	4.8	3	170	320	100
IN-M <sub>2</sub> -3	3.7	0.22	5.5	48	150	1200	60
IN-M <sub>2</sub> -4	4.1	0.13	4.7	8	180	560	140
IN-M <sub>3</sub> -1	4	0.31	6.7	24	160	1920	150
IN-M <sub>3</sub> -2	1.3	0.06	5.5	5	100	400	80
IN-M <sub>3</sub> -3	2.2	0.15	4.6	23	110	520	90
IN-M <sub>3</sub> -4	1.3	0.07	4.3	42	50	112	32
IN-C-1	2.5	0.23	4.4	40	160	1120	220
IN-C-2	2.3	0.2	4.6	28	130	880	150
IN-C-3	3.1	0.2	5.6	18	150	1600	500
IN-C-4	1	0.08	4.9	70	130	400	70
IN-R-1	1.7	0.14	6	46	70	1240	150
IN-R-2	3.3	0.09	5.5	5	130	1680	780
IN-R-3	2.9	0.07	4.5	2	70	600	80
IN-R-4	3.7	0.09	6.5	4	150	2640	780
IN-CR-1	1.4	0.06	4.7	10	50	640	60
IN-CR-2	2.5	0.11	4.8	26	70	880	60
IN-CR-3	2.1	0.21	4.2	78	180	560	130
IN-CR-4	1.1	0.1	6.2	59	70	560	60
IN-F-1	5.4	0.28	6.8	629	310	2000	380
IN-F-2	2.8	0.13	6.5	109	130	1720	360
IN-F-3	3.3	0.1	5.6	15	100	1520	560
IN-F-4	2.1	0.09	5.7	30	100	1120	310
IN-A-1	3	0.09	5.1	89	120	680	120
IN-A-2	4.9	0.12	4.4	97	210	560	80

ตารางที่ ก. 5 (ต่อ)

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
IN-B-1	1.5	0.08	6.8	34	340	1520	160
IN-B-2	2.7	0.07	4.9	112	70	124	34
IN-C*-1	3.3	0.13	5.2	116	360	1040	170
IN-C*-2	2.5	0.1	5.3	594	210	960	120
IN-D-1	1.1	0.09	6.4	153	300	2000	330
IN-D-2	1	0.08	6.3	683	300	880	190
IN-D-3	1.5	0.09	6.5	316	110	720	90

ตารางที่ ก. 6 แสดงคุณลักษณะของตัวอย่างดินที่ทำการสุ่มตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
INE-M <sub>1</sub> -1	2	0.15	4.3	24	40	400	21
INE-M <sub>1</sub> -2	4.3	0.08	3.8	6	40	84	15
INE-M <sub>1</sub> -3	4	0.12	4.4	4	30	48	9
INE-M <sub>1</sub> -4	3.3	0.14	4.7	6	20	40	7
INE-M <sub>2</sub> -1	2.5	0.08	4.2	1	70	96	24
INE-M <sub>2</sub> -2	2.8	0.08	4.4	1	60	76	20
INE-M <sub>2</sub> -3	4.4	0.08	4.9	6	30	32	8
INE-M <sub>2</sub> -4	3.8	0.08	5.1	7	30	40	6
INE-M <sub>3</sub> -1	2.6	0.08	5.3	13	60	280	100
INE-M <sub>3</sub> -2	2.7	0.1	4.8	9	90	120	80
INE-M <sub>3</sub> -3	1.9	0.09	4.6	4	80	180	59
INE-M <sub>3</sub> -4	2.6	0.11	4.9	9	90	360	90
INE-C-1	0.7	0.03	7	5	20	760	24
INE-C-2	1.6	0.19	7.3	21	70	2200	110
INE-C-3	0.5	0.05	7.1	7	20	400	39
INE-C-4	2.1	0.11	6	7	160	1440	580
INE-R-1	2.1	0.08	7.3	16	120	2480	280
INE-R-2	2.1	0.12	6.1	5	130	1920	340
INE-R-3	1.9	0.11	6	15	110	1520	280
INE-R-4	2	0.14	6.2	9	110	1560	330
INE-CR-1	1.6	0.12	6	5	100	1680	480
INE-CR-2	2.1	0.16	5.2	30	110	1240	290
INE-CR-3	1.7	0.13	5.3	13	110	1200	290
INE-CR-4	1.6	0.1	5	21	120	1120	260
INE-F-1	1.8	0.12	7.3	44	80	1000	90
INE-F-2	1.1	0.07	7.4	30	70	880	70
INE-F-3	1.4	0.13	7.4	5	90	2240	130
INE-F-4	2.5	0.18	6.5	36	250	960	300
INE-A-1	2.5	0.08	5.6	5	70	440	90
INE-A-2	2.3	0.12	5.8	9	40	480	70

## ตารางที่ ก. 6 (ต่อ)

Place	OM. (%)	EC.	pH	P (ppm.)	K (ppm.)	Ca (ppm.)	Mg (ppm.)
INE-B-1	1.4	0.07	5.4	12	30	280	45
INE-B-2	0.9	0.09	6.0	13	50	280	55
INE-C*-1	0.8	0.08	5.2	28	30	112	29
INE-C*-2	0.5	0.11	5.1	28	30	148	31
INE-D-1	0.7	0.09	6.5	161	380	176	540
INE-D-2	3	0.12	6.3	161	380	176	540
INE-D-3	1.8	0.13	6.3	656	170	240	360

คำย่อ :

OM = Organic matter

EC = Electroconductivity

pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง

P = ฟอสฟอรัส

K = โพแทสเซียม

Ca = แคลเซียม

Mg = แมกนีเซียม



# ส่วนที่ 1

จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่มไรโซเบียม

(RHIZOBIUM)

## จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่มไรโซเบียม (วัตถุประสงค์ที่ 1-3)

### บทนำ

ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์คินชนิดหนึ่ง มีความสามารถในการสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่ว เมื่ออยู่ในปมรากถั่ว ไรโซเบียมจะทำการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ในการเจริญเติบโตสร้างเนื้อหนังของเซลล์ และให้ไนโตรเจนแก่พืชอาศัย ไรโซเบียมจึงถือได้ว่าเป็นแหล่งผลิตไนโตรเจนที่ไม่มีขอบเขตจำกัด (Hartmann and Amarge, 1991) ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในพวก prokaryote ที่มีเอนไซม์ (enzyme) ที่เรียกว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) และใช้พลังงานในรูปของ ATP ทำการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation) ขบวนการทางเอนไซม์นี้สามารถรวมแก๊ส  $N_2$  และ  $H_2$  ให้เป็นแอมโมเนีย ทำให้ไนโตรเจนมาเป็นประโยชน์ต่อพืชและสัตว์ต่าง ๆ ได้ จากการศึกษาค้นคว้าของนักวิทยาศาสตร์ ได้มีการสำรวจ รวบรวม และคัดเลือกจุลินทรีย์ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยการนำมาคลุกกับถั่วก่อนปลูกเพื่อเพิ่มผลผลิตทดแทนการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งบทบาทของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในโลกนั้นมีมากมายโดยเฉพาะในระบบนิเวศที่ยังไม่ถูกทำลาย ระบบนี้จะช่วยจัดหาไนโตรเจนให้แก่สิ่งมีชีวิตทั้งหลาย จนกระทั่งเมื่อโลกมีการพัฒนาขึ้น ความต้องการบริโภคอาหารมากขึ้น ซึ่งผลให้พื้นที่ป่าถูกบุกรุกทำลายเพื่อนำมาทำการผลิตพืชและอาหารอย่างต่อเนื่อง เมื่อพื้นที่อาศัยและสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปอาจมีผลกระทบต่อประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์เหล่านี้ได้

สภาวะแวดล้อมมีผลอย่างมากต่อประชากรและชนิดของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน โดยเฉพาะไรโซเบียม เนื่องจากไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่ว กล่าวคือ ไรโซเบียมจะถูกจำแนกตามลักษณะความสามารถในการเข้าสร้างปมได้กับชนิดของพืชตระกูลถั่วที่อาศัยอยู่ เช่น *Bradyrhizobium japonicum* จะสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเหลืองเท่านั้น ซึ่งในสภาพแวดล้อมต่างกัก็มีอิทธิพลต่อการเป็นอยู่ของไรโซเบียมต่างกัน (Boonkerd and Weaver, 1982; Weaver *et al*, 1987) และนอกจากนี้ Boonkerd และคณะ (1993) ยังพบอีกว่าอิทธิพลของระบบการปลูกพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับประชากร และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมอีกด้วย

เป้าหมายของงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อต้องการศึกษาถึงอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมและระบบนิเวศแบบใดที่มีต่อการดำรงชีวิต และพลวัตรของประชากรไรโซเบียม และเมื่อระบบนิเวศเปลี่ยนแปลงไป จะมีผลกระทบต่อจำนวนประชากรไรโซเบียมมากน้อยเพียงใด นอกจากนั้นยังทำการศึกษานับประชากรที่มีอยู่ในระบบปลูกพืชต่าง ๆ ตลอดปีที่สมบูรณ์อีกด้วย

## อุปกรณ์และวิธีการของการตรวจวัดผล

### อุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเซอรราโตร
2. สูตรสารละลายธาตุอาหารที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน (Broughton and Dilworth, 1971)
3. ถุงปลูก (growth pouch) ขนาด 5 x 8 นิ้ว
4. เครื่องมือต่าง ๆ สำหรับการเก็บผลการทดลอง
  - คู่มือตัวอย่างดิน
  - เครื่องวัดค่า pH (pH meter)
  - เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity meter)
  - เทอร์โมมิเตอร์ สำหรับวัดอุณหภูมิดินและอากาศ

### วิธีการ

#### 1. การเตรียมสารละลายดิน

คำนวณปริมาณดินที่ใช้โดยให้มีปริมาณตัวอย่างดินแห้ง 50 กรัม ต่อน้ำ 150 มล. (เจือจางดิน 4 เท่า) เริ่มจากปริมาณตั้งต้นที่  $4^{-1}$  ถึง  $4^{-8}$  วิธีการทำ คือ เตรียมดินน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อจำนวน 8 ขวด ขวดที่ 1 ใส่น้ำ 150 มล. ขวดที่ 2-8 ใส่น้ำ 30 มล. ซึ่งดินที่คำนวณได้ใส่ขวดที่ 1 เขย่าและดูดสารละลายดินจากขวดที่ 1 ใส่ขวดที่ 2 จำนวน 10 มล. เขย่าและดูดสารละลายดิน 10 มล. ใส่ขวดที่ 3 ทำเช่นนี้จนถึงขวดที่ 8 ก็จะได้สารละลายดินเจือจางจากความเข้มข้นที่  $4^{-1}$  เท่าถึง  $4^{-8}$  เท่า

#### 2. การเพาะเมล็ดเซอรราโตร

ทำความสะอาดผิวของเมล็ดและทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดเซอรราโตรอ่อนลงโดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น (concentrated  $H_2SO_4$ ) ตามวิธีการของ Somasegaran and Hoben (1985) โดยทำการแช่เมล็ดเซอรราโตรในกรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างกรดออกด้วยน้ำสะอาดแล้วปล่อยให้ผ่านน้ำเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง นำเมล็ดไปเพาะลงบนจานสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้หุ้มทั่วสำลี วางเมล็ดให้กระจายทั่วจานสำลี บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน เมล็ดก็จะงอกรากออกมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำไปปลูกในชั้นตอนต่อไป

### 3. การเตรียมถุงปลูก

ถุงปลูก (growth pouch) เป็นถุงพลาสติกทึบร้อนแบบหนาขนาด 5 x 8 นิ้ว ภายในบรรจุกระดาษฟางที่พับขอบ ใส่หลอดพลาสติกไว้ทางด้านใดด้านหนึ่งของถุงนำถุงทั้งชุดนี้ไปนึ่งฆ่าเชื้อวางถุงทั้งหมดในแรค (rack) ที่ทำจากลวดสแตนเลสตัดเป็นกรอบสี่เหลี่ยมตอกลงบนแผ่นไม้ ช่องห่างระหว่างกรอบลวดประมาณ 1 เซนติเมตร (Somasegaran and Hoben, 1985)

### 4. การปลูกถั่วและการใส่สารละลายดินลงในถุงปลูก

นำถุงปลูกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางใน rack เติมสารละลายธาตุอาหารที่ปราศจากธาตุไนโตรเจนในปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่อถุง ปลูกเมล็ดเซอรราโตที่มีรากงอกลงบนกระดาษฟาง 2 เมล็ดต่อ 1 ถุงปลูก นำสารละลายดินที่เตรียมไว้เจือจางที่ความเข้มข้น  $4^{-1}$ - $4^{-8}$  มาหยดลงบนบริเวณรากถั่วในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อ 1 ถุง ทำ 4 ซ้ำ (replication) รวมทั้งถุงที่เป็น control อีก 4 ถุง

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของไรโซเบียมในระบบนิเวศต่าง ๆ

จำนวนประชากรของไรโซเบียมในดินที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ กัน นำมาประเมินด้วยวิธี MPN – plant infection technique มีจำนวนแตกต่างกันตามพื้นที่ และระยะเวลาในการศึกษาดังนี้

### 1.1 จำนวนประชากรไรโซเบียมในแต่ละระดับพื้นที่ของภาคต่าง ๆ

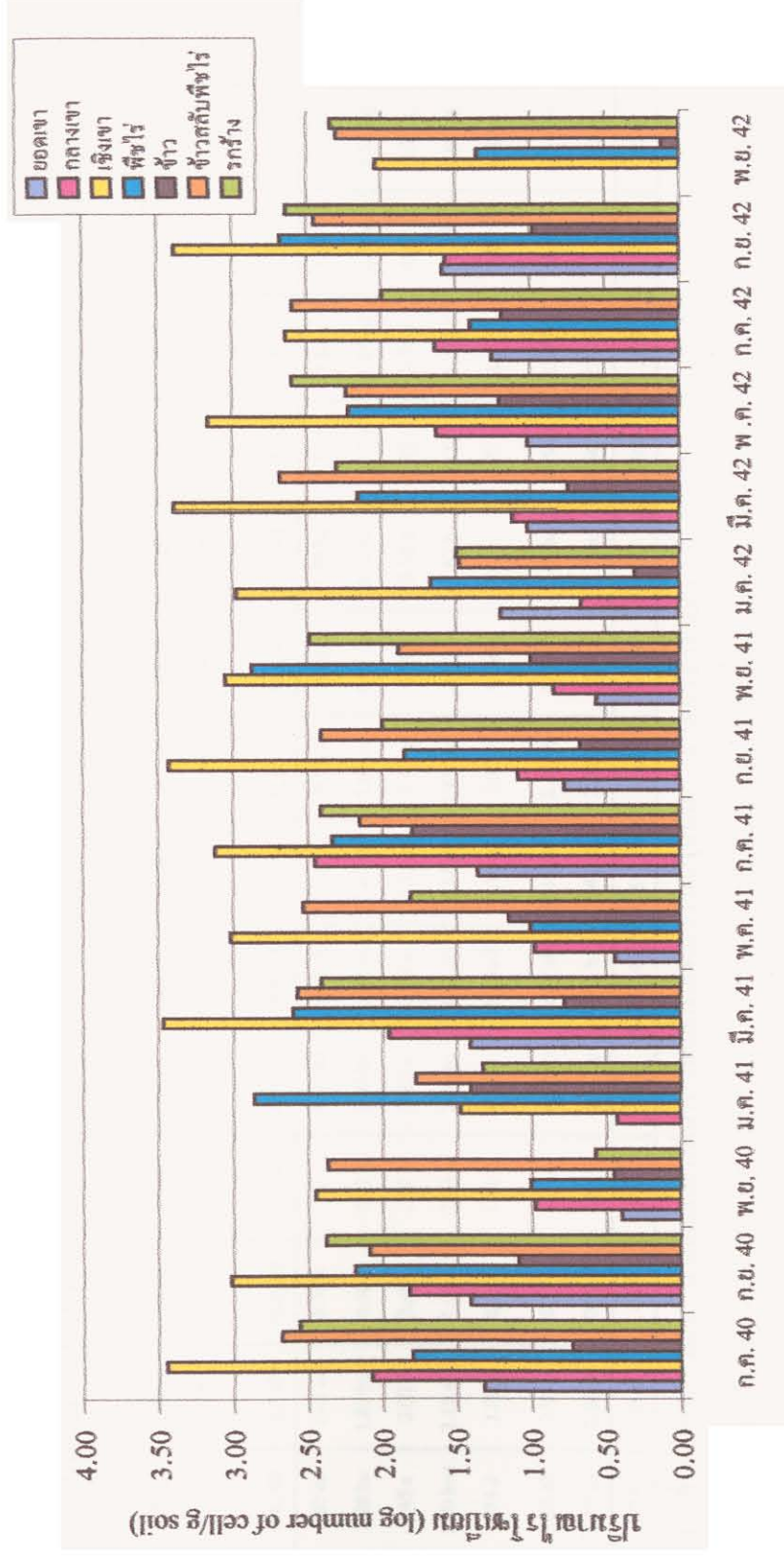
#### 1.1.1 ภาคกลาง

จากการนับประชากรไรโซเบียมจากดินภาคกลางในพื้นที่ต่าง ๆ กัน แสดงดังตารางที่ 1.1 และรูปที่ 1.1 พบว่า ในพื้นที่ภูเขาที่ความสูง 3 ระดับ คือ ยอดเขา กลางเขา และเชิงเขา มีปริมาณประชากรไรโซเบียมแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ จะพบปริมาณไรโซเบียมมากที่สุดที่บริเวณเชิงเขาซึ่งจะพบในปริมาณ 1.48 - 3.45 log number of cell/g dry soil (30 – 2,455 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) พื้นที่กลางเขามีประชากร 0 - 2.4 log number of cell/g dry soil (0 – 282 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ส่วนยอดเขามีประชากรต่ำสุดเท่า 0- 1.59 log number of cell/g dry soil (0 – 39 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง)

ในพื้นที่ราบที่ทำการเกษตร พบว่า บริเวณพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวและบริเวณพื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง มีปริมาณไรโซเบียมในดิน ตั้งแต่ 1.48 – 2.68 log number of cell/g dry soil (30 – 479 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) และ 1.01 – 2.86 log number of cell/g dry soil (10 – 741 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะมีประชากรไรโซเบียมสูงกว่าบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่องเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีประชากรเพียง 0.12 – 1.80 log number of cell/g dry soil (1 – 63 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่อง เป็นพื้นที่ลุ่มอยู่ในสภาพน้ำขังมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของไรโซเบียม ทั้งความชื้นที่มากเกินไป การถ่ายเทอากาศไม่ดี เนื่องจากมีออกซิเจนน้อย เหล่านี้เป็นต้น

ในพื้นที่รกร้างว่างเปล่า แต่ก็มีพืชขึ้นปกคลุมดิน พบว่าปริมาณไรโซเบียมในดินมีอยู่ค่อนข้างสูง คือ 0.57 – 2.64 log number of cell/g dry soil (4 – 437 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะพบในปริมาณสม่ำเสมอตลอดทั้งปี

การที่พบประชากรไรโซเบียมมากในพื้นที่เชิงเขา พื้นที่ปลูกพืชไร่ พืชไร่สลับข้าวและพื้นที่รกร้างว่างเปล่ากว่าบริเวณอื่นแสดงให้เห็นถึงพืชที่ปลูกในบริเวณนั้น จะพบว่าบริเวณดังกล่าวมีพืชขึ้นคลุมดินตลอดเวลาและพื้นที่ปลูกพืชไร่ และพืชไร่สลับข้าว นั้น ในภาคกลางพบว่าส่วนใหญ่เป็นพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ซึ่งพืชต่าง ๆ เหล่านี้จะช่วยรักษาสมดุลของประชากรไรโซเบียมในดินไว้ได้



รูปที่ 1.1 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 1.1 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคกลาง (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1**	ครั้งที่ 2**	ครั้งที่ 3**	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8**	ครั้งที่ 9**	ครั้งที่ 10**	ครั้งที่ 11**	ครั้งที่ 12**	ครั้งที่ 13**	ครั้งที่ 14**	ครั้งที่ 15**	เฉลี่ย
	ก.ค. 40	ก.ย. 40	พ.ย. 40	ม.ค. 41	มี.ค. 41	พ.ค. 41	ก.ค. 41	ก.ย. 41	พ.ย. 41	ม.ค. 42	มี.ค. 42	พ.ค. 42	ก.ค. 42	ก.ย. 42	พ.ย. 42	
M <sub>1</sub>	1.32 cd	1.41 cd	0.40 b	0	1.41 cd	0.44 d	1.36 b	0.78 d	0.56 c	1.20 bc	1.02 c	1.02 d	1.26 b	1.59 bc	0	0.92
M <sub>2</sub>	2.08 bc	1.82 bcd	0.98 b	0.43 c	1.96 bc	0.98 cd	2.45 ab	1.09 cd	0.85 bc	0.66 bc	1.12 c	1.63 cd	1.64 ab	1.57 bc	0	1.28
M <sub>3</sub>	3.45 a	3.02 a	2.45 a	1.48 b	3.47 a	3.02 a	3.12 a	3.43 a	3.05 a	2.98 a	3.39 a	3.16 a	2.64 a	3.39 a	2.04 ab	2.94
C	1.80 bcd	2.19 abc	1.01 b	2.86 a	2.60 ab	1.01 cd	2.34 ab	1.85 bcd	2.87 a	1.67 b	2.16 b	2.22 bc	1.4 b	2.68 ab	1.36 b	2.00
R	0.73 d	1.09 d	0.45 b	1.41 b	0.78 d	1.15 cd	1.80 b	0.67 d	1.00 bc	0.3 c	0.75 c	1.21 d	1.19 b	0.98 c	0.12 c	0.91
CR	2.68 ab	2.09 a	2.37 a	1.78 b	2.57 ab	2.53 ab	2.15 ab	2.41 ab	1.89 ab	1.48 bc	2.68 ab	2.24 bc	2.6 a	2.45 ab	2.30 a	2.28
F	2.56 ab	2.38 ab	0.57 b	1.33 b	2.41 bc	1.81 bc	2.41 ab	2.00 bc	2.49 a	1.5 bc	2.30 b	2.60 ab	2.0 a	2.64 a	2.34 a	2.09
CV (%)	37.4	28.4	46.7	37.7	30.2	47.0	31.0	42.9	42.8	52.8	30.2	24.8	34.3	37.8	35.7	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT

\* Significantly different at p = 0.05

\*\* Significantly different at p = 0.01

M<sub>1</sub> = ยอดเขา

R = ซ้ำอย่างต่อเนื่อง

M<sub>2</sub> = กลางเขา

CR = พืชไรสลับข้าว

M<sub>3</sub> = เจริงเขา

F = พื้นที่กว้างแปลง

C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง

จากการศึกษาของ Singleton และคณะ (1990) ซึ่งทำการศึกษาปริมาณไรโซเบียมในดิน พบว่าบริเวณที่มีไรโซเบียมสูงในธรรมชาติ คือ บริเวณพื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูกและบริเวณที่มีพืชตระกูลถั่วปกคลุมอยู่ แต่ในพื้นที่ยอดเขาซึ่งเป็นที่สูงพบประชากรไรโซเบียมต่ำ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิต่ำ ปริมาณธาตุอาหารในดินน้อย เนื่องจากการชะล้างพังทลายของดินสูง เป็นต้น

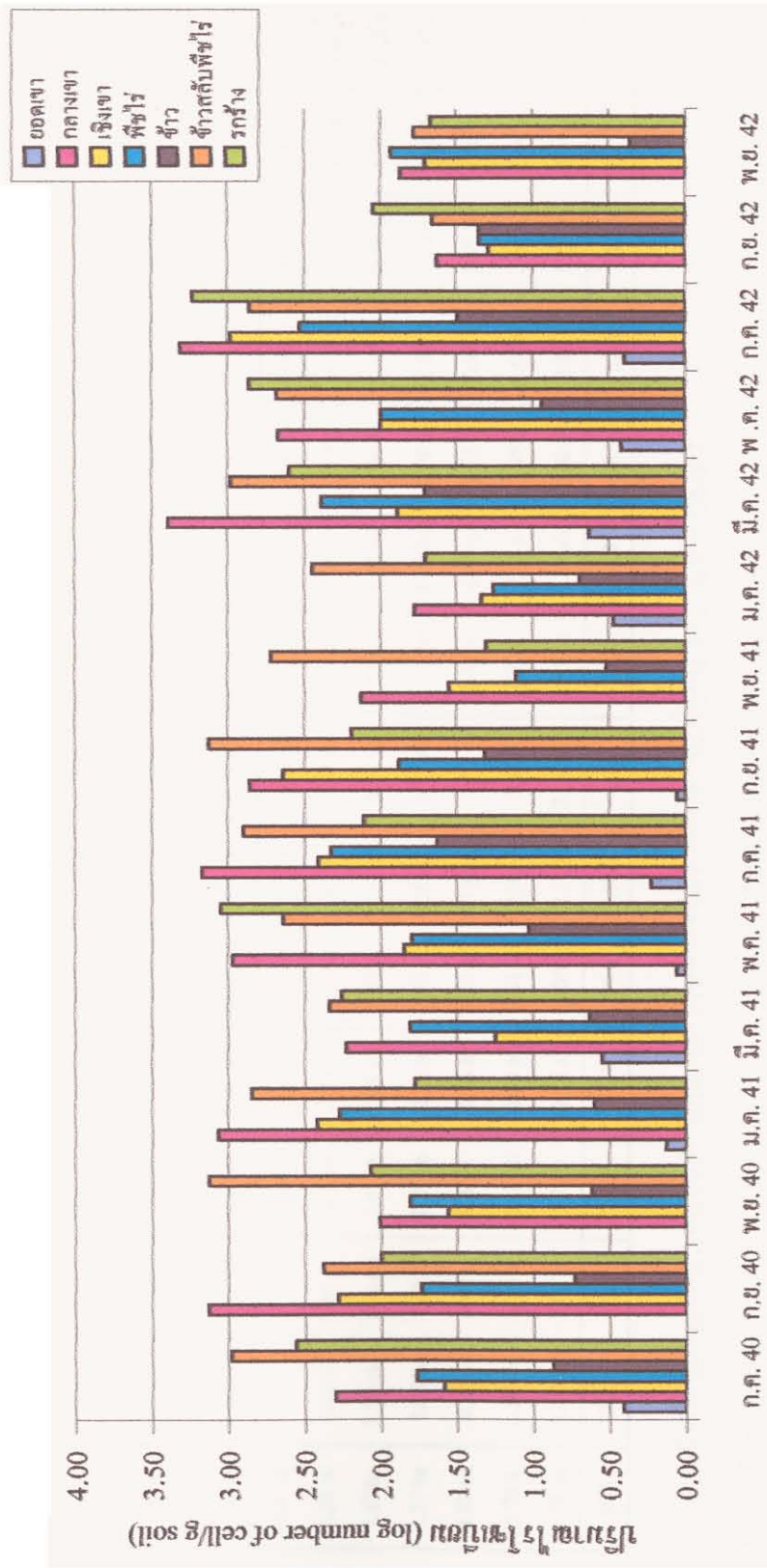
ปัจจัยที่มีผลทำให้ประชากรของไรโซเบียมแตกต่างกันในพื้นที่ต่าง ๆ กัน นั้น เมื่อมีการนำเอาสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เข้ามาพิจารณา เช่น อุณหภูมิดิน อุณหภูมิอากาศ ความชื้นในดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน pH ของดิน ปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ในดิน ความสูงของพื้นที่ (จากตาราง ผ.1.1) จะเห็นได้ว่า การเปลี่ยนแปลงประชากรมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทางบวกกับความชื้นของดินโดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวและพื้นที่กรังว่างเปล่า แต่อิทธิพลของ pH ดินมีความสัมพันธ์กับประชากรของไรโซเบียมในทางลบ พื้นที่ภูเขา พบว่าค่า EC ของดินมีความสัมพันธ์กับประชากรไรโซเบียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าอุณหภูมิดินและอุณหภูมิของอากาศในพื้นที่ยอดเขามีความสำคัญต่อประชากรไรโซเบียมด้วย เช่นกัน ส่วนปัจจัยอื่น ๆ นอกจากนี้มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของประชากรในแต่ละพื้นที่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัจจัยเหล่านั้น เช่น ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน มีอยู่ในระดับที่พอเหมาะตามความต้องการของไรโซเบียมอยู่แล้ว

#### 1.1.2 ภาคเหนือ

ในพื้นที่ต่าง ๆ ของภาคเหนือ ทำการนับประชากรไรโซเบียมเช่นเดียวกับภาคกลาง จากตารางที่ 1.2 และรูปที่ 1.2 พบว่าบริเวณพื้นที่กลางเขา และเชิงเขามีปริมาณประชากรไรโซเบียมสูงกว่าพื้นที่ยอดเขาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถคำนวณปริมาณไรโซเบียมได้ 1.63 ถึง 3.39 log number of cell/g dry soil (เท่ากับ 43 – 2,455 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) และ 1.25 ถึง 2.98 log number of cell/g dry soil (เท่ากับ 18 – 955 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พบเพียง 0 – 4 เซลล์บนยอดเขา (เท่ากับ 0 – 0.63 log number of cell/g dry soil) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพื้นที่ยอดเขาอินทนนท์ในจังหวัดเชียงใหม่ ค่อนข้างสูงชัน ความชื้นในดินสูงมาก มีการทับถมของอินทรีย์วัตถุมาก หน้าดินน้อย ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไรโซเบียม ส่วนพื้นที่กลางเขาบางส่วนเป็นพื้นที่ทำการเกษตร มีการปลูกพืชเป็นระบบ ปลูกพืชคลุมดิน มีการอนุรักษ์ดินและน้ำ จึงสามารถรักษาประชากรจุลินทรีย์ในดินไว้ได้ค่อนข้างสูง และสม่ำเสมอ

ในพื้นที่ทำการเกษตรของภาคเหนือ ปริมาณประชากรไรโซเบียมในพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื้อเพียง 0.36 – 1.71 log number of cell/g dry soil (3 – 51 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ในขณะที่พื้นที่ปลูกพืชไร่และพื้นที่สลับข้าวมีประชากร 1.11 – 2.53 log number of cell/g dry soil (13 – 339 เซลล์)





รูปที่ 1.2 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 1.2 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคเหนือ (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1**	ครั้งที่ 2**	ครั้งที่ 3**	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8**	ครั้งที่ 9**	ครั้งที่ 10**	ครั้งที่ 11**	ครั้งที่ 12**	ครั้งที่ 13**	ครั้งที่ 14**	ครั้งที่ 15**	เฉลี่ย
	ก.ค. 40	ก.ย. 40	พ.ย. 40	ม.ค. 41	มี.ค. 41	พ.ค. 41	ก.ค. 41	ก.ย. 41	พ.ย. 41	ม.ค. 42	มี.ค. 42	พ.ค. 42	ก.ค. 42	ก.ย. 42	พ.ย. 42	
M <sub>1</sub>	0.41 d	0	0	0.13 c	0.55 b	0.06 d	0.23 d	0.06 d	0	0.47 c	0.63 c	0.42 c	0.4 c	0 b	0	0.22
M <sub>2</sub>	2.30 ab	3.13 a	2.01 b	3.07 a	2.23 a	2.97 a	3.17 a	2.86 ab	2.13 ab	1.78 ab	3.39 a	2.67 a	3.31 a	1.63 a	1.87 a	2.57
M <sub>3</sub>	1.59 bc	2.28 ab	1.56 bc	2.42 ab	1.25 ab	1.85 bc	2.41 abc	2.64 ab	1.55 abc	1.34 bc	1.89 b	2.00 b	2.98 a	1.29 a	1.71 a	1.92
C	1.77 bc	1.74 b	1.81 b	2.27 ab	1.81 a	1.80 bc	2.33 abc	1.88 bc	1.11 bc	1.26 bc	2.39 ab	2.00 b	2.53 a	1.35 a	1.93 a	1.87
R	0.87 cd	0.73 c	0.62 c	0.60 c	0.63 b	1.03 cd	1.63 c	1.32 c	0.52 c	0.69 c	1.71 b	0.94 c	1.49 b	1.35 a	0.36 b	0.97
CR	2.98 a	2.38 ab	3.13 a	2.85 ab	2.34 a	2.64 ab	2.90 ab	3.13 a	2.72 a	2.45 a	2.98 a	2.68 ab	2.86 a	1.66 a	1.78 a	2.62
F	2.56 ab	2.00 b	2.07 b	1.78 b	2.26 a	3.05 a	2.11 bc	2.19 abc	1.31 bc	1.71 ab	2.60 ab	2.86 a	3.23 a	2.05 a	1.67 a	2.23
CV (%)	34.8	28.5	35.7	38.1	45.1	34.6	30.7	32.4	51.8	43.9	28.7	22.8	24.8	51.2	35.4	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT

\* Significantly different at p = 0.05

\*\* Significantly different at p = 0.01

M<sub>1</sub> = ยอดเขา

M<sub>2</sub> = กลางเขา

M<sub>3</sub> = เียงเขา

C = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง

R = ข้าวอย่างต่อเนื่อง

CR = พืชไร่สลับข้าว

F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า

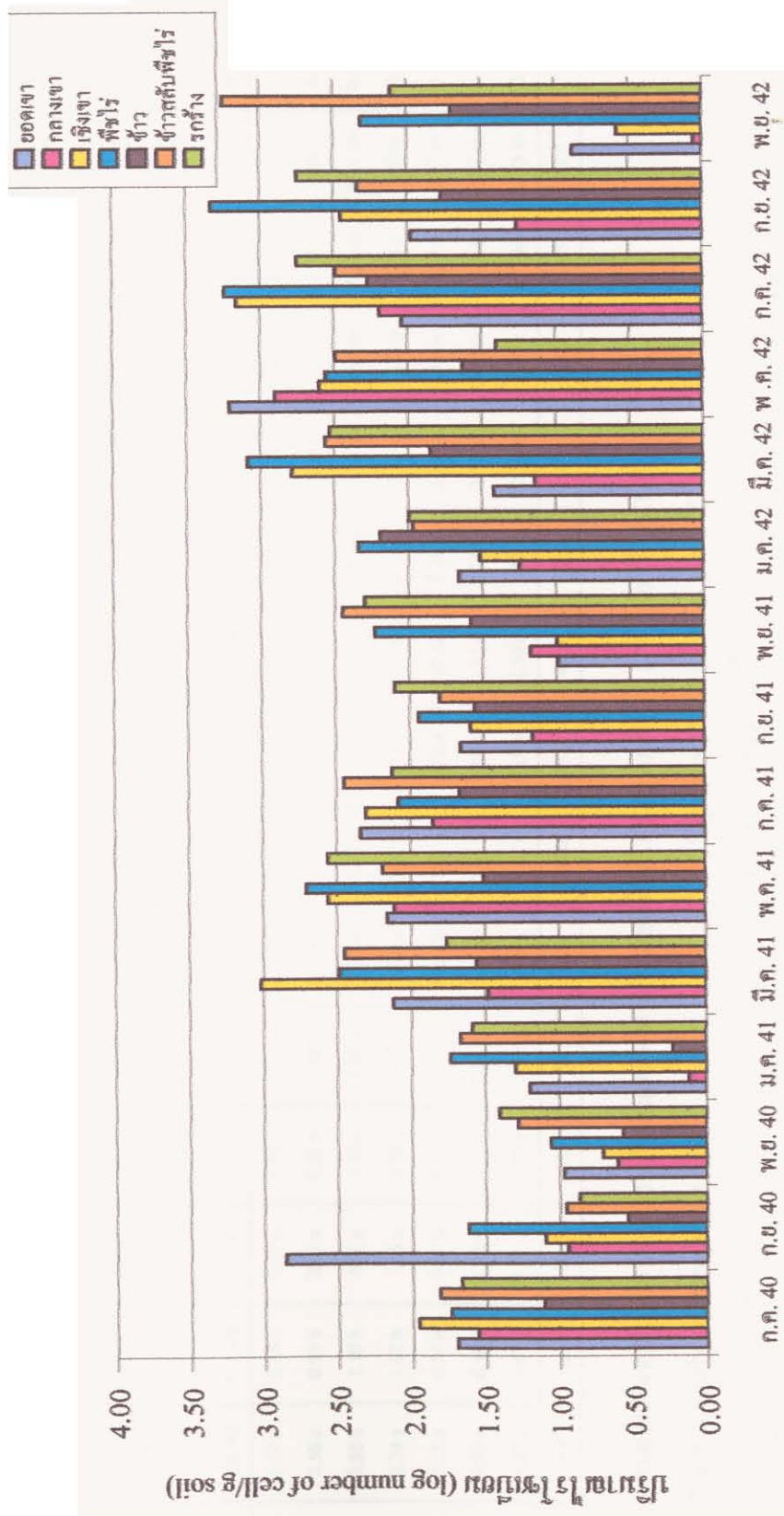
และ 1.66 – 3.13 log number of cell/g dry soil (46 – 1349 เซลล์) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงพืชที่ปลูกในพื้นที่เหล่านั้น พบว่าพืชไร่ที่ปลูกส่วนใหญ่เป็น ถั่วเหลือง จึงสนับสนุนการทดลองของ Singleton และคณะ (1990) ที่ว่าพืชตระกูลถั่วสามารถรักษาสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ไรโซเบียมในดินไว้ได้

ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับประชากรในแต่ละพื้นที่ของภาคเหนือ (ภาคผนวกตารางที่ ผ.1.2) ได้แก่ระดับความสูง ความชื้นของดิน จะเห็นว่าในพื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่องและพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่องที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างนั้นมีความสูงของพื้นที่แตกต่างกันมาก ๆ มีผลทำให้ประชากรไรโซเบียมแตกต่างกันด้วยเช่นกัน โดยในพื้นที่สูงจะมีประชากรไรโซเบียมน้อยกว่าในพื้นที่ราบ นอกจากนั้นความชื้นในดินก็มีผลต่อประชากรไรโซเบียมเช่นเดียวกับในภาคกลางส่วนค่าอื่น ๆ นั้นอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จึงไม่แสดงผลต่อประชากรแต่อย่างไร

### 1.1.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากการนับประชากรไรโซเบียมในดินพื้นที่ต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตารางที่ 1.3 และรูปที่ 1.3 พบว่า ค่าเฉลี่ยประชากรพื้นที่ยอดเขาและเชิงเขามีปริมาณสูงกว่าพื้นที่กลางเขาโดยที่ยอดเขาพบไรโซเบียมค่อนข้างสูงตั้งแต่ 0.88 ถึง 3.21 log number of cell/g dry soil (8 – 1622 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ที่เชิงเขามี 0.58 ถึง 3.16 log number of cell/g dry soil (4 – 1445 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ในขณะที่กลางเขามี 0.06 ถึง 2.90 log number of cell/g dry soil (1 – 794 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากยอดเขาหรือเป็นภูเขาหินทรายซึ่งเป็นลักษณะที่ราบถูกยกตัวขึ้นสูง (plateau) ประกอบกับพบพืชตระกูลถั่วบางชนิดขึ้นอยู่บางแห่งจึงมีพื้นที่และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้จุลินทรีย์อยู่ได้ เช่นเดียวกับพืชพรรณอื่น ๆ ส่วนพื้นที่กลางเขามีความลาดเทสูง มีการชะล้างพังทลายสูง จึงมีเนื้อดินธาตุอาหารน้อยปริมาณจุลินทรีย์ในดินก็น้อยลงไปด้วยเช่นกัน ส่วนในพื้นที่เชิงเขาเป็นพื้นที่ราบกว่ามีดินและแร่ธาตุอาหารเหมาะสมกว่า จึงมีจุลินทรีย์อยู่ได้สูงกว่า

ในพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว และพื้นที่รกร้างว่างเปล่า มีปริมาณไรโซเบียมสูงกว่าพื้นที่ปลูกข้าวอย่างเดียว หรือพื้นที่ปลูกพืชไร่อย่างเดียว ซึ่งจากตารางที่ 1.3 ภาพที่ 1.3 พบว่า พื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวมีประชากร 0.96 – 3.25 log number of cell/g dry soil (46 – 1,349 เซลล์) และพื้นที่รกร้างว่างเปล่ามีประชากร 0.87 – 2.75 log number of cell/g dry soil (20 – 698 เซลล์) และปริมาณที่พบค่อนข้างสูงสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาที่สุ่มเก็บตัวอย่างดินภายในเวลา 2 ปีครึ่ง (15 ครั้ง) ซึ่งจากตารางภาคผนวกที่ ผ.1.3 ซึ่งแสดงถึงพืชที่ปลูกและลักษณะพืชที่คลุมดินตลอดเวลาในที่รกร้างว่างเปล่า แสดงให้เห็นว่า มีการปลูกพืชตระกูลถั่วสลับกับข้าว ทำให้ยังคงรักษาความสม่ำเสมอของประชากรไรโซเบียมในดินไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะแตกต่างกับการใช้ที่ดินเพื่อปลูกข้าวเพียงอย่างเดียว และปลูกพืชไร่ชนิดอื่นเพียงอย่างเดียวอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 1.3 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 1.3 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (log number of cell) ครั้งที่ 1-15 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1**	ครั้งที่ 2**	ครั้งที่ 3**	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8**	ครั้งที่ 9**	ครั้งที่ 10**	ครั้งที่ 11**	ครั้งที่ 12**	ครั้งที่ 13**	ครั้งที่ 14**	ครั้งที่ 15**	เฉลี่ย
M <sub>1</sub>	ก.ค. 40	ก.ย. 40	พ.ย. 40	ม.ค. 41	มี.ค. 41	พ.ค. 41	ก.ค. 41	ก.ย. 41	พ.ย. 41	ม.ค. 42	มี.ค. 42	พ.ค. 42	ก.ค. 42	ก.ย. 42	พ.ย. 42	1.81
M <sub>2</sub>	1.70 a	2.86 a	0.97 a	1.20 a	2.12 ab	2.16 ab	2.34 a	1.66 a	0.99 c	1.66 ab	1.42 c	3.21 a	2.04 c	1.98 bc	0.88 c	1.32
M <sub>3</sub>	1.56 a	0.95 b	0.61 a	0.12 b	1.48 b	2.11 ab	1.85 a	1.17 a	1.18 bc	1.25 b	1.14 c	2.90 a	2.19 c	1.26 c	0.06 d	1.91
C	1.96 a	1.10 b	0.71 a	1.30 a	3.02 a	2.56 a	2.30 a	1.59 a	1.00 c	1.52 ab	2.79 ab	2.60 ab	3.16 ab	2.45 abc	0.58 cd	2.3
R	1.74 a	1.62 b	1.06 a	1.74 a	2.49 ab	2.71 a	2.08 a	1.94 a	2.23 ab	2.34 a	3.09 a	2.56 ab	3.24 a	3.33 a	2.31 b	1.64
CR	1.11 a	0.54 b	0.57 a	0.23 b	1.56 b	1.51 b	1.67 a	1.56 a	1.58 abc	2.19 a	1.85 bc	1.63 bc	2.27 c	1.77 bc	1.70 b	2.14
F	1.82 a	0.96 b	1.28 a	1.67 a	2.45 ab	2.19 ab	2.45 a	1.80 a	2.45 a	1.97 ab	2.56 ab	2.49 ab	2.49 bc	2.34 abc	3.25 a	1.97
CV (%)	1.67 a	0.87 b	1.41 a	1.59 a	1.76 b	2.56 a	2.12 a	2.10 a	2.30 a	2.00 ab	2.53 ab	1.40 c	2.75 abc	2.75 ab	2.11 b	30.5
	34.6	52.7	58.8	58.5	32.3	22.6	29.0	48.1	41.3	29.7	26.9	25.9	17.5	33.6	30.5	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT

\* Significantly different at p = 0.05

\*\* Significantly different at p = 0.01

M<sub>1</sub> = ยอดเขา

M<sub>2</sub> = กลางเขา

M<sub>3</sub> = เขิงเขา

C = พืชไร่อย่างต่อเมือง

R = ข้าวอย่างต่อเมือง

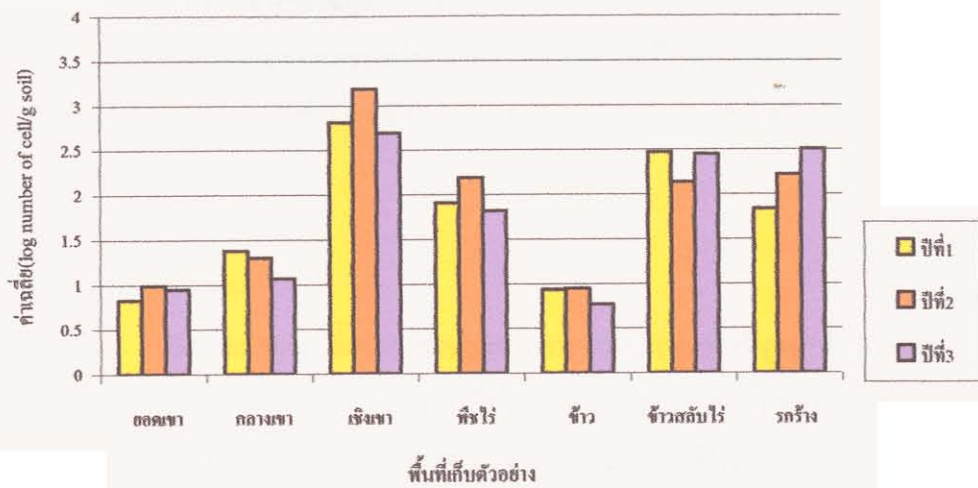
CR = พืชไร่สลับข้าว

F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า

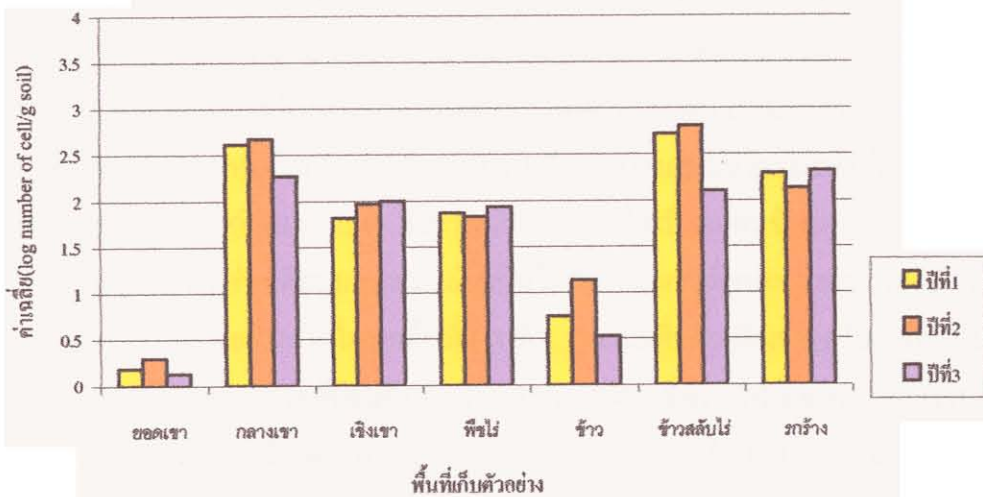
ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรไรโซเบียมในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ความชื้นของดิน ซึ่งจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในพื้นที่เชิงเขา และพื้นที่รกร้างว่างเปล่าพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่อง พบว่าอุณหภูมิของอากาศและอุณหภูมิดินมีผลต่อปริมาณประชากรไรโซเบียมในดิน เนื่องจากพื้นที่ปลูกข้าวเป็นพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาคือช่วงที่มีและไม่มีน้ำขัง เมื่ออุณหภูมิอากาศและดินเปลี่ยนแปลงไปอยู่ตลอดเวลาที่มีผลต่อจำนวนประชากรไรโซเบียมที่อยู่ในดินได้

เมื่อพิจารณาคุณภาพรวมของประชากรไรโซเบียมจากค่าเฉลี่ยในแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษาดู (รูปที่ 1.4-1.6) พบว่าบริเวณระบบนิเวศตามธรรมชาติที่เป็นยอดเขาสูงจะมีจำนวนประชากรของไรโซเบียมน้อยที่สุด ในขณะที่ระบบนิเวศที่มีการเกษตรกรรมพบว่าบริเวณที่ทำการปลูกข้าวแต่เพียงอย่างเดียวมีจำนวนประชากรน้อยที่สุดเช่นกันในทุกภาค ในขณะที่ระบบนิเวศตามธรรมชาติที่เป็นเชิงเขาและพื้นที่รกร้างและระบบนิเวศที่มีการทำการเกษตรที่เป็นการปลูกข้าวสลับกับพืชไร่ เป็นบริเวณที่พบประชากรของไรโซเบียมสูงสุดในทุก ๆ ภาค แม้ว่าจะพบว่าปริมาณธาตุฟอสฟอรัสในดินบริเวณยอดเขาภาคกลางและกลางเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีปริมาณน้อยคืออยู่ในช่วง 1-4 ppm แต่พบว่าไม่ได้มีผลต่อจำนวนประชากรของไรโซเบียม เมื่อเทียบกับปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ ที่กล่าวมาเช่น ความชื้นหรือความสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ O'Hara และคณะ 1988 ที่ได้กล่าวไว้ว่ากลุ่มไรโซเบียมมักจะต้องการฟอสฟอรัสในการเจริญค่อนข้างต่ำ คืออยู่ในช่วง 0.5-0.06 ppm หรือแม้แต่ธาตุโปแตสเซียม แมกนีเซียมและแคลเซียม ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน (Vincent, 1977, Beck และ Mues, 1985)

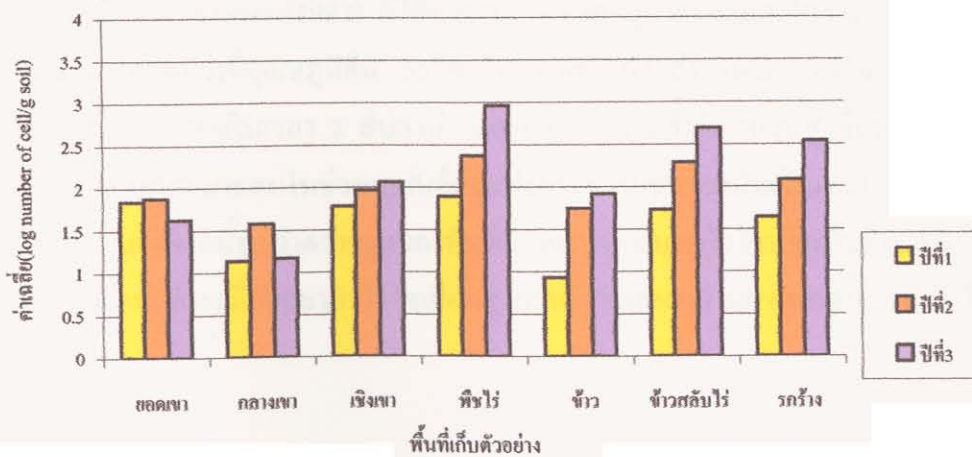
รูปที่ 1.4 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคกลางปีที่ 1-3



รูปที่ 1.5 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคเหนือปีที่ 1-3



รูปที่ 1.6 ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือปีที่ 1-3



## วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อให้ทราบถึงพลวัตประชากรของไรโซเบียมในระบบการปลูกพืชและที่มีอยู่ในระบบธรรมชาติที่ไม่ถูกรบกวน

การเพิ่มขึ้นและลดลงของประชากรไรโซเบียมที่เก็บทุก 2 เดือน ในบริเวณพื้นที่เดียวกัน โดยดูตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 จนถึงครั้งที่ 15 ตลอดระยะเวลา 2 ปีครั้งนั้น แบ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงตามภาคต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

### 2.1 ภาคกลาง

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงประชากรพบว่าบริเวณพื้นที่ภูเขาทั้ง 3 ระดับ คือ ยอดเขา กลางเขา และเชิงเขา และพื้นที่รกร้างว่างเปล่ามีประชากรเปลี่ยนแปลงขึ้นลงไปในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2540 มีประชากรของไรโซเบียมอยู่ในระดับ 3.45, 2.08, 1.32 และ 2.56 log number of cell/g dry soil ของพื้นที่ยอดเขา กลางเขา เชิงเขา และพื้นที่รกร้างว่างเปล่าตามลำดับ และช่วงนี้เป็นฤดูฝนของประเทศไทย ปริมาณประชากรจะลดลงจนถึงเดือนมกราคม 2541 จะมีประชากรไรโซเบียมต่ำสุด คือ 1.488, 0.430 และ 1.33 log number of cell/g dry soil ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว มีความแห้งแล้งสูง หลังจากนั้นจะพบประชากรเพิ่มสูงขึ้นในเดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤษภาคม 2541 อยู่ในช่วงฤดูร้อน ซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดของไรโซเบียม เมื่อถึงฤดูฝนเดือนกรกฎาคม ถึงพฤศจิกายน 2541 จำนวนประชากรไรโซเบียมค่อนข้างแปรปรวนขึ้น ๆ ลง ๆ แต่ยังคงมีประชากรสูงกว่าในช่วงเดือนมกราคมอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเข้าเดือนมกราคม 2542 ซึ่งเป็นฤดูหนาว จำนวนประชากรลดลงอย่างมากในทุกพื้นที่ (รูปที่ 1.1) และเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าฤดูร้อนเดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤษภาคม 2542 และรักษาระดับจนถึงเดือนกันยายน 2542 จึงเริ่มมีประชากร ลดลงในฤดูหนาวเดือนพฤศจิกายน 2542 อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจากการสังเกตพบว่าประชากรไรโซเบียมในดินมีความสัมพันธ์กับฤดูกาล ความชื้นของดินอุณหภูมิดิน ระดับความสูงของพื้นที่เป็นอย่างมาก จากรูปที่ 1.1 พบว่า ประชากรจะลดลงในช่วงฤดูหนาวมีความแห้งแล้งสูง ความชื้นในดินต่ำ (ตารางภาคผนวก) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Boonkerd and Weaver (1982) ที่ได้ทำการศึกษาเชื้อกลุ่มไรโซเบียมที่สร้างปมในพืช กลุ่มถั่วลิสงและ cowpeas โดยพบว่าที่อุณหภูมิดิน 35°C ในสภาพที่แห้งแล้งสามารถลดจำนวนประชากรของไรโซเบียมได้ถึง 2.5 log ภายในเวลา 2 สัปดาห์ และประชากรจะเริ่มมีจำนวนสูงขึ้นเมื่อเข้าฤดูร้อน มีสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิเหมาะสมในช่วงฤดูฝนก็ผันแปรตามความชื้นของดินเป็นเช่นนี้ตลอด 2 ปีกว่าที่ทำการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้พบว่าความสูงของพื้นที่มีผลทำให้ปริมาณไรโซเบียมในดินแตกต่างกัน ที่เชิงเขาและที่รกร้างว่างเปล่าจะมีประชากรไรโซเบียมสูงกว่าพื้นที่กลางเขา และยอดเขาอย่างเห็นได้ชัดเจน



ในพื้นที่ที่ทำการเกษตร คือพื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง ปลูกข้าวต่อเนื่อง และปลูกพืชไร่สลับข้าวก็เช่นเดียวกันที่มีประชากรไรโซเบียมลดลงเมื่อเริ่มเข้าฤดูหนาวในเดือนพฤศจิกายน และเดือนมกราคม 2541 ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่องที่มีปริมาณไรโซเบียมลดต่ำลงมาก แต่ในพื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง และพืชไร่สลับข้าว นั้น ประชากรไรโซเบียมลดลงไม่มากนัก เพราะในพื้นที่พืชไร่ที่ปลูกในภาคกลางเป็นพืชตระกูลถั่วเป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ ก.2) ซึ่งพืชตระกูลถั่วสามารถที่จะทำให้ประชากรไรโซเบียมคงอยู่ในดินได้ตลอดเวลาเป็นการรักษาสมดุลย์ของประชากรไรโซเบียมในระบบนิเวศได้ดียิ่ง (Singleton และคณะ, 1990)

## 2.2 ภาคเหนือ

การเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมตลอดระยะเวลาที่เก็บในแต่ละพื้นที่ภาคเหนือ จะเห็นได้ในพื้นที่ยอดเขาสูงทางภาคเหนือมีประชากรไรโซเบียมต่ำมากเนื่องจากบนยอดเขามีเนื้อดินน้อยมาก ส่วนใหญ่เป็นซากพืชที่ทับถมผุพังกลายเป็นอินทรีย์วัตถุที่มีปริมาณค่อนข้างสูงไม่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ดินและประชากรไรโซเบียมจะอยู่ในระดับต่ำเช่นนี้ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างดิน ประชากรไรโซเบียมจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนมีนาคมของทุกปี เนื่องจากอุณหภูมิดินเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไรโซเบียม พื้นที่ที่ทำการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องก็เช่นเดียวกันที่มีประชากรไรโซเบียมค่อนข้างต่ำ และเพิ่มจำนวนประชากรเพียงเล็กน้อยเมื่อเข้าฤดูร้อนของทั้ง 2 ปี (มีนาคม – พฤษภาคม) เนื่องจากสภาพแวดล้อมในดินนาน้ำขังไม่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของไรโซเบียม

พื้นที่กลางเขา เขิงเขาซึ่งเป็นพื้นที่ทำการเกษตรของภาคเหนือ และพื้นที่ราบที่ทำการเกษตร คือ พื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง และปลูกพืชไร่สลับข้าว ตลอดจนถึงที่รกร้างว่างเปล่าที่มีพืชปกคลุมพื้นดินตลอดเวลา พบว่า ปริมาณประชากรไรโซเบียมมีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ จะมีประชากรลดลงในฤดูหนาว อากาศแห้งแล้ง อุณหภูมิต่ำทั้งอุณหภูมิดินและอุณหภูมิอากาศ และจำนวนประชากรจะเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าฤดูร้อนและฤดูฝน (มีนาคม – กันยายน) ประชากรจะลดลงเมื่อเข้าฤดูหนาวของปีถัดไปในเดือนพฤศจิกายน (ครั้งที่ 9) และเพิ่มขึ้นเมื่อถึง ฤดูร้อนและฤดูฝน (ครั้งที่ 10 – ครั้งที่ 13) เมื่อเก็บไปถึงครั้งที่ 14 ก็เริ่มลดลงอีกเช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่กลางเขาและพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวมีประชากรไรโซเบียมสูงสุด เนื่องจากบริเวณกลางเขาพบพืชตระกูลถั่วคลุมดิน และพืชไร่ที่ปลูกมากทางภาคเหนือ คือ ถั่วเหลือง จึงสามารถเกื้อหนุนให้จำนวนประชากรไรโซเบียมไว้ได้สูงสุด

### 2.3 ภาวะตะวันออกเฉียงเหนือ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรไรโซเบียมตลอดระยะเวลาที่เก็บ 15 ครั้ง ทุก 2 เดือน ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า ทุกพื้นที่ตั้งแต่พื้นที่ภูเขา 3 ระดับ พื้นที่รกร้างว่างเปล่า และพื้นที่ทำการเกษตรคือพื้นที่ ปลูกข้าวต่อเนื่อง ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง และปลูกพืชไร่สลับข้าว มีประชากรไรโซเบียมลดลงเมื่อผ่านพ้นจากฤดูฝนเป็นฤดูหนาว (ครั้งที่ 1 – ครั้งที่ 3) ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2540 และจะเพิ่มปริมาณประชากรสูงขึ้นเมื่อเข้าฤดูร้อนเดือนมีนาคม 2541 (ครั้งที่ 5) และจะรักษาระดับประชากรได้ต่อเนื่องตลอดฤดูฝนในทุกพื้นที่ ในช่วงฤดูหนาวเดือนมกราคม 2542 (ครั้งที่ 9) อัตราจำนวนประชากรลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มากนักเพราะเป็นฤดูปลูกพืชของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 11 เดือนมีนาคม จำนวนประชากรไรโซเบียมขึ้นสูงสุดยกเว้นบริเวณปลูกข้าว ต่อเนื่องและที่รกร้างว่างเปล่า หลังจากนั้นในเดือนพฤศจิกายน 2542 ประชากรในทุกพื้นที่ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ยกเว้นบริเวณพื้นที่ที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวที่ใช้พืชตระกูลถั่วเป็นพืชไร่ (ตารางที่ ก.3) ยังคงสามารถรักษาระดับประชากรไรโซเบียมในดินไว้ได้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Boonkerd และคณะ (1993) ที่พบว่าบริเวณที่มีการปลูกถั่วลิสงอย่างต่อเนื่องจะทำให้รักษาจำนวนประชากรโดยเฉลี่ยไว้ได้ถึง  $1.6 \times 10^3$  เซลล์ต่อกรัมดิน แต่ในขณะที่เดียวกันบริเวณที่มีการปลูกพืชไร่เช่น อ้อย มันลำปะหลัง ข้าวโพดและสับปะรด มักจะไม่พบหรือพบไรโซเบียมที่สร้างปมในถั่วลิสงได้เพียง 28-46 เซลล์ต่อกรัมดินเท่านั้น

จะเห็นได้ว่าประชากรไรโซเบียมของแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากมีปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่เข้ามาเกี่ยวข้อง คือความชื้นในดิน อุณหภูมิในดิน อุณหภูมิอากาศ ความสูงของพื้นที่ ส่วนปริมาณธาตุอาหารนั้นอยู่ในภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงไม่แสดงความสัมพันธ์ทางสถิติแต่อย่างใด

### วัตถุประสงค์ที่ 3 เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางระบบนิเวศว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ประชากรไรโซเบียมมากน้อยเพียงใด

#### 3.1 ภาคกลาง

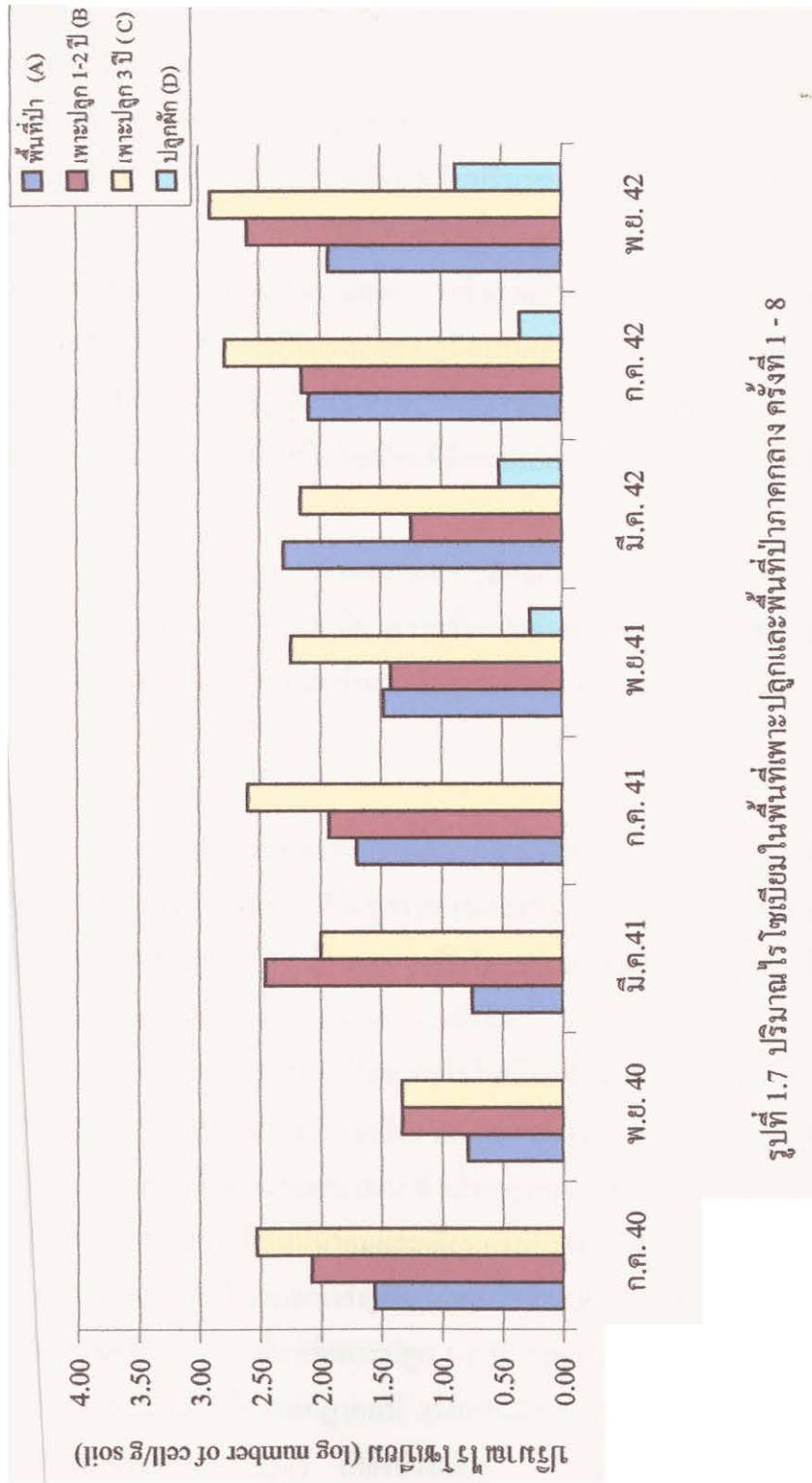
จากการนับจำนวนประชากรไรโซเบียมในดินพื้นที่ต่าง ๆ ตั้งแต่พื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1 – 2 ปี พื้นที่เพาะปลูก 3 ปีขึ้นไป และพื้นที่ปลูกผักของภาคกลาง จากตารางที่ 1.4 และรูปที่ 1.7 โดยเฉลี่ยพบว่าบริเวณพื้นที่ป่าที่ไม่ถูกรบกวน มีจำนวนประชากรไรโซเบียม โดยเฉลี่ยน้อยกว่าพื้นที่ที่เปิดป่าเพื่อทำการเกษตรและน้อยกว่าพื้นที่ทำการเกษตรมานาน การปลูกพืชเป็นระบบเช่นปลูกพืชไร่ สลับข้าวก็จะมีปริมาณไรโซเบียมในดินสูงกว่าพื้นที่เหล่านี้ ในส่วนของพื้นที่ปลูกผักในภาคกลางจะพบประชากรไรโซเบียมน้อยมาก เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการใส่ปุ๋ยและสารเคมีในการกำจัดโรคแมลงต่อเนื่องกันตลอดเวลา ทำให้จุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ในดินลดปริมาณลงอย่างมาก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Rucey และคณะ 1988 ที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการใช้ยากำจัดวัชพืช sethoxydim, alachlor, fluazifopbutyl, metolachor และ paraquat ซึ่งพบว่า sethoxydim และ paraquat ส่งผลกระทบต่อหัวเชื้อไรโซเบียมส่งผลให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่ำลงอีกด้วย

ตารางที่ 1.4 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคกลางที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3*	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7*	ครั้งที่ 8**	ค่าเฉลี่ย
1. พื้นที่ป่า (A)	ก.ค. 40	พ.ย.40	มี.ค. 41	ก.ค. 41	พ.ย. 40	มี.ค. 42	ก.ค. 42	พ.ย. 42	
2. พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	1.56 b	0.79 b	0.75 a	1.70 b	1.48 b	2.3 a	2.09 a	1.93 b	1.83
3. พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C)	2.08 a	1.33 a	2.46 a	1.93 b	1.42 b	1.25 b	2.15 a	2.60 a	2.09
4. พื้นที่ปลูกผัก (D)	2.53 a	1.33 a	2.00 a	2.60 a	2.24 a	2.16 a	2.78 a	2.90 a	2.07
	0	0	0	0	0.27 c	0.52 b	0.35 a	0.88 c	0.21
CV.(%)	11.7	22.6	25.4	27.4	28.3	25.3	21.0	12.1	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT

\* - - -  
\*\* - - -



รูปที่ 1.7 ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่าภาคกลาง ครั้งที่ 1 - 8

สำหรับการเปลี่ยนแปลงประชากรในแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษาในแต่ละฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างดิน เมื่อหมดฤดูฝนเข้าฤดูหนาว (กรกฎาคม – พฤศจิกายน) ของทั้ง 2 ปี คือปี 2540 และปี 2541 ครั้งที่ 1-2 และครั้งที่ 7-8) ปริมาณไรโซเบียมในดินลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นฤดูหนาวมีความแห้งแล้งและอุณหภูมิดินและอุณหภูมิกอากาศต่ำลง ประชากรจึงลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าฤดูร้อน (มีนาคม) ของทั้ง 2 ปี ประชากรไรโซเบียมก็เพิ่มปริมาณสูงขึ้น และจะคงรักษาระดับเช่นนั้นไว้ในฤดูฝน (กรกฎาคม, ครั้งที่ 4 และ 7) และระดับปริมาณจะเริ่มลดลงเมื่อเข้าฤดูหนาวในปีถัดไป ปฏิกิริยาการเช่นนี้เป็นเช่นเดียวกับพื้นที่ที่ทำการเกษตรเนื่องจากว่าสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของไรโซเบียมคือ ความชื้นของดิน อุณหภูมิดินและอุณหภูมิกอากาศค่อนข้างเหมาะสมในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเดือนกันยายนของทุกปี ส่วนพื้นที่ปลูกผักที่มีประชากรไรโซเบียมเพิ่มขึ้นในปีที่ 2 เนื่องจากมีการปลูกผักที่เป็นพืชตระกูลถั่ว คือ ถั่วฝักยาว ทำให้ไรโซเบียมที่ยังคงเหลืออยู่ในดิน เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นได้ (ตารางที่ ก.2)

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมภาคกลางจะเห็นได้ชัดเจนมาก (ตารางภาคผนวกที่ ผ.1.4) คือ ความชื้นของดินซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอุณหภูมิดิน อุณหภูมิกอากาศ และปริมาณธาตุอาหาร ไม่มีผลทางสถิติต่อประชากรไรโซเบียมในดิน

### 3.2 ภาคเหนือ

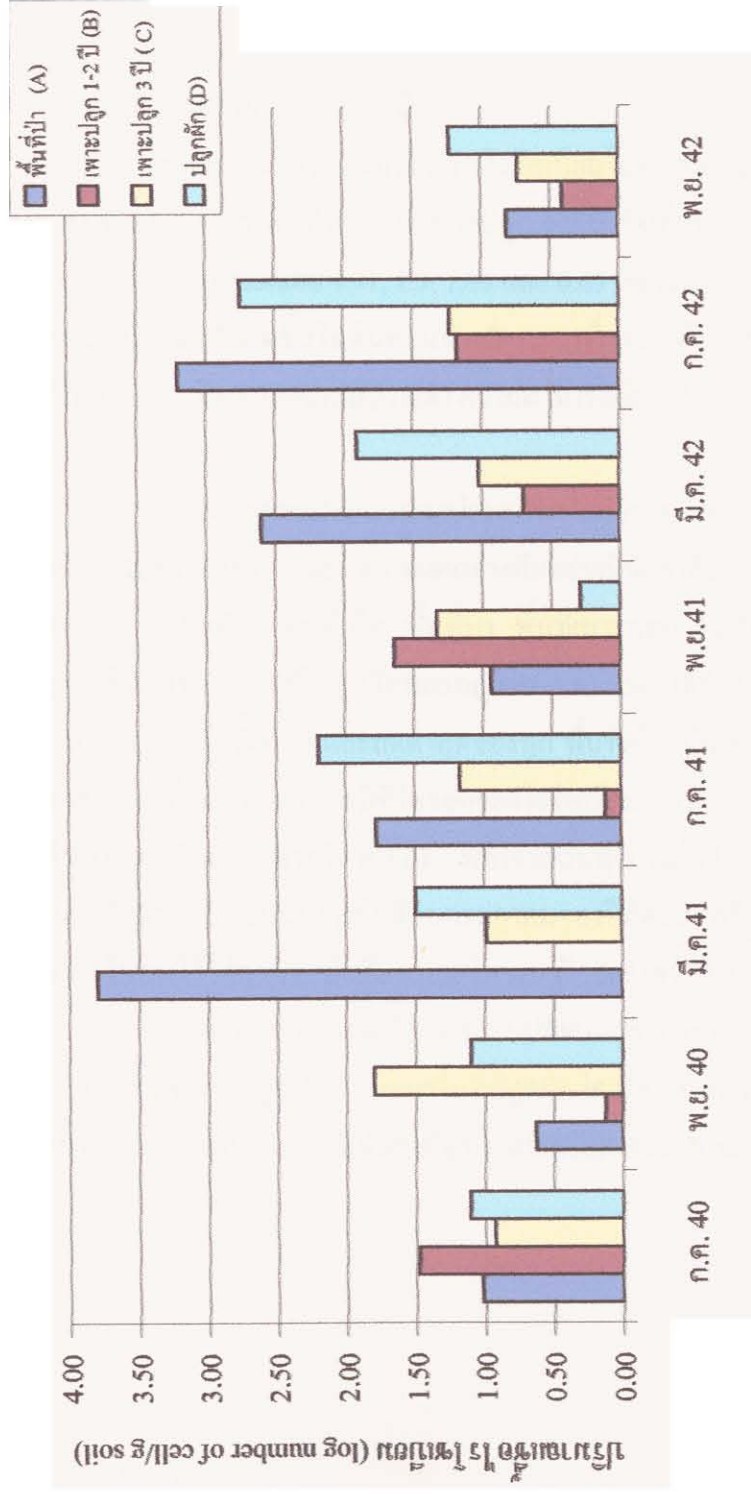
ในบริเวณภาคเหนือ จากการศึกษาจำนวนประชากรของไรโซเบียมในดิน ตารางที่ 1.5 และรูปที่ 1.8 พบว่าในพื้นที่ป่าที่ไม่ถูกรบกวนและพื้นที่ปลูกผักอย่างต่อเนื่อง มีประชากรไรโซเบียมสูงกว่าพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูก 1-2 ปี และ 3 ปี โดยพบประชากรไรโซเบียมเฉลี่ยประมาณ 1.85, 1.51, 0.71 และ 1.15 log number of cell/g dry soil ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมทั้ง 4 พื้นที่ พบว่าในพื้นที่ป่าและพื้นที่ปลูกผัก มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรไรโซเบียมในดินเช่นเดียวกับภาคกลาง กล่าวคือ ปริมาณจะลดต่ำลงหลังจากเดือนกรกฎาคมเข้าเดือนพฤศจิกายน ซึ่งเป็นฤดูหนาว (ครั้งที่ 2 ครั้งที่ 5 และครั้งที่ 8) หลังจากนั้นประชากรจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในเดือนมีนาคมและเดือนกรกฎาคม เมื่อเข้าช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตและเจริญเติบโตของไรโซเบียม ประกอบกับมีการเพาะปลูกพืชคลุมดินอยู่ตลอดเวลาในฤดูนี้ ส่วนใน พื้นที่ที่เพาะปลูก 1-2 ปี และพื้นที่เพาะปลูก 3 ปี นั้น มีการเปลี่ยนแปลงประชากรที่ลดต่ำลงเมื่อพ้นเดือนกรกฎาคมปี 2540 จนถึงกรกฎาคมปี 2541 แต่ไม่เพิ่มจำนวนประชากรไรโซเบียมในเดือนพฤศจิกายน 2541 เพียงช่วงเดียว และเมื่อเข้าเดือนมีนาคมก็จะลดจำนวนลงจนถึงพฤศจิกายน 2542 ทั้งนี้ เนื่องจากระบบปลูกพืชของภาคเหนือไม่ตรงกับภาคกลาง จึงทำให้ปริมาณไรโซเบียมในดินมีการผันแปรไปได้ เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความชื้นของดิน

ตารางที่ 1.5 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคเหนือที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2**	ครั้งที่ 3**	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7*	ครั้งที่ 8	ค่าเฉลี่ย
1. พื้นที่ป่า (A)	ก.ค. 40	พ.ย. 40	มี.ค. 41	ก.ค. 41	พ.ย. 41	มี.ค. 42	ก.ค. 42	พ.ย. 42	
2. พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	1.02 a	0.63 b	3.80 a	1.78 ab	0.94 b	2.60 a	3.2 a	0.81 a	1.85
3. พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C)	1.48 a	0.13 c	0	0.12 c	1.64 a	0.70 c	1.18 b	0.41 a	0.71
4. พื้นที่ปลูกผัก (D)	0.93 a	1.80 a	0.98 b	1.17 b	1.33 b	1.02 bc	1.23 b	0.73 a	1.15
CV.(%)	1.11 a	1.1 b	1.50 b	2.20 a	0.29 b	1.91 ab	2.75 a	1.23 a	1.51
	52.3	30.4	24.8	28.6	36.3	33.4	36.5	74.6	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT



รูปที่ 1.8 ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่พาะปลูกและพื้นที่ป่า ภาคเหนือ ครั้งที่ 1-8



อุณหภูมิดิน และอุณหภูมิอากาศ ต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมในดิน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด (ตาราง ผ. 1.5 ในภาคผนวก)

### 3.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากการนับจำนวนประชากรไรโซเบียมในดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แสดงดังตารางที่ 1.6 รูปที่ 1.9 พบว่าพื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี และ พื้นที่ปลูกผักต่อเนื่องมีประชากรไรโซเบียมโดยเฉลี่ย 1.71, 1.7, 2.08 และ 0.65 log number of cell/g dry soil ซึ่งพื้นที่ปลูกผักมีน้อยที่สุดอาจเนื่องจากความชื้นในดินค่อนข้างต่ำ เนื่องจากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเนื้อดินค่อนข้างเป็นดินทราย มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ความสามารถอุ้มน้ำในดินต่ำ ทำให้มีจุลินทรีย์ในดินน้อยกว่าภาคอื่น ๆ ด้วย

เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงประชากรนับแต่ละครั้งที่เก็บเองแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูปที่ 1.10 จะเห็นได้ว่า ประชากรไรโซเบียมทั้ง 4 พื้นที่ คือ พื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี พื้นที่เพาะปลูกมากกว่า 3 ปี และพื้นที่ปลูกผักที่มีปริมาณค่อนข้างสูงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2540 (ครั้งที่ 1) ลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540 (ครั้งที่ 2) และลดต่ำสุดของทุก พื้นที่เดือนมีนาคม ปี 2541 (ครั้งที่ 3) ทั้งนี้อาจเป็นสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของไรโซเบียม เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิที่สูงมาก ความชื้นในดินต่ำ (ตารางภาคผนวกที่ ผ.1.6) หลังจากนั้นปริมาณไรโซเบียมเพิ่มขึ้นในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 และรักษาระดับเช่นนั้นจนถึงเดือนกรกฎาคมของปีถัดไป (ครั้งที่ 4 – ครั้งที่ 7) และมีแนวโน้มคงประชากรในดินไว้ได้คงที่จนถึงเดือนพฤศจิกายน ปี 2542 (ครั้งที่ 8)

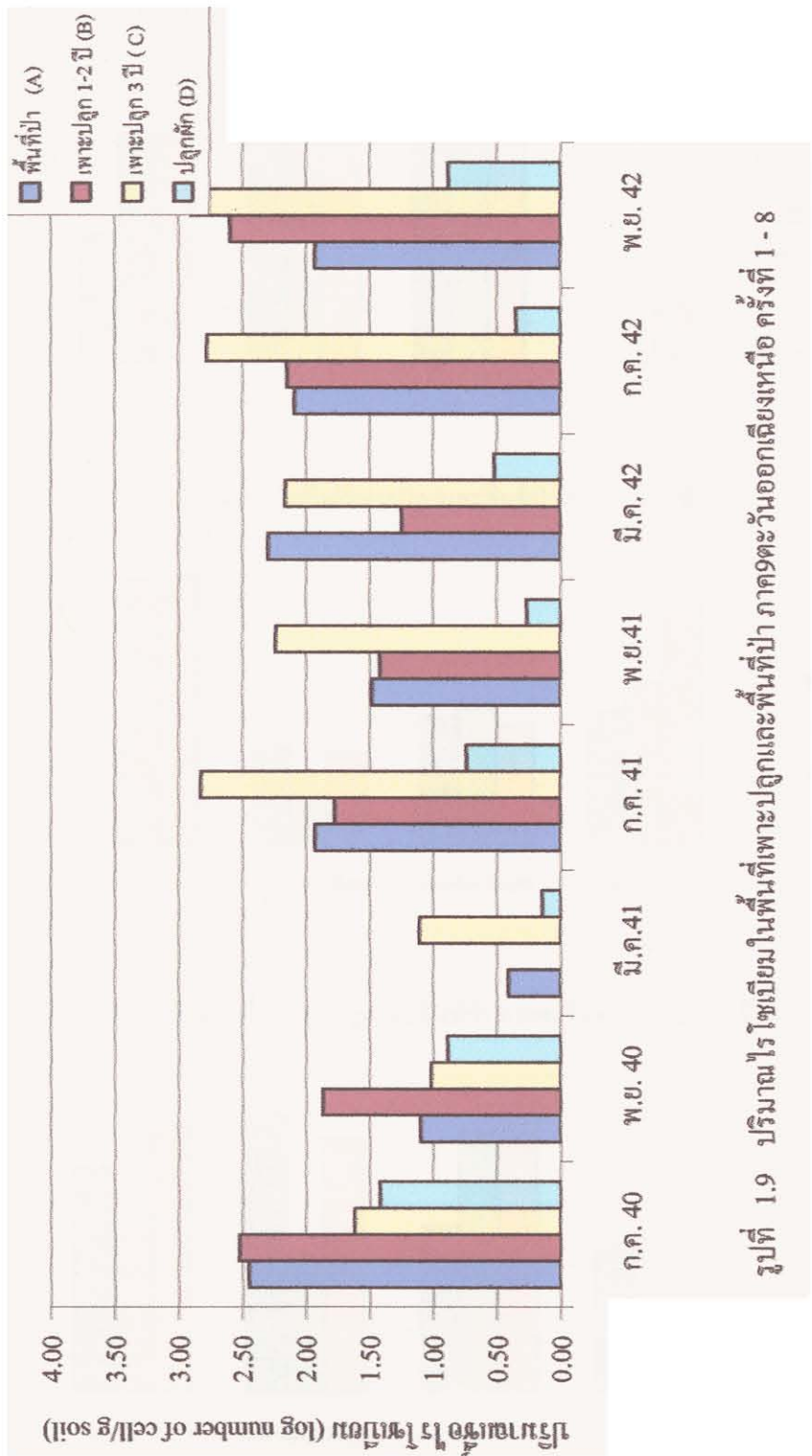
การศึกษาปัจจัยแวดล้อมต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมในพื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี และพื้นที่ปลูกผักต่อเนื่องไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยแวดล้อมต่อประชากรไรโซเบียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงปริมาณเฉลี่ยในแต่ละภาคในรูปที่ 1.10

ตารางที่ 1.6 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell) ครั้งที่ 1-8 ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม

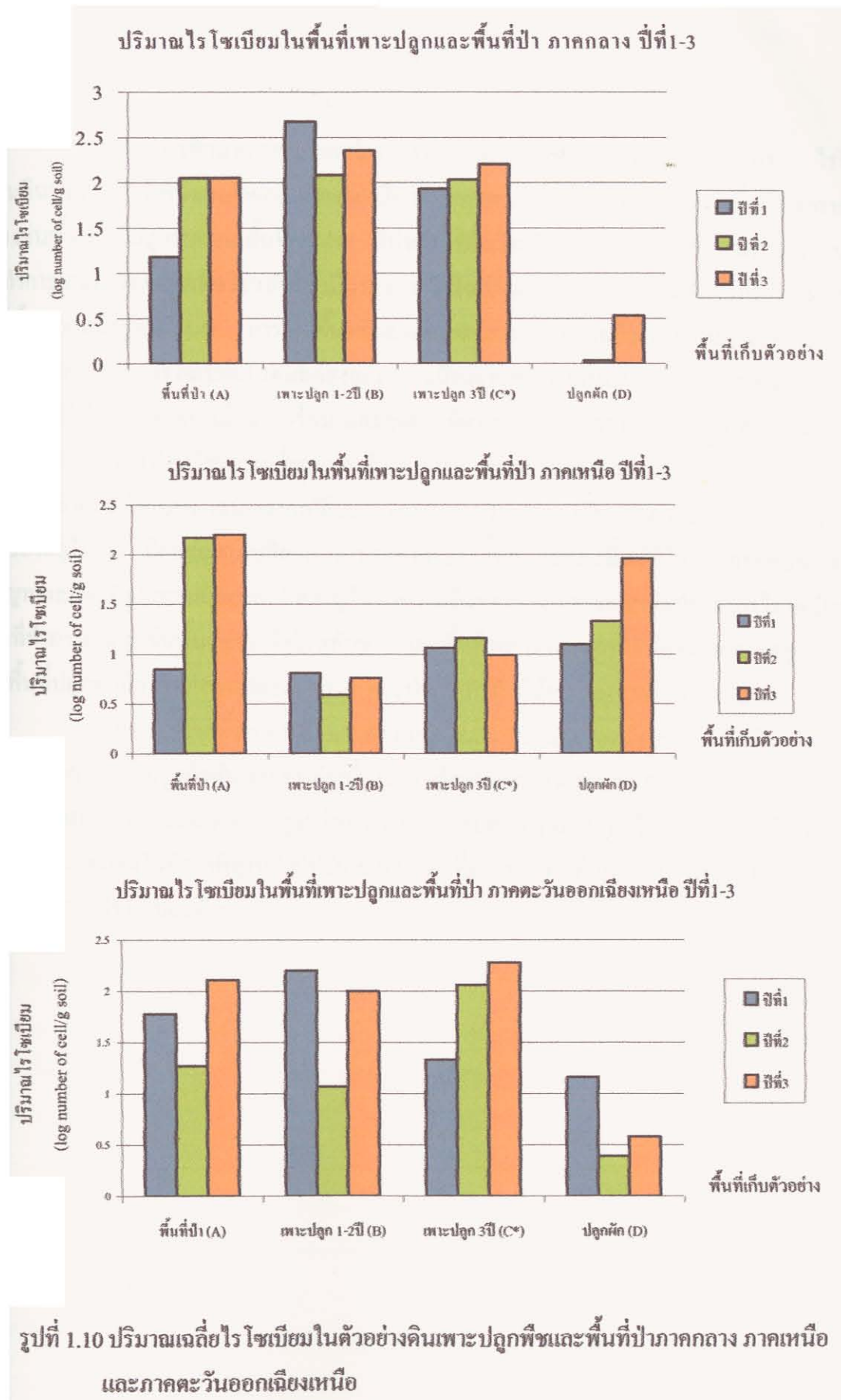
2540 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2542

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3*	ครั้งที่ 4**	ครั้งที่ 5**	ครั้งที่ 6**	ครั้งที่ 7*	ครั้งที่ 8**	ค่าเฉลี่ย
1. พื้นที่ป่า (A)	ก.ค. 40	พ.ย. 40	มี.ค. 41	ก.ค. 41	พ.ย. 41	มี.ค. 42	ก.ค. 42	พ.ย. 42	
	2.45 ab	1.10 b	0.41 b	1.93 b	1.71 ab	2.16 a	2.09 a	1.93 b	1.71
2. พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	2.53 a	1.87 a	0	1.78 b	1.85 b	2.60 a	2.15 a	2.60 a	1.7
3. พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C)	1.62 ab	1.02 b	1.11 a	2.83 a	1.48 a	2.68 a	2.78 a	2.90 a	2.08
4. พื้นที่ปลูกผัก (D)	1.42 b	0.89 b	0.15 b	0.74 c	0.08 c	0.47 b	0.35 b	0.88 c	0.65
CV(%)	27.2	34.9	58.9	9.6	14.6	26.6	21.0	12.1	

- ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT



รูปที่ 1.9 ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1 - 8



## สรุป

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียมในดินพื้นที่ต่าง ๆ กันของภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าพื้นที่ที่ถูกรบกวนน้อย เช่นพื้นที่ป่าไม่ถูกรบกวน พื้นที่ขุดเขา มีประชากรไรโซเบียมน้อยกว่าพื้นที่ทำการเกษตร และพื้นที่ทำการเกษตรโดยปลูกพืชไร่สลับข้าวมีประชากรไรโซเบียมสูงสุดเช่นเดียวกันพื้นที่รกร้างว่างเปล่าแต่มีพืชขึ้นปกคลุมอยู่หนาแน่น การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของประชากรโดยเฉลี่ย เป็นไปตามฤดูกาล คือในช่วงฤดูหนาวปริมาณไรโซเบียมในดินลดลงอย่างมากเนื่องจากสภาพแห้งแล้ง ความชื้นในดินต่ำ อุณหภูมิต่ำ และไม่มีพืชปกคลุมดิน เมื่อถึงฤดูร้อน และฤดูฝน อัตราของประชากรไรโซเบียมก็เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เหมือนกันการเปลี่ยนแปลงในปีถัดไป สำหรับปัจจัยแวดล้อมอื่นที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียม เช่นคุณสมบัติของทางเคมีบางประการของดิน เช่น pH EC Ca K P และอินทรีย์วัตถุในดิน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรบางพื้นที่ แต่บางพื้นที่ก็ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปัจจัยทางกายภาพ ที่สำคัญได้แก่ความชื้นของดินมีผลกระทบต่อประชากรไรโซเบียมในพื้นที่ทำการเกษตรเช่นพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว และพื้นที่รกร้างว่างเปล่าที่มีพืชขึ้นปกคลุมอยู่หนาแน่น ส่วนพื้นที่ปลูกผักมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก และประชากรมักมีน้อยเนื่องจากไม่มีการปลูกถั่ว

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Palmer และ Young, 2000 ยังพบว่าในดินที่เหมาะสมแก่การเพาะปลูกที่มีการปลูกถั่วลันเตาอย่างต่อเนื่องจะพบจำนวนประชากรของ *R. leguminosarum* และความหลากหลายของ *Rhizobium* สูงกว่าบริเวณที่ทำการปลูกหญ้าแต่อย่างเดียว และยังพบอีกว่าดินที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราที่สูงหรือมีปริมาณฟอสเฟตที่มากหรือดินที่มีค่า pH ต่ำจะส่งผลให้ลดความหลากหลายของไรโซเบียมด้วย

## วัตถุประสงค์ที่ 4 เพื่อให้ทราบความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของไรโซเบียมที่อยู่ใน สถานะแวดล้อมที่ต่างกัน

### บทนำ

แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมมีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างเป็นท่อน แกรมลบ มีขนาดกว้างประมาณ 0.5-0.9  $\mu$  และยาวประมาณ 1.2-3  $\mu$  ไม่มีการสร้าง endospore เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ลักษณะการดำรงชีวิตโดยทั่วไปเจริญในสภาพที่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วงค่า 25-30°C ส่วนค่า pH อยู่ระหว่าง 6-7 ลักษณะโคโลนีเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหาร YM มักมีสีขาว และไรโซเบียมส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการดูดกลืนสี congoed (diphenylazo-bis-O-naphthyl aminesulfonate) จึงเป็นที่นิยมในการคัดแยกไรโซเบียมจากปมของรากถั่ว นอกจากนี้ถ้าจำแนกตามลักษณะทางสรีระวิทยาโดยเฉพาะความสามารถในการสร้างกรดและเบสของไรโซเบียม พบว่ากลุ่มที่มีการเจริญเติบโตได้เร็ว (fast grower) มักจะมีการสร้างกรด ในทางกลับกันกลุ่มที่เจริญเติบโตช้า (slow grower) มักจะมีการสร้างเบสซึ่งมักจะได้แก่ ไรโซเบียมในกลุ่มจีนิส *Bradyrhizobium*

หลักการพื้นฐานทั่วไปในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมนี้อาจทำได้หลายวิธี เช่น

1. การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา
2. การใช้เทคนิคทาง serology
3. การจำแนกตามรูปแบบของการด้านสารปฏิชีวนะแต่ละชนิด
4. ศักยภาพของการตรึงไนโตรเจน
5. การจำแนกตามพีชอาคัย
6. วิธีการทางชีววิทยาอณู

อย่างไรก็ตามอนุกรมวิธานในปัจจุบันของไรโซเบียมสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 จีนิส ได้แก่ *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* และ *Azorhizobium* โดยในจีนิส *Rhizobium* *Sinorhizobium* และ *Mesorhizobium* มีลักษณะที่สำคัญคือมักพบว่ามีอัตราเจริญปานกลางถึงเร็ว ในขณะที่จีนิส *Bradyrhizobium* จะมีอัตราการเจริญช้าและจีนิส *Azorhizobium* จะเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดปมบนลำต้นของพืชกลุ่มโสนได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในขั้นนี้เพื่อที่ความต้องการจะทราบถึงความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของไรโซเบียมในสถานะแวดล้อมต่าง ๆ กัน โดยจะทำการจัดกลุ่มและสร้างความสัมพันธ์จากลักษณะสำคัญของไรโซเบียมที่ได้จากระบบนิเวศต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะสำคัญทางสรีระวิทยาของประชากร เช่น อัตราการเจริญ การสร้างกรด-เบส การผลิต IAA รูปแบบของการด้านสารปฏิชีวนะ ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนและการจำแนกตามพีชอาคัย ในขณะเดียวกันได้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาอณู PCR ในการจำแนกความแตกต่าง และจัดกลุ่มระหว่างสายพันธุ์อีกด้วย

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์อ้างอิงและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มไรโซเบียมสายพันธุ์อ้างอิงที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ *Rhizobium leguminosarum*, *R. tropici*, *Bradyrhizobium japonicum* และ *Azorhizobium* sp. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาคืออาหาร Yeast manitol medium (YM) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, D-manitol 10.0 g, Yeast extract 0.4 g, NaCl 1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g pH 6.8 ต่อน้ำ 1 ลิตร) เชื้อไรโซเบียมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับจากการศึกษาในวัตถุประสงค์ที่ 1-3 โดยสุ่มมาจำนวน 200 ไอโซเลตจากทุกระบบนิเวศและจากที่แยกได้ในฤดูฝนและฤดูแล้ง

### 2. การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

#### 2.1 การจำแนกตามขนาดโคโลนี

นำไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตมาทำการขีดเลี้ยงบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ YM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  สังเกตคุณลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยกำหนดขนาดตามรายงานของ Mpeperekhi และคณะ (1997) โดยโคโลนีที่มีขนาดใหญ่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 2 มม. และโคโลนีขนาดกลางมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1-2 มม. และโคโลนีขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มม. นอกจากนี้ลักษณะของโคโลนีจำแนกออกเป็น 2 ลักษณะคือ dry colony (gum and surface) และ wet colony (slimy)

#### 2.2 การผลิตกรดและเบส

นำไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น YM ที่มี Bromthymol blue เป็น indicator จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  สังเกตการเจริญและการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันแล้วบันทึกผล กลุ่มที่เป็น fast grower จะผลิตกรดสามารถเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ในขณะที่กลุ่มที่เป็น slow grower จะผลิตต่างและเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงินและสร้างโคโลนีภายใน 4-8 วัน (Somasegaran และคณะ 1983)

#### 2.3 การทดสอบการสร้าง IAA (Indole acetic acid)

นำเชื้อแต่ละไอโซเลตเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tris-TMRT (D-manitol 10.0 g, yeast extract 0.2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, Tris base 1.21 g, L-tryptophan 0.061 g pH 6.8 ในน้ำ 1 ลิตร) ที่อุณหภูมิ  $28^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 วันในที่มืด จากนั้นตรวจสอบการสร้าง IAA โดยเติมสารละลาย 0.01 M  $\text{FeCl}_3$  ใน 35%  $\text{HClO}_4$  ในปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงใน broth ที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบสีที่เกิดขึ้นหลังจากนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที ถ้ามีการสร้าง IAA จะได้สารละลายสีชมพูจนถึงส้ม ในขณะที่ส่วนที่ไม่มี IAA จะได้สารละลายเป็นสีเหลืองปกติ

### 3. การตรวจสอบศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

นำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาทำการปลูกลงบนเมล็ดถั่วเซอราโตรที่ผ่านการทำ surface-sterilized จากนั้นนำไปปลูกในถุงพลาสติก poche ที่บรรจุสารอาหารปราศจากแหล่งไนโตรเจนบนชั้นวางให้แสง 12 ชม. และมีด 12 ชม. เป็นเวลา 45 วัน จากนั้นนำปมที่เกิดบริเวณรากถั่วมาตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)

### 4. การศึกษารูปแบบของการต้านสารปฏิชีวนะ

เตรียมอาหารรุ้น YM ที่ใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณดังต่อไปนี้ Carbenicillin (car) 500  $\mu\text{g/ml}$ , Chloramphenicol (chl) 500  $\mu\text{g/ml}$ , Erythromycin (Ery) 250  $\mu\text{g/ml}$ , Kanamycin (Kan) 100  $\mu\text{g/ml}$ , Nalidixic acid (Nal) 50  $\mu\text{g/ml}$ , Tetracyclin (Tet) 100  $\mu\text{g/ml}$ , Trimetropim (Tmp) 50  $\mu\text{g/ml}$  และ Streptomycin (str) 100  $\mu\text{g/ml}$  จากนั้นนำเซลล์ไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM มีความขุ่นในช่วง  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.4-0.6$  ในปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  มาหยดลงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดทำการบ่มเป็นเวลา 4-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C บันทึกผลการเกิดโคโลนีเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่ใส่สารปฏิชีวนะ

### 5. การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมตามพืชอาศัย

พืชอาศัยตระกูลถั่วที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว (cow pea) และ โสน (sesbania) โดยนำเมล็ดของพืชทั้งสามมาทำ surface-sterilize ด้วย 20%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ตามด้วย 70% เอทานอล และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะให้เริ่มงอกในจานอาหารที่รองด้วยสำลีที่เปียกปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงใส่เชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตลงไปบนเมล็ดถั่วทั้งสามชนิดในปริมาณ  $10^6-10^7$  เซลล์/เมล็ด ทำการปลูกบน pouch เป็นเวลา 30-45 วัน สังเกตการสร้างปมต่อไป

### 6. การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมด้วยเทคนิค PCR

นำไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตมาทำการสกัด DNA โดยดูด cell suspension ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวบรรจุลงในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำ deionized ปลอดเชื้อ 300  $\mu\text{l}$  แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยความเร็วเท่าเดิม จากนั้นเติมน้ำ deionized ลงไป 100  $\mu\text{l}$  นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ดูดส่วนใสในปริมาตร 1-2  $\mu\text{l}$  เพื่อใช้เป็น ส่วน DNA template ในการทำ PCR ต่อไป DNA primer ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ RAPD (5'-GTTTCGCTCC-3') ในปริมาณ 50 pMol โดยมีสภาพ PCR คือ 94°C 1 นาที, 36°C 1 นาที, 72°C 2 นาที เป็นจำนวน 44 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis บน agarose ความเข้มข้น 1.2% ที่ 80-100 volt



### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

จากเชื้อไรโซเบียมที่สุ่มมาทั้งหมดจำนวน 200 ไอโซเลต เมื่อทำการจำแนกตามลักษณะของโคโลนี พบว่ามีหลากหลายต่างกันไปในแต่ละพื้นที่และฤดูกาล แต่ที่พบว่ามีลักษณะเด่นปรากฏที่ชัดเจนได้แก่ บนยอดเขาตอยอินทนนท์พบว่าทุกไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีเป็นแบบ small dry เป็นพวกเจริญช้า และสามารถสร้าง IAA ได้ทุกไอโซเลต ส่วนบริเวณพื้นที่ป่าที่ถูกทำลายเพื่อการเกษตรเป็นเวลา 1-2 ปี ในภาคกลางพบว่าทุกไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีแบบ medium wet เป็นพวกเจริญช้าทั้งหมด และในระบบนิเวศเดียวกันในภาคอีสานพบทุกไอโซเลตมีลักษณะ medium dry เป็นพวกเจริญช้าทั้งหมดเช่นเดียวกัน (ดังแสดงผลสรุปรวมในตารางที่ 1.7) จากการสำรวจทั้งหมดพบว่าประชากรส่วนใหญ่ของกลุ่มไรโซเบียมถึง 99% จัดเป็นกลุ่มที่เจริญช้า (slow grower) หรืออาจจัดอยู่ในจีนัส *Bradyrhizobium* ส่วนอีก 1% จัดอยู่ในกลุ่ม fast grower ซึ่งอาจอยู่ในกลุ่มจีนัส *Rhizobium* ในกลุ่ม slow grower เองพบว่า 36% ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดสามารถสร้าง IAA ได้ในขณะที่มีเพียง 1% ในกลุ่ม fast grower สามารถสร้าง IAA ได้ ซึ่งลักษณะนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Fuhrman (1993) ที่ว่าในส่วนจีนัส *Bradyrhizobium* ที่ไม่สามารถสร้าง IAA ซึ่งคาดว่าเป็นประชากรส่วนใหญ่ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะมีความสัมพันธ์กับ *B. japonicum* ที่สามารถตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจได้ (Nantagij และคณะ, 1997) และนอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของทั้ง 200 ไอโซเลตกับถั่วเซอร่าโตรพบว่า ค่าความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.01-258.68  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{กรัม ปม/ชม.}$  โดยพบว่าประชากรส่วนใหญ่ประมาณ 179 ไอโซเลตสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในช่วงที่ต่ำคือน้อยกว่า 9  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{กรัม ปม/ชม.}$  (ดังแสดงในรูปที่ 1.11)

**Table 1.7** The percentage of some morphological and physiological aspects of rhizobia in rainy season and dry season

Areas	Type of colony	Fast/Slow grower	IAA population
<b>1. Highest mountain</b> - in the Central  - in the North - in the North Eastern	Sd 58%	Slow grower 100%	+ 72%
	Sw 14%		
	Md 14%		
	Mw 14%		
	Sd 100%	Slow grower 100%	+ 100%
	Sd 63%	Slow grower 100%	+ 37%
	Md 37%		
<b>2. Middle mountain</b> - in the Central  - in the North  - in the North Eastern	Sd 64%	Slow grower 88%	+ 25%
	Sw 12%	Fast grower 12%	
	Mw 12%		
	Lw 12%		
	Mw 50%	Slow grower 100%	+ 38%
	Md 25%		
	Sd 25%		
	Sd 58%	Slow grower 100%	+ 58%
	Md 29%		
Sw 13%			
<b>3. Foot hill of mountain</b> - in the Central  - in the North	Mw 75%	Slow grower 100%	+ 13%
	Md 15%		
	Mw 50%	Slow grower 100%	+ 38%
	Md 38%		
	Sw 12%		

Table 1.7 (Continued)

Areas	Type of colony	Fast/Slow grower	IAA population
- in the North Eastern	Sd 50% Mw 62% Md 12% Sw 12%	Slow grower 100%	+ 25%
<b>4. Field crop cultivation</b>			
- in the Central	Mw 38% Md 25% Sd 25% Sw 1%	Slow grower 100%	- 100%
- in the North	Md 76% Mw 12% Sd 12%	Slow grower 100%	+ 50%
- in the North Eastern	Mw 76% Md 12% Sd 12%	Slow grower 100%	+ 13%
<b>5. Rice cultivation</b>			
- in the Central	Sw 43% Mw 27% Md 15% Sd 15%	Slow grower 100%	+ 43%
- in the North	Mw 72% Sw 14% Sd 14%	Slow grower 100%	+ 15%
- in the North Eastern	Mw 86% Sw 14%	Slow grower 100%	+ 29%
<b>6. Rice in rotation with other crops</b>			
- in the Central	Sd 38% Mw 38% Md 24%	Slow grower 100%	+ 50%

Table 1.7 (Continued)

Areas	Type of colony	Fast/Slow grower	IAA population
<b>9. Forest clearance for crop cultivation for 1-2 years</b>			
- in the Central	Mw 100%	Slow grower 100%	+ 25%
- in the North	Md 50%	Slow grower 100%	+ 100%
	Sd 50%		
- in the North Eastern	Md 100%	Slow grower 100%	+ 50%
<b>10. Forest clearance for crop cultivation for 3 years</b>			
- in the Central	Md 50%	Slow grower 100%	+ 75%
	Mw 25%		
	Sd 25%		
- in the North	Mw 50%	Slow grower 100%	+ 50%
	Md 25%		
	Sd 25%		
- in the North Eastern	Mw 75%	Slow grower 100%	+ 25%
	Md 25%		
<b>11. Intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers</b>			
- in the North	Md 33%	Slow grower 100%	+ 50%
	Sw 33%		
	Mw 17%		
	Sw 17%		
- in the North Eastern	Md 60%	Slow grower 100%	+ 20%
	Mw 20%		
	Sd 20%		

Sd = Small dry Sw = Small wet Mw = Medium wet Md = Medium dry

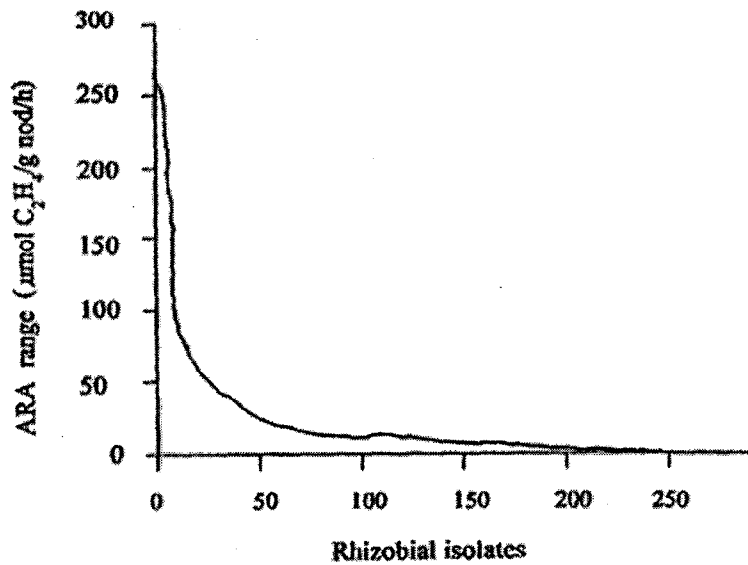


Figure 1.11 The range of AA from rhizobial isolates.

## 2. การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมตามรูปแบบของการต้านสารปฏิชีวนะ

จากการศึกษารูปแบบของการต้านสารปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกรูปแบบของความแตกต่างได้ถึง 123 กลุ่ม โดยพบว่าประชากรส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ trimetroprim และ sensitive ต่อ kanamycin (ผลดังแสดงในภาคผนวกตารางที่ ผ.1.7 และ ผ.1.8) และยิ่งไปกว่านั้นเป็นที่น่าสังเกตว่าไอโซเลตที่แยกได้จากระบบนิเวศที่มาจากภูเขาที่ อำเภอภูเรือ จ.เลย 7 ไอโซเลตมีรูปแบบของการต้านทานสารปฏิชีวนะรูปแบบเดียวกัน วิธีการศึกษานี้ได้มีการใช้กันบ้างพอสมควรในการจัดจำแนก (Beynon และ Josey 1980, Rupela และคณะ 1982, Eaglesham 1987, Mueller และคณะ 1988 และ Hurse, 1991) ซึ่งพบว่าผลที่ได้จากการศึกษารุ่นนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Elkan, 1992 ที่ว่ากลุ่มที่เป็น slow grower ส่วนใหญ่จะไม่ค่อย sensitive ต่อสารปฏิชีวนะและจากการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มจีส *Bradyrhizobium* sp. และ *B. japonicum* จำนวน 38 สายพันธุ์ที่สร้างปมได้ในถั่วเขียว ถั่วลิสงและถั่วเหลืองก็ให้ผลทำนองเดียวกันอีกด้วย (Teaumroong และคณะ 1998)

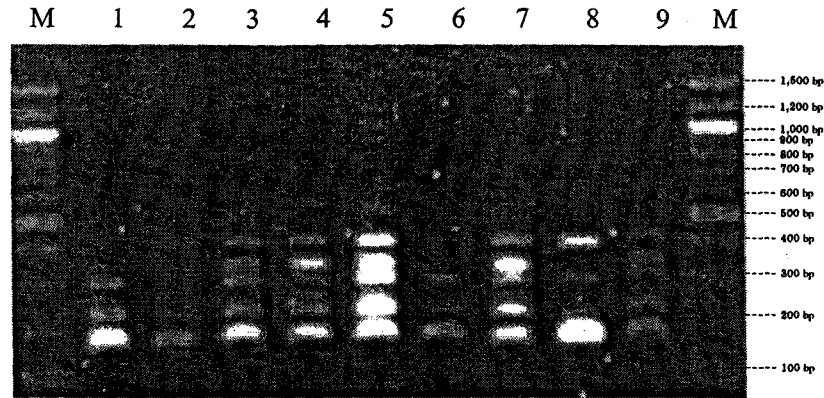
## 3. การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมตามพืชอาศัย

จากการนำเชื้อไรโซเบียมทั้งหมดมาปลูกลงบนพืชอาศัยทั้ง 3 ชนิดเพื่อสังเกตการสร้างปม (ผลดังแสดงในตารางที่ ผ.1.9 และ ผ.1.10 ในภาคผนวก) โดยพบว่าไรโซเบียม 175 ไอโซเลตสามารถสร้างปมได้กับถั่วฝักยาว 23 ไอโซเลตสามารถสร้างปมได้กับถั่วเหลืองและโสน ผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้อีกครั้งว่าประชากรส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Bradyrhizobium* และจากหลักการการจำแนกกลุ่ม *Bradyrhizobium* (Fuhrman, 1993) ที่สร้างปมได้กับถั่วเหลืองถ้ามีการสร้าง IAA ได้จะจัดว่าเป็น *B. elkanii* แต่ถ้าไม่สามารถสร้าง IAA ได้จะเป็น *B. japonicum* ซึ่งทำให้คาดการณ์ได้ว่าประชากรส่วนใหญ่ น่าจะเป็น *Bradyrhizobium* sp. ประมาณ 88%, *B. japonicum* 8% และ *B. elkanii* 4%

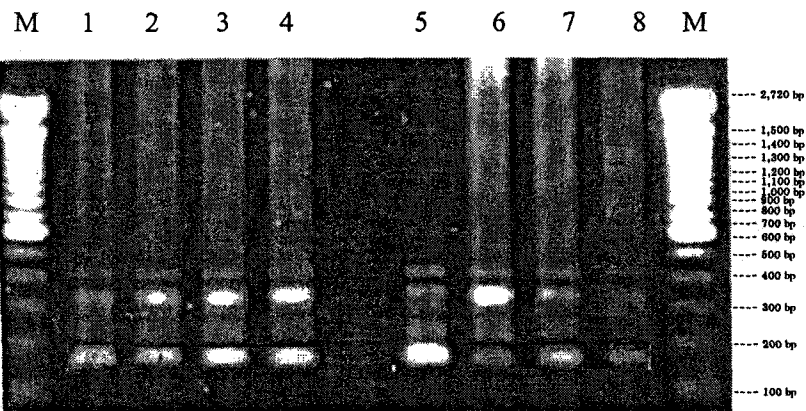
#### 4. การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ไรโซเบียมโดยเทคนิค PCR-RAPD

##### 4.1 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากยอดเขาทั้ง 3 ภาค

PCR product ที่ได้จากไรโซเบียมไอโซเลตต่าง ๆ พบว่ามีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่ 150-390 bp. โดยพบว่าไรโซเบียมที่แยกได้จากในฤดูฝนจากบริเวณยอดเขาในภาคเหนือ (ดอยอินทนนท์) และยอดเขาภาคกลาง (ยอดเขาเขียว) จะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก ในขณะที่ ไรโซเบียมที่แยกได้จากยอดเขาภาคอีสาน (ยอดภูเรือ) มีเพียง 1 ไอโซเลต (INEM<sub>1</sub>-2) ที่คล้ายกับที่แยกได้จากภาคเหนือและกลาง ส่วนอีก 3% ไอโซเลตจะต่างกันออกไป ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตที่ทำการแยกมาจากช่วงฤดูแล้งพบว่า PCR pattern ของไรโซเบียมในฤดูแล้งนี้จะต่างจากในฤดูฝนอย่างสิ้นเชิง และพบว่าลักษณะ pattern ของทุกไอโซเลตจากทั้ง 3 ภาคค่อนข้างคล้ายกันมาก (ดังแสดงในรูปที่ 1.12 และ 1.13) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ฤดูแล้งเป็นปัจจัยตัวกำหนดการปรากฏของสปีชีส์ของไรโซเบียม และบริเวณยอดเขาทั้ง 3 ภาคพบความหลากหลายของไรโซเบียมค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ INEM<sub>1</sub>-1 ที่แยกได้จากยอดเขาภูเรือในฤดูฝนเป็นสายพันธุ์เดียวกับ III NEM<sub>1</sub>-4 ที่แยกได้จากบริเวณเดียวกันในฤดูแล้งอีกด้วย จึงคาดว่าสายพันธุ์นี้น่าจะเป็น dominant native strain ที่สามารถพบจำนวนมากได้ตลอดทั้งปี และสายพันธุ์พบว่าเป็นกลุ่มเจริญช้า สร้างปมได้กับถั่วฝักยาวและให้ลักษณะการด้านสารปฏิชีวนะรูปแบบเดียวกัน คือ ด้านทานต่อ tetracyclin เพียงชนิดเดียว



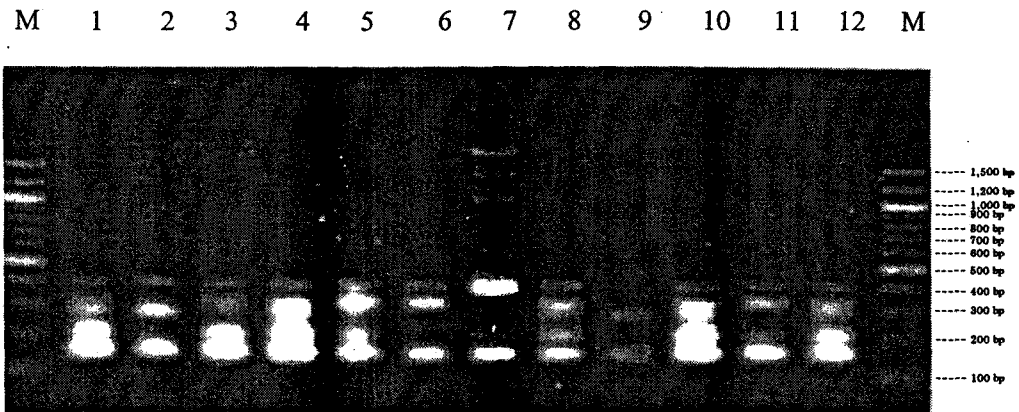
**Figure 1.12** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from highest mountain area in rainy season. M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM<sub>1</sub>-1; Lane 2, ICM<sub>1</sub>-4; Lane 3, INM<sub>1</sub>-1; Lane 4, INM<sub>1</sub>-2; Lane 5, INM<sub>1</sub>-4; Lane 5, INEM<sub>1</sub>-1, Lane 7, INEM<sub>1</sub>-2; Lane 8, INEM<sub>1</sub>-3 and Lane 9, INEM<sub>1</sub>-4.



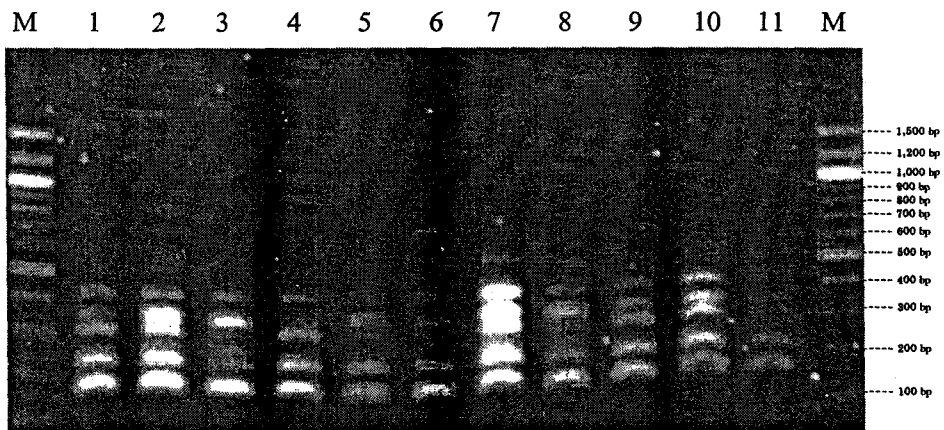
**Figure 1.13** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from highest mountain area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IICM<sub>1</sub>-1; Lane 2, IICM<sub>1</sub>-2; Lane 3, IICM<sub>1</sub>-3; Lane 4, IICM<sub>1</sub>-4; Lane 5, IINEM<sub>1</sub>-1; Lane 6, IINEM<sub>1</sub>-2; Lane 7, IINEM<sub>1</sub>-3 and Lane 8, IINEM<sub>1</sub>-4.

#### 4.2 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากบริเวณกลางเขาทั้ง 3 ภาค

ไรโซเบียมที่แยกจากบริเวณกลางเขาทั้ง 3 ภาคในฤดูฝนพบว่าบริเวณกลางคอยอินทนนท์ทั้ง 4 ไอโซเลตมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากและยังใกล้เคียงกับที่บริเวณยอดเขาด้วย ในขณะที่ไอโซเลตที่ได้จากกลางเขาเขียวมีความแตกต่างกันเกือบทุกไอโซเลต และดูเหมือนจะมีความหลากหลายสูงกว่าบริเวณยอดเขาเขียว ในขณะที่บริเวณกลางเขาภูเรือได้ผลในการทำงานเดียวกับภาคเหนือ (ดังแสดงในรูปที่ 1.14 และ 1.15) เมื่อเปรียบเทียบกับฤดูแล้งพบว่าลักษณะ PCR-product ที่ได้จากทุกไอโซเลตจะมีความคล้ายคลึงกันเกือบทุกไอโซเลต ซึ่งคาดว่าไรโซเบียมกลุ่มนี้จะเป็นที่พบได้มากในฤดูแล้งมากกว่าฤดูฝน ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามีการด้านสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่เหมือนกันและเหมือนกับสายพันธุ์ III NEM<sub>1</sub>-4 ที่แยกได้ออกจากยอดเขาภูเรือในฤดูแล้งอีกด้วย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการพังทลายของหน้าดินอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดการแพร่กระจายของความหลากหลายของไรโซเบียมด้วย



**Figure 1.14** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from middle mountain area in rainy season  
M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM<sub>2</sub>-1; Lane 2, ICM<sub>2</sub>-2; Lane 3, ICM<sub>2</sub>-3; Lane 4, ICM<sub>2</sub>-4; Lane 5, INM<sub>2</sub>-1; Lane 6, INM<sub>2</sub>-2; Lane 7, INM<sub>2</sub>-3; Lane 8, INM<sub>2</sub>-4; Lane 9, INEM<sub>2</sub>-1; Lane 10, INEM<sub>2</sub>-2; Lane 11, INEM<sub>2</sub>-3 and Lane 12, INEM<sub>2</sub>-4.

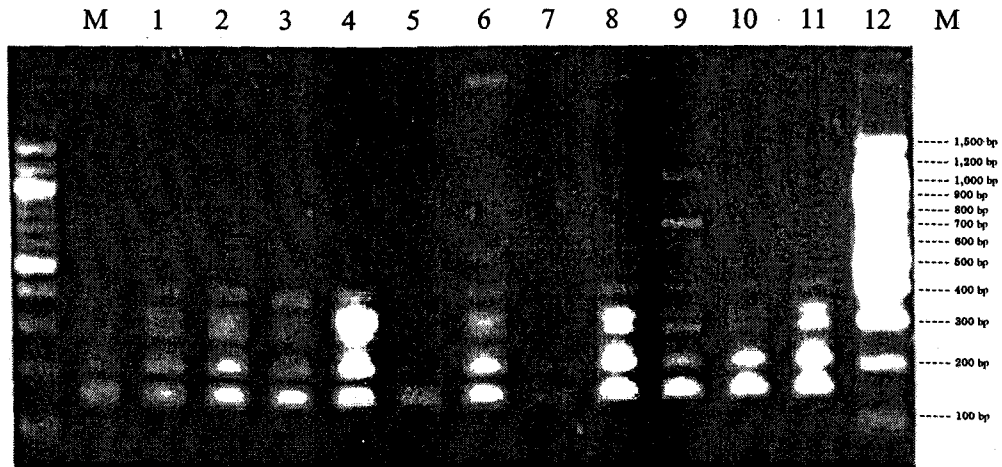


**Figure 1.15** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from middle mountain area in dry season  
M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICM<sub>2</sub>-1; Lane 2, IIICM<sub>2</sub>-2; Lane 3, IIICM<sub>2</sub>-3; Lane 4, IIICM<sub>2</sub>-4; Lane 5, IINM<sub>2</sub>-1; Lane 6, IINM<sub>2</sub>-2; Lane 7, IINM<sub>2</sub>-3; Lane 8, IINM<sub>2</sub>-4; Lane 9, IINEM<sub>2</sub>-2; Lane 10, IINEM<sub>2</sub>-3 and Lane 11, IINEM<sub>2</sub>-4.

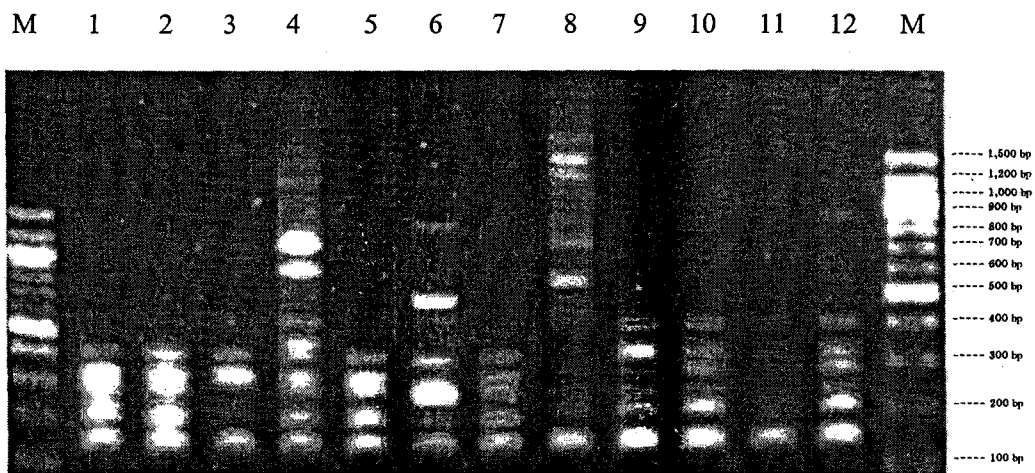
#### 4.3 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากบริเวณเชิงเขาทั้ง 3 ภาค

ไรโซเบียมที่แยกได้จากบริเวณเชิงเขาทั้ง 3 ภาคในฤดูฝนพบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและปรากฏในฤดูแล้งด้วยเช่นเดียวกัน (ดังแสดงในรูป 1.16 และ 1.17) เช่น สายพันธุ์ที่แยกได้จากภาคกลาง (ICM<sub>3</sub>-4 และ IIICM<sub>3</sub>-3 ทั้งสองสายพันธุ์เป็นกลุ่ม slow grower ที่สามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้เหมือนกัน), ภาคเหนือ (IINM<sub>3</sub>-3, INM<sub>3</sub>-2 และ INM<sub>3</sub>-4 ทั้งสามสายพันธุ์เป็นกลุ่ม slow grower ที่สามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้เช่นเดียวกัน และสายพันธุ์ INM<sub>3</sub>-4 พบว่าเป็นตัวเดียวกับที่พบบนยอดคอกอินทนนท์เช่นเดียวกัน) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (INEM<sub>3</sub>-2 และ IINEM<sub>3</sub>-2 ทั้งสองสายพันธุ์เป็นกลุ่ม slow grower ที่มีรูปแบบการด้านสารปฏิชีวนะคล้ายกันและสามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้เหมือนกัน)





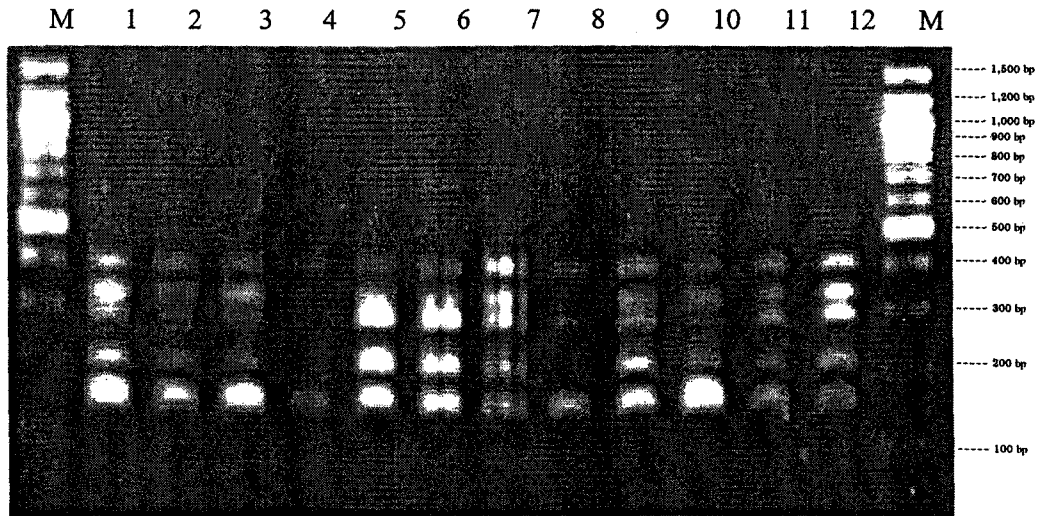
**Figure 1.16** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from foot hill of mountain area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICM<sub>3</sub>-1; Lane 2, ICM<sub>3</sub>-2; Lane 3, ICM<sub>3</sub>-3; Lane, ICM<sub>3</sub>-4; Lane 5, INM<sub>3</sub>-1; Lane 6, INM<sub>3</sub>-2; Lane 7, INM<sub>3</sub>-3; Lane 8, INM<sub>3</sub>-4; Lane 9, INEM<sub>3</sub>-1; Lane 10, INEM<sub>3</sub>-2; Lane 11, INEM<sub>3</sub>-3 and Lane 12, INEM<sub>3</sub>-4.



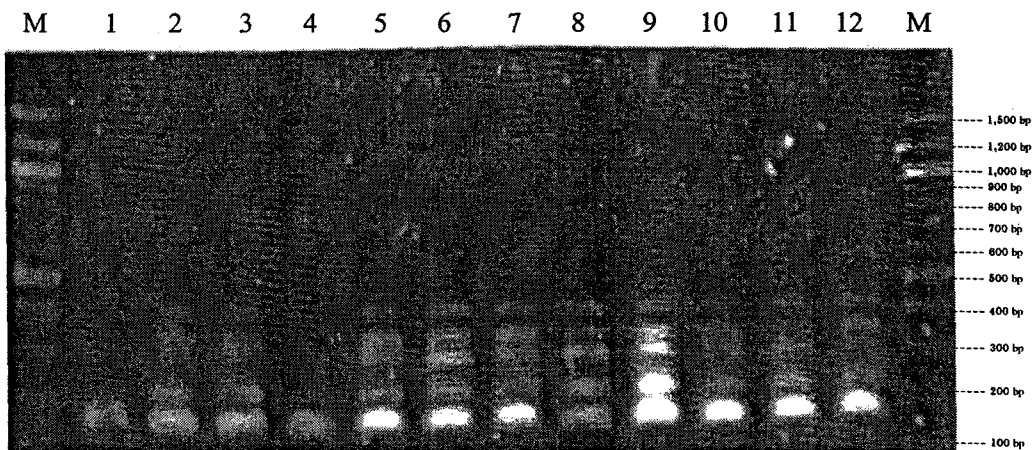
**Figure 1.17** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from foot hill of mountain area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICM<sub>3</sub>-1; Lane 2, IIICM<sub>3</sub>-2; Lane 3, IIICM<sub>3</sub>-3; Lane 4, IIICM<sub>3</sub>-4; Lane 5, IIINM<sub>3</sub>-1; Lane 6, IIINM<sub>3</sub>-2; Lane 7, IIINM<sub>3</sub>-3; Lane 8, IIINM<sub>3</sub>-4; Lane 9, IIINEM<sub>3</sub>-2; Lane 10, IIINEM<sub>3</sub>-3 and Lane 11, IIINEM<sub>3</sub>-4.

#### 4.4 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากบริเวณปลูกพืชไร่ทั้ง 3 ภาค

พบว่าความหลากหลายของกลุ่มไรโซเบียมจากสิ่งแวดล้อมประเภทพื้นที่ทำการเกษตรที่มีการปลูกแต่พืชไร่อย่างเดียวกทั้ง 3 ภาคมีความหลากหลายน้อย (ดังแสดงในรูปที่ 1.18 และ 1.19) และเชื้อที่พบส่วนใหญ่สามารถดำรงชีวิตอยู่ข้ามฤดูฝนและฤดูแล้งได้ตลอดทั้งปี ซึ่งลักษณะเชื้อส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็น slow grower และค่อนข้าง sensitive ต่อสารปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด และสามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้



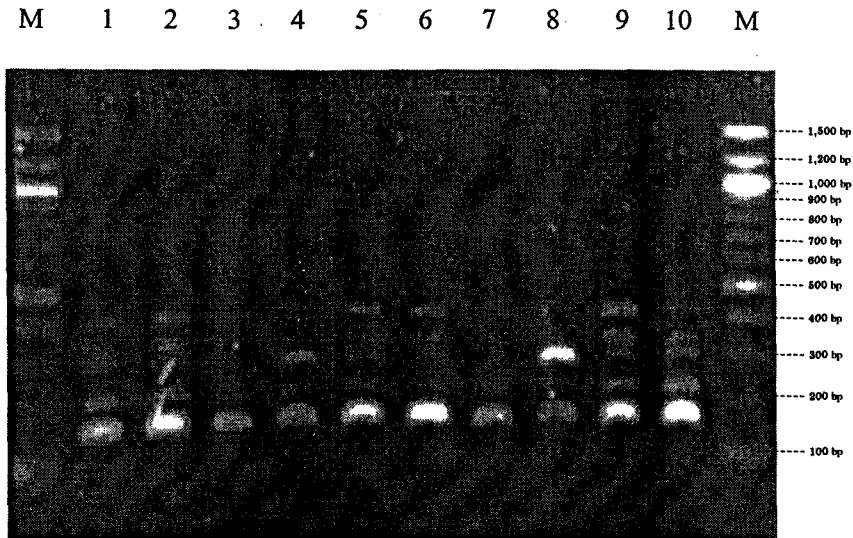
**Figure 1.18** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from field crop cultivation area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICC1; Lane 2, ICC2; Lane 3, ICC3; Lane 4, ICC4; Lane 5, INC1; Lane 6, INC2; Lane 7, INC3; Lane 8, INC4; Lane 9, INEC1; Lane 10, INEC2; Lane 11, INEC3 and Lane 12, INEC4.



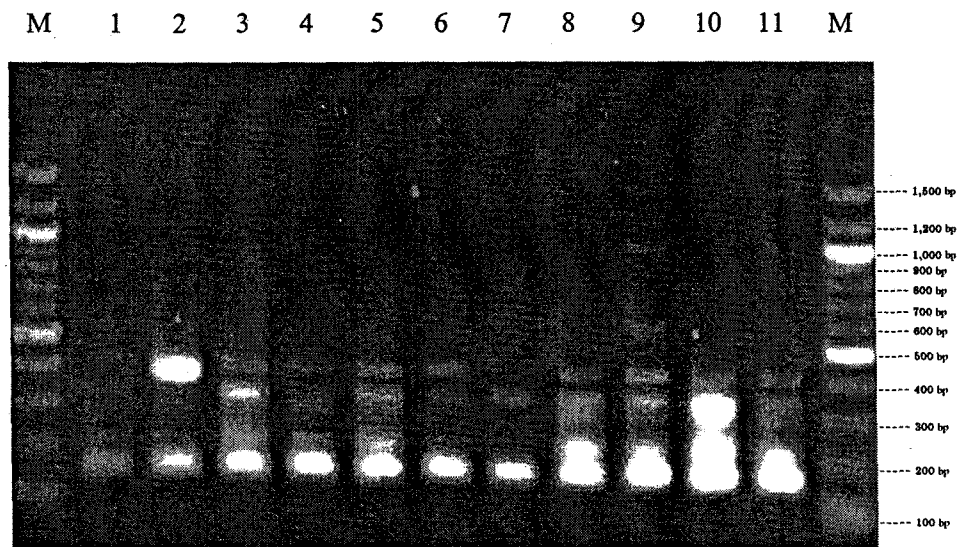
**Figure 1.19** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from field crop cultivation area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICC1; Lane 2, IIICC2; Lane 3, IIICC3; Lane 4, IIICC4; Lane 5, IIINC1; Lane 6, IIINC2; Lane 7, IIINC3; Lane 8, IIINC4; Lane 9, IIINEC1; Lane 10, IIINEC2; Lane 11, IIINEC3 and Lane 12, IIINEC4.

#### 4.5 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากบริเวณที่นาทั้ง 3 ภาค

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมในระบบนิเวศแบบนี้ระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง พบว่า เมื่อพิจารณาจาก PCR-RAPD (ดังแสดงในรูปที่ 1.20 และ 1.21) พบว่าในแต่ละฤดูกาล ปรากฏของประชากรไรโซเบียม มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนใหญ่ พบเพียง 2 กลุ่มของไรโซเบียมในภาคกลางและภาคเหนือที่ยังคงปรากฏข้ามฤดู ซึ่งทั้งสองกลุ่มจัดเป็น slow grower และสามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้



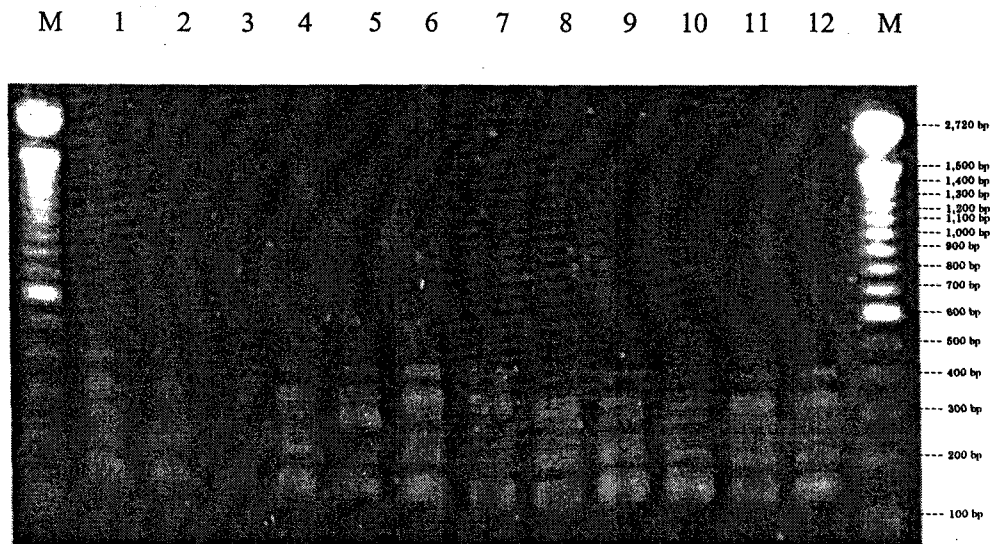
**Figure 1.20.** PCR-RAPA patterns of rhizobial isolates from rice cultivation area in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICR1; Lane 2, ICR2; Lane 3, ICR4; Lane 4, INR1; Lane 5, INR2; Lane 6, INR4; Lane 7, INER1; Lane 8, INER2; Lane 9, INER3 and Lane 10, INER4.



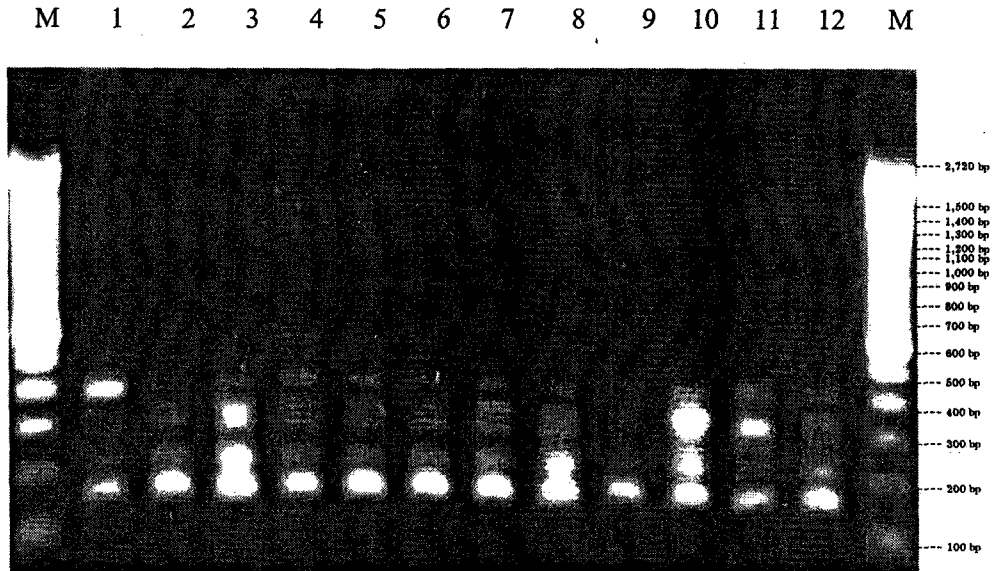
**Figure 1.21** PCR-RAPA patterns of rhizobial isolates from rice cultivation area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IICR1; Lane 2, IICR2; Lane 3, IICR3; Lane 4, IICR4; Lane 5, IIINR1; Lane 6, IIINR2; Lane 7, IIINR3; Lane 8, IIINR4; Lane 9, IIINER1; Lane 10, IIINER3 and Lane 11, IIINER4.

#### 4.6 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการลุ่มจากบริเวณพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวสลับพืชไร่ทั้ง 3 ชนิด

จากการเปรียบเทียบการปรากฏของไรโซเบียมข้ามฤดูในระบบนิเวศแบบนี้พบว่ามีไรโซเบียมที่เป็น dominant native strain ทุกภาค (ดังแสดงในรูปที่ 1.22 และ 1.23) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ที่ 1-3 ว่าการปลูกพืชตระกูลถั่วจะเป็นตัวซึ่งรักษาความอยู่รอดของกลุ่มไรโซเบียมไว้ได้ จึงทำให้พบการปรากฏของไรโซเบียมกลุ่มเดียวกันในทุกฤดูและทุกภาค และไรโซเบียมส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่ม slow grower และสร้างปมได้กับถั่วฝักยาว ในขณะที่บางสายพันธุ์ที่พบในภาคอีสานในฤดูฝนสามารถสร้างปมกับถั่วเหลืองได้ และไม่สร้าง IAA ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. japonicum* มากที่สุด แต่ในฤดูแล้งซึ่งไม่ใช่ฤดูกาลปลูกถั่วเหลืองกลับไม่พบกลุ่มที่คาดว่าจะ เป็น *B. japonicum* ในพื้นที่เดียวกัน



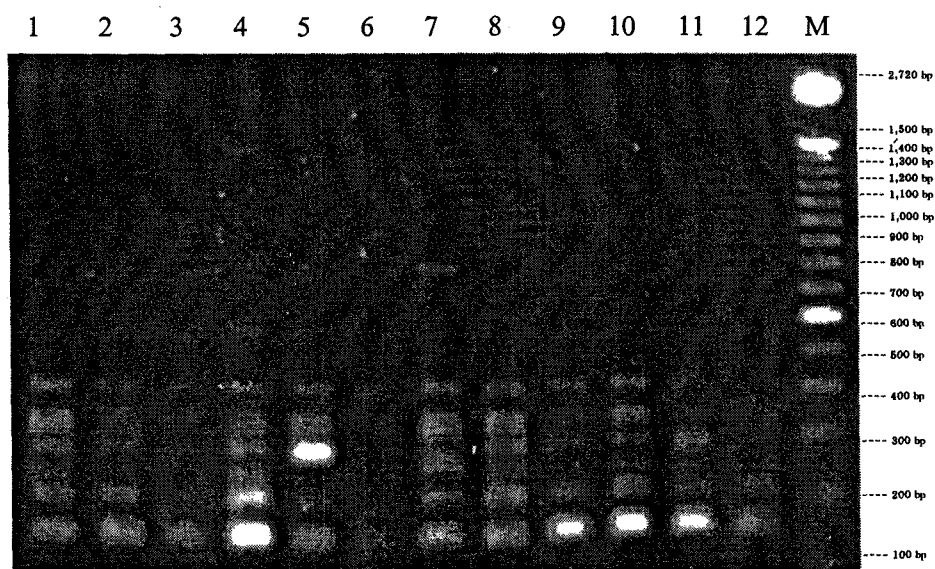
**Figure 1.22** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from rice in rotation with other crops in rainy season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICCR1; Lane 2, ICCR2; Lane 3, ICCR3; Lane 4, ICCR4; Lane 5, INCR1; Lane 6, INCR2; Lane 7, INCR3; Lane 8, INCR4; Lane 9, INEGR1; Lane 10, INEGR2; Lane 11, INEGR3 and Lane 12, INEGR4.



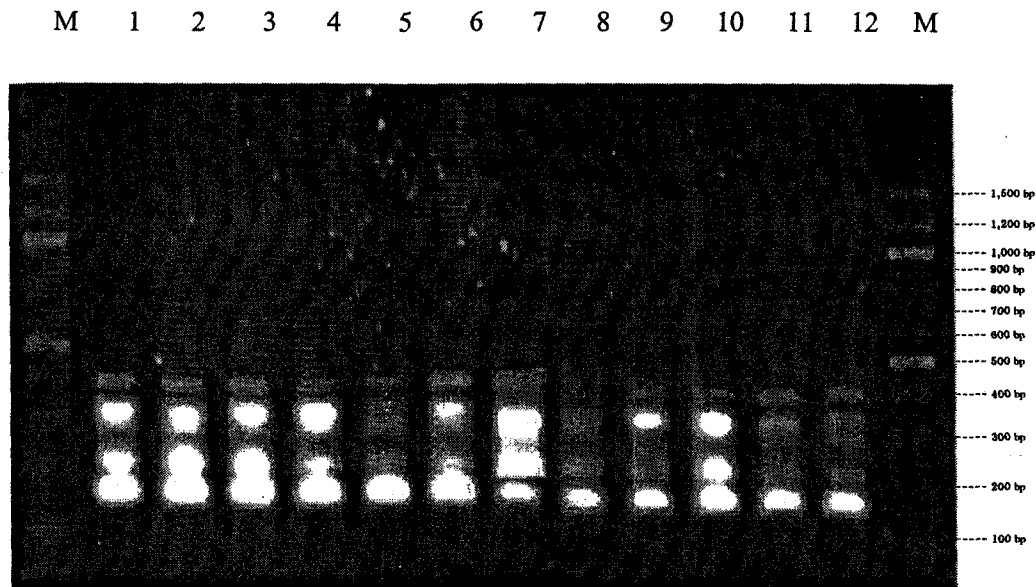
**Figure 1.23** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from rice in rotation with other crops in winter season. M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IICCR1; Lane 2, IICCR2; Lane 3, IICCR3; Lane 4, IICCR4; Lane 5, IINCR1; Lane 6, IINCR2; Lane 7, IINCR3; Lane 8, IINCR4; Lane 9, IINECR1; Lane 10, IINECR2; Lane 11, IINECR3 and Lane 12, IINECR4.

#### 4.7 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ทำการสุ่มจากบริเวณรกร้างว่างเปล่า

ในระบบนิเวศแบบนี้พบว่าทั้ง 3 ภาคมีกลุ่มไรโซเบียมที่มีความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ในทุกภาคและทุกฤดู (ดังแสดงในรูปที่ 1.24 และ 1.25) กลุ่มนี้ทุกไอโซเลตเป็นพวก slow grower และสร้างปมได้กับถั่วฝักยาว



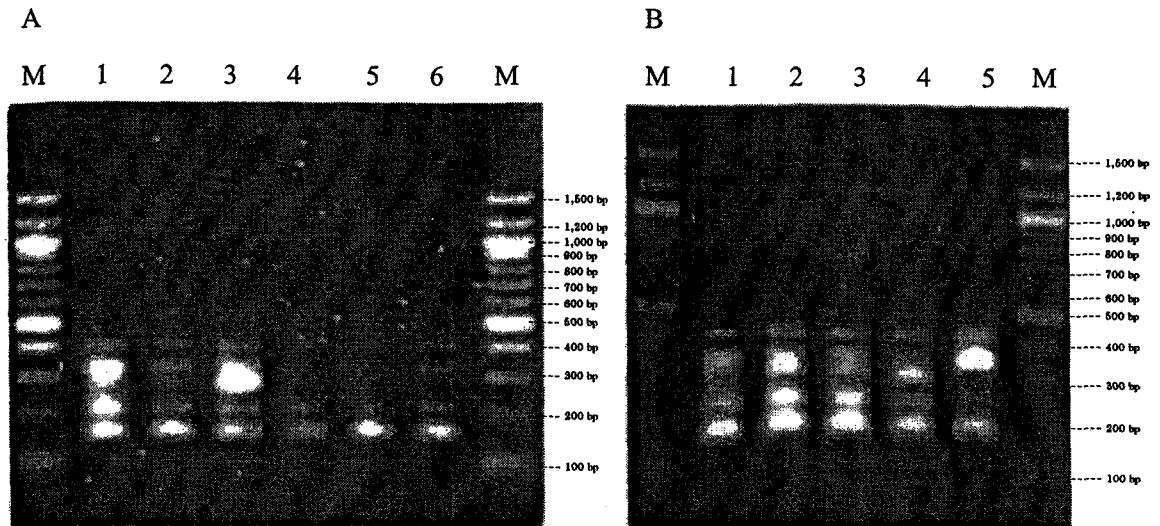
**Figure 1.24** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from uncultivated area in rainy season Lane 1, ICF1; Lane 2, ICF2; Lane 3, ICF3; Lane 4, ICF4; Lane 5, INF1; Lane 6, INF2; Lane 7, INF3; Lane 8, INF4; Lane 9, INEF1; Lane 10, INEF2; Lane 11, INEF3; Lane 12, INEF4 and M, 100 bp Ladder marker.



**Figure 1.25.** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from uncultivated area in dry season M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IICF1; Lane 2, IICF2; Lane 3, IICF3; Lane 4, IICF4; Lane 5, IINF1; Lane 6, IINF2; Lane 7, IINF3; Lane 8, IINF4; Lane 9, IINEF1; Lane 10, IINEF2; Lane 11, IINEF and Lane 12, IINEF4.

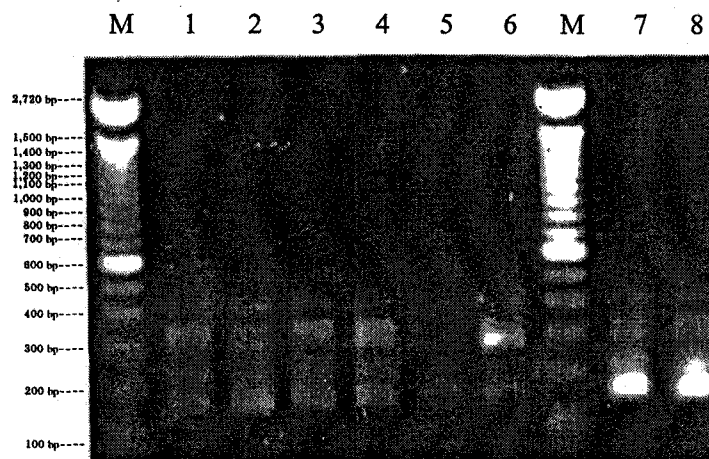
#### 4.8 การจำแนกความแตกต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่ปรากฏในระบบนิเวศที่มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางระบบนิเวศเพื่อเป็นพื้นที่ทำการเกษตร

จากการศึกษาของกลุ่มไรโซเบียมจากบริเวณป่าที่ไม่ถูกรบกวนที่ใกล้เคียงกับพื้นที่ที่ถูกทำลายไปเพื่อใช้ในการเกษตรเป็นเวลา 1-2 ปี และมากกว่า 2 ปีขึ้นไปและพื้นที่ปลูกผัก พบว่า ความหลากหลายของไรโซเบียมในพื้นที่ป่าทั้ง 3 ภาคทั้งสองฤดูมีไม่สูงนัก (ดังแสดงในรูปที่ 1.26 และ 1.27) มีสายพันธุ์หลัก ๆ ที่เป็น dominant native strain ปรากฏข้ามฤดูได้ซึ่งส่วนใหญ่เป็น slow grower บางกลุ่มสามารถสร้างปมได้ทั้งกับถั่วลิสงและถั่วฝักยาว บางกลุ่มสามารถสร้างปมได้ทั้งกับโสนและถั่วเหลือง แต่เมื่อเทียบกับไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ทำการเกษตรทั้ง 3 ประเภทกับพื้นที่ที่เป็นป่าที่ไม่ถูกรบกวนในทุกฤดูพบว่า ความหลากหลายที่พบว่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับลักษณะการสร้างปมในพืชอาศัยคือพบเพียงแต่กลุ่มที่สามารถสร้างปมในถั่วฝักยาวได้เท่านั้น จากการศึกษาครั้งนี้สามารถกล่าวได้ว่า การบุกทำลายป่าเพื่อนำพื้นที่มาใช้ในการเกษตรเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มไรโซเบียม

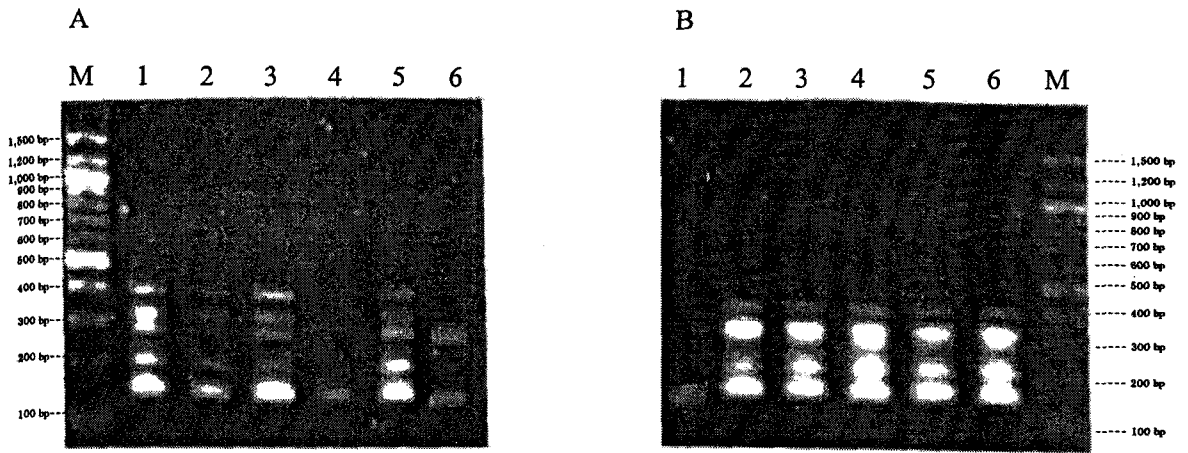


**Figure 1.26 (A,B).** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from undisturbed forest in rainy season (A) and winter season (B)

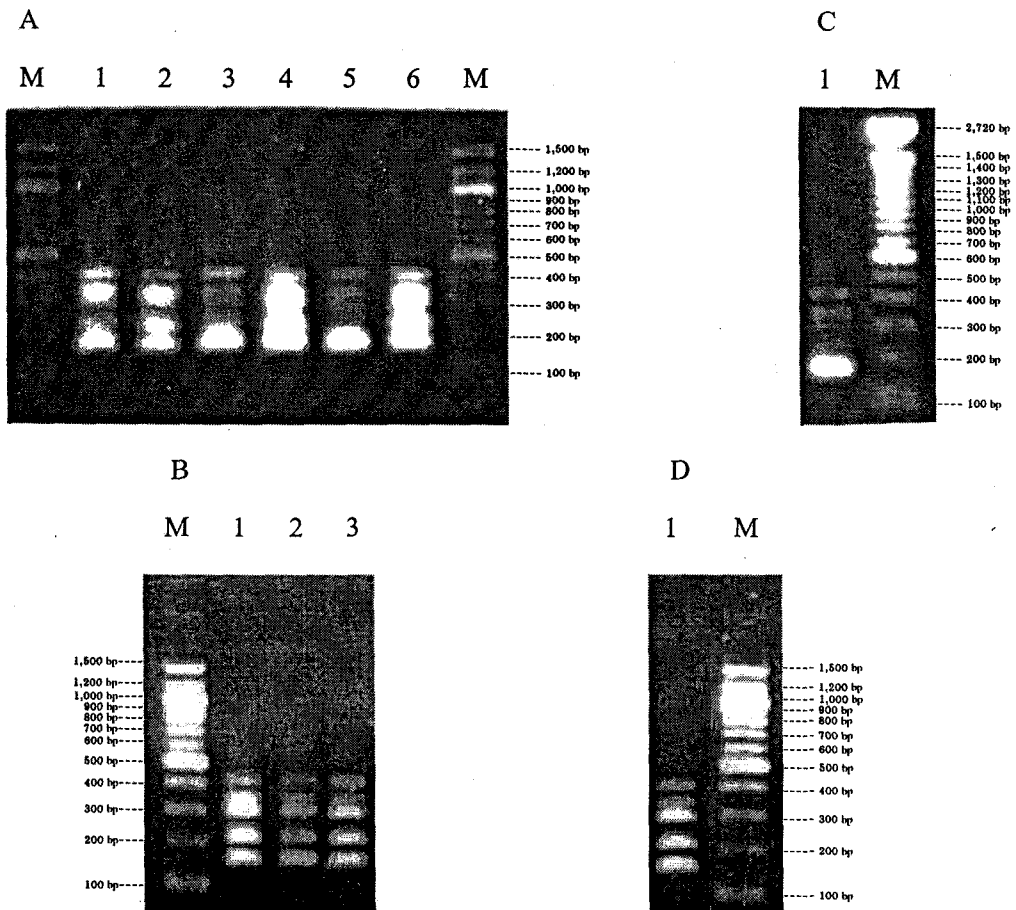
A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICA1; Lane 2, ICA2; Lane 3, INA1; Lane 4, INA2; Lane 5, INEA1 and Lane 6, INEA2. B) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIICA1; Lane 2, IIICA2; Lane 3, IIINA1; Lane 4, IIINA2 and Lane 5, IIINEA1.



**Figure 1.27** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years in rainy season (Lanes 1-6), and in winter season (Lanes 7-8). M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICB1; Lane 2, ICB2; Lane 3, INB1; Lane 4, INB2; Lane 5, INEB1; Lane 6, INEB2; Lane 7, IIICB1 and Lane 8, IIICB2.



**Figure 1.28 (A,B).** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from forest clearance for crop cultivation for 3 years in rainy season (A) and dry season (B)  
 (A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, ICC\*1; Lane 2, ICC\*2; Lane 3, INC\*1; Lane 4, INC\*2; Lane 5, INEC\*1 and Lane 6, INEC\*2. (B) Lane 1, IIICC\*1; Lane 2, IIICC\*2; Lane 3, IIINC\*1; Lane 4, IIINC\*2; Lane 5, IIINEC\*1; Lane 6, IIINEC\*2 and M, 100 bp Ladder marker.



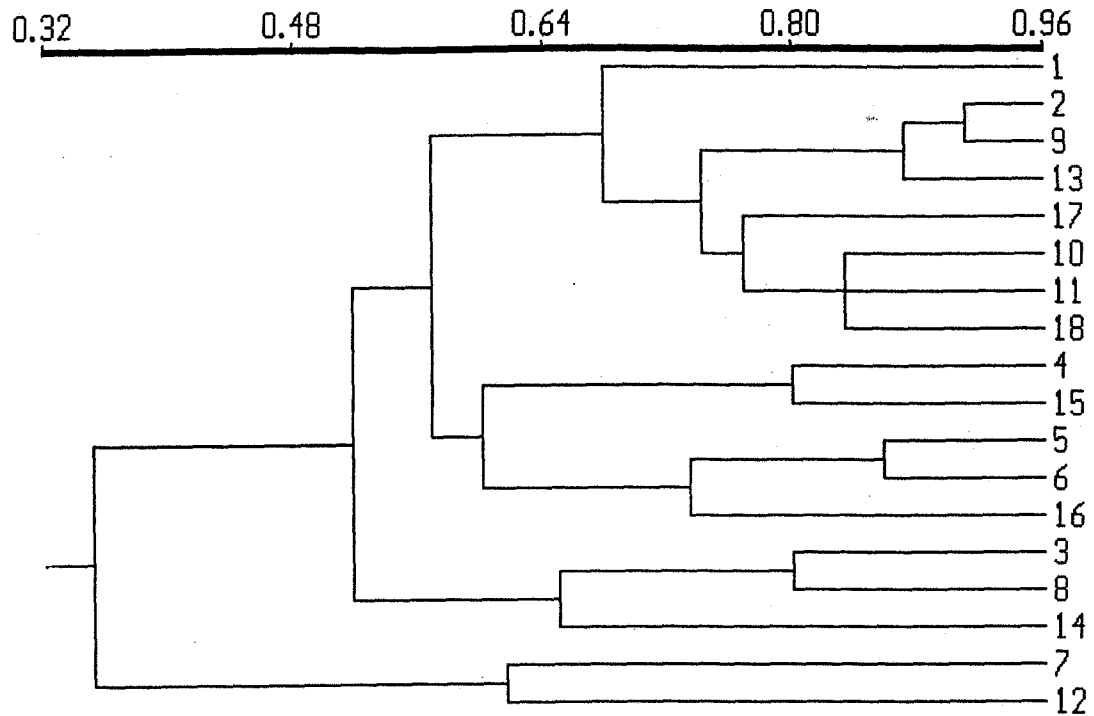
**Figure 1.29 (A,B,C,D).** PCR-RAPD patterns of rhizobial isolates from intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers in rainy season (A,B) and dry season (C,D)  
 A) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IND1; Lane 2, IND2; Lane 3, IND3; Lane 4, INED1; Lane 5, INED2 and Lane 6, INED3  
 B) M, 100 bp Ladder marker; Lane 1, IIIND1; Lane 2, IIIND2 and Lane 3, IIIND3  
 (C) Lane 1, IIINED1 and M, 100 bp Ladder marker  
 (D) Lane 1, IIINED3 and M, 100 bp Ladder marker.



การใช้ PCR-RAPD (random amplified polymorphic DNA) ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ในจุลินทรีย์ในปัจจุบันเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ genetic polymorphism ในแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (Cancilla และคณะ 1992, Fani และคณะ 1993 และ Jayrao และคณะ 1992) นอกจากนี้การใช้ RAPD ในการศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมโดย De Bruijn, 1992 ก็ยังพบว่าให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือได้อีกด้วย ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้ จึงได้นำเทคนิคมาใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ในระดับชีววิทยาของสายพันธุ์ไรโซเบียมว่า สายพันธุ์ใดมีปรากฏในฤดูกาลใดบ้างในระบบนิเวศแต่ละแบบ

จากภาพแสดง Phylogenetic tree ที่ 1.30 แสดงให้เห็นว่าไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้าที่แยกได้จากดินในประเทศทั้งหมดไม่ได้เป็น *B. japonicum* (ดังแสดงด้วยหมายเลข 1 ในภาพ) นอกจากนี้เมื่อนำ RAPD pattern ทั้งหมดมาสรุปวิเคราะห์เทียบกับแหล่งดินต่าง ๆ ในฤดูฝนและฤดูแล้งพบว่ากลุ่มไรโซเบียมที่ให้ RAPD pattern แบบที่ 2 พบได้ทั่วไปในทุกภาคและทุกฤดูกาลในขณะที่ส่วนระบบนิเวศที่เป็นภูเขา (M1 - M3) ซึ่งมีได้ถูกรบกวนจากการกระทำของมนุษย์พบที่มีความหลากหลายของไรโซเบียมสูงที่สุด รองลงมาคือ บริเวณป่า (A) ในขณะที่ระบบนิเวศที่มีการทำลายป่าเพื่อการเพาะปลูก (B และ C) รวมไปถึงแปลงปลูกผัก (D) พบว่ามีความหลากหลายน้อยที่สุด

ผลของการศึกษาพบว่าไรโซเบียมในประเทศไทยน่าจะเป็น *Bradyrhizobium* sp. ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างปมกับ cowpea (*Vigna*) เป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่สามารถสร้างปมได้กับถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ว่าถั่วเหลืองเป็นพืชดั้งเดิมในบริเวณตะวันออกเฉียงเหนือของจีน และแพร่กระจายตัวไปยังญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน และรัสเซีย ในขณะที่พืชตระกูลถั่วกลุ่ม *Vigna*, *Desmodium* และ *Sesbania* มีการแพร่กระจายตัวอยู่มากในประเทศไทย (Duke, 1981) ประกอบกับมีการพบว่าไรโซเบียมในกลุ่ม *Bradyrhizobium* มีความหลากหลายในกลุ่มสูงมาก (Heterogenous group) (Jordan, 1984) ดังเช่น ในการศึกษาของกลุ่ม *Bradyrhizobium* ที่ได้แยกจากถั่วเหลืองในประเทศไทยกับญี่ปุ่นโดย Yokoyama และคณะ, 2000 ซึ่งใช้เทคนิค RELP และการอ่านลำดับเบส ในการตรวจสอบกลุ่ม nod gene และ 16S rRNA ก็พบว่ากลุ่ม *Bradyrhizobium* ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างไปจากกลุ่มที่พบในญี่ปุ่นอย่างเห็นได้ชัด หรือแม้แต่ *Bradyrhizobium* ที่สร้างปมได้ในพืชกลุ่ม *Vigna* ในประเทศไทยเองก็พบว่ามีสายวิวัฒนาการแยกออกมาจาก *B. japonicum* และ *B. elkanii* ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษารุ่นนี้



รูปที่ 1.30 แสดง Phylogenetic tree ของรูปแบบ RAPD-PCR จากไรโซเบียมที่ทำการแยกได้จากแหล่งดินทุกตัวอย่างทั้ง 3 ภาคของประเทศในฤดูฝนและฤดูแล้ง (ตัวเลขระบุที่ปลายด้านขวาของ Phylogenetic tree แสดงถึงกลุ่มของเชื้อในตารางข้างล่างนี้)

ตารางที่ 1.8 แสดงผลการกระจายตัวของไรโซเบียมในภาคต่าง ๆ ที่พบในฤดูแล้งและฤดูฝน โดยแยกตามกลุ่มลักษณะ RAPD-PCR pattern ตามรูปที่ 1.30

พื้นที่	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง
M1	2	5	3	2, 5	2, 3, 4	5
M2	5, 6, 7	2	6	2	5, 8	2
M3	2, 10, 13	2	2	2, 5, 9, 14	2, 6, 10, 11	2, 12
C	2, 5	2	2	2	2	2
R	2, 5	2, 17	2	16	2, 15	2, 18
CR	2, 4	2	2, 4	2, 16	2	2
F	2, 17	2	2	2	2	2
A	2, 5, 8	2	2, 5	2	2, 5, 8	2
B	2	2	2	2	2	2
C	2	2	2	2	2	2
D	2	2	2	2	2	2

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้พบว่ามี *Bradyrhizobium* sp. อีกสปีชีส์หนึ่งที่มีความสามารถในการสร้างปมได้ในถั่วเหลืองได้แก่ *B. Liaoningense* (Xu และคณะ 1995) โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *B. japonicum* มากกว่า *B. elkanii* เมื่อมีการพิจารณาจากลำดับเบสบนยีน 16SrRNA แต่ในปัจจุบันได้มีการพบชุดของยีนที่มีความ conserve น้อยกว่าส่วน 16SrRNA ซึ่งได้แก่บริเวณที่เรียกว่า Internally Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งอยู่ในระหว่างชุดยีน 16S และ 23S rRNA (Youn และ คณะ 1997) จึงทำให้มีการค้นพบใหม่ว่าที่แท้ *B. Liaoningense* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดต่างไปจากเดิมเมื่อเทียบกับ *B. japonicum* (van Berkum และคณะ 2000)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าเทคนิคทางชีววิทยาอนุในการศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ ๆ ขึ้นมาตลอดเวลา ประกอบกับมีหลายการทดลองแสดงให้เห็นว่าแท้จริงแล้วความหลากหลายในกลุ่ม *Bradyrhizobium* sp. มากกว่าที่เคยคาดกันไว้ เฉพาะในกลุ่ม fast grower คณะผู้วิจัยมีแนวคิดว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bradyrhizobium* sp. ในประเทศไทย มีโอกาสที่จะได้พบสายพันธุ์ใหม่ ๆ อีกมาก โดยน่าจะมีการศึกษาต่อด้วยเทคนิค เช่น การจำแนกตามลักษณะลำดับชุดยีนที่ควบคุมการสร้างปม ถ้าจำแนกโครงสร้างของ nod factor ที่เป็น Polysaccharide ชนิดต่าง ๆ หรือการอ่านลำดับเบสบริเวณ ITS รวมไปถึงยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ gyrase ที่พบที่มีความแปรปรวนน้อยมาก เหมาะที่จะใช้ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถเกิด Horizontal gene transfer ได้ง่ายอย่างไรโซเบียม

ภาคผนวก

จุดยืนที่แท้จริงในโครงการกลุ่มไรโซเบีย

ตารางที่ ผ.1.1 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพันธ์ต่างๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	POP M <sub>1</sub> = 25.711 + 0.00201 (Moist) - 0.140** (Ts) + 0.110** (Ta) - 0.011(OM) + 5.486* (EC) - 0.051(pH) - 0.037 (level)	0.390	0.361
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	POP M <sub>2</sub> = 1.954 + 0.0206 (Moist) - 0.047(Ts) + 0.113*(Ta) - 0.072(OM) + 0.769*(EC) + 0.286 (pH) - 0.00035 (level)	0.634	0.287
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	POP M <sub>3</sub> = -2.008 + 0.00605 (Moist) + 0.0514(Ts) + 0.0289(Ta) + 0.0132(OM) + 3.561* (EC) + 0.0263(pH) + 0.0128 (level)	0.476	0.159
พีชไรต่อเนื่อง (C)	POPCC = 4.087 + 0.0151 (Moist) - 0.054(Ts) + 0.0433(Ta) + 0.033(OM) + 0.7(EC) - 0.244 (pH) - 0.04 (level)	0.586	0.176
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POPCR = 7.544 - 0.003022 (Moist) + 0.01873(Ts) - 0.154*(Ta) - 0.284 (OM) - 2.542(EC) + 0.372(pH) - 0.254 (level)	0.555	0.300
ไรต่อต้นข้าว (CR)	POPCCR = 3.245 + 0.02961** (Moist) + 0.07163(Ts) - 0.07653*(Ta) - 0.259(OM) + 3.314 (EC) - 0.373(pH) - 0.06658 (level)	0.364	0.267
พื้นที่กรังกว้างเปล่า (F)	POPFCF = 2.859 + 0.03666*(Moist) + 0.02203(Ts) - 0.06379(Ta) + 0.04419(OM) - 1.925 (EC) + 0.003886(pH) + 0.004869 (level)	0.655	0.257

หมายเหตุ POP = ประชากร

Moist = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = ค่าการนำไฟฟ้า

pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ผ.1.2 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	$POP_N M_1 = 1.463 + 0.0007014(Mois) + 0.03611(Ts) - 0.02875(Ta) - 0.0289(OM) - 0.213(EC) - 0.07467(pH) - 0.0002627 (level)$	0.153	0.123
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	$POP_N M_2 = -3.003 + 0.02539*(Mois) + 0.08457*(Ts) - 0.031(Ta) - 0.106(OM) + 2.636(EC) - 0.02795(pH) + 0.004218 (level)$	0.515	0.329
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	$POP_N M_3 = -0.729 + 0.01679**(Mois) - 0.008929(Ts) + 0.02245(Ta) - 0.02631(OM) + 0.467(EC) + 0.02714(pH) + 0.005062* (level)$	0.414	0.311
พืชไร่ต่อเนื่อง (C)	$POP_{NC} = 4.96 + 0.005528(Mois) + 0.0003376(Ts) + 0.003376(Ta) - 0.193(OM) - 0.308(EC) + 0.145(pH) - 0.009631** (level)$	0.336	0.611
ข้าวต่อเนื่อง (R)	$POP_{NR} = 6.056 + 0.01168**(Mois) - 0.02187(Ts) + 0.0107(Ta) - 0.09737(OM) - 2.334(EC) + 0.05806(pH) - 0.01569* (level)$	0.405	0.328
ไร่สลับข้าว (CR)	$POP_{NCR} = 3.010 + 0.004524(Mois) - 0.01213(Ts) + 0.03348(Ta) - 0.07143(OM) - 3.095(EC) - 0.186(pH) + 0.0005703 (level)$	0.401	0.157
พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (F)	$POP_{NF} = 1.394 + 0.00837(Mois) - 0.004119(Ts) - 0.01999(Ta) - 0.001691(OM) - 1.082*(EC) + 0.07338(pH) + 0.003476 (level)$	0.406	0.325

หมายเหตุ POP = ประชากร Mois = % ความชื้น  
 Ts = อุณหภูมิ (°C) Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)  
 OM = อินทรีย์วัตถุ EC = ค่าการนำไฟฟ้า  
 pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง level = ความสูงของพื้นที่

**ตารางที่ ผ.1.3** ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	POPNE M <sub>1</sub> = -159.072 + 0.0264(Mois) - 0.0098(Ts) + 0.0152(Ta) - 0.141(OM) - 3.572(EC) - 0.286(pH) + 0.124 (level)	0.647	0.261
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	POPNE M <sub>2</sub> = 29.68 + 0.00297(Mois) - 0.121(Ts) - 0.067(Ta) + 0.0254(OM) - 2.972(EC) - 0.161(pH) - 0.019 (level)	0.550	0.370
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	POPNE M <sub>3</sub> = -21.868 + 0.0333*(Mois) - 0.078(Ts) - 0.094(Ta) + 0.00817(OM) - 1.499(EC) - 0.484(pH) + 0.0431 (level)	0.488	0.518
พีชไรต์ต่อเนื่อง (C)	POPNEC = 4.372 + 0.0443(Mois) + 0.04794(Ts) - 0.03785(Ta) - 0.160(OM) + 2.004(EC) - 0.0004928(pH) - 0.01307 (level)	0.689	0.135
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POPNER = 0.922 - 0.0012(Mois) - 0.084*(Ts) + 0.121*(Ta) - 0.0096(OM) - 0.910 (EC) + 0.0406(pH) - 0.0037 (level)	0.543	0.183
ไรต์สลับข้าว (CR)	POPNECR = - 2.839 - 0.0055(Mois) - 0.032(Ts) + 0.0618(Ta) + 0.448(OM) - 3.452(EC) + 0.284(pH) + 0.00916 (level)	0.563	1.073
พื้นที่กรังวาลเปล้า (F)	POPNEF = 8.193 + 0.0943**(Mois) + 0.002095(Ts) - 0.02085(Ta) - 0.06931(OM) + 2.693(EC) - 0.723**(pH) - 0.008356 (level)	0.470	0.420

หมายเหตุ POP = ประชากร

Mois = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = ค่าการนำไฟฟ้า

pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ๕.1.4 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	$POPCA = 25.019 + 0.04686^{**}(\text{Mois}) - 0.108(\text{Ts}) + 0.02092(\text{Ta}) - 1.217^{**}(\text{level})$	0.314	0.696
ปลูกพืช 1 ปี (B)	$POPCB = 1.833 - 0.03604^{*}(\text{Mois}) + 0.003914(\text{Ts}) - 0.03991(\text{Ta}) + 0.103(\text{level})$	0.679	0.358
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	$POPCC^{*} = 7.837 - 0.006642(\text{Mois}) + 0.16(\text{Ts}) - 0.217(\text{Ta}) - 0.127(\text{level})$	0.759	0.240
ปลูกผัก (D)	$POPCCD = -5.3 + 0.0007843(\text{Mois}) - 0.08183(\text{Ts}) + 0.268(\text{Ta}) + 0.04566(\text{level})$	0.379	0.350

หมายเหตุ      POP = ประชากร      Mois = % ความชื้น  
 Ts = อุณหภูมิดิน (°C)      Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)  
 level = ความสูงของพื้นที่



ตารางที่ ๗.1.5 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POPNA = -2.082 + 0.02481(Mois) - 0.04047(Ts) + 0.01654(Ta) + 0.01202 (level)	1.839	0.191
ปลูกพืช 1 ปี (B)	POPNB = 9.784 + 0.003789(Mois) - 0.03958(Ts) - 0.05729(Ta) - 0.01812 (level)	0.646	0.134
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	POPNC* = 12.225 - 0.00003793(Mois) + 0.02894(Ts) - 0.09212(Ta) - 0.02681 (level)	0.605	0.140
ปลูกผัก (D)	POPND = -2.643 - 0.007449(Mois) + 0.05228(Ts) - 0.01672(Ta) + 0.0197 (level)	0.989	0.044

หมายเหตุ POP = ประชากร Moiss = % ความชื้น  
 Ts = อุณหภูมิดิน (°C) Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)  
 level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ผ.1.6 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากรไรโซเบียมพันธ์ุต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POPNEA = -1.59 + 0.005863(Mois) - 0.08979(Ts) + 0.06121(Ta) + 0.01668 (level)	0.490	0.309
ปลูกพืช 1 ปี (B)	POPNEB = 3.833 + 0.01485(Mois) - 0.02361(Ts) - 0.06654(Ta) + 0.001028 (level)	0.380	0.606
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	POPNEC* = 1.689 - 0.0118(Mois) - 0.04915(Ts) - 0.0131(Ta) + 0.0126 (level)	0.410	0.373
ปลูกผัก (D)	POPNE D = 0.877 + 0.01327(Mois) + 0.07002(Ts) - 0.05449(Ta) - 0.006003 (level)	0.356	0.265

หมายเหตุ POP = ประชากร      Mois = % ความชื้น  
 Ts = อุณหภูมิดิน (°C)      Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)  
 level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ๗.1.7 Antibiotic resistant profiles of rhizobial isolates in rainy season.

Group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
1	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	S <sub>m</sub>	INEM <sub>1</sub> -2, INEM <sub>1</sub> -3, INEM <sub>2</sub> -4, INEM <sub>3</sub> -1, INEM <sub>3</sub> -2, INEM <sub>3</sub> -3, INEA1, INEC*2
2	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICC*1, IND1, IND3, INEB2
3	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICB1, ICC*2, INEM <sub>2</sub> -2, INER2
4	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	S <sub>m</sub>	ICM <sub>3</sub> -1, INM <sub>1</sub> -1, INB1
5	r	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	INF1, INA2, INEM <sub>1</sub> -4
6	r	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	ICCR2, ICF4, INEF4
7	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICC1, ICC2, IND2
8	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICM <sub>1</sub> -4, INCR2
9	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	s	ICM <sub>3</sub> -4, INF4
10	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICC3, ICCR4
11	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	s	ICR1, ICF1
12	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	ICC4, INR2
13	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	S <sub>m</sub>	ICR4, INA1
14	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICCR1, INF2
15	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	ICF2, ICA1
16	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICB2, INC*1
17	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	INM <sub>1</sub> -2, INM <sub>3</sub> -4
18	s	s	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	INM <sub>1</sub> -4, INM <sub>2</sub> -4
19	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	INC1, INEM <sub>1</sub> -1
20	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INC2, INED1
21	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	r	r	s	INER1, INER3
22	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	INECR1, INECR2
23	r	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	INECR4, INEF2
24	r	S <sub>m</sub>	s	r	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INEF3, INED2

ตารางที่ ผ.1.7 (ต่อ)

Group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
25	r	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	r	r	s	ICM <sub>1</sub> -1
26	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	ICM <sub>1</sub> -3
27	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	ICM <sub>2</sub> -1
28	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	s	ICM <sub>2</sub> -2
29	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	S <sub>m</sub>	ICM <sub>2</sub> -3
30	r	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICM <sub>2</sub> -4
31	s	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICM <sub>3</sub> -2
32	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	ICM <sub>3</sub> -3
33	r	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	s	ICR2
34	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	ICCR3
35	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	ICA2
36	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	INM <sub>2</sub> -1
37	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	INM <sub>2</sub> -2
38	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	INM <sub>2</sub> -3
39	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	s	INM <sub>3</sub> -1
40	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	INM <sub>3</sub> -2
41	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	r	s	INM <sub>3</sub> -3
42	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	INC3
43	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	INC4
44	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	INR1
45	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INR4
46	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INCR1
47	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	INCR3
48	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	s	s	INCR4
49	s	s	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	INF3
50	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	INB2

ตารางที่ ผ.1.7 (ต่อ)

Group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
51	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	S <sub>m</sub>	INC*1
52	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	INEM <sub>2</sub> -1
53	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	INEM <sub>2</sub> -3
54	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	s	INEM <sub>3</sub> -4
55	s	s	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	INEC1
56	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	r	r	S <sub>m</sub>	INEC2
57	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INEC3
58	r	S <sub>m</sub>	s	r	r	r	r	S <sub>m</sub>	INEC4
59	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	INER4
60	r	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INER3
61	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	r	INEF1
62	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	r	s	INEA2
63	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INEB1
64	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	INEC*1
65	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	INED3
66	s	s	s	R	s	r	s	s	<i>R. leguminosarum</i>
67	s	s	s	S <sub>m</sub>	s	r	s	s	<i>R. cerciri</i>
68	s	s	s	R	s	S <sub>m</sub>	s	r	<i>R. elti</i>
69	s	s	s	R	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	<i>R. Huakii</i>
70	r	s	s	S <sub>m</sub>	s	r	s	s	<i>R. trifolii</i>
71	r	s	s	R	s	r	s	s	<i>R. tropici</i>
72	s	r	s	R	s	r	r	r	<i>B. japonicum</i>

ตารางที่ ๘.1.8. Antibiotic resistant profiles of rhizobial isolates in dry season.

group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
1	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICR1, IINM <sub>2</sub> -2, IIINF1, IIINF2, IIINECR2, IIINEF1, IIINFC*1
2	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICR2, IIICR3, IINR1, IINCRC2, IIINEC1, IINEM <sub>3</sub> -3
3	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	r	s	IIICM <sub>2</sub> -2, IINM <sub>2</sub> -1, IINM <sub>2</sub> -3, IINEM <sub>1</sub> -2, IINEM <sub>1</sub> -4
4	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>3</sub> -3, IICNR4, IINEM <sub>2</sub> -3, IINEM <sub>2</sub> -4
5	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>3</sub> -4, IIINC2, IIINEC4
6	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	r	IINM <sub>3</sub> -2, IINCRC1, IINER4
7	r	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIINF4, IIINECR1, IIINECR4
8	s	s	s	s	s	s	s	s	IINEM <sub>1</sub> -1, IINEM <sub>1</sub> -3, IINER3
9	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>2</sub> -1, IIICM <sub>2</sub> -4
10	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>2</sub> -3, IIICC1
11	r	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>3</sub> -1, IINER1
12	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICC2, IIICC3
13	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICR4, IIICCR1
14	r	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIICCR2, IIICCR4
15	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	s	IINM <sub>2</sub> -4, IIINF3
16	r	r	S <sub>m</sub>	r	s	r	r	s	IINM <sub>3</sub> -1, IINM <sub>3</sub> -3
17	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	r	S <sub>m</sub>	IINM <sub>3</sub> -4, IIINC3
18	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IINCRC3, IINEM <sub>2</sub> -2
19	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	IIINC*1, IIINC*2
20	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	IIICM <sub>1</sub> -1
21	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>1</sub> -2
22	s	s	s	s	s	r	s	s	IIICM <sub>1</sub> -4

ตารางที่ ผ.1.8. (ต่อ)

group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
23	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICM <sub>3</sub> -2
24	s	s	s	r	s	r	r	S <sub>m</sub>	IIICC4
25	r	S <sub>m</sub>	s	r	r	r	r	r	IIICCR3
26	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	s	IIICF1
27	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	IIICF2
28	r	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICF3
29	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	IIICF4
30	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	IIICA1
31	r	r	s	S <sub>m</sub>	r	r	r	s	IIICA2
32	S <sub>m</sub>	r	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICB1
33	r	r	s	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIICB2
34	r	r	S <sub>m</sub>	r	s	r	r	S <sub>m</sub>	IIICC*1
35	S <sub>m</sub>	r	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIICC*2
36	s	s	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	s	IIINC1
37	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIINC4
38	r	r	S <sub>m</sub>	r	s	r	S <sub>m</sub>	s	IIINR2
39	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	s	s	s	s	s	IIINR3
40	s	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	IIINR4
41	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	r	r	s	IIINA1
42	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIINA2
43	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	r	S <sub>m</sub>	IIIND1
44	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	IIIND2
45	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	r	S <sub>m</sub>	r	IIIND1
46	r	r	r	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	r	s	IIINEM <sub>3</sub> -1
47	r	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	IIINEM <sub>3</sub> -2

## ตารางที่ ผ.1.8. (ต่อ)

group	Antibiotic resistant profiles								Rhizobial isolates
	Car	Chl	Ery	Nal	Kan	Tmp	Tet	Str	
48	s	r	s	r	s	r	s	s	IIINEM <sub>3</sub> -4
49	s	r	s	s	s	s	s	s	IIINEC2
50	S <sub>m</sub>	s	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	s	IIINEC3
51	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	r	s	r	r	S <sub>m</sub>	IIINECR3
52	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	r	IIINEF2
53	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	S <sub>m</sub>	IIINEF3
54	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIINEF4
55	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	r	s	r	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIINEA1
56	s	S <sub>m</sub>	s	r	s	r	S <sub>m</sub>	s	IIINEC*2
57	s	r	s	S <sub>m</sub>	s	r	S <sub>m</sub>	s	IIINED1
58	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	S <sub>m</sub>	IIINED3
59	s	s	s	r	s	r	s	s	<i>R. leguminosarum</i>
60	s	s	s	S <sub>m</sub>	s	r	s	s	<i>R. cerciri</i>
61	s	s	s	r	s	S <sub>m</sub>	s	r	<i>R. elti</i>
62	s	s	s	r	s	S <sub>m</sub>	s	S <sub>m</sub>	<i>R. Huakii</i>
63	r	s	s	S <sub>m</sub>	s	r	s	s	<i>R. trifolii</i>
64	r	s	s	r	s	r	s	s	<i>R. tropici</i>
65	s	r	s	r	s	r	r	r	<i>B. japonicum</i>



ตารางที่ ๗.1.9 The host dependent cross-inoculation group of rhizobia in rainy season.

Isolate	Host plant
ICM <sub>1</sub> -1	Cowpea
ICM <sub>1</sub> -4	Cowpea
ICM <sub>2</sub> -1	Cowpea
ICM <sub>2</sub> -2	Cowpea
ICM <sub>2</sub> -3	Cowpea
ICM <sub>2</sub> -4	Cowpea
ICM <sub>3</sub> -1	Cowpea
ICM <sub>3</sub> -2	Cowpea
ICM <sub>3</sub> -3	Cowpea
ICM <sub>3</sub> -4	Cowpea
ICC1	Cowpea
ICC2	Cowpea
ICC3	Cowpea
ICC4	Cowpea
ICR1	Cowpea
ICR2	Cowpea
ICR4	Cowpea
ICCR1	Cowpea
ICCR2	Cowpea
ICCR3	Cowpea
ICCR4	Cowpea
ICF1	Cowpea
ICF2	Cowpea
ICF3	Cowpea
ICF4	Cowpea, Soy bean
ICA1	Cowpea

ตารางที่ ผ.1.9 (ต่อ)

Isolate	Host plant
ICA2	Cowpea
ICB1	Cowpea
ICB2	Cowpea
ICC*1	Cowpea
ICC*2	Cowpea
INM <sub>1</sub> -1	Cowpea
INM <sub>1</sub> -2	Cowpea
INM <sub>1</sub> -4	Cowpea
INM <sub>2</sub> -1	Cowpea
INM <sub>2</sub> -2	Cowpea
INM <sub>2</sub> -3	Cowpea, Soy bean
INM <sub>2</sub> -4	Cowpea
INM <sub>3</sub> -1	Cowpea
INM <sub>3</sub> -2	Cowpea
INM <sub>3</sub> -3	Cowpea, Soy bean
INM <sub>3</sub> -4	Cowpea
INC1	Cowpea
INC2	Cowpea
INC3	Cowpea
INC4	Cowpea
INR1	Cowpea
INR2	Cowpea
INR4	Cowpea
INCR1	Cowpea
INCR2	Cowpea
INCR3	Cowpea
INCR4	Cowpea

## ตารางที่ ผ.1.9 (ต่อ)

Isolate	Host plant
INF1	Cowpea
INF2	Cowpea
INF3	Cowpea, Soy bean
INF4	Cowpea
INA1	Cowpea
INA2	Soy bean, <i>Sesbania rostrata</i>
INB1	Cowpea
INB2	Cowpea
INC*1	Cowpea
INC*2	Cowpea
IND1	Cowpea
IND2	Cowpea
IND3	Cowpea, Soy bean
INEM <sub>1</sub> -1	Cowpea
INEM <sub>1</sub> -2	Cowpea
INEM <sub>1</sub> -3	Cowpea
INEM <sub>1</sub> -4	Cowpea
INEM <sub>2</sub> -1	Cowpea
INEM <sub>2</sub> -2	Cowpea
INEM <sub>2</sub> -3	Cowpea
INEM <sub>2</sub> -4	Cowpea
INEM <sub>3</sub> -1	Cowpea
INEM <sub>3</sub> -2	Soy bean
INEM <sub>3</sub> -3	Cowpea
INEM <sub>3</sub> -4	Cowpea
INEC1	Cowpea

## ตารางที่ ผ.1.9 (ต่อ)

Isolate	Host plant
INEC2	Cowpea
INEC3	Cowpea
INEC4	Cowpea
INER1	Cowpea
INER2	Cowpea
INER3	Cowpea
INER4	Cowpea
INECR1	Soy bean
INECR2	Soy bean
INECR3	Cowpea
INECR4	Cowpea
INEF1	Cowpea
INEF2	Cowpea
INEF3	Cowpea
INEF4	Cowpea
INEA1	Cowpea
INEA2	Cowpea
INEB1	Cowpea
INEB2	Cowpea
INEC*1	Cowpea
INEC*2	Cowpea
INED1	Cowpea
INED2	Cowpea
INED3	Cowpea

ตารางที่ ผ.1.10. The host dependent cross-inoculation group of rhizobia in dry season.

Isolate	Host plant
IIICM <sub>1</sub> -1	Cowpea
IIICM <sub>1</sub> -2	Cowpea
IIICM <sub>1</sub> -3	Cowpea
IIICM <sub>1</sub> -4	Cowpea
IIICM <sub>2</sub> -1	Cowpea
IIICM <sub>2</sub> -2	Cowpea
IIICM <sub>2</sub> -3	Cowpea
IIICM <sub>2</sub> -4	Cowpea
IIICM <sub>3</sub> -1	Cowpea
IIICM <sub>3</sub> -2	Cowpea
IIICM <sub>3</sub> -3	Cowpea
IIICM <sub>3</sub> -4	Cowpea, Soy bean
IIICC1	Cowpea
IIICC2	Cowpea
IIICC3	Cowpea
IIICC4	Cowpea
IIICR1	Cowpea
IIICR2	Soy bean
IIICR3	Cowpea
IIICR4	Cowpea
IIICCR1	Cowpea
IIICCR2	Cowpea
IIICCR3	Cowpea
IIICCR4	Cowpea
IIICF1	Cowpea
IIICF2	Cowpea

## ตารางที่ ผ.1.10. (ต่อ)

Isolate	Host plant
IIICF3	Soy bean
IIICF4	Cowpea
IIICA1	Cowpea
IIICA2	Cowpea, Soy bean
IIICB1	Cowpea
IIICB2	Cowpea
IIICC*1	Cowpea
IIICC*2	Cowpea
IIINM <sub>2</sub> -1	Cowpea
IIINM <sub>2</sub> -2	Cowpea
IIINM <sub>2</sub> -3	Cowpea , Soy bean
IIINM <sub>2</sub> -4	Cowpea
IIINM <sub>3</sub> -1	Cowpea
IIINM <sub>3</sub> -2	Cowpea , Soy bean
IIINM <sub>3</sub> -3	Cowpea
IIINM <sub>3</sub> -4	Cowpea, Soybean
IIINC1	Cowpea
IIINC2	Cowpea
IIINC3	Cowpea
IIINC4	Cowpea
IIINR1	Cowpea
IIINR2	Cowpea
IIINR3	Cowpea
IIINR4	Cowpea
IIINCR1	Cowpea
IIINCR2	Cowpea
IIINCR3	Cowpea

## ตารางที่ ผ.1.10. (ต่อ)

Isolate	Host plant
IIINCR4	Cowpea
IIINF1	Cowpea
IIINF2	Cowpea
IIINF3	Cowpea
IIINF4	Cowpea
IIINA1	Cowpea , Soy bean
IIINA2	Cowpea , Soy bean
IIINC*1	Cowpea
IIINC*2	Cowpea
IIINEM <sub>1</sub> -1	Cowpea , <i>Sesbania rostrata</i>
IIINEM <sub>1</sub> -2	Cowpea
IIINEM <sub>1</sub> -3	Cowpea
IIINEM <sub>1</sub> -4	Cowpea
IIINEM <sub>2</sub> -2	Cowpea , <i>Sesbania rostrata</i>
IIINEM <sub>2</sub> -3	Cowpea
IIINEM <sub>2</sub> -4	Cowpea
IIINEM <sub>3</sub> -1	Cowpea
IIINEM <sub>3</sub> -2	Cowpea
IIINEM <sub>3</sub> -3	Cowpea
IIINEM <sub>3</sub> -4	Cowpea , Soy bean
IIINEC1	Cowpea
IIINEC2	Cowpea
IIINEC3	Cowpea
IIINEC4	Cowpea , Soy bean
IIINER1	Cowpea, Soybean
IIINER3	Cowpea
IIINER4	Cowpea , Soy bean

ตารางที่ ผ.1.10. (ต่อ)

Isolate	Host plant
IIINECR1	Cowpea
IIINECR2	Cowpea
IIINECR3	Cowpea
IIINECR4	Cowpea
IIINEF1	Cowpea
IIINEF2	Cowpea
IIINEF3	Cowpea
IIINEF4	Cowpea
IIINEA1	Cowpea
IIINEC*1	Cowpea
IIINEC*2	Cowpea
IIINED1	Cowpea



## ส่วนที่ 2

# จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่ม ไซยาโนแบคทีเรีย (CYANOBACTERIA)

## จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (วัตถุประสงค์ที่ 1-3)

### บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปตั้งแต่เขตร้อนจนถึงขั้วโลก เช่น *Nostoc commune* (Liengen และ Olsen 1997) และพบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีอีกด้วย โดยภาพรวมไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีทั้งพวกที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวและพวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ทั้งที่มีการสร้างและไม่มีการสร้าง Heterocyst (Wanabe และคณะ 1951) โดยพบว่ากลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีทั้งหมด 28 สกุล ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน รวมไปถึงบางสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทั้ง 2 สภาวะ เช่น *Alphanothece* เป็นต้น (Kaplan และคณะ 1980)

โครงสร้างของเซลล์ที่มีบทบาทต่อการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ Heterocyst ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังหนาสามารถผลิต ATP โดยกระบวนการ phosphorylation และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่มีอากาศ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่มี Heterocyst เช่น กลุ่มที่เป็น unicellular (เซลล์เดี่ยว) ก็จะมีเอนไซม์ nitrogenase อยู่ภายใน vegetable cell ได้แก่จีส *Synechococcus* เป็นต้น

แม้ว่าจะได้มีผู้ศึกษาวิจัยความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในประเทศไทยมาบ้างแล้ว แต่ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่ศึกษาจากในสภาวะแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำหรือกลุ่มที่อยู่รวมกันเป็นแบบ symbiosis ในແหนແคงเพื่อนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ แต่สำหรับการศึกษารังนี้จักได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพจากระบบนิเวศที่เป็นดินจากสภาพแวดล้อมแบบต่าง ๆ รวมไปถึงพลวัตรของประชากรและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ด้วย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อนับจำนวน Cyanobacteria

การนับจำนวน Cyanobacteria ในตัวอย่างดินโดยวิธี MPN โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ มาชั่งน้ำหนักหนักตัวอย่างละ 50 กรัม เขย่าใน flask ที่มีน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร นำมาทำ 10 fold dilution technique จาก  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  โดยดูดตัวอย่างจาก dilution ที่ 1 ใน flask จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน test tube ที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้ออยู่ 9 มิลลิลิตร เป็น dilution ที่ 2 หรือ  $10^{-2}$  ทำเช่นเดียวกันจนถึง  $10^{-6}$

### 2. วิธีการทำ MPN

เตรียมสารละลายเลี้ยง Cyanobacteria โดยใช้อาหาร BG<sub>11</sub> ประกอบด้วย MgSO<sub>4</sub> 0.31 mM., Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.19 mM., CaCl<sub>2</sub> 0.24 mM., Citric acid 0.03 mM., FeNH<sub>4</sub> citrate 0.01 mM., Na<sub>2</sub>EDTA 0.03 mM., K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.22 mM. และสารละลาย A micronutrient ใส่สารละลายที่เตรียมได้ใน test tube หลอดละ 9 มิลลิลิตร ดูดสารละลายดินที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ แล้วนำ test tube ทั้งหมดไป incubate ภายใต้แสงที่มีความเข้มประมาณ  $400 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 25 ถึง 30 วัน แล้วนับจำนวนหลอดที่มี Cyanobacteria ขึ้น นำไปเทียบจำนวนเซลล์ของ Cyanobacteria จากตาราง MPN แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม พร้อมกับวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

### 3. การแยกเชื้อ Cyanobacteria

เพื่อให้ Cyanobacteria แยกออกเป็นชนิดเดี่ยว ๆ จำเป็นต้องทำ dilution plating technique โดยทำการเท plate ด้วย media BG<sub>11</sub> agar medium ที่ไว้จนวันแข็งตัว แล้วนำตัวอย่างสารละลายดินใน dilution ตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  จากตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน dilution ละ 1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารวุ้นแล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วให้ทั่วผิวของ medium ทำ dilution ละ 3 plate นำไป incubate นาน 25-30 วัน โดยสังเกตว่าไม่มี colony ใหม่ของ Cyanobacteria เกิดขึ้นแล้วจึงนำมาแยก colony ที่เกิดขึ้นเดี่ยว ๆ เก็บไว้ใน test tube ที่มี slant agar medium อยู่ เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและศึกษาการตรึงไนโตรเจนต่อไป

### 4. การตรวจวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA)

การตรวจวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Grant *et al.* (1985) นำ cyanobacteria มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG<sub>11</sub> ดูดเอาก๊าซภายในขวดที่ใช้บ่มออก 10% และใส่ acetylene ที่บริสุทธิ์เข้าไปแทนที่ โดยใช้ acetylene 10% ของปริมาตรอากาศทั้งหมดในขวด นำไปบ่มในบริเวณที่มีแสงสว่าง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องครบกำหนดแล้วเก็บตัว

อย่างก๊าซในภาชนะ 10 ml ไว้ใน vacutainer เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ ethylene ซึ่งจะใช้ตัวอย่างก๊าซที่เก็บในหลอด vacutainer จำนวน 10 ml ฉีดเข้าเครื่อง gas chromatograph

## 5. การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ตามวิธีของ Wintermans and Demots (1965) ดูดสารละลาย 10 ml นำไปปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบ/15 นาที นำตะกอนที่ได้เติมด้วย ethanol 95% ปริมาณ 5 ml จากนั้นบดละเอียดโดยเครื่อง Homogenizer เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ส่วนใสที่ความยาวคลื่น 665 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ ethanol 95% เป็น reference

## 6. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้น้ำหนักแห้ง นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ออบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษกรองใส่ในโถดูดความชื้น รองกระดาษกรองเย็น นำมาชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองสาหร่าย ที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 10 ml นำกระดาษกรองที่กรองสาหร่ายแล้วไปอบให้แห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80°C นาน 48 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (mg/ml) (ประภคิต, 2536)

## 7. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีของ Lowry *et al* (1951) หลังจากการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% 0.5 ml 1N NaOH 0.1 ml นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เมื่อต้มเสร็จแล้วปรับปริมาตรส่วนผสมให้ได้ 1 ml ด้วยน้ำกลั่น ใส่สารละลาย C (สารละลาย Na หรือ K Tartrate 2% 1 ml ผสมกับ CuSO<sub>4</sub> 1% 1 ml เข้าด้วยกันแล้วเอาส่วนผสมนี้ 1 ml ผสมกับสารละลาย NaCO<sub>3</sub> 2% ใน 0.1N NaOH 50 ml) ลงในหลอดตัวอย่างหลอดละ 5 ml ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลาย Phenol 1 N ลงไป 0.5 ml ผสมกันทันทีให้ทั่วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrophotometer Spectronic-21 โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 660 nm โดยใช้ NaOH 0.1 N เป็น Blank และเปรียบเทียบกับ Standard Curve ของปริมาณโปรตีน BSA (Bovin Serum Albumin) ละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่ทราบค่าหน่วยเป็น (µg/ml)

#### 8. วิธีการนับจำนวนเซลล์

สาหร่ายที่จะนำมานับต้องทำให้อยู่ในสภาพการกระจายแบบสุ่ม (random distribution) โดยนำเข้าเครื่องปั่นให้เซลล์แยกจากกัน ถ้าเป็นสาหร่ายที่ขณะเจริญจะต้องไปเกาะติดผนังของภาชนะพวกนี้ ต้องชูดออกเสียก่อนแล้วจึงนำไปปั่นให้เซลล์หลุดออกจากกัน (จงจินต์, 2524) การนับจำนวนเซลล์ใช้ Petroff-hausser counting chamber โดยการหยดตัวอย่างบนสไลด์ปิดกระจก (cover glass) รอให้เซลล์ตกตะกอนประมาณ 4-5 นาที ทำการนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เลื่อนสไลด์ให้ตรงกับกริด

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ คือ บริเวณภูเขา 3 ระดับ ได้แก่ ยอดเขา กลางเขา และเชิงเขา และพื้นที่ทำการเกษตร บริเวณปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่อง พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง และพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว เปรียบเทียบกับพื้นที่บริเวณรกร้างว่างเปล่า ในภาคเหนือ, ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยทำการเก็บตัวอย่างดินห่างกันทุก 2 เดือน จำนวน 14 ครั้ง ผลการศึกษามีดังนี้คือ

**วัตถุประสงค์ที่ 1 :** เพื่อให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของไซยาโนแบคทีเรีย

จำนวนประชากรของ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินจากการประเมินด้วยวิธี MPN มีจำนวนแตกต่างกันตามพื้นที่และระยะเวลาในการศึกษาดังนี้

### 1.1 ภาคเหนือ

ประชากรของ Cyanobacteria ในภาคเหนือ (ตารางที่ 2.1) พบว่า ในแต่ละครั้งที่เก็บตั้งแต่ครั้งที่ 1 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2540 ถึงครั้งที่ 15 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 จำนวนประชากรบริเวณพื้นที่ภูเขาทั้ง 3 ระดับ และพื้นที่รกร้างว่างเปล่ามีจำนวนน้อยกว่าบริเวณที่ทำการเกษตร (รูปที่ 2.1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ใช้ปลูกพืชไร่สลับข้าวจะมีจำนวนประชากร Cyanobacteria มากที่สุด คือ ประมาณ 1.30 ถึง 3.36 log number of cell/g soil ในขณะที่บริเวณที่รกร้างว่างเปล่ามีแนวโน้มว่ามีประชากรน้อยกว่าพื้นที่อื่น ๆ กล่าวคือ มีประชากรประมาณ 0.82 ถึง 1.32 log number of cell/g soil เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณภูเขาด้วยกัน ประชากร Cyanobacteria มีจำนวนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 พื้นที่ คือ ยอดเขา กลางเขา และเชิงเขา และในส่วนของพื้นที่ทำการเกษตร พบว่า บริเวณปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่องจะมีจำนวน Cyanobacteria โดยเฉลี่ยน้อยกว่าพื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว

ปัจจัยที่มีผลทำให้ประชากร Cyanobacteria แตกต่างกันในพื้นที่ต่าง ๆ (ตารางภาคผนวกที่ ผ 2.1) พบว่าการเปลี่ยนแปลงประชากรมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทางบวก กับความชื้นของดิน แต่อิทธิพลของ pH มีความสัมพันธ์กับประชากร Cyanobacteria ในทางลบดังเช่นจากการศึกษาอิทธิพลของค่า pH ใน *Anabaena oryzae* เมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะปลอดคลอรีน พบว่า ที่ค่า pH 7 เท่านั้นที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ซึ่งพบว่าแม้จะเพิ่มค่า pH ให้เป็นเพียงแค่ว่า 8 ก็ส่งผลกระทบต่อการศึกษาที่ทดลองอย่างชัดเจน (สมพรและคณะ 2527) ปัจจัยอื่นนอกจากนี้มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของประชากรในแต่ละพื้นที่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ อาจจะเป็นเพราะปัจจัยเหล่านี้ยังอยู่ในระดับ optimum ตามความต้องการของ Cyanobacteria แล้ว

ตารางที่ 2.1 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ครั้งที่ 11	ครั้งที่ 12	ครั้งที่ 13	ครั้งที่ 14	ครั้งที่ 15	เฉลี่ย*
M1	1.11 b	1.08 b	0.92 b	1.26 b	1.37 b	1.36 bc	1.36 b	1.29 c	1.28 ab	1.35 a	1.42 b	1.59 a	1.39 bc	1.35 bc	1.58 b	1.31
M2	1.18 b	1.03 b	0.92 b	1.22 b	1.25 b	1.24 b	1.24 b	1.43 bc	1.21 b	1.26 bc	1.32 b	1.68 a	1.35 bc	1.30 c	1.74 b	1.34
M3	0.98 b	1.02 b	1.34 b	1.21 b	1.26 b	1.38 b	1.38 b	1.38 bc	1.20 b	1.23 cd	1.56 ab	1.80 a	1.28 c	1.74 abc	1.87 b	1.42
C	1.20 b	2.10 a	1.30 b	1.23 b	1.25 b	1.23 b	1.23 b	1.24 c	1.20 b	1.25 cd	1.28 b	1.91 a	1.43 bc	1.87 abc	1.84 b	1.51
R	2.45 a	1.68 ab	1.22 b	1.66 ab	1.55 b	1.50 b	1.50 b	1.92 b	1.27 ab	1.28 bc	1.37 b	1.52 a	1.63 ab	2.04 ab	1.94 b	1.67
CR	2.99 a	2.44 a	2.14 a	1.91 a	1.86 a	2.41 a	2.41 a	2.80 a	1.46 a	1.30 ab	1.89 a	1.53 a	1.78 a	2.12 a	3.36 a	2.16
F	0.86 b	1.16 b	0.82 b	1.33 b	1.22 b	1.26 b	1.26 b	1.19 c	1.19 b	1.21 d	1.28 b	1.20 a	1.32 c	1.22 c	1.21 b	1.18
C.V.%	45.02	37.40	24.16	21.80	16.20	26.60	19.40	23.00	11.90	2.50	15.80	26.60	12.80	26.50	27.70	

<sup>1</sup>Mean with in a column followed by the same letters are not significantly different

\* Significantly different at p = 0.05

\*\* Significantly different at p = 0.01

M1 = ยอดเขา

R = ฟ้าอย่างตอเมือง

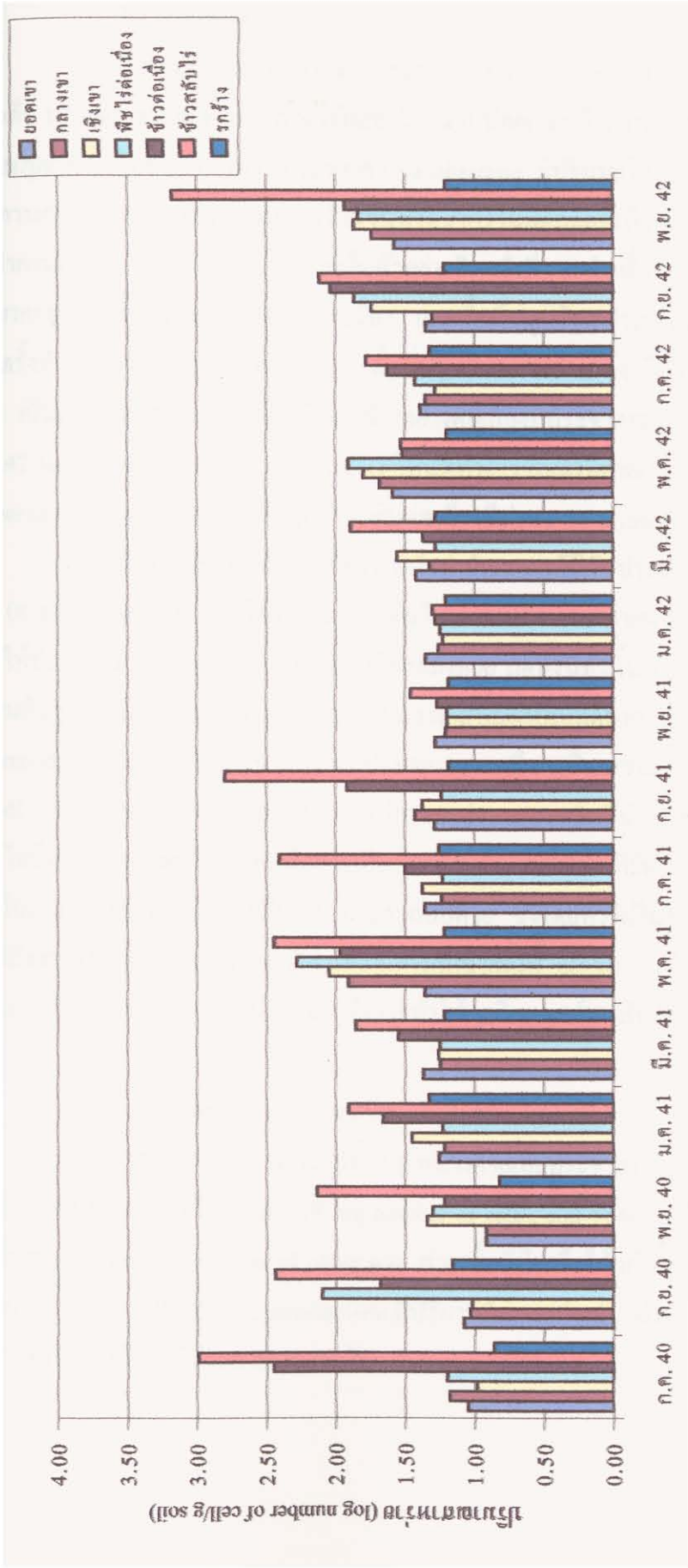
M2 = กลางเขา

CR = ฟ้าไร่สลับข้าว

M3 = เชียงเขา

F = พื้นที่กร้างว่างเปล่า

C = ฟ้าไร่อย่างตอเมือง



รูปที่ 2.1 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่กลุ่มเก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15



## 1.2 ภาคกลาง

ลักษณะความแตกต่างของประชากร Cyanobacteria (ตารางที่ 2.2) คล้ายกันกับภาคเหนือคือ บริเวณภูเขาและพื้นที่รกร้างว่างเปล่ามีจำนวนน้อยกว่าบริเวณทำการเกษตร และเมื่อเปรียบเทียบบริเวณภูเขาด้วยกัน พบว่า จำนวนประชากร Cyanobacteria มีปริมาณใกล้เคียงกัน (รูปที่ 2.2) ส่วนในพื้นที่ทำการเกษตรมีความแปรปรวนของจำนวนประชากรในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างในแต่ละลักษณะของการทำการเกษตร ตัวอย่างเช่น ในการเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 3 ในพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว มีจำนวนประชากรสูงกว่าพื้นที่ปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่อง และพื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 7 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง มีประชากรมากกว่าอีก 2 พื้นที่ที่เหลือ เป็นต้น แต่โดยเฉลี่ยแล้วพื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องมีประชากรมากกว่าโดยมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.85 ถึง 1.47 log number of cell/ g soil ในขณะที่พื้นที่ทำการเกษตรมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.07 ถึง 2.47 log number of cell /g soil โดยที่พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องมีประชากร Cyanobacteria มากที่สุด

ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับประชากรในแต่ละพื้นที่บริเวณภาคกลาง (ตารางภาคผนวกที่ 2.2) ได้แก่ อุณหภูมิดินโดยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิดินที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง จะทำให้ประชากร Cyanobacteria เพิ่มขึ้นหรือลดลงด้วย แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นพบว่าปัจจัยอื่น เช่น แสงก็มีอิทธิพลร่วมกับอุณหภูมิเช่นเดียวกัน เช่น ถ้าได้รับแสงเต็มที่อุณหภูมิที่ต้องการในการเจริญอาจไม่ต้องสูงมาก (Richmond, 1986) ส่วนปัจจัยอื่นๆ ทั้งองค์ประกอบทางเคมีของดิน ความชื้นของดิน อุณหภูมิอากาศและค่า pH ไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉพาะช่วงค่า pH ไม่มีผลดังเช่นที่พบในภาคเหนืออาจเป็นเพราะมิได้มีเพียงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการกระจายตัวของไซยาโนแบคทีเรียจะต้องมีปัจจัยอื่น ๆ มาประกอบด้วย ซึ่งโดยทั่วไปในช่วงค่า pH 6.8-9.6 ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ก็ยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ pH ของดินค่อนข้างต่ำและปริมาณของไซยาโนแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่มีไม่มากจึงอาจทำให้ผลวิเคราะห์สหสัมพันธ์ที่ได้เป็นเชิงลบเช่นในภาคเหนือ

## 1.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากตารางที่ 2.3 และรูปที่ 2.3 พบว่าค่าเฉลี่ยประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวมีปริมาณมากที่สุด คือ 1.78 log number of cell/g soil รองลงมาได้แก่ พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องมีประมาณ 1.62 log number of cell/g soil ส่วนพื้นที่ที่เหลือได้แก่ พื้นที่ปลูกพืชไร่ พื้นที่รกร้างว่างเปล่า และพื้นที่ภูเขา ประชากร Cyanobacteria มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่า พื้นที่ปลูกพืชไร่มีประชากรมากกว่า

ตารางที่ 2.2 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากภาคกลาง จ.สระบุรี จ.นครนายก ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ครั้งที่ 11	ครั้งที่ 12	ครั้งที่ 13	ครั้งที่ 14	ครั้งที่ 15	เฉลี่ย
	ก.ค.40	ก.ย.40	พ.ย.40	ม.ค.41	มี.ค.41	พ.ค.41	ก.ค.41	ก.ย.41	พ.ย.41	ม.ค.42	มี.ค.42	พ.ค.42	ก.ค.42	ก.ย.42	พ.ย.42	
M1	0.89 d	0.90 a	0.85 b	1.29 b	1.28 b	1.29 b	1.25 b	1.28 b	1.26 b	1.26 a	1.40 ab	1.33ab	1.33 a	1.24 c	1.25 b	1.21
M2	0.87 d	0.92 a	1.00 b	1.28 b	1.29 b	1.29 b	1.34 b	1.32 b	1.25 b	1.24 a	1.31 b	1.31 ab	1.31 a	1.27 c	1.42 b	1.23
M3	0.97 cd	1.07 a	1.17 b	1.34 b	1.25 b	1.45 b	1.47 b	1.34 b	1.26 b	1.26 a	1.30 b	1.22 b	1.37 a	1.47abc	1.22 b	1.28
C	1.95 ab	1.25 a	1.12 b	1.29 b	2.00 a	1.68 ab	1.38 b	1.68 ab	1.52 ab	1.38 a	1.46 ab	1.30 ab	1.50 a	1.42 bc	2.69 a	1.58
R	1.92 ab	1.07 a	1.12 b	1.87 a	1.44 b	1.41 b	2.47 a	2.28 a	1.82 a	1.58 a	1.75 a	1.53 a	1.34 a	1.78 ab	2.30 a	1.71
CR	2.13 a	1.20 a	1.53 a	1.46 b	1.24 b	2.11 a	1.59 b	1.78 ab	1.54 ab	1.50 a	1.52 ab	1.47 ab	1.54 a	1.86 a	2.37 a	1.66
F	1.78 bc	1.17 a	1.04 b	1.20 b	1.26 b	1.26 b	1.51 b	1.36 b	1.34 b	1.24 a	1.28 b	1.24 b	1.38 a	1.25 c	1.60 b	1.33
C.V.%	33.61	27.30	8.44	17.60	12.60	25.00	25.50	26.30	14.30	21.50	17.00	11.60	19.20	18.80	18.00	

<sup>1</sup>Mean with in a column followed by the same letters are not significantly different

\*Significantly different at p = 0.05

M1 = ยอดเขา

M2 = กลางเขา

M3 = เิงเขา

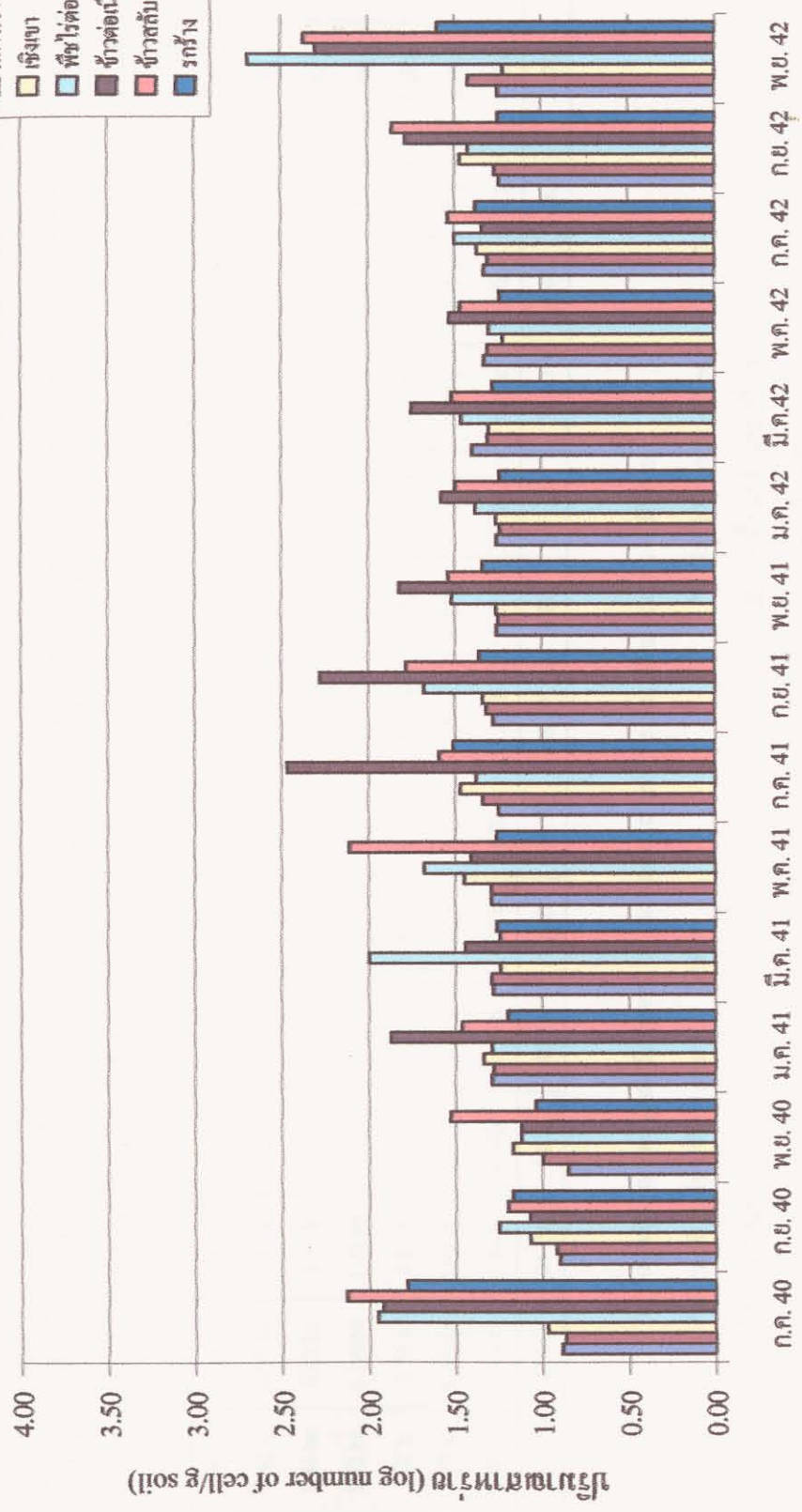
C = พืชไร่อย่างตอเนือง

\*\* Significantly different at p = 0.01

R = ไร่อย่างตอเนือง

CR = ไร่สลับข้าว

F = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ 2.2 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลาง ครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 2.3 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินที่สัมพันธ์กับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.เลย และ จ.นครราชสีมา ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 15 (log number of cell/g soil)

พื้นที่	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3**	ครั้งที่ 4*	ครั้งที่ 5*	ครั้งที่ 6*	ครั้งที่ 7*	ครั้งที่ 8*	ครั้งที่ 9*	ครั้งที่ 10**	ครั้งที่ 11*	ครั้งที่ 12	ครั้งที่ 13**	ครั้งที่ 14*	ครั้งที่ 15**	เฉลี่ย*
	ก.ค.40	ก.ย.40	พ.ย.40	ม.ค.41	มี.ค.41	พ.ค.41	ก.ค.41	ก.ย.41	พ.ย.41	ม.ค.42	มี.ค.42	พ.ค.42	ก.ค.42	ก.ย.42	พ.ย.42	
M1	0.87 c	0.86 bc	1.19 b	1.27bc	1.23 b	1.25 b	1.25 c	1.21 b	1.19 a	1.33 a	1.27bc	1.28 b	1.27 c	1.23 a	1.70 b	1.23
M2	0.92 c	0.97 bc	1.19 b	1.28bc	1.24 b	1.27 b	1.29 c	1.20 b	1.21 a	1.19 a	1.31bc	1.26 b	1.32 c	1.23 a	1.51 b	1.23
M3	1.46 bc	0.93 bc	1.31 b	1.29bc	1.23 b	1.26 b	1.25 c	1.19 b	1.31 a	1.18 a	1.34bc	1.24 b	1.26 c	1.42 a	1.98 bc	1.31
C	1.32 bc	1.14abc	1.46 ab	1.20 c	1.19 b	1.24 b	1.76 b	1.21 b	1.22 a	1.23 a	1.35bc	1.24 b	1.27 c	1.46 a	1.89 bc	1.34
R	1.02 b	1.56 a	1.82 a	1.66 b	1.37 b	1.45ab	1.82ab	1.39 a	1.25 a	1.22 a	1.57ab	2.17 a	2.26 b	1.27 a	2.41 a	1.62
CR	1.87 a	1.32 ab	1.62 ab	2.31 a	1.82 a	1.61 a	2.01 a	1.50 a	1.25 a	1.37 a	1.72 a	1.97 a	2.50 a	1.45 a	2.43 a	1.78
F	0.96 c	0.83 c	1.20 b	1.34bc	1.19 b	1.24 b	1.27 c	1.23 b	1.18 a	1.21 a	1.23 c	1.20 b	1.21 c	1.29 a	1.81 bc	1.23
C.V.%	45.78	27.60	24.70	18.00	18.70	13.20	14.10	8.10	8.20	11.00	12.90	13.60	8.20	16.70	20.80	

<sup>1</sup>Mean with in a column followed by the same letters are not significantly different

\* Significantly different at p = 0.05

M1 = ยอดเขา

M2 = กลางเขา

M3= เชนงเขา

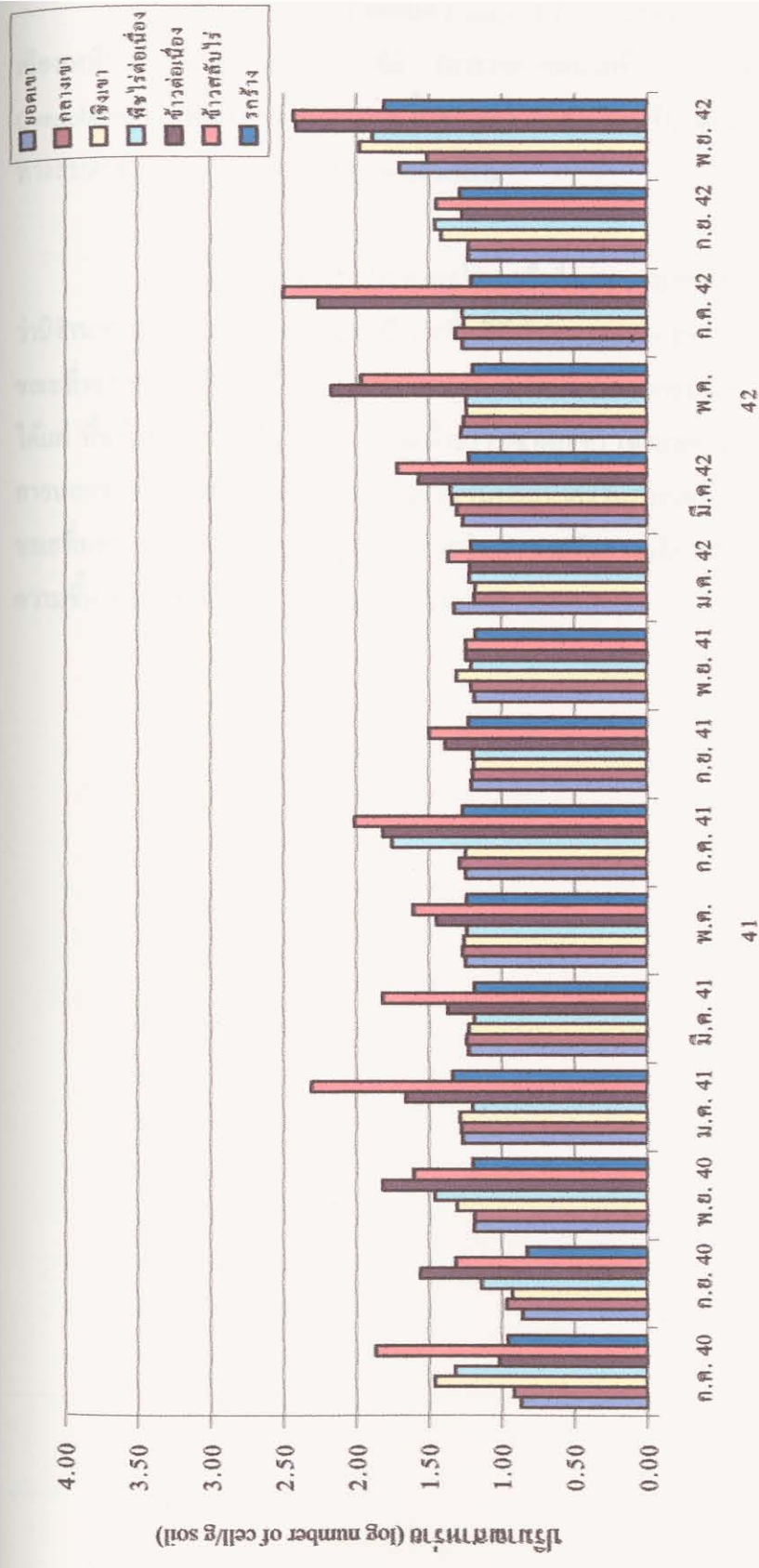
C = พื้นที่ไร่อย่างตอเนื่อง

\*\* Significantly different at p = 0.01

R = ข้าวอย่างตอเนื่อง

CR = พืชไร่สลับข้าว

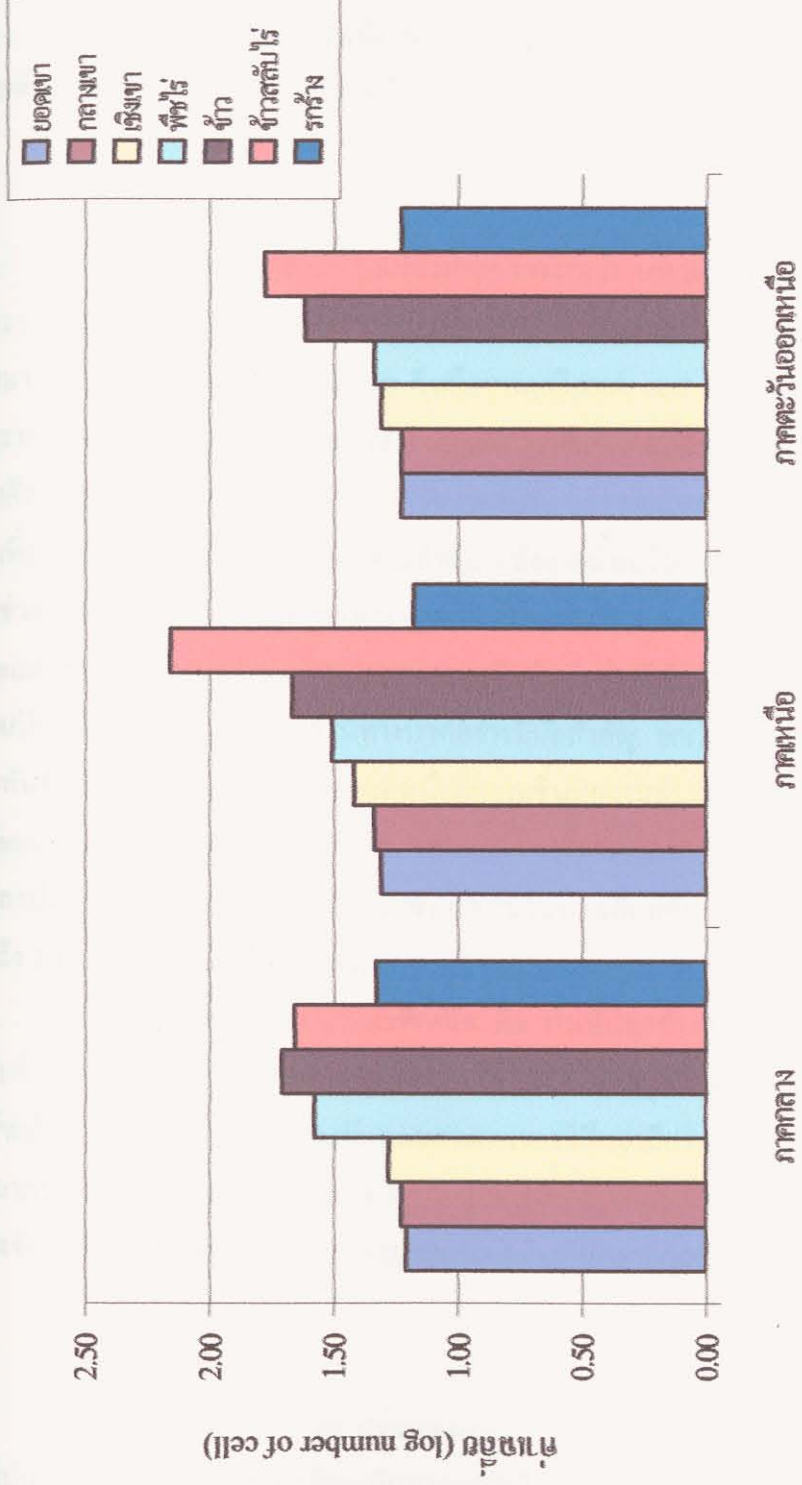
F = พื้นที่ไร่กว้างว่างเปล่า



รูปที่ 2.3 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บในตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-15

ความชื้นเป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 2.3) ในทางบวก กล่าวคือ ประชากร Cyanobacteria เพิ่มหรือลดตามความชื้นของดิน ในขณะที่ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน มีความสัมพันธ์ในทางลบต่อจำนวนประชากรของ Cyanobacteria

เมื่อสรุปจำนวนประชากร โดยเฉลี่ยในภาพรวมของแต่ละภาคพบว่า สภาพแวดล้อมที่พบว่ามีจำนวนประชากรสูงสุดจะเป็นบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรแบบปลูกพืชไร่สลับข้าวและพื้นที่นา ในขณะที่ระบบนิเวศที่เป็นพื้นที่ปลูกพืชไร่จะพบจำนวนประชากรปานกลางและระบบนิเวศที่พบน้อยที่สุด ได้แก่ พื้นที่รกร้างว่างเปล่า และบริเวณป่าธรรมชาติภูเขา (ดังแสดงในรูปที่ 2.4) นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อจำนวนประชากรในภาคเหนือ ได้แก่ ค่า pH และความชื้น ในขณะที่ภาคกลาง ได้แก่ อุณหภูมิดิน ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ปริมาณอินทรีย์วัตถุและความชื้น (ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ผ.2.4)



รูปที่ 2.4 ค่าเฉลี่ยประชากรสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่ต่าง ๆ บริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

## วัตถุประสงค์ที่ 2 : เพื่อให้ทราบถึงพลวัตรของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในระบบการปลูกพืช และที่มีอยู่ในระบบธรรมชาติที่ไม่รบกวน

การเพิ่มขึ้นและลดลงของประชากร Cyanobacteria ในบริเวณพื้นที่เดียวกัน โดยดูตั้งแต่เริ่มเก็บตัวอย่างดินครั้งแรกจนถึงครั้งสุดท้าย แบ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงตามภาคต่าง ๆ ได้ดังนี้

### 2.1 ภาคเหนือ

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงประชากรพบว่า บริเวณพื้นที่ภูเขาทั้ง 3 ระดับ มีจำนวนประชากรเปลี่ยนแปลงขึ้นลงไปในทำนองเดียวกัน ตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างดินมาศึกษา กล่าวคือ ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540 ประชากร Cyanobacteria มีประมาณ 0.92 ถึง 1.34 log number of cell/g soil แต่หลังจากนั้นประชากรเพิ่มขึ้นและจะเพิ่มสูงขึ้นในเดือนพฤษภาคม ของปี 2541 โดยมีปริมาณ 1.36, 1.91 และ 2.05 log number of cell/g soil ในพื้นที่ยอดเขา, กลางเขา และเชิงเขา ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณจะลดลงแล้วมาเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือนกันยายน และเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 การเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในบริเวณพื้นที่ภูเขามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความชื้นของดิน ส่วนปัจจัยอื่นไม่มีความสัมพันธ์ในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นบริเวณยอดเขาที่ค่า EC มีความสัมพันธ์ในทางลบ อีกพื้นที่หนึ่งที่มีความชื้นมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาคือ พื้นที่ปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงประชากรขึ้นลงคล้ายกับบริเวณภูเขา ยกเว้นในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2540 ที่ประชากรเพิ่มสูงถึง 2.10 log number of cell/g soil

ในพื้นที่ทำการเกษตรที่เหลือน้อย คือ พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ปลูกพืชไร่ สลับข้าวมีแนวโน้มว่าประชากร Cyanobacteria มีปริมาณสูงในช่วงฤดูฝน และลดต่ำลงในช่วงหน้าแล้ง ส่วนพื้นที่รกร้างว่างเปล่าตลอดระยะเวลาที่ศึกษามีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงของประชากรไม่มากนัก มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.82 ถึง 1.33 log number of cell/g soil เท่านั้น และในพื้นที่เหล่านี้ไม่มีปัจจัยใดสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 2.2 ภาคกลาง

จำนวนประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ภูเขาทั้ง 3 ระดับมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงไม่มากนัก คล้ายกับผลการศึกษาในภาคเหนือโดยมีประชากรต่ำสุดในช่วงปลายปี 2540 หลังจากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกันกับบริเวณพื้นที่รกร้างว่างเปล่า สำหรับในพื้นที่ทำการเกษตรการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 3 พื้นที่ กล่าวคือ ประชากรโดยเฉลี่ยมีจำนวนมาก ในระยะแรกของการศึกษาจนถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2541 จึงเริ่มสูงขึ้น และมีแนวโน้มเพิ่มสูงสุด



ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2541 แล้วลดต่ำลงเล็กน้อย และประชากรเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 ในทุกพื้นที่การเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ไม่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นพื้นที่ยอดเขา และเชิงเขา ที่ความชื้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 2.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

การเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ภูเขาทั้ง 3 ระดับ และพื้นที่รกร้างว่างเปล่าเป็นไปในทำนองเดียวกันกับภาคเหนือ และภาคกลาง กล่าวคือ มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ส่วนบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันออกไป ดังนี้คือ พื้นที่ปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่องการเปลี่ยนแปลงประชากรมีลักษณะใกล้เคียงกับพื้นที่ภูเขา แต่ในระยะปลายปี 2540 จะมีประชากรสูงกว่าบริเวณภูเขา และในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 ประชากรจะมีปริมาณสูงหลังจากนั้นจะลดต่ำลง และเพิ่มสูงขึ้นอีกในเดือนกันยายนและพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 ในพื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง และปลูกพืชไร่สลับข้าว ประชากร Cyanobacteria เพิ่มสูงขึ้นในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2541 หลังจากนั้นลดต่ำลงตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2541 จนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2542 จึงเริ่มเพิ่มขึ้นอีกจนถึงสูงสุดประมาณเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2542 และลดต่ำลงในเดือนกันยายน พ.ศ. 2542

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือความชื้นของดินเป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ในทางบวกต่อการเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ยอดเขา กลางเขา พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว

จะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่แล้วความชื้นดินเป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับประชากร Cyanobacteria ในเกือบทุกๆ พื้นที่

**วัตถุประสงค์ที่ 3 : เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางกระบวนการทางระบบนิเวศว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ**

### 3.1 ภาคเหนือ

ประชากร Cyanobacteria (ตารางที่ 2.4 และรูปที่ 2.5) โดยเฉลี่ยพบว่า บริเวณพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ที่ไม่ถูกรบกวนโดยมนุษย์มีจำนวนน้อยกว่าพื้นที่ทำการเกษตรและยังเป็นพื้นที่ทำการเกษตรมานาน ประชากรของ Cyanobacteria ก็จะมีมากขึ้น และในส่วนของพื้นที่ปลูกผัก ประชากรของ Cyanobacteria มีมากที่สุด สำหรับการเปลี่ยนแปลงประชากรในแต่ละพื้นที่ที่ศึกษา พบว่าในช่วงปลายปี 2540 ถึงต้นปี 2541 ประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี และพื้นที่ ปลูกผักมีปริมาณสูง หลังจากนั้นจะลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงเดือนพฤศจิกายน

พ.ศ. 2542 จึงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นอีก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ปลูกผัก ส่วนพื้นที่ป่าจำนวนประชากรมีมากในปลายปี 2540 และค่อยๆ ลดลงในช่วงต้นปี 2541 หลังจากนั้นประชากรเปลี่ยนแปลงขึ้นลงเช่นเดียวกันกับ 3 พื้นที่ ที่กล่าวมาแล้ว จากการนำเอาปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิดิน , อุณหภูมิอากาศ และความชื้นดิน มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ที่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงประชากร (ตารางภาคผนวกที่ ผ.2.5) พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 3.2 ภาคกลาง

ในบริเวณพื้นที่ภาคกลาง (ตารางที่ 2.5 และรูปที่ 2.6) พบว่า พื้นที่ปลูกผักจะมีจำนวนประชากร Cyanobacteria มากกว่าพื้นที่ป่า และพื้นที่เพาะปลูกพืชอื่นอย่างชัดเจน แต่ในพื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี และพื้นที่เพาะปลูก 3 ปี จำนวน Cyanobacteria ไม่ต่างกันมากนัก โดยมีประชากรเฉลี่ยประมาณ 1.14, 1.17, 1.34 และ 2.03 log number of cell/g soil ในพื้นที่ป่า พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี และพื้นที่ปลูกผักตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในแต่ละพื้นที่ (ตารางที่ 11 และรูปที่ 12) พบว่า ประชากร Cyanobacteria ในทุกพื้นที่ที่มีความแปรปรวนในช่วงปลายปี 2540 ถึงต้นปี 2541 แต่หลังจากนั้นปริมาณประชากรค่อนข้างคงที่โดยตลอด และจะเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ช่วงปลายปี 2542

ความชื้นเป็นเพียงปัจจัยเดียวที่พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับประชากรในพื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี ส่วนปัจจัยอื่นไม่มีความสัมพันธ์กับประชากร Cyanobacteria อย่างมีนัยสำคัญในทุกพื้นที่ (ตารางภาคผนวกที่ ผ.2.6)

### 3.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จำนวนประชากร Cyanobacteria (ตารางที่ 2.6 และรูปที่ 2.7) ในบริเวณแหล่งดินที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณ โดยเฉลี่ยดังนี้ คือ ในพื้นที่ปลูกผักมีปริมาณมากที่สุด ประมาณ 1.72 log number of cell/g soil รองลงมาได้แก่ บริเวณเพาะปลูก 1-2 ปี มีค่าเฉลี่ย 1.68 log number of cell/g soil และพื้นที่ป่าซึ่งมีค่าประมาณ 1.44 log number of cell/g soil ในขณะที่พื้นที่เพาะปลูกต่อเนื่อง 3 ปี มีปริมาณน้อยที่สุด คือ ประมาณ 1.35 log number of cell/ g soil เมื่อพูดถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรในแต่ละพื้นที่ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา พบว่าการเปลี่ยนแปลงประชากรในทุกพื้นที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติยกเว้นพื้นที่เพาะปลูกพืชต่อเนื่อง 3 ปี แต่มีแนวโน้มว่าพื้นที่ป่า และพื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี ประชากร Cyanobacteria เพิ่มสูงขึ้นในช่วงต้นปี 2541 หลังจากนั้นจะลดลงแล้วปริมาณจะอยู่ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างดินมาศึกษา ในส่วนของพื้นที่ปลูกผักพบว่าช่วงปลายปี 2540 ประชากร Cyanobacteria สูงและหลังจากนั้นจะลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก

ตารางที่ 2.4 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคเหนือจากแหล่งดินที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)

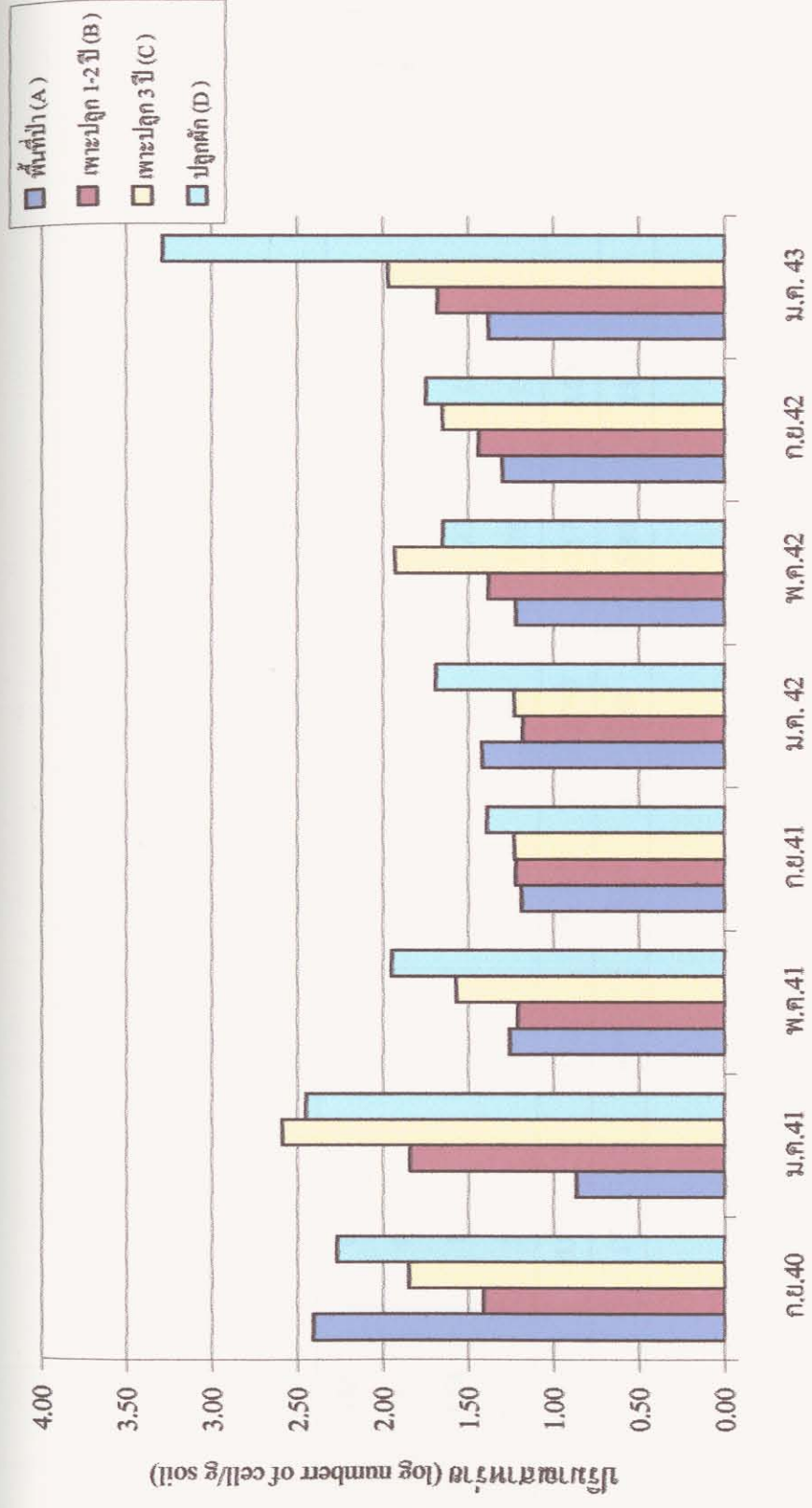
พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	เฉลี่ย
A	2.41	0.87	1.26	1.19	1.42	1.22	1.30	1.38	1.38
B	1.41	1.84	1.21	1.22	1.18	1.38	1.44	1.68	1.42
C.	1.85	2.59	1.57	1.23	1.23	1.93	1.65	1.97	1.75
D	2.27	2.45	1.95	1.39	1.69	1.65	1.75	3.29	2.06
LSD <sub>0.05</sub>	1.899x10 <sup>-16</sup>	0.8824	0.6087	0.3723	0.6201	1.4523	0.6788	3.0484	
C.V.%	42.18	19.23	14.64	10.68	12.53	33.84	15.93	31.80	

A = พื้นที่ป่า

B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี

C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี

D = พื้นที่ปลูกผัก



รูปที่ 2.5 ปริมาณสหายเชื้อแบคทีเรียในดินในพื้นที่พาะปลูกและพื้นที่ป่า ภาคเหนือ ครั้งที่ 1-8

ตารางที่ 2.5 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคกลางที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	เฉลี่ย
A	0.85	0.84	1.20	1.25	1.23	1.26	1.25	1.23	1.14
B	-	0.84	1.23	1.20	1.21	1.24	1.23	1.23	1.17
C.	1.54	1.08	1.21	1.29	1.23	1.23	1.29	1.89	1.34
D	2.26	1.55	2.84	2.41	1.80	1.76	1.68	1.91	2.03
LSD <sub>0.05</sub>	2.085x10 <sup>-16</sup>	0.8733	2.1728	0.1475	0.1750	0.1173	2.0332	2.0332	
C.V.%	27.18	17.62	29.12	2.08	2.88	5.80	18.23	28.24	

A = พื้นที่ป่า

B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี

C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี

D = พื้นที่ปลูกผัก



รูปที่ 2.6 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่เพาะปลูก และพื้นที่ป่า ภาคกลาง ครั้งที่ 1-8

ตารางที่ 2.6 ปริมาณ Cyanobacteria ในตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือจากแหล่งดินที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่า (log number of cell/g soil)

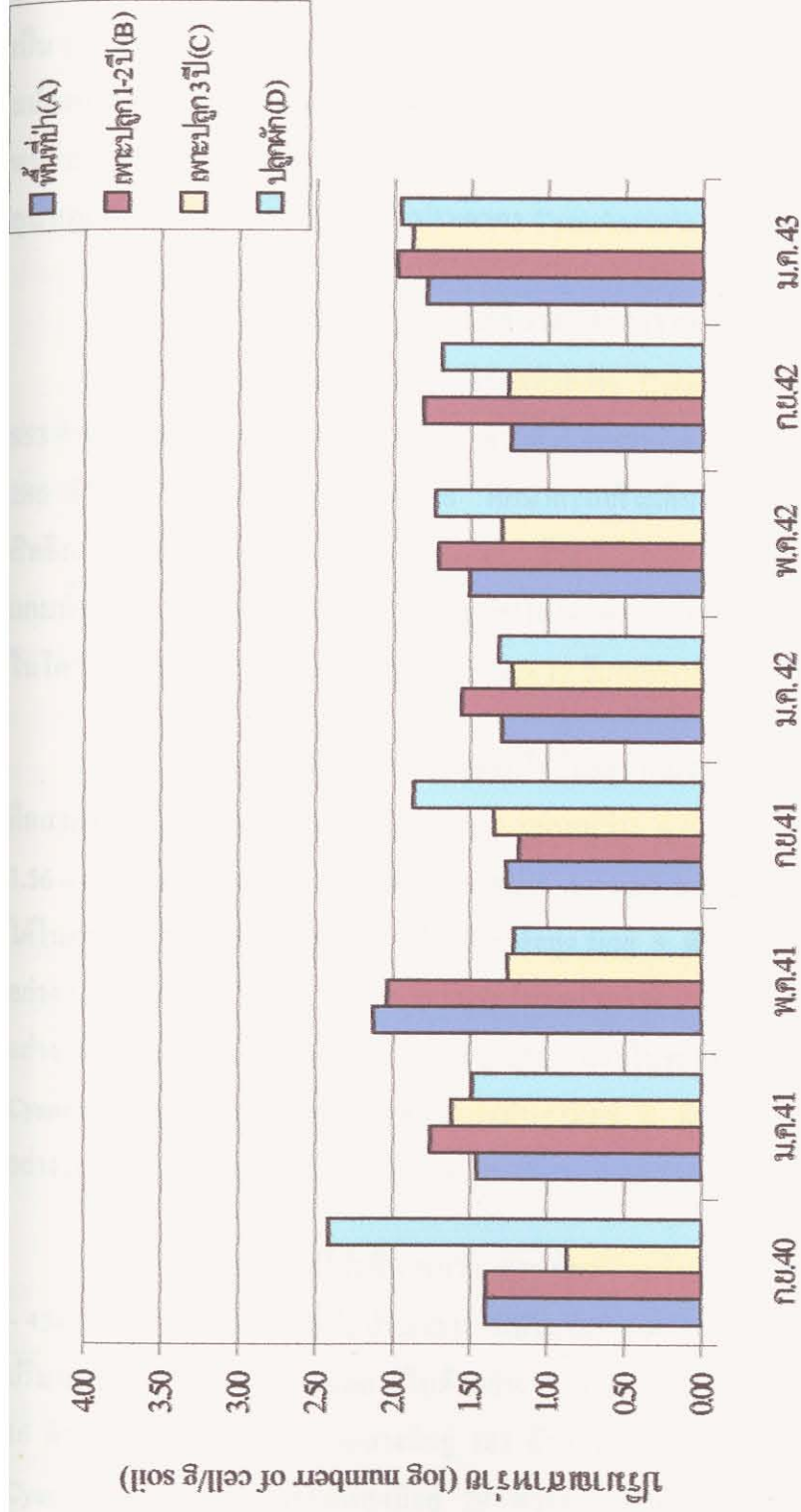
พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	เฉลี่ย
A	1.40	1.46	2.13	1.27	1.30	1.51	1.24	1.79	1.51
B	1.40	1.76	2.04	1.19	1.56	1.71	1.81	1.98	1.68
C	0.87	1.62	1.26	1.35	1.23	1.30	1.26	1.88	1.35
D	2.42	1.49	1.22	1.87	1.32	1.73	1.69	1.96	1.72
LSD <sub>0.05</sub>	$4.403 \times 10^{-16}$	3.6712	3.0950	0.8238	$1.080 \times 10^{-16}$	0.1173	1.1438	1.2442	
C.V.%	50.26	33.17	40.42	12.56	11.86	22.39	31.99	23.59	

A = พื้นที่ป่า

B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี

C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี

D = พื้นที่ปลูกผัก



รูปที่ 2.7 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-8



สำหรับในพื้นที่เพาะปลูกพืช 3 ปี การเปลี่ยนแปลงประชากรในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างดินมาศึกษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในช่วงปลายปี 2540 พบว่าปริมาณประชากรมีประมาณ 0.87 log number of cell/g soil ในเดือนกรกฎาคม 2540 แต่หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเป็น 1.23 log number of cell/g soil แล้วปริมาณค่อนข้างคงที่ไปจนถึงเดือนกรกฎาคม 2542 การเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องและพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือไม่พบที่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยแวดล้อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในพื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี ที่อุณหภูมิดินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria (ตารางภาคผนวกที่ ผ.2.7)

### การศึกษาคุณสมบัติบางประการของ Cyanobacteria

จากการศึกษารายละเอียดของตัวอย่าง Cyanobacteria ที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดจำนวน 853 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นภาคเหนือ 280 ตัวอย่าง ภาคกลาง 287 ตัวอย่างและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 286 ตัวอย่าง ไปศึกษารายละเอียด คือ ศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณและชนิดเซลล์ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในแต่ละ isolate ด้วย ได้ผลดังนี้คือ ผลการศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความแตกต่างกันในการเจริญเติบโตโดยดูจากมวลของน้ำหนักแห้ง, โปรตีน, อัตราการตรึงไนโตรเจน และจำนวนเซลล์ หลังจาก incubate 12 วัน ผลการศึกษา ตามตารางที่ 20-37 มีดังนี้คือ

1. ผลการศึกษาการเจริญเติบโต โดยดูจากมวลของน้ำหนักแห้ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือสาหร่ายที่มีระดับมวลของน้ำหนักแห้งสูง อยู่ระหว่าง 6.12 – 8.67 mg/ml ระดับปานกลางอยู่ระหว่าง 3.56 – 6.11 mg/ml และในระดับต่ำ อยู่ระหว่าง 1 – 3.55 mg/ml ในตัวอย่าง Cyanobacteria ที่รวบรวมได้ในภาคเหนือสาหร่ายที่มีมวลของน้ำหนักแห้งสูง มีอยู่ 5 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 31 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 244 ตัวอย่าง ส่วนในตัวอย่าง Cyanobacteria ภาคกลาง ระดับสูงมีอยู่ 3 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 40 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 244 ตัวอย่าง และในตัวอย่าง Cyanobacteria ภาคตะวันออกเฉียงเหนือระดับสูงมีอยู่ 6 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 9 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 271 ตัวอย่าง

2. ปริมาณโปรตีน พบว่า สาหร่ายที่มีระดับโปรตีนสูง มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 291.50 – 434.75  $\mu\text{g/ml}$  ส่วนในระดับปานกลาง มีปริมาณตั้งแต่ 148.25 – 291.49  $\mu\text{g/ml}$  และในระดับต่ำ มีปริมาณตั้งแต่ 5 – 148.24  $\mu\text{g/ml}$  ในตัวอย่าง Cyanobacteria ภาคเหนือพบว่า มีปริมาณโปรตีนสูงมีอยู่ 16 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 182 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 82 ตัวอย่าง ส่วนในตัวอย่าง Cyanobacteria ภาคกลางระดับสูงมีอยู่ 29 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 173 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 85 ตัวอย่าง และในตัวอย่างภาคตะวันออกเฉียงเหนือระดับสูงมีอยู่ 37 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 181 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 68 ตัวอย่าง

3. อัตราการตรึงไนโตรเจน พบว่าสาหร่ายที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงตั้งแต่ 56.76 – 85.12  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h}/\text{mg chlorophyll}$  ส่วนในระดับปานกลางตั้งแต่ 28.40 – 56.75  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h}/\text{mg chlorophyll}$  และในระดับต่ำ ตั้งแต่ 0.042 – 28.39  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h}/\text{mg chlorophyll}$  ในตัวอย่าง Cyanobacteria จากภาคเหนือพบว่ามีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูง มีอยู่เพียงตัวอย่างเดียว ส่วนในระดับปานกลางมีอยู่ 2 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 277 ตัวอย่าง ส่วนในตัวอย่าง Cyanobacteria จากภาคกลางระดับสูงมีอยู่ 2 ตัวอย่าง ส่วนในระดับปานกลางมีเพียงตัวอย่างเดียว และในระดับต่ำมีอยู่ 277 ตัวอย่าง และในตัวอย่าง Cyanobacteria จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือระดับสูงไม่พบ ส่วนในระดับปานกลาง มีอยู่ 4 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 282 ตัวอย่าง

4. ปริมาณเซลล์ *Heterocyst*, *Vegetative* และ *Akinete* หาได้โดยการใช้ Haemocytometer หลังจากทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าสาหร่ายที่มีระดับปริมาณเซลล์ *Heterocyst* สูงมีประมาณ 7.42 – 8.08 cells/ml ระดับปานกลาง ตั้งแต่ 6.76 - 7.41 cells/ml และในระดับต่ำมีประมาณ 6.1 – 6.75 cells/ml ส่วนปริมาณเซลล์ *Vegetative* สูงตั้งแต่ 8.01 – 8.77 cells/ml ระดับปานกลางตั้งแต่ 7.25 – 8.00 cells/ml และในระดับต่ำ ตั้งแต่ 6.49 – 7.24 cells/ml สำหรับ *Akinete* ระดับสูงตั้งแต่ 6.49 – 8.70 cells/ml ส่วนในระดับปานกลาง ตั้งแต่ 4.28 – 6.48 cells/ml และในระดับต่ำตั้งแต่ 2.07 – 4.27 cells/ml ขึ้นอยู่กับพื้นที่เก็บตัวอย่าง และเมื่อนำมาหาอัตราส่วนระหว่าง *Heterocyst* กับ *Vegetative* พบว่า ระดับสูงมีค่าตั้งแต่ 0.97 – 1.11 ส่วนในระดับปานกลางมีค่าตั้งแต่ 0.83 - 0.96 และในระดับต่ำ มีค่าตั้งแต่ 0.69 – 0.82

ในตัวอย่าง Cyanobacteria ภาคเหนือพบว่ามีปริมาณ *Heterocyst* สูงมีอยู่ 20 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 207 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 53 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ *Vegetative* มีอยู่ 151 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 124 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 5 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ *Akinete* สูงมีอยู่ 95 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 10 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 6 ตัวอย่าง ส่วนอัตราส่วนระหว่าง *Heterocyst* กับ *Vegetative* สูงมีอยู่ 5 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 244 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 31 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง Cyanobacteria ในภาคกลางพบว่ามีปริมาณเซลล์ *Heterocyst* สูงมีอยู่ 14 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 239 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 34 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ *Vegetative* สูงมีอยู่ 149 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 128 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 10 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ *Akinete* สูงมีอยู่ 80 ตัวอย่าง ปานกลาง 13 ตัวอย่าง และในระดับต่ำมีอยู่ 14 ตัวอย่างส่วนอัตราส่วนระหว่าง *Heterocyst* กับ *Vegetative* ระดับสูงมีอยู่ 12 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 252 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 23 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง Cyanobacteria ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าปริมาณ เซลล์ Heterocyst สูงมีอยู่ 21 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 216 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 49 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ Vegetative สูงมีอยู่ 167 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 117 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 2 ตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ Akinete สูงมีอยู่ 110 ตัวอย่าง ปานกลางมีเพียงตัวเดียว และในระดับต่ำมีอยู่ 7 ตัวอย่าง ส่วนอัตราส่วนระหว่าง Heterocyst กับ Vegetative ระดับสูงมีอยู่ 2 ตัวอย่าง ระดับปานกลางมีอยู่ 259 ตัวอย่างและในระดับต่ำมีอยู่ 25 ตัวอย่าง

การหาน้ำหนักแห้งเป็นวิธีการหาการเติบโตของสาหร่ายวิธีหนึ่ง น้ำหนักแห้งนี้เป็นผลมาจากการเติบโตของเซลล์ โดยจะมีการสะสมอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ ไว้ภายใน ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ และน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของสาหร่ายพบว่า ทั้ง 3 ภาค มีปริมาณน้ำหนักแห้งสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะสาหร่ายที่เก็บจากบริเวณพื้นที่ปลูกข้าว และพื้นที่ปลูกพืชไร่ สลับข้าว รองลงมาได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนพบว่าทั้ง 3 ภาค มีระดับใกล้เคียงกันอัตราการตรึงไนโตรเจนนั้น Cyanobacteria ในภาคเหนือมีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูง โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่ปลูกข้าว รองลงมาได้แก่ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือตามลำดับ ส่วนปริมาณเซลล์ Heterocyst และ Vegetative พบว่าทั้ง 3 ภาคมีระดับใกล้เคียงกัน ทำให้ทราบว่า Heterocyst ที่เพิ่มจำนวนขึ้นเกิดมาจากเซลล์ธรรมดา โดยมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เกิดขึ้น การเปลี่ยนเป็น Heterocyst ขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณไนโตรเจนในบริเวณที่เก็บเลี้ยงน้อยกว่าจำนวนที่พอเหมาะหรืออาจจะกว่าได้อีกนัยหนึ่งว่าจำนวน Heterocyst สามารถควบคุมได้โดยควบคุมปริมาณไนโตรเจน คือ ถ้าบริเวณที่เก็บมีไนโตรเจนน้อยก็จะกระตุ้นการสร้าง Heterocyst ขึ้น โดยซึ่งจะทำให้เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงเป็น Heterocyst มากขึ้น ในทางตรงกันข้าม ถ้าแหล่งดินที่เหมาะสมกับการเติบโตของสาหร่ายแต่มีปริมาณไนโตรเจนสูง ทำให้เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงเป็น Heterocyst น้อยลง แต่ในกรณีที่ธาตุอาหารไม่เหมาะสม และมีปริมาณไนโตรเจนน้อย ทำให้จำนวน Heterocyst น้อยลงด้วย เนื่องจากเซลล์เติบโตได้ไม่ดี ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงเป็น Heterocyst น้อยลงด้วย และธาตุที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยงอีกอย่างหนึ่งที่จะช่วยให้เกิดการสร้าง Heterocyst คือ ฟอสเฟต ฟอสเฟตในแหล่งดินช่วยในการส่งเสริมการสร้าง Heterocyst เช่นเดียวกัน แต่การสร้าง Heterocyst ไม่จำกัดว่าจะมีปริมาณฟอสเฟตเท่าใด เพียงแต่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบในแหล่งดินในปริมาณที่เพียงพอ สำหรับเซลล์ Akinete ปรากฏว่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณเซลล์ Akinete มากที่สุด โดยเฉพาะพื้นที่บริเวณปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่อง พื้นที่รกร้างว่างเปล่า เจริญ และพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว รองลงมาได้แก่ ภาคเหนือและภาคกลาง ตามลำดับ และอัตราส่วน Heterocyst กับ Vegetative นั้นพบว่าทั้ง 3 ภาคมีอัตราใกล้เคียงกัน

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากร Cyanobacteria ในระบบนิเวศที่แตกต่างกันพบว่า พื้นที่ที่ถูกรบกวนจากมนุษย์น้อยหรือไม่มีถูกรบกวนได้แก่ บริเวณภูเขาที่มีประชากร Cyanobacteria น้อยกว่าบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรอย่างชัดเจน และการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของประชากร โดยเฉลี่ยเป็นไปตามฤดูกาล กล่าวคือ ในช่วงฤดูฝนปริมาณเพิ่มมากกว่าในหน้าแล้ง สำหรับปัจจัยแวดล้อมที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากร Cyanobacteria โดยที่คุณสมบัติทางเคมีของดินบางประการเช่น Ca, K, P, Organic matter และ pH มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรในบางพื้นที่แต่ในบางพื้นที่ปัจจัยเหล่านี้ไม่มีผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังเช่นการศึกษาผลของปริมาณ P ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของ *A. oryzae* พบว่าในปริมาณของ P ที่ปรากฏเพียง 20 ppm ก็เพียงพอต่อการเจริญแล้ว (สมพรและคณะ 2523) เป็นต้น ส่วนปัจจัยทางกายภาพได้แก่ ความชื้นของดิน ก็มีผลเป็นบางพื้นที่เช่นเดียวกัน นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า ในบริเวณที่การปลูกพืชไร่ในทุกภาคพบว่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมี ประชากรโดยเฉลี่ยต่ำที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะเป็นบริเวณที่มีลักษณะเป็นดินทรายมากกว่าภาคอื่น ๆ ซึ่ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (1998) ที่ได้ทำการศึกษการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรีย ในดินบริเวณตอนกลางของแม่น้ำเหลือง ประเทศจีนซึ่งพบว่าในดินร่วนและดินเหนียวมักพบการแพร่กระจายตัวของไซยาโนแบคทีเรียมากในขณะที่ดินทรายพบว่ามีน้อยที่สุด

## วัตถุประสงค์ที่ 4 : เพื่อให้ทราบความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจนในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน

### บทนำ

#### กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ( $N_2$ -fixing cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นแบคทีเรียที่มีหลักฐานการค้นพบจาก fossil ว่าเคยปรากฏบนโลกมานานจนอาจจัดได้ว่าเป็นบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม eukaryote โดยมีลักษณะสำคัญต่างๆ ใกล้เคียงกับกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) นอกจากนี้ยังคาดกันว่าไซยาโนแบคทีเรียเองนั้นอาจเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแรกที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงตั้งแต่ในยุค precambrian และยิ่งไปกว่านั้นอาจเป็นบรรพบุรุษของคลอโรพลาสต์ กล่าวคือ กลุ่ม eukaryote ในสมัยโบราณอาจกิน (engulf) เอาไซยาโนแบคทีเรียเข้าไปแล้ววิวัฒนาการกลายเป็น chloroplast ในที่สุด (Mazel 1990)

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายกันไป เช่น แหล่งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อนที่มีความเป็นกรดรวมไปถึงทะเลทราย ในส่วนของการจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบดูความหลากหลายอาจทำได้โดยใช้หลักการพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้ (Rippka 1988)

1. ลักษณะการเจริญที่ปรากฏ (growth formation) แบ่งได้เป็น
  - 1.1 เป็นลักษณะแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular)
  - 1.2 เป็นลักษณะโคโลนี (colonial formation)
  - 1.3 เป็นลักษณะเส้นสาย (filamentous formation)
2. ลักษณะการสร้างโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและแบบเหลว
3. โครงสร้างของเส้นสาย แบ่งได้เป็น
  - 3.1 Simple filament เป็นลักษณะของเส้นสายที่ต่อกันเป็นสายยาว ปกติไม่มีการแตกกิ่งก้าน ตัวอย่างของจีนัสที่พบว่ามีเส้นสายแบบนี้ได้แก่ *Oscillatoria* และ *Lyngbya* เป็นต้น
  - 3.2 Branching filament เป็นลักษณะของเส้นสายที่มีกิ่งก้าน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะได้แก่
    - 3.2.1 False branching เช่น ในจีนัส *Plectonema* และ *Sytonema* เป็นต้น
    - 3.2.2 True branching เช่น ในจีนัส *Fischerella* และ *Stigonema* เป็นต้น
4. ลักษณะของเซลล์พิเศษ ได้แก่
  - 4.1 Heterocyst
  - 4.2 Akinete

5. ลักษณะขั้ว (polarity) ของเซลล์ หมายถึงตำแหน่งการปรากฏของเซลล์พิเศษที่อยู่บริเวณเส้นสาย เช่นในจีส *Gloeotrichia* มี heterocyst อยู่ที่ปลายสุดของเส้นสายที่เป็น vegetative cell เป็นต้น
6. เมื่อกหุ้มเซลล์ (Sheath) ไชยาโนแบคทีเรียที่พบว่ามีการสร้างนี้ได้แก่จีส *Lyngbya* และ *Phormidium* เป็นต้น
7. ขนาดของ vegetative cell

อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะปรากฏภายนอกดังกล่าวมาแล้วนี้ยังไม่เพียงพอต่อการศึกษาคความหลากหลายของไชยาโนแบคทีเรีย ดังตัวอย่างเช่น การจำแนกชนิดของไชยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายในกลุ่มจีส *Oscillatoria*, *Lyngbya* และ *Phormidium* ก่อนข้างจำแนกออกจากกันได้ยาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาในระดับลึกลงไปโดยเฉพาะในส่วนของสารพันธุกรรม เช่นการจำแนกโดยดูจากปริมาณ mol % G+C เทคนิค PCR โดยใช้การเพิ่มจำนวนชุดยีน *nif H* (ควบคุมการสร้างเอนไซม์ nitrogenase) เพื่อใช้ศึกษาในกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน หรือการใช้ primer แบบ random amplified polymorphic DNA (RAPD), DNA amplification fingerprinting (DAF) ซึ่งใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดของไชยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ในแห่นแดง (*Azolla*) (West และ Adams, 1997) หรือการใช้ชุด primer ที่เรียกว่า short tandemly repeated repetitive sequences (STRR) และ highly iterated palindrome (HIP1) ในการจำแนกไชยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Nostoc* และ *Anobaena* ที่อาศัยในรากของต้นปรง (cycad) (Robinson และคณะ 1995)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะทราบถึงความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของไชยาโนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่างๆ จึงได้ทำการศึกษาไชยาโนแบคทีเรียที่แยกมาได้จากดินทั้ง 3 ภาค ทั้งในเชิงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการจำแนกโดยอาศัยหลักการการทำลายนิ้วมือ DNA (DNA fingerprint)

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. สายพันธุ์อ้างอิงและการเพาะเลี้ยง

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงในจีนัส *Nostoc* sp., *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon* sp. สายพันธุ์ DASH5101, *Calothrix* sp. สายพันธุ์ DASH02101 และ *Scytonema* sp. ได้รับความเอื้อเฟื้อจากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวมไปถึงสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ที่ทำการแยกจากดินในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ตามการทดลองในวัตถุประสงค์ที่ 1 จำนวนทั้งสิ้น 102 สายพันธุ์ นำมาทำการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 (ภาคผนวก) ที่ปราศจากแหล่งอาหารไนโตรเจนทั้งชนิดแข็งและเป็นของเหลวภายใต้สภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 25<sup>o</sup>ซ ตลอดการทดลอง

### 2. การจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบันทึกลักษณะปรากฏภายนอกของโคโลนีของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สี ขนาดของโคโลนี ลักษณะโคโลนีเช่น การยักตัวของโคโลนีและลักษณะขอบของโคโลนีภายหลังเริ่มทำการเพาะเลี้ยงไปแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในส่วนของลักษณะปรากฏเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวได้ทำการบันทึกสี ลักษณะการเจริญเติบโตในหลอด ภายใต้เวลาและสภาพเดียวกันกับการเลี้ยงบนอาหารวุ้น จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า

### 3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำโคโลนีของไซยาโนแบคทีเรียมาแช่ในสารละลาย 3% glutaraldehyde จากนั้นนำไปล้างต่อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 3-24 ชม. ที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ แล้วทำการล้างตัวอย่างซ้ำด้วยสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ก่อนที่จะทำการดึงน้ำออกโดยใช้เอธานอลจากความเข้มข้น 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% ตามลำดับ โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที นำตัวอย่างมาทำให้แห้งด้วย critical point dryer (CPD) จากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปวางบน grid แล้วฉายด้วยทองโดยใช้ Ion sputtering device รุ่น JFC 1100 E นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM 6400, Japan) ต่อไป

#### 4. การวิเคราะห์ค่า Acetylene reduction assay (ARA) เทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ a

นำไซยาโนแบคทีเรียมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่ปราศจากแหล่งอาหารในโตรเจนที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาพที่ให้แสง 12 ชม. เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นเปลี่ยนจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจุกแบบ double septum ทำการอัดแก๊สอะเซทิลีนลงไปในส่วนปริมาตรเหนืออาหารเหลว 10% บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชม. ในสภาพที่มีแสงเข้มข้น 400  $\mu\text{E}\cdot\text{S}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  ในกรณีที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในสภาพมีคัลเจอร์ดำเนินการในทำนองเดียวกันในสภาพที่ไม่มีแสง แต่ทำการบ่มไว้เป็นเวลา 12 ชม. จากนั้นดึงก๊าซจากหลอดที่ผ่านการบ่มไว้แล้วมาในปริมาตร 1 มล. แล้วฉีดวิเคราะห์ในเครื่อง gas chromatography (Perkin Elmer) โดยใช้ porapak N Column การตรวจวัดเอธิลีน จะทำการวัดต่อ 1 หลอดต่อ 1 ชม. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ a การตรวจหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a ทำโดยการนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียหลังจากการวิเคราะห์ค่า ARA แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสายละลาย 95% เอทานอลในปริมาตร 10 มล. ลงไปแล้วจึงนำไปปั่นให้เซลล์แตกโดยใช้ homogenizer (Ace Homogenizer No. 10-717, Japan) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใส่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm. จากนั้นคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a โดยสมการดังต่อไปนี้ (Wintermans และ Demots, 1965)

$$\text{มก.ของคลอโรฟิลล์ a} = \frac{\text{ปริมาตรของ 95\% เอทานอล} \times \text{ค่า OD}_{665}}{83.4}$$

#### 5. การสกัด chromosomal DNA จากไซยาโนแบคทีเรีย

วิธีการสกัด chromosomal DNA ได้ทำการดัดแปลงจากวิธีการของ Golden และคณะ (1988) โดยนำเอาเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารละลาย *Azolla* extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 100 mM EDTA และ 0.4% 2-mercaptoethanol) ลงไปในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการเขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer แล้วนำไปสกัดต่อด้วยสารละลายฟีนอลในปริมาตรที่เท่ากัน 2 ครั้ง นำส่วน upper phase แยกออกใส่หลอดทดลองอันใหม่จากนั้นเติมสารละลาย 2% CTAB ใน 1.4 M NaCl ในปริมาตรที่เท่ากัน ไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการสกัดอีกครั้งโดยใช้คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1 โดยปริมาตร) นำส่วนที่ใสชั้น upper phase มาตกตะกอน DNA ด้วยไอโซโพรพานอล แล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอน DNA แห้งแล้วละลายด้วย TE buffer ที่มี Rnase A ในปริมาตร 1 ใน 10 ส่วน นำไปบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำสารละลาย DNA นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป



## 6. การทำ PCR

ในการทดลองนี้ได้ใช้ primer ทั้งสิ้น 3 ชนิดโดยใช้ DNA template ในปริมาณ 50 นาโนกรัม โดยแต่ละชนิดมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 6.1 *nifH* primer

มีลำดับของ primer เป็น 5'-GGAATTCCTGYGAGAYCCNAARGCNGA-3' และ 5'-CGGATCCGDNGCCATCATYTCNCC-3' (โดย Y คือ T หรือ C, N คือ A, C, G หรือ T, R คือ A หรือ G และ D คือ A, G หรือ T) โดยใช้ Taq polymerase 2.5 U (GibcoBRT) 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ในสภาพ PCR ที่ 93<sup>o</sup>ซ 5 นาที 1 รอบ สภาพ denature 93<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 1.2 นาที สภาพ annealing ที่ 50<sup>o</sup>ซ 1 นาที และ extension ที่ 70<sup>o</sup>ซ 1.5 นาที จำนวนรอบ 35 รอบ และ 70<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบโดยใช้เครื่อง PCR (Hybaid, UK)

### 6.2 DAF primer

ประกอบไปด้วย primer 2 ชุดได้แก่ DAF 8.7b 5'-GCGGTGG-3' ในปริมาณ 1.08 พิโคโมล DAF 10.6e 5'-GTGACGTAGG ในปริมาณ 1.75 พิโคโมล จากนั้นเติม deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) ในปริมาณ 200 ไมโครโมล, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM และ 2.5 U ของ Taq polymerase ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร โดยมีสภาพ PCR จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ โดยประกอบไปด้วย 95<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 30 วินาที, 30<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 1 นาที, 72<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่ 72<sup>o</sup>ซ 10 นาที

### 6.3 STRR primer

ใช้ primer ที่มีลำดับเป็น 5'-CCARTCCCCARTCCCC-3' ในปริมาณ 0.97 พิโคโมล, 200 ไมโครโมลของ dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> และ 2.5 U ของ Taq polymerase ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร โดยมีสภาพ PCR ที่ 95<sup>o</sup>ซ 6 นาที 1 รอบ, 94<sup>o</sup>ซ เวลา 1 นาที, 56<sup>o</sup>ซ เวลา 1 นาที และ 65<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 30 รอบและ 65<sup>o</sup>ซ 10 นาที 1 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดมาตรวจสอบใน 1.0% agarose โดยวิธี electrophoresis ที่ 80 Vcm แล้วย้อม DNA เพื่อตรวจสอบโดย ethidium bromide

## 7. การวิเคราะห์ Phylogenetic

ขนาดและจำนวนของแถบ DNA ที่ได้จาก PCR นำมาจับคู่เข้าระบบ matrix โดยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) จากนั้นวิเคราะห์และสร้าง tree โดยโปรแกรม NTSYS-pc (version 1.8; Exeter Software, Setauket, N.Y.)

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การจำแนก cyanobacteria ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำ cyanobacteria ที่แยกเชื้อได้จากดินทั้งหมด 102 ตัวอย่าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร BG11 ภายใต้แสงและอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาทำการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาประกอบกับหนังสือ cyanophyta (Desikachary, 1958) โดยได้ประยุกต์จากหนังสือดังกล่าวเพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง, การเจริญเติบโตบนอาหารเหลวและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (ตารางที่ 1) โดยลำดับแรกที่ศึกษาคือ สีของ cyanobacteria ได้แก่ สีเขียว, สีเขียวแกมน้ำเงิน, สีแดง-ม่วงและสีน้ำตาลเข้ม นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งพบว่า มีขนาดเส้นศูนย์กลางอยู่ในค่าตั้งแต่ 0.1- 0.4 นิ้ว มีหลายลักษณะเช่น รูปร่างกลม (circular), รูปร่างไม่แน่นอน (irregular), รูปร่างเป็นสาย (filamentous), มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายขน (hairy) และมีการสร้าง gas (gas forming colony) เป็นต้น เมื่อศึกษาจากความหนูนของโคโลนีแบ่งเป็น 2 ระดับคือ โคโลนีที่ฝังแบนไปกับผิวอาหารแข็ง (flat) และโคโลนีนูนขึ้นจากผิวอาหาร (convex) และการศึกษาริม (ขอบ) ของโคโลนีพบหลายลักษณะได้แก่ ขอบเรียบ (entire), ขอบหยัก (erose), ขอบเป็นเส้น ๆ (filamentous) และขอบเป็นเส้นซ้อนกันรูปร่างไม่แน่นอน (curled) สำหรับในการศึกษาการเจริญเติบโตของ cyanobacteria บนอาหารเหลว พบว่ามีการเจริญลักษณะต่างๆ ดังนี้ เซลล์เกาะเหนืออาหารเหลวและบริเวณก้นหลอด บางเซลล์มีการเกาะของเซลล์เป็นก้อนหรือเป็นแผ่นอยู่ข้างภาชนะทดลอง ส่วนการศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเป็นกลุ่มที่มีเส้นสายทั้งหมดและมี heterocyst ซึ่งอาจพบบริเวณปลายหรือภายในเส้นสาย จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสามารถแบ่ง cyanobacteria 102 ตัวอย่างได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่คาดว่าเป็น *Nostoc* sp. 45 ตัวอย่าง, กลุ่มที่คาดว่าเป็น *Anabaena* sp. 44 ตัวอย่าง, กลุ่มที่คาดว่าเป็น *Anabaenopsis* sp. 5 ตัวอย่าง, กลุ่มที่คาดว่าเป็น *Nodularia* sp. 3 ตัวอย่าง และ branching group 5 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับการศึกษาของ สุวรรณ, 2542 ที่ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายตัวของไซยาโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินนาและตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บในบริเวณภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 275 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกไซยาโนแบคทีเรียได้ อยู่ 2 อันดับได้แก่ Nostocales และ Stigonematales โดยส่งผลที่สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้คือพบจีโนส *Nostoc* และ *Anabeena* มากที่สุด *Fischerella*, *Cylindospermum*, *Gloeotrichia*, *Stigonema* และ *Mastigocladus*

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง, การเจริญของ cyanobacteria ในอาหารเหลวและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x สำหรับกลุ่มที่คาดว่าเป็น *Nostoc* sp. ทั้ง 3 ลักษณะข้างต้นไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม heterocyst cell ของ cyanobacteria ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นวงกลม (50%) รองลงมาคือวงรี (44.12%) และเป็นสี่เหลี่ยม

(5.88%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่คาดว่าเป็น *Anabaena* sp. จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Nostoc* sp. แต่ส่วนใหญ่โคโลนีบนอาหารแข็งของกลุ่มนี้จะเป็น filamentous หรือ gas forming colony, การเจริญในอาหารเหลวจะพบว่ามีอยู่เหนือและก้นภาชนะทดลอง อีกทั้งมักพบเซลล์เกาะอยู่ภาชนะทดลองด้วย และลักษณะ heterocyst cell ส่วนใหญ่จะเป็นรูปวงรี นอกจากนี้การเรียงตัวของเซลล์บนเส้นสาย (trichome) มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ในขณะที่หากเป็น *Nostoc* sp. จะมีการเรียงตัวของเซลล์บน trichome ไม่เป็นระเบียบ สำหรับกลุ่มที่คาดว่าเป็น *Anabaenopsis* sp. จะมีสีน้ำตาลและ trichome ลักษณะคล้ายกันหอย (spirally coiled) ส่วนกลุ่มที่คาดว่าเป็น *Nodularia* sp. ลักษณะโคโลนีบนอาหารเหลวสามารถแยกออกจากกลุ่มของ *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีลักษณะคล้ายเส้นขนที่เจริญพันผิวอาหาร, heterocyst cell เป็นรูปสี่เหลี่ยมและ vegetative cell มีขนาดด้านกว้างมากกว่าด้านยาว (Desikachary, 1958) ในกลุ่มที่เป็น branching จะเจริญเติบโตได้ช้ากว่า cyanobacteria กลุ่มอื่นๆ และบางสายพันธุ์มีลักษณะคล้ายเส้นขนบนอาหารแข็ง และพบว่ามีกิ่งก้านของ trichome ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 2.7 แสดงให้เห็นว่า *Nodularia* sp., *Anabaenopsis* sp. และ branching group สามารถแยกความแตกต่างออกจาก cyanobacteria กลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน โดยการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง การเจริญบนอาหารเหลวและลักษณะของเซลล์ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แต่ *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่พบในดินมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นการจำแนกโดยการศึกษาดังกล่าวข้างต้น Rippka (1988) จึงใช้ส่วนที่เป็น hormogonia (cell ที่ใช้สืบพันธุ์) ในการจำแนกความแตกต่างของทั้งสอง genus ซึ่ง *Nostoc* sp. จะพบ hormogonia ได้ตั้งแต่ยังเป็น trichome ใหม่ๆ ที่มี heterocyst อยู่ที่ปลายทั้งสองของ trichome hormogonia จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ทั่วไปและมีรูปร่างแตกต่างกัน (อาจพบ cylindrical หรือ isodiametric) และบางครั้งอาจพบ gas vacuole ส่วน *Anabaena* sp. จะพบ hormogonia ได้ตั้งแต่ยังเป็น trichome ใหม่ๆ เช่นกัน แต่จะมี heterocyst cell ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของ trichome hormogonia จะมีขนาดและรูปร่างไม่แตกต่างจากเซลล์ทั่วไป (หากเป็น filament ที่สมบูรณ์แล้วอาจมีขนาดสั้นกว่า) และไม่พบ gas vacuole

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ายากแก่การจำแนก cyanobacteria ในแต่ละ genus โดยเฉพาะในระดับ species ปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีทาง molecular genetic มาใช้ในการศึกษา cyanobacteria ดังเช่น การศึกษาลักษณะของ cyanobacteria (Porath และ Zehr, 1994), การจำแนกและวิเคราะห์ทาง phylogenetic ใน toxigenic cyanobacteria (Neilan, 1995) และการเปรียบเทียบลักษณะทาง phenotype และ genotic ของ cyanobacteria ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นกับ cyanobacteria ที่ดำรงชีวิตอิสระบนพื้นที่เดียวกัน (West และ Adam, 1997) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษา cyanobacteria โดยใช้วิธีทาง molecular genetic ซึ่งจะใช้ข้อมูลที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นส่วนประกอบร่วมต่อไป



Table 2.7 (continued)

Strains	Cell Morphology										Colony on BG <sub>11</sub> solid medium							Clumping cell on BG <sub>11</sub> liquid medium							ARA	
	Colour		Size of vegetative cell (µm)	Ratio of size vegetative cell	Heterocyst cell	Location of heterocyst cell	Colour		Size of colony on 4 weeks (cm)	Form	Elevation	Edge	Colour			Broth				umolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg of Chlorophyll a/h	Dark					
	Green	Pale-green	>5	W>L	Spherical	Terminal	Green	0-0.5	Circular	Flat	Filamentous	Entire	Green	Olive-green	Brownish	Reddish-brown	Ring	Granular	Viscid	Clumping on tube	Mat	Light				
IIINEA 1-1					Both																	0.549	0.000			
III NEA 2-5																						0.895	0.095			
II NEC*1-20																						4.481	0.050			
IIINEC*1-3																						0.624	0.071			
IIICR 2-1																						0.058	0.047			
IIICM 3-1																						0.551	1.884			
IIICA 1-33																						0.476	0.124			
IIICB 2-27																						0.232	0.047			
IIICD 1-17																						0.023	0.213			
IIINEA 2-11																						1.851	0.351			

B: cyanobacteria that expected to *Anabaena* sp.

Strains	Cell Morphology										Colony on BG <sub>11</sub> solid medium							Clumping cell on BG <sub>11</sub> liquid medium							ARA	
	Colour		Size of vegetative cell (µm)	Ratio of size vegetative cell	Heterocyst cell	Location of heterocyst cell	Colour		Size of colony on 4 weeks (cm)	Form	Elevation	Edge	Colour			Broth				umolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mg of Chlorophyll a/h	Dark					
	Green	Pale-green	>5	W>L	Spherical	Terminal	Green	0-0.5	Circular	Flat	Filamentous	Entire	Green	Olive-green	Brownish	Yellowish-brown	Ring	Granular	Viscid	Clumping on tube	Mat	Light				
INR 1-6					Both																	1.217	0.000			
INR 2-2																						0.525	0.410			
INC 2-1																						0.439	0.120			
INC 4-21																						1.333	0.172			
INCR 2-3																						1.114	0.258			
INCR 2-3-1																						0.526	0.045			
INCR 3-1																						0.474	0.363			
INCR 4-2																						0.188	0.473			
INM 1-1-3																						1.443	0.626			
INM 2-4-1																						0.517	0.259			
INM 3-1-3																						0.832	1.705			
INA 2-1																						0.201	0.005			
INC* 2-6																						0.862	0.000			
IND 1-14																						0.869	0.000			
IND-2																						0.418	0.418			
IND 2-3																						0.269	0.696			



Table 2.7 (continued)

B : cyanobacteria that expected to be *Anabaena* sp.

Strains	Cell Morphology										Colony on BG11, solid medium										Clumping cell on BG11, liquid medium										umolC2H4/mg of Chlorophyll a/h		
	Colour		Size of vegetative cell (µm)	Ratio of size vegetative cell	Heterocyst cell	Location of heterocyst cell	Colour		Size of colony on 4 weeks (cm)	Form		Elevation	Edge		Colour				Broth														
	Green	Pale-green	Olive-green	Brownish	Yellowish-brown	Redish-purple	0-1	1-3	3-5	>5	W>L	W<L	W=L	Spherical	Elliptical	Quadrat	Terminal	Intercalary	Both	Green	Pale-green	Olive-green	Brownish	Yellowish-brown	Redish-brown	Ring	Granular	Viscid	Clumping on tube	Mat	Light	Dark	
INR 1-6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.000	0.410	
INR 2-2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.120	0.410
INC 2-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.120	0.410	
INC 4-21	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.172	0.410	
INCR 2-3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.258	0.410	
INCR 2-3.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.045	0.410	
INCR 3-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.363	0.410	
INCR 4-2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.473	0.410	
INM 1-1-3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.626	0.410	
INM 2-4-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.259	0.410	
INM 3-1-3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1.705	0.410	
INA 2-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.005	0.410	
INC* 2-6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.000	0.410	
IND 1-14	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.000	0.410	
IND -2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.418	0.418	
IND 2-3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.696	0.418	
INEC 4-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.236	0.418	
INEM 3-3-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.710	0.418	
INED 1-2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.000	0.418	
ICC 3-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.000	0.418	
ICCR 3-2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.277	0.418	
ICM 3-1-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.157	0.418	
ICA 2-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.161	0.418	
III NF 1-4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.291	0.418	
IV NR 3-9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.026	0.418	
II NC 3-20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.026	0.418	
III NCR 1-11	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.415	0.415	







Table 2.7 (continued)

E : cyanobacteria that expected to be branching group

Strains	Cell Morphology					Colony on BG11 solid medium					Clumping cell on BG11 liquid medium					ARA	
	Colour	Size of vegetative cell (um)	Ratio of size vegetative cell	Heterocyst cell	Location of heterocyst cell	Colour	Size of colony on 4 weeks (cm)	Form	Elevation	Edge	Colour	Broth	ARA	umolC2H4/mg of Chlorophyll a/h			
INER 4-4	Green	0-1	>L	Spherical	Terminal	Green	0-0.5	Circular	Flat	Entire	Green	Clumping on tube	Light	0.504			
ICM 1-2-21	Pale-green	1-3	>L	Spherical	Terminal	Pale-green	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.826			
ICM 3-1-2	Olive-green	3-5	>L	Spherical	Terminal	Olive-green	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.437			
ICM 3-4-2	Brownish	3-5	>L	Spherical	Terminal	Brownish	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	1.690			
III CC* 2-1 1/2	Yellowish-brown	3-5	>L	Spherical	Terminal	Yellowish-brown	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.042			
	Reddish-purple	3-5	>L	Spherical	Terminal	Reddish-brown	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.042			

F : reference strains

Strains	Cell Morphology					Colony on BG11 solid medium					Clumping cell on BG11 liquid medium					ARA	
	Colour	Size of vegetative cell (um)	Ratio of size vegetative cell	Heterocyst cell	Location of heterocyst cell	Colour	Size of colony on 4 weeks (cm)	Form	Elevation	Edge	Colour	Broth	ARA	umolC2H4/mg of Chlorophyll a/h			
Nostoc sp.	Green	0-1	>L	Spherical	Terminal	Green	0-0.5	Circular	Flat	Entire	Green	Clumping on tube	Light	0.000			
A. cylindrica	Pale-green	1-3	>L	Spherical	Terminal	Pale-green	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.275			
Hapalosiphon sp.	Olive-green	3-5	>L	Spherical	Terminal	Olive-green	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.467			
Calothrix sp.	Brownish	3-5	>L	Spherical	Terminal	Brownish	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.212			
Scytonema sp.	Yellowish-brown	3-5	>L	Spherical	Terminal	Yellowish-brown	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.386			
	Reddish-purple	3-5	>L	Spherical	Terminal	Reddish-brown	0.5-0.8	Circular	Flat	Entire	Olive-green	Clumping on tube	Light	0.000			

## 2. การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

นอกจากกลุ่ม heterocystous cyanobacteria ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แล้วยังพบว่า cyanobacteria ที่ไม่มี heterocyst cell เช่น *Plectonema boryanum* ยังสามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะ anaerobic และ anaerobic ได้เช่นกัน (Rippka และ Waterbury, 1977 และ Stewart, 1980) อีกทั้งยังมีรายงานว่า unicellular species บางชนิดเช่น *Synechococcus* (พบในน้ำ) สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ในเซลล์เดียวกันได้ (Mitsui, 1986) Gallon (1980) ได้ทำการศึกษาใน *Gloeocapsa* และ *Gloeotheca* ซึ่งเป็น unicellular cyanobacteria พบว่าสามารถสังเคราะห์แสงในเวลากลางวันแต่ตรึงไนโตรเจนในเวลากลางคืน โดยจะสะสมคาร์โบไฮเดรตในเวลากลางวันเพื่อใช้เป็นพลังงานในการตรึงไนโตรเจนเวลากลางคืน ในขณะที่ *Trichodesmium thiebautii* เป็น nonheterocystous cyanobacteria สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงในเวลากลางวันซึ่งเป็นช่วงที่มีการสังเคราะห์แสงสูงสุดอาจเกิดจาก 1) เส้นสาย (trichome) ของ *Trichodesmium* sp. มีความแตกต่างในการสร้าง  $O_2$  และการตรึงไนโตรเจน หรือ 2) โครงสร้างของแต่ละเซลล์มีการจำแนกอย่างพิเศษภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม *Gloeotheca* spp., *Oscillatoria* spp. และ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ RF-1 จะตรึงไนโตรเจนเวลากลางคืนที่มีความเข้มข้นของ  $O_2$  ต่ำ

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของ cyanobacteria ทั้งในสภาวะมืดและสว่างโดยวิธี Acetylene reduction assay (ARA) พบว่าทั้ง 102 ตัวอย่างซึ่งเป็น heterocystous cyanobacteria สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทั้งในสภาวะมืดและสว่าง (ตารางที่ 2.8) โดยในสภาวะที่สว่าง cyanobacteria ส่วนใหญ่คือ 48.54% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับต่ำ ( $0.0-0.5 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม.), 28.16% ตรึงไนโตรเจนได้ในระดับปานกลาง ( $0.51-1.0 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม.) และ 23.30% สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับสูง (มากกว่า  $1.0 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม.) ส่วนในสภาวะมืด 83.50%, 10.68% และ 5.82% ของ cyanobacteria ทั้งหมดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับต่ำ, ปานกลางและสูงตามลำดับ จากตารางที่ 2.7 และ 2.8 สามารถสรุปได้ว่า cyanobacteria ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มืดและสว่างได้ในระดับต่ำในสภาวะที่สว่าง 20.39% ของ *Nostoc* sp., 20.39% ของ *Anabaena* sp., 1.94% ของ *Anabaenopsis* sp., 1.94% ของ branching group และ 3.88% ของ *Nodularia* sp. จะตรึงไนโตรเจนได้ในระดับต่ำ ส่วนในสภาวะที่มืด 36.89%, 37.86%, 4.85%, 19.4%, 1.94% ของ *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Anabaenopsis* sp., branching group และ *Nodularia* sp. ตามลำดับ ก็สามารถตรึงไนโตรเจนในระดับต่ำเช่นกัน กลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับปานกลางในสภาวะที่สว่างได้แก่ *Anabaena* sp. = 14.57%, *Nostoc* sp. = 10.68%, branching group = 1.94% และ *Anabaenopsis* sp. = 0.97% ส่วนในสภาวะที่มืด ได้แก่ *Anabaena* sp. = 3.88%, *Nostoc* sp. = 2.91%, *Nodularia* sp. = 1.94% และ branching group = 1.94% สำหรับกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับสูงในสภาวะที่สว่างคือ *Nostoc* sp. = 12.62%,

*Anabaena* sp. = 7.77%, *Anabaenopsis* sp. = 1.94% และ branching group 0.97% ในขณะที่ในสภาวะที่มีคได้ผลดังนี้ *Nostoc* sp. = 3.88%, *Anabaena* sp. 0.97% และ branching group 0.97% เช่นกัน

จากผลการศึกษพบว่ากลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า  $0.5 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a/ชม. ส่วนใหญ่เป็น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. (ตารางที่ 2.8) โดยเป็น 56% ของ cyanobacteria ทั้งหมดที่แยกได้จากบนพื้นที่ภูเขา, 52.94% ของ cyanobacteria ที่อยู่ในพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูก (พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง, พื้นที่ปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่องและพื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว), 50% ของพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเพาะปลูก (พื้นที่รกร้าง) และ 47.22% ของพื้นที่ป่า, พื้นที่ป่าที่ถากถางมาทำการเพาะปลูก 1 ปี, มากกว่า 1 ปี และพื้นที่ที่มีการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงสูง (พื้นที่แปลงผัก) นอกจากนี้บางสายพันธุ์ เช่น INM3-1-1 (พื้นที่เชิงเขา) สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีคได้สูงกว่าสภาวะที่สว่าง อาจเนื่องจากมีการสะสม ATP ในเวลากลางวันเพื่อใช้ในการตรึงไนโตรเจนเวลากลางคืน เช่นเดียวกับกลุ่ม unicellular cyanobacteria Roger, Zimmerman และ Lumpkin (1992) พบว่าความสามารถในการตรึงไนโตรเจนขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสม เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงโดยจะพบว่ามีประชากร cyanobacteria ประมาณ  $1 \times 10^2 - 8 \times 10^6$  cell/g ของดิน และตรึงไนโตรเจนให้ข้าวได้ประมาณ 10-20 KgN/ha นอกจากนี้ pH และปริมาณฟอสฟอรัส (P) ก็มีอิทธิพลต่อจำนวนประชากรของ cyanobacteria เช่นกัน จากผลการศึกษพบว่า cyanobacteria ที่อยู่บนพื้นที่ที่มี P สูงจะสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า cyanobacteria บนพื้นที่อื่น ดังเช่นสายพันธุ์ INC 4-21 ซึ่งแยกได้จากพื้นที่ที่ปลูกพืชไร่อย่างต่อเนื่องในภาคเหนือมี P สูงประมาณ 70 ppm สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง 1.443 และ  $0.626 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a/ชม. ในสภาวะที่สว่างและมีคตามลำดับ เช่นเดียวกับ IND 1-3 จากพื้นที่แปลงผักในภาคเหนือ (P = 153 ppm) สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 1.434 และ  $0.167 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a/ชม. ในสภาวะที่สว่างและมีคตามลำดับในทางตรงกันข้ามสายพันธุ์ INEM 3-3-11 จากพื้นที่เชิงเขาภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งในดินมี P 4 ppm สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 0.346 และ  $0.127 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม. ในพื้นที่ที่สว่างและมีคตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ P ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ ATP และมีความสำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ในการกระตุ้นให้เอนไซม์ nitrogenase เป็น  $\text{N}_2$  ไปเป็น  $\text{NH}_3$

### 3. การศึกษาโดยใช้ *nifH* gene

จากการที่เอนไซม์ nitrogenase เป็นเอนไซม์หลักที่มีความสำคัญในการตรึงไนโตรเจนของ cyanobacteria จึงได้มีการใช้ *nif* gene ในการศึกษาความหลากหลายของ cyanobacteria ซึ่ง *nifH* gene มีบทบาทในการสร้างส่วนที่เป็น Fe protein ของเอนไซม์ nitrogenase (Porath และ Zehr, 1994 ดังนั้นการศึกษครั้งนี้ถึงใช้ *nifH* primer ประกอบด้วย Primer1 (5'-GGAATTCCTGYGAYCCNAARGCNGA-3') ซึ่งอยู่ใน *nifH* sequence ที่ตำแหน่ง 318 ถึง 335 ใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7210 และ Primer 2

(5'-CGGATCCGDNGCCATCATYTCNCC-3') ที่ตำแหน่ง 659 ถึง 674 ในสายตรงข้าม ผลการเพิ่มจำนวน DNA จาก 107 ตัวอย่าง (รวมสายพันธุ์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง) สามารถเพิ่มจำนวนได้ 1-6 amplification products ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์

โดยสายพันธุ์อ้างอิง *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 มี PCR-product เพียง 1 band ขนาด 330 bp., *Calothrix* sp. DASH 02101, *Scytonema* sp. และ *Anabaena cylindrica* พบ 2 band ขนาด 830 และ 330 bp. ส่วน *Nostoc* sp. พบ 5 bands ขนาด 830, 446, 330, 208 และ 182 bp. (รูปที่ 2.8) จะเห็นได้ว่า major band ที่พบคือขนาด 330 bp. ซึ่งใกล้เคียงกับที่รายงาน โดย Porath และ Zehr (1994) คือ 359 bp. Cyanobacteria ทั้งหมดสามารถจำแนกได้เป็น 77 กลุ่มที่แตกต่างกันและมีเพียง 4 สายพันธุ์ที่ไม่มี major band ที่ 330 bp. ได้แก่ ICF3-22 (*Nostoc* sp.), ICD1-1 (*Nostoc* sp.), INM3-1-3 (*Anabaena* sp. และ IINCR4-1 (*Anabaenopsis* sp.) หลังจากนั้นได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *nifH* gene ของ cyanobacteria ด้วยการสร้าง dendrogram โดย UPGMA algorithm (รูปที่ 2.9) ทำให้สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ เมื่อนำความสัมพันธ์ของ *nifH* product มาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน พบว่ากลุ่มที่มี *nifH* product ใกล้เคียงกับ *A. cylindrica* ซึ่งมีขนาดของ band ประมาณ 380, 330 และ 290 bp. สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า  $0.5 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม. ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *nifH* fragment อาจจะสามารถนำมาเป็นเครื่องมือเพื่อใช้ในการทำนายประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ cyanobacteria ได้

อย่างไรก็ตาม Porath และ Zehr (1994) รายงานว่า *Anabaena oscillarioides* (M63686), *Anabaena* sp. สายพันธุ์ CA, *Nostoc* sp. และ *Nostoc muscorum* มีความคล้ายคลึงของ *nifH* sequence ดังนั้น *nifH* fragment จึงไม่สามารถนำมาแบ่งกลุ่มความหลากหลายของ cyanobacteria ได้ นอกจากนั้น Zehr และ McReynold (1989) พบว่า 66-79% ของ DNA sequence ของ *nifH* gene จะคล้ายคลึงกันใน *nifH* gene ของ *Anabaena* sp. (Mevarech, Rice และ Haselkorn, 1980), *Rhizobium meliloti* (Torok และ Kondorosi, 1981), *Clostridium pasteurianum* (Chen, K.C.N., Chen, J.S. และ Johnson, 1986), *Azotobacter vinelandii* (Brigle, Newton และ Dean, 1985), *Klebsiella pneumoniae* (Scott, Rolfe และ Shine, 1981 และ Sundaresan และ Ausubel, 1981) และ *Rhodobacter (Rhodospseudomonas) capsulatus* (Schumann และ Waitehes, 1986) Zehr และ Porath (1994) ได้รายงาน DNA sequence ของ *nifH* fragment จากการศึกษาในกลุ่มที่เป็น heterocystous และ nonheterocystous cyanobacteria เปรียบเทียบกับ cyanobacteria ชนิดอื่นๆ eubacteria และ archaeobacteria sequence พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันขึ้นอยู่กับ bacteria แต่ละชนิด ฉะนั้น *nifH* gene จึงยากที่จะสามารถจำแนก cyanobacteria แต่ละ genus ได้ ดังนั้นจึงได้นำ random primers มาใช้ในการศึกษาต่อไป

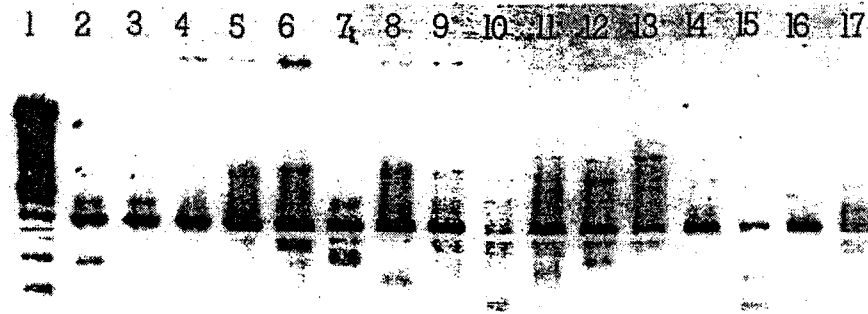


Fig. 2.8A *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 100 bp DNA ladder marker, *Nostoc* sp., *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon* sp. DASH 05101, *Calothrix* sp. DASH 02101, *Scytonema* sp., III NM 1-4-1, II NEM 1-4-8, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4, I NEM 3-3-11, II NEM 3-2-40 and III CM 3-1, respectively.

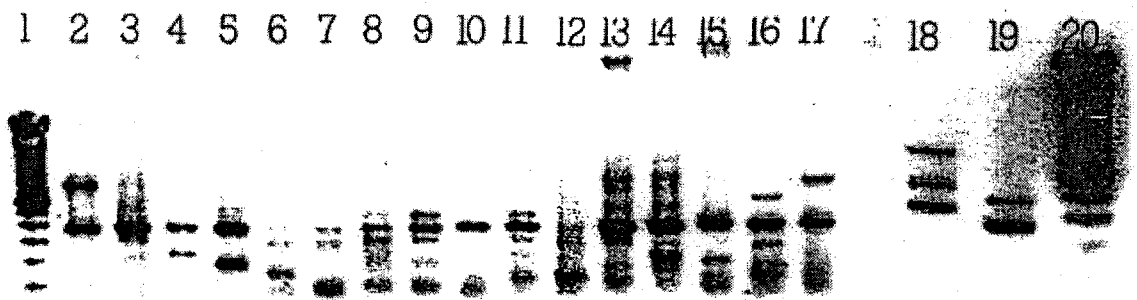


Fig. 2.8B *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-20; 100 bp DNA ladder marker, I NEA 1-2/2, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC\* 1-4, II NEC\* 1-20, I ND 1-3, I CD 2-2, I CD 1-14, I CD 1-1, III CD 1-17, and 100 bp DNA ladder marker, respectively.

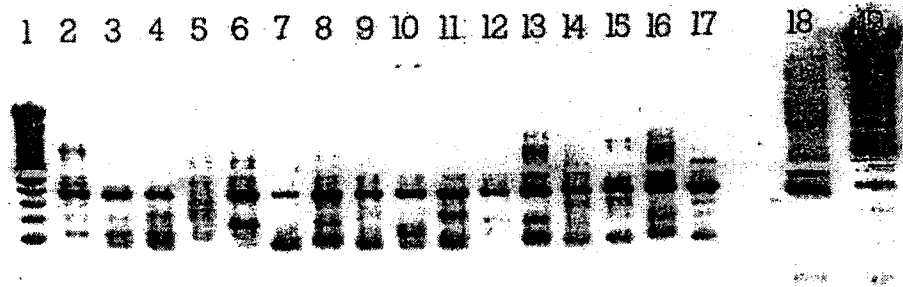


Fig. 2.8C *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Nostoc sp.* group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-19, 100 bp DNA ladder marker, INF, INEF 4-2, III NEF 3-4, ICF 3-22, ICF 2-2, II NEC 4-12, III NEC\* 1-3, III NEC 3-29, III NEC 2-13, ICC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, II NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1, III CR 2-1 and 100 bp DNA ladder marker, respectively.

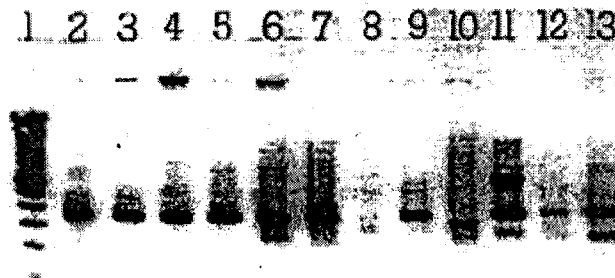


Fig. 2.8D *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-13; 100 bp DNA ladder marker, *Nostoc sp.*, *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon sp.* DASH 05101, *Calothrix sp.* DASH 02101, *Scytonema sp.*, I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-13, I NEM 3-3-1 and I CM 3-1-1, respectively.

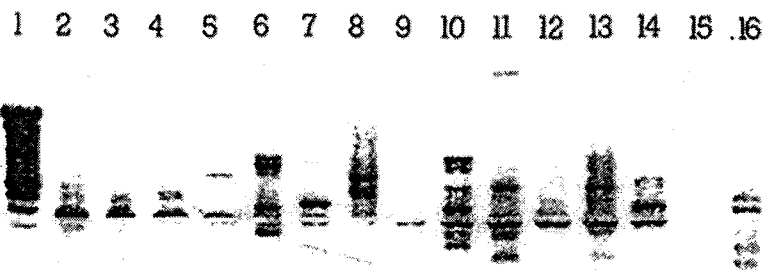


Fig. 2.8E *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-16; 100 bp DNA ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6 1/2, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, III CB 2-2, I NC\* 2-6, III CC\* 2-10, I ND2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III NED 2-9, respectively.

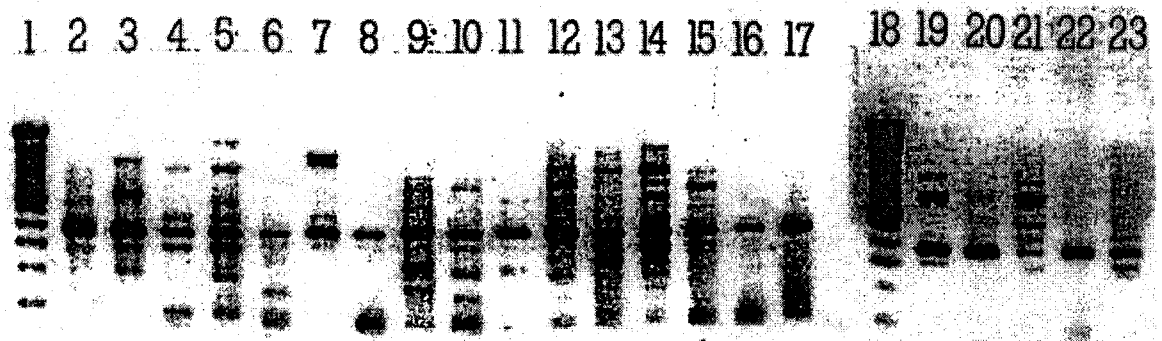


Fig. 2.8F *NifH*-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-23; 100 bp DNA ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, I NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 2-3.1, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, IIINECR 4-22, I CCR 3-22, III CCR 4-24, 100 bp DNA ladder marker, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.

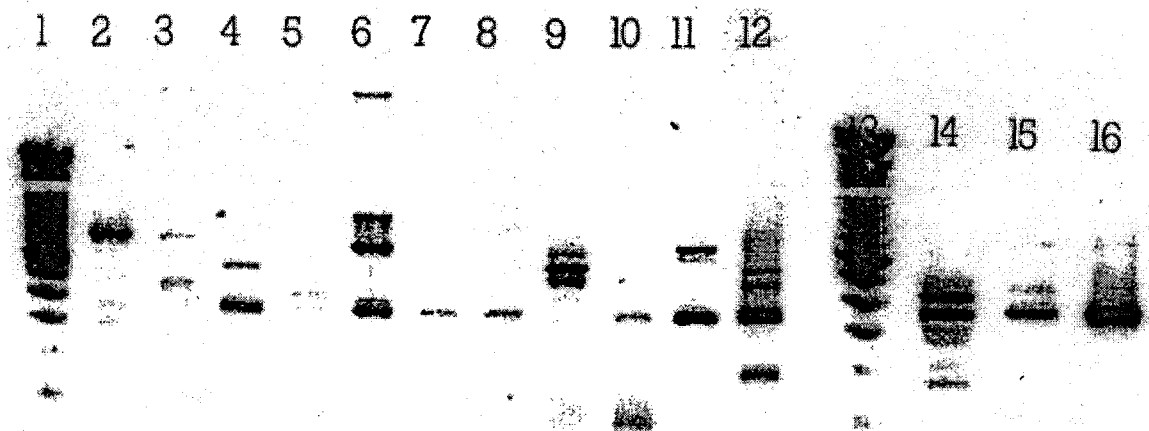


Fig. 2.8G *NifH*-PCR fingerprint patterns of other group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 100 bp DNA ladder marker, lane 2-5 (branching group); I CM3-1-2, I CM 3-4-2, I CM1-2-21, I NER 4-4, lane 6 and 7 (*Nodularia sp.*); I CM 3-1-5, I CA 1-10, lane 8-12 (*Anabaenopsis sp.*); I CF -2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1, III NEC 2-11, lane 13; 100 bp DNA ladder marker, lane 14 (*Nodularia sp.*); II CM 2-1-3, lane 15 (Branching group) III CC\* 2-1/2 and lane 16 (*Anabaena sp.*) II NM3-3-22, respectively.



0.00

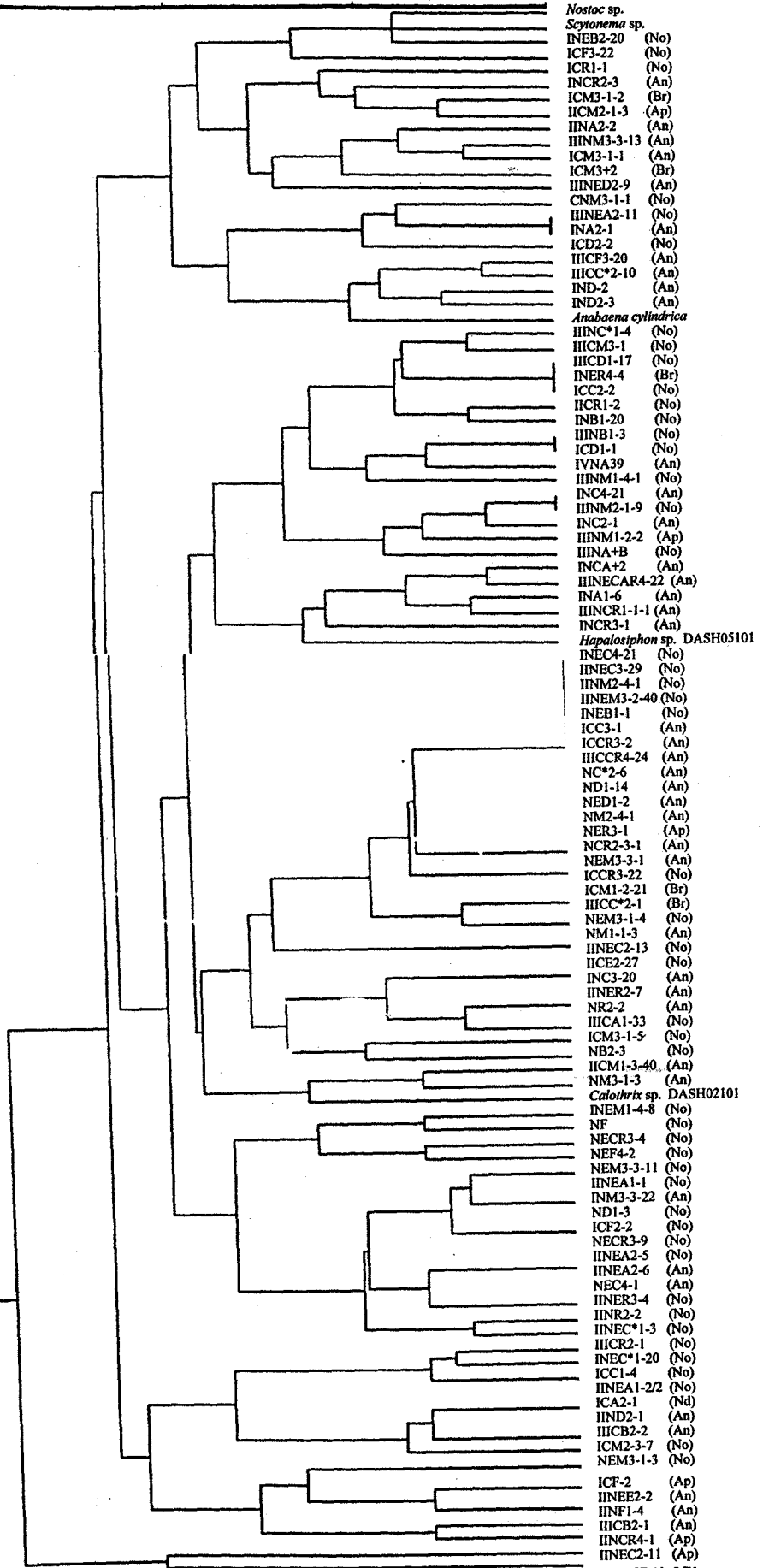
0.25

0.50

0.75

1.00

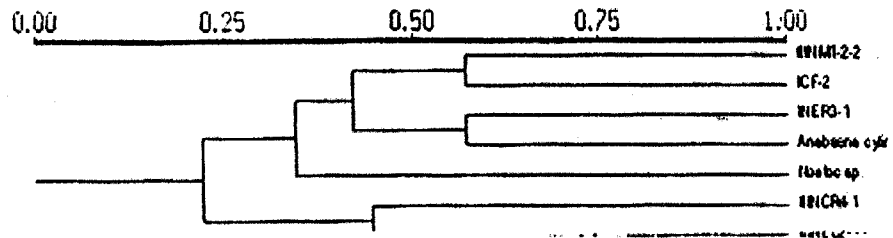
A



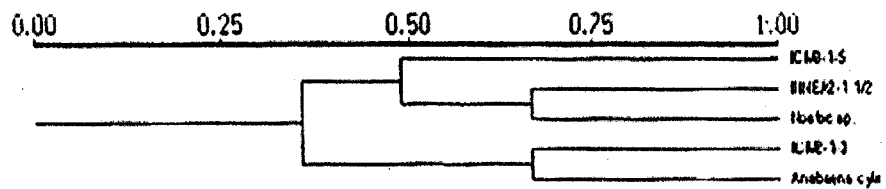
Note : No : *Nostoc* sp., Nd : *Nodularia* sp., An : *Anabaena* sp., Ap : *Anabaenopsis* sp. and Br : unidentified Branching species.



D



E



F

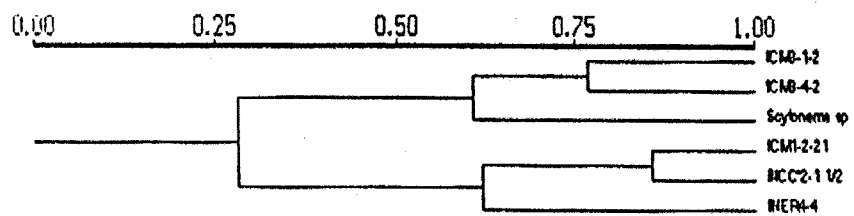


Fig. 2.9 Dendrograms (UPGMA) of similarities between *nifH* fragment; all cyanobacterial isolates (A), *Nostoc* sp. group (B), *Anabaena* sp. group (C), *Anabaenopsis* sp. group (D), *Nodularia* sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.

#### 4. การเพิ่มจำนวน genomic DNA โดยใช้ repetitive sequence เป็น primer

repetitive sequence ที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ short tandemly repeated repetitive sequence (STRR) ซึ่งใช้ในการ identify ทั้ง genus และ species ของ cyanobacteria (Mazel และคณะ 1990) sequence ดังกล่าวได้จากการศึกษาใน *Calothrix* sp. ซึ่งมีประมาณ 100 copy number / genome (Maazel และคณะ 1990) สำหรับหน้าที่ของ repetitive sequence ยังไม่เป็นที่ชัดเจน แต่ Haselkorn และ Buikema (1992) รายงานว่า repetitive sequence มีหน้าที่ควบคุม transcription termination หรือเป็นบริเวณของ DNA-binding protein ของ chromosome ในเซลล์ (Lupski และ Weinstock, 1992 และ Mazel และคณะ 1990) แต่อย่างไรก็ตาม repetitive sequence ได้นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและ identify ในกลุ่ม prokaryotes

จากการศึกษาโดยใช้ STRR primer จะได้ DNA product ที่มีขนาดอยู่ในค่า 4,000-132 bp. (รูปที่ 2.10) แบ่งได้เป็น 97 กลุ่มที่แตกต่างกัน (รวมสายพันธุ์อ้างอิง) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์โดยสร้างเป็น dendrogram สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (รูป 2.11A) ซึ่งบางสายพันธุ์ยังไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน จากนั้นนำมาศึกษาความสัมพันธ์ในแต่ละกลุ่ม genus (รูป 2.11B, C, D, E และ F) แต่ก็ยังคงพบว่าบางสายพันธุ์ไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ เช่น IN 2-6 (โคโลนีสีเขียว) และ ICC3-1 (โคโลนีสีน้ำตาล) ในกลุ่มของ *Anabaena* sp. หรือ INEM3-3-11 (เป็น filament บนอาหารแข็ง) และ IINC\*1-4 (ขอบโคโลนีไม่เป็นระเบียบบนอาหารแข็ง) ในกลุ่มของ *Nostoc* sp. เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้ STRR primer สามารถจำแนกบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกได้จากการใช้ *nifH* primer ดังนั้น ICD1-4, IINEA1-2/2 และ ICA2-1 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า STRR อย่างเดียวไม่เพียงพอในการศึกษาความหลากหลายของ cyanobacteria ดังนั้นจึงนำ random primer ชนิดอื่นมาใช้ร่วมด้วย ซึ่ง Rasmussen และ Sveuning (1998) ได้ศึกษาเปรียบเทียบและแบ่งกลุ่ม cyanobacteria ได้เป็น 4 กลุ่มโดยใช้ STRR และ LTRR primer (Masephol, Gorlitz และ Bohmen, 1996)

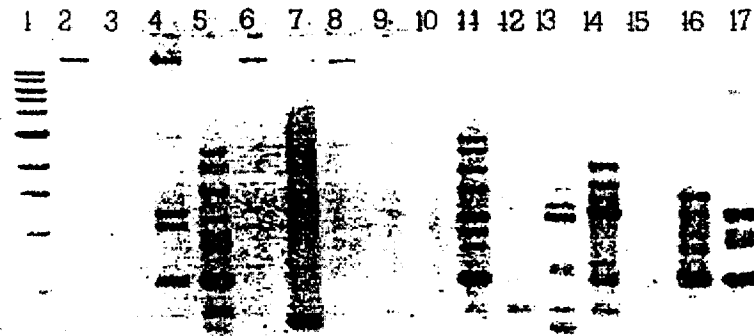


Fig 2.10A STRR-PCR fingerprint patterns of *Nostoc sp.* group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1kb ladder marker, *Nostoc sp.*, *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon sp.* DASH 05101, *Calothrix sp.* DASH 02101, *Scytonema sp.*, II NM 1-4-1, II NEM 1-4-8, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, ICM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4 and INEM 3-3-11, respectively.

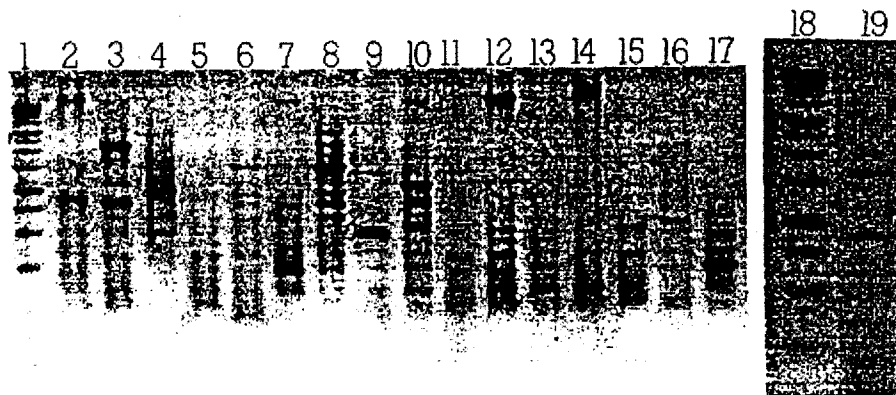


Fig. 2.10B STRR-PCR fingerprint patterns of *Nostoc sp.* group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-19; 1 kb ladder marker, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC\* 1-4, II NEC\* 1-20, I ND 1-3, I CD 2-2, I CD 1-4, I CD 1-1, 1 kb ladder marker and III CD 1-17, respectively.

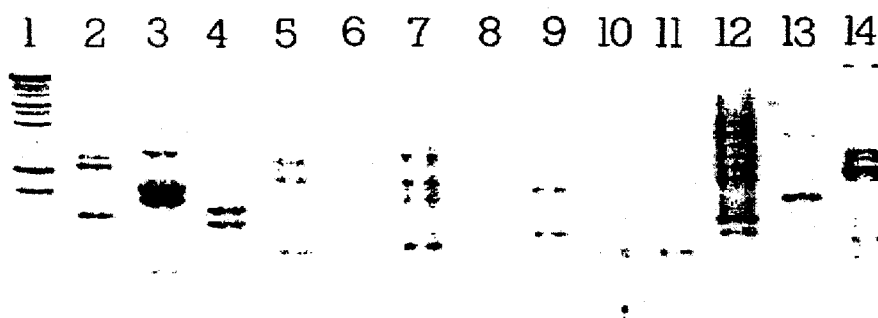


Fig. 2.10C STRR-PCR fingerprint patterns of *Nostoc sp.* group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-19; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, II NEC 4-21, III NEC\* 1-3, III NEC 3-29, III NEC 2-13, I CC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, II CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2 and I CR 1-1, III CR2-1 and 1kb ladder marker, respectively.

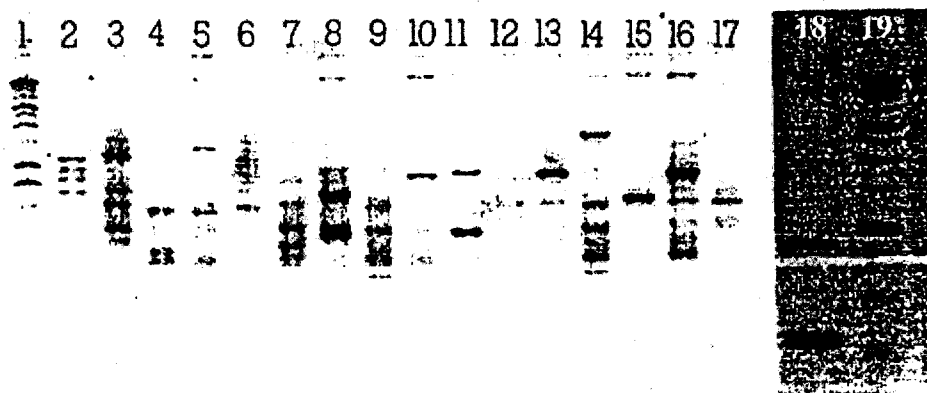


Fig. 2.10D STRR-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, *Nostoc sp.*, *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon sp.* DASH 05101, *Calothrix sp.* DASH 02101, *Scytonema sp.*, I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-13, I NEM 3-3-1, I CM 3-1-1, and II NM 3-3-22, respectively.

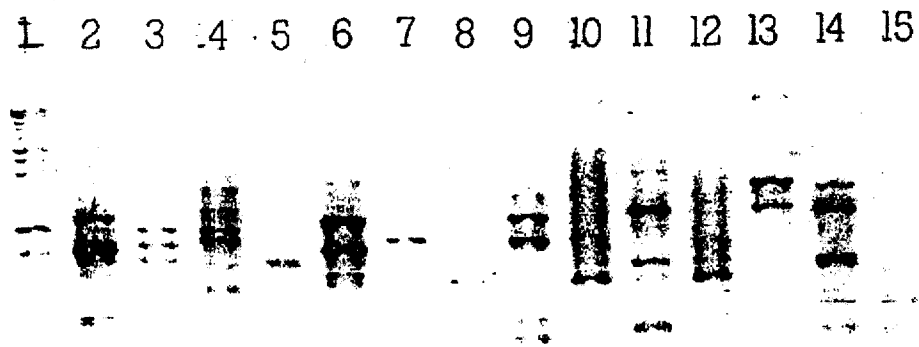


Fig. 2.10E STRR-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6<sup>1</sup>, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, I NC\* 2-6, III CC\* 2-10, I ND -2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III CB2 -2, respectively.

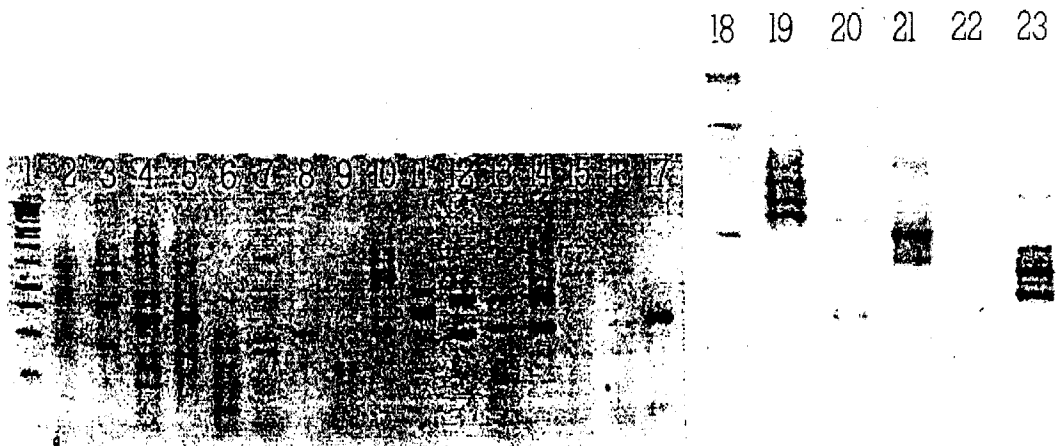


Fig. 2.10F STRR-PCR fingerprint patterns of *Anabaena sp.* group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-23; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, II NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 2-3.1, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NECR 4-22, I CCR 3-2, III CCR 4-22, 1 kb ladder marker, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.

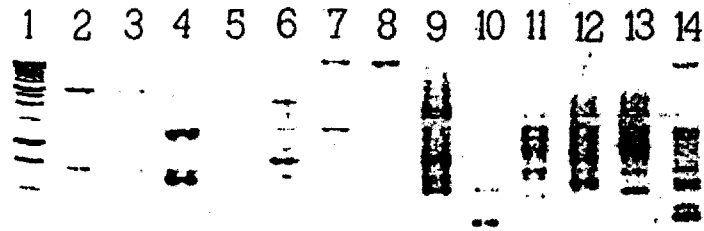
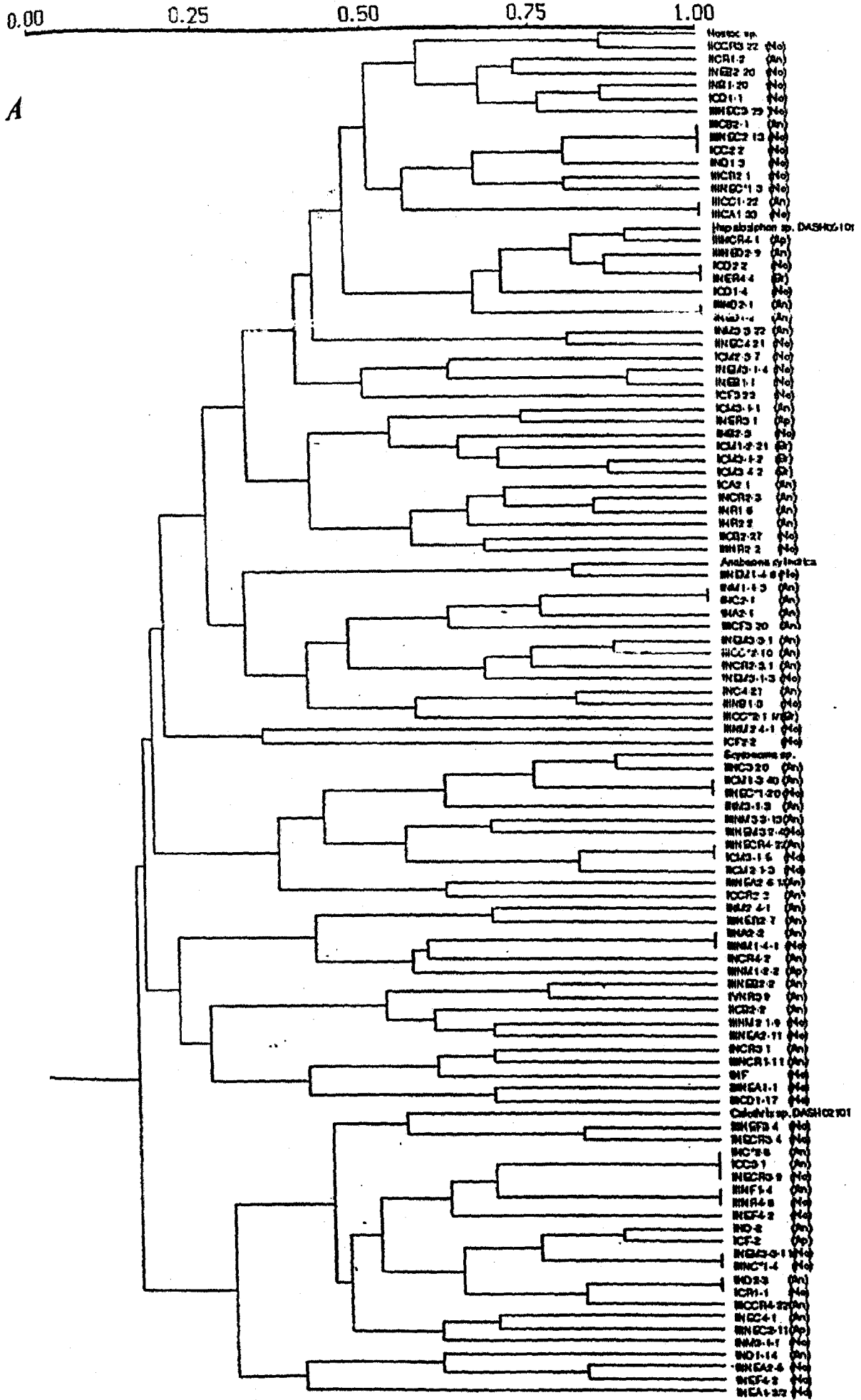
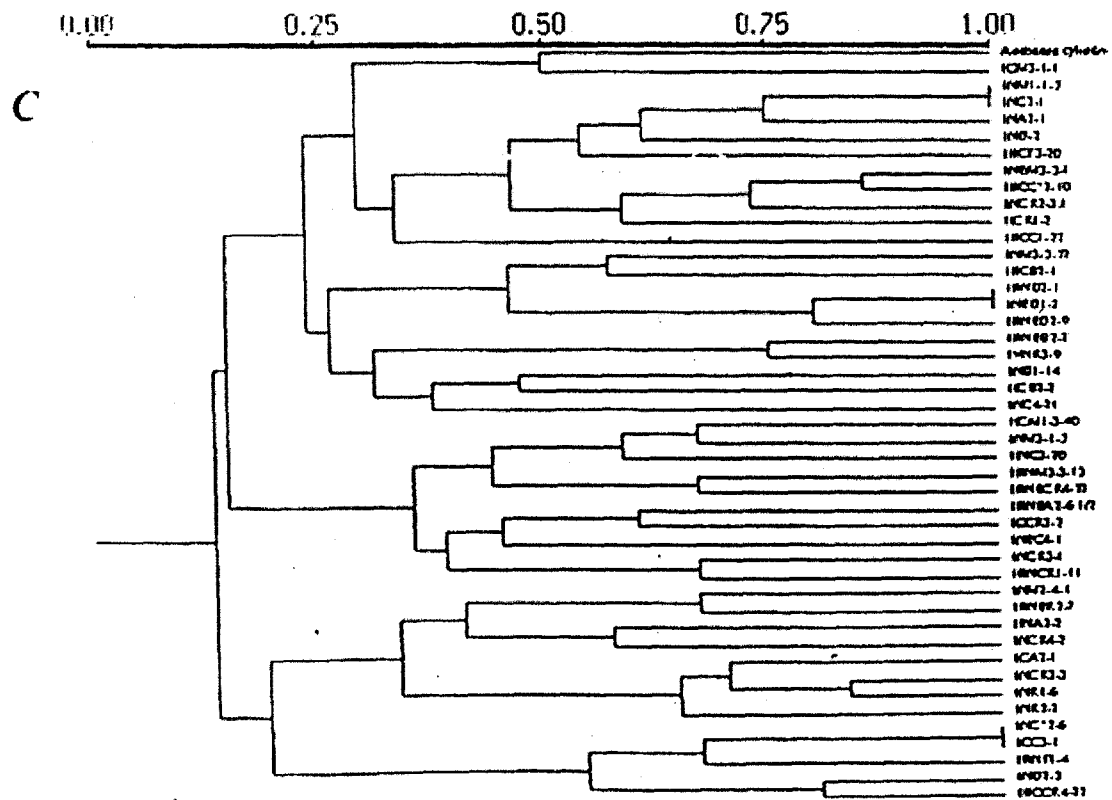
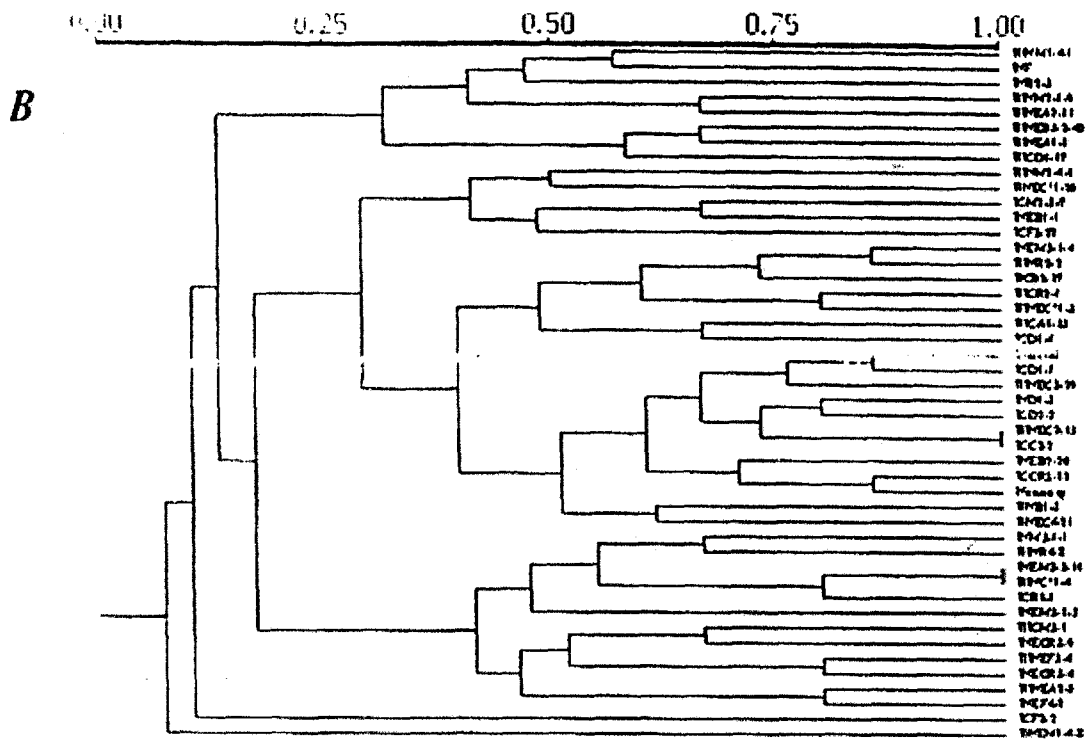


Fig. 2.10G STRR-PCR fingerprint patterns of other group (Table C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-5 (Branching group); I CM 3-12, ICM 1-2-21, I CM 3-4.2, I NER 4-4, lane 6 (*Anabaenopsis* sp.); III CC\* 2-1 1/2, lane 7-8 (*Nodularia* sp.) I CM 3-1-5, I CA 1-10, lane 9-13 (*Anabaenopsis* sp.); I CF -2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1, III NEC 2-11, respectively, and lane 14 (*Nodularia* sp.) II CM 2-1-3, respectively.





No: Notox sp., No: Notox sp., An: Amblopsis sp., Ap: Amblopsis sp., and D: Dorsal cytochrome b



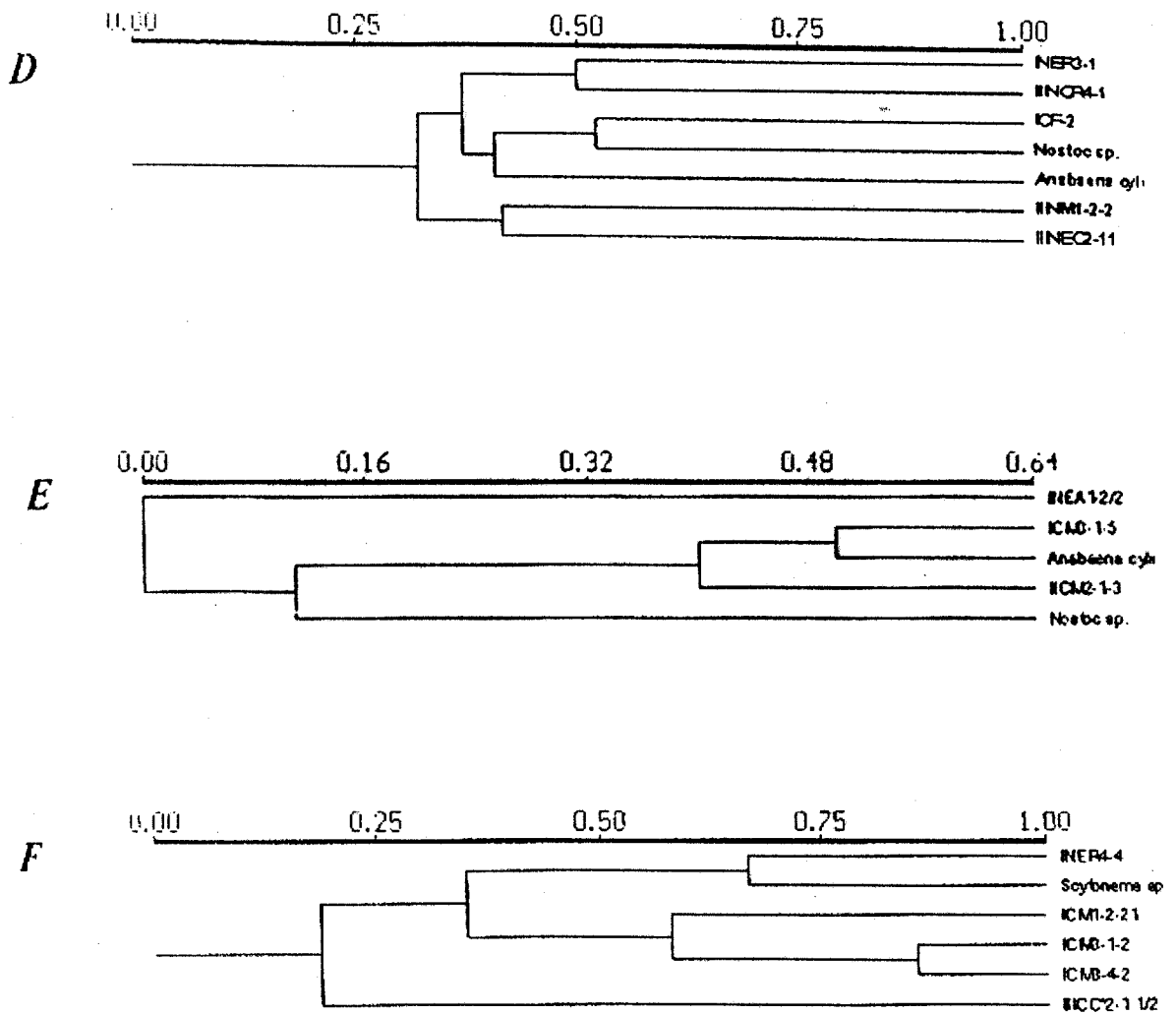


Fig. 2.11 Dendrograms (UPGMA) of similarities between short tandemly repeated repetitive sequence (STRR) primer; all cyanobacterial isolates (A), *Nostoc* sp. group (B), *Anabaena* sp. group (C), *Anabaenopsis* sp. group (D), *Nodularia* sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.

## 5. การศึกษาโดยใช้ DAF primer

DAF primer (DNA Amplification Fingerprint) ได้ออกแบบจาก arbitrary sequence โดยในครั้งแรกใช้เพิ่มจำนวน *Anabaena* sp ในແຫນແດງ (Esckew และคณะ 1993) West และ Adams (1997) ใช้ primer ดังกล่าวในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทาง genotype และ phenotypic ของ cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นและ cyanobacteria ที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระในพื้นที่เดียวกัน

DAF 8.7b primer ที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่า มี DNA products ในช่วงขนาดประมาณ 3,000-178 bp. (รูปที่ 2.12) และเมื่อใช้ DAF 10.6e primer มี DNA products ขนาดประมาณ 4,000-178 bp. (รูปที่ 2.14) มีเพียง 78 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้โดยใช้ DAF 8.7b primer (รวมสายพันธุ์อ้างอิง 3 ตัวอย่าง; *Nostoc* sp., *A. cylindrica* และ *Hapalosiphon* sp. DASH05101) และ 94 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA เมื่อใช้ DAF10.6e เป็น primer) และ 75 กลุ่มจาก cyanobacteria 94 ตัวอย่าง (ใช้ DAF 10.6e primer) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ในรูปแบบ dendrogram โดย NTSYS-PC package version 1.8 จากการใช้ primer 8.7b สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (รูป 2.13A) และ 7 กลุ่มเมื่อใช้ primer 10.6e หากแบ่งตาม genus ได้ผลดังนี้ DAF 8.7b primer; กลุ่มของ *Nostoc* sp. แบ่งได้เป็น 32 กลุ่มจาก 33 ตัวอย่าง (รูปที่ 2.13B) กลุ่มของ *Anabaena* sp. แบ่งได้เป็น 32 กลุ่มจาก 36 ตัวอย่าง (รูปที่ 2.13C) ส่วน DAF 10.6 primer; กลุ่มของ *Nostoc* sp. แบ่งได้เป็น 35 กลุ่มจาก 42 ตัวอย่าง (รูปที่ 2.15B) และกลุ่มของ *Anabaena* sp. แบ่งได้เป็น 34 กลุ่มจาก 39 ตัวอย่าง (รูปที่ 2.15C) ในขณะที่กลุ่มของ *Anabaenopsis* sp. (รูปที่ 2.13D และ 2.15D), กลุ่มของ *Nodularia* sp. (รูปที่ 2.13E และ 2.15E) และ branching group (รูปที่ 2.132F และ 2.152F) สามารถจำแนก cyanobacteria ได้อย่างชัดเจนเมื่อใช้ primer ทั้ง 2 ชนิด หากนำผลการศึกษา DAF primer มาเปรียบเทียบกับการใช้ *nifH* primer จะพบว่า ICF-2 และ INEM3-1-3 สามารถจำแนกออกจากกันได้เมื่อใช้ DAF primer บางตัวอย่างไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้หากใช้ STRR primer แต่สามารถจำแนกออกจากกันได้เมื่อใช้ DAF 8.7b primer เช่น IND2-3, ICR1-1 และ INB2-3 เป็นต้น และตัวอย่างที่ INM1-1-3 และ INC2-1 ก็สามารถจำแนกออกจากกันได้เมื่อใช้ DAF10.6e primer นอกจากนั้น บางครั้งการใช้ DAF8.7b primer จะสามารถ cyanobaeteria ได้ดีกว่า primer 10.6e เช่น IIINECR4-22 และ INER3-1 ดังนั้นจึงได้มีการนำ PCR product ของ primer เหล่านี้ (STRR, DAF 8.7b และ DAF 10.6e) มารวมกันเพื่อให้สามารถจำแนกแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยจัดอยู่ในรูป dendrogram

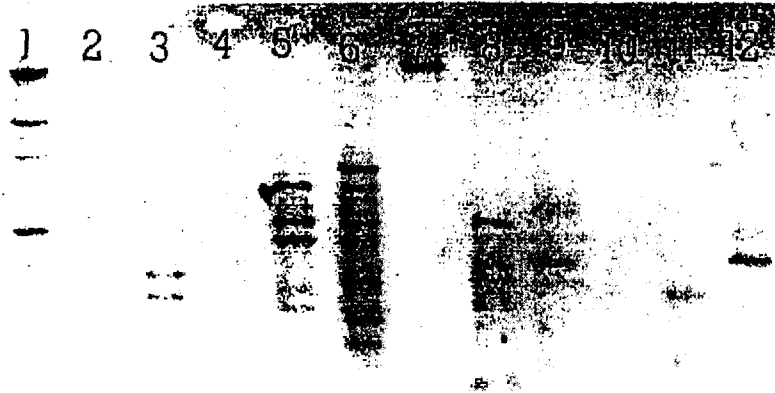


Fig. 2.12A DAF8, 7B-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, *Nostoc* sp., *Anabaena cylindrica*, *Hapalosiphon* sp. DASH 05101, III NM 1-4-1, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4 and III CM 3-1, respectively.

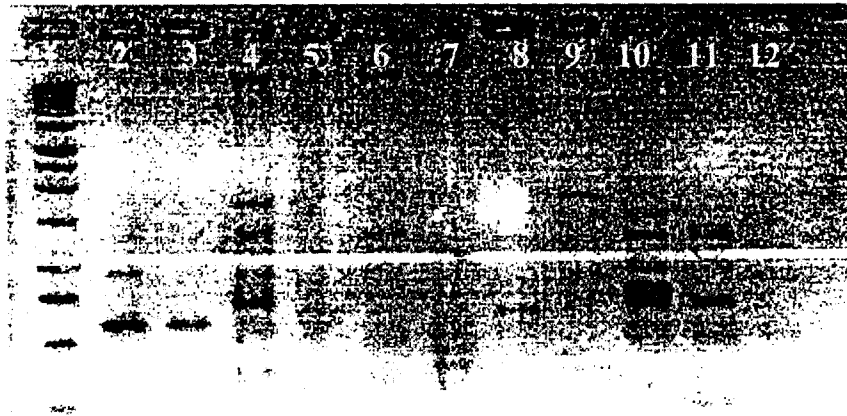


Fig. 2.12B DAF8, 7b-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, INB 1-20, III NC\*1-4, II NEC\*1-20, I CD 2-2, I CD 1-4, I CD 1-1\* and III CD 1-17, respectively.

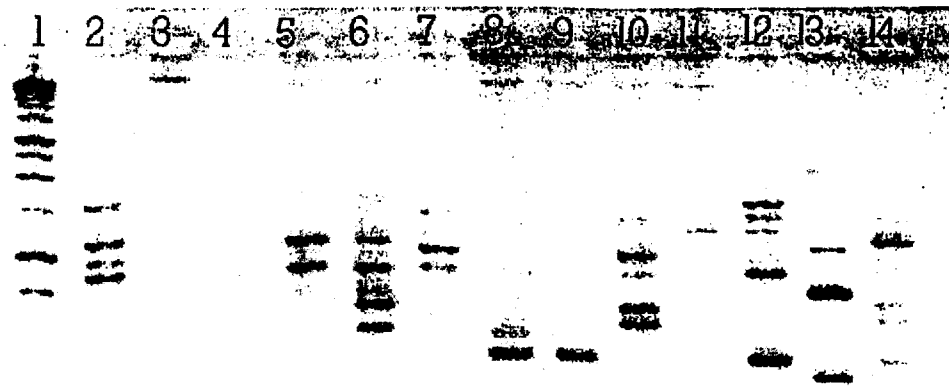


Fig. 2.12C DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, III NEC 3-20, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1 and III CR 2-1, respectively.

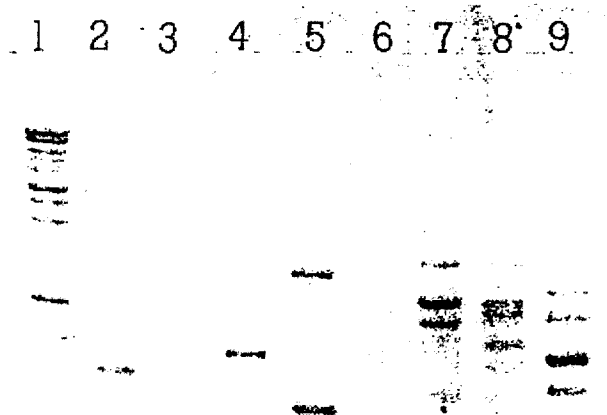


Fig. 2.12D DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-9; 1 kb ladder marker, *Nostoc* sp., *A. cylindrica*, *Hapalopsiphon* sp. DASH 05101, I NM 1-1-3, I NM 2-4-1, I NM 3-1-3, II NM 3-3-22 and I NEM 3-3-1, respectively.

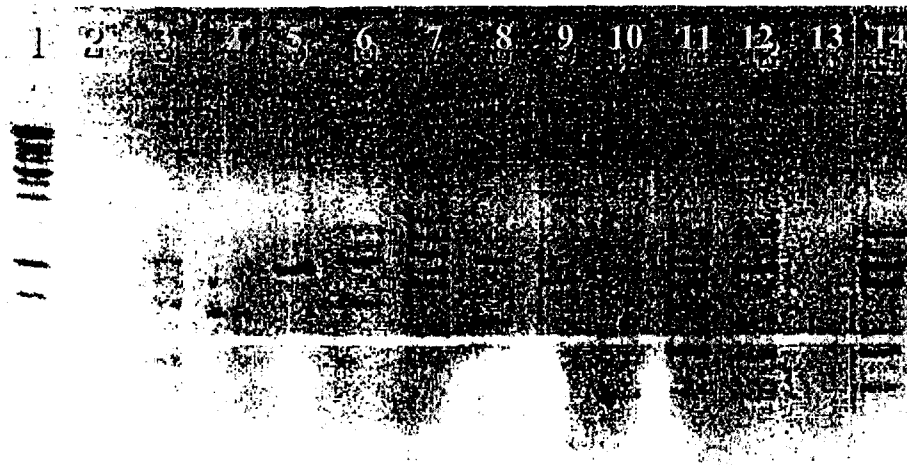


Fig. 2.12E DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-14; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, III NEA 2-6 1/2, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-1, III CB 2-2, III CC\*2-10, I ND-2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-2 and III NED 2-9, respectively.

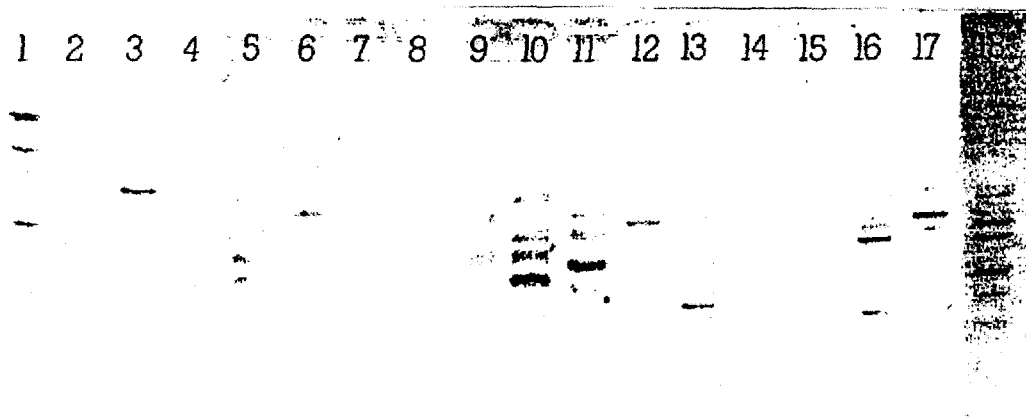


Fig. 2.12F DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-18; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, I NEC 4-1, I CC 3-1, I NCR 2-3, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NCR 4-22, III CCR 4-24, I NR 1-6, I NR 2-2, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.

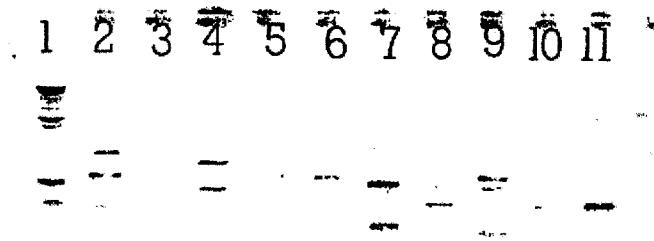
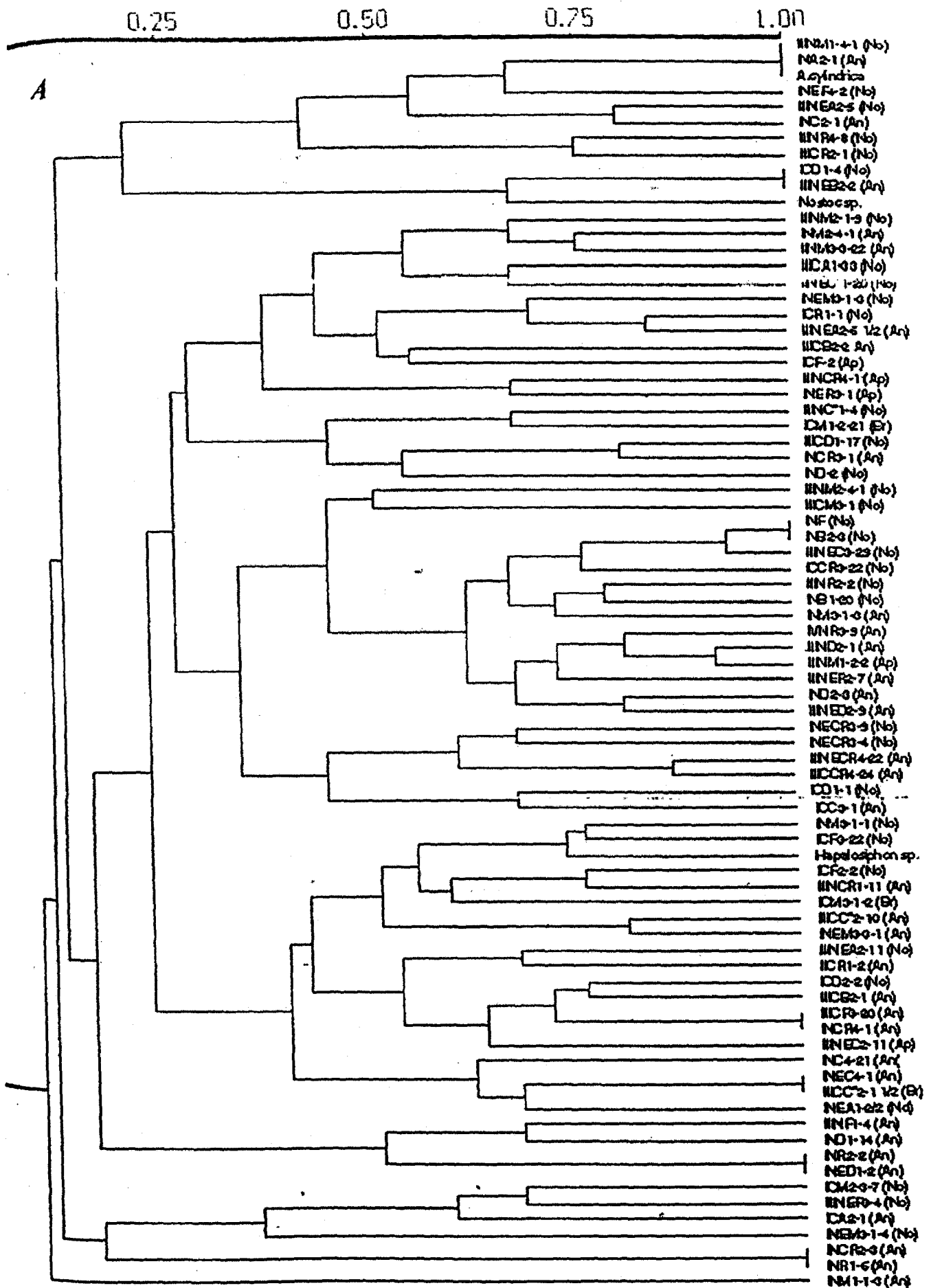


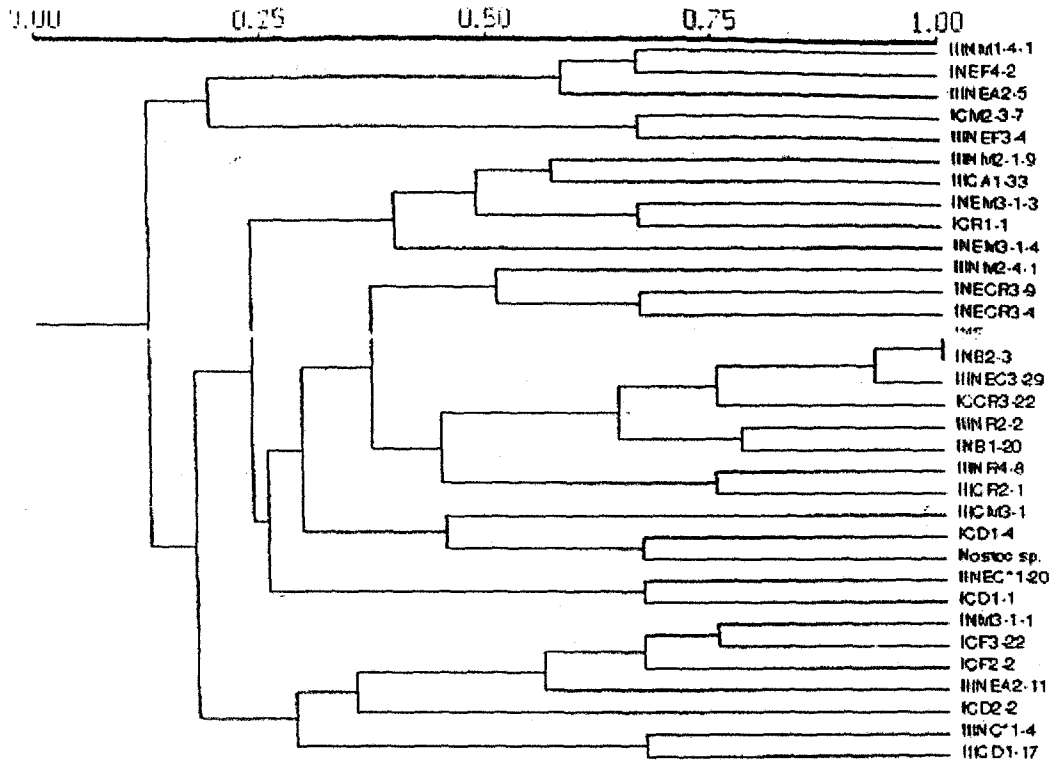
Fig. 2.12G DAF 8.7b-PCR fingerprint patterns of other group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-4 (branching group); I CM 3-1-2, I CM 3-4-2, I CM 1-2-21, III CC\* 2-1 1/2, lane 5 (*Nodularia* sp.); I NEA 1-2/2, lane 6-11 (*Anabaenopsis* sp.); I CF-2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1 and III NEC 2-11, respectively.



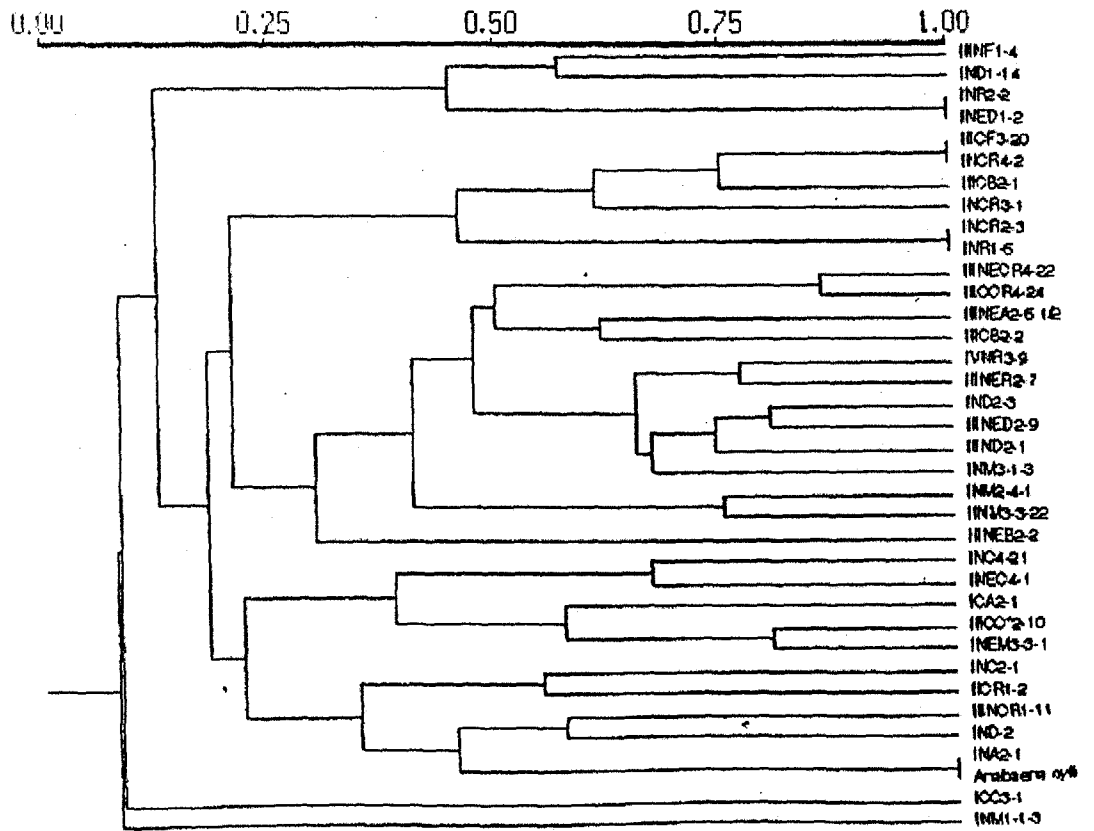


No Nostoc sp., Nd; Nodularia sp., An; Anabaena sp., Ap; Anabaenopsis sp. and B; Branching cyanobacteria

B



C



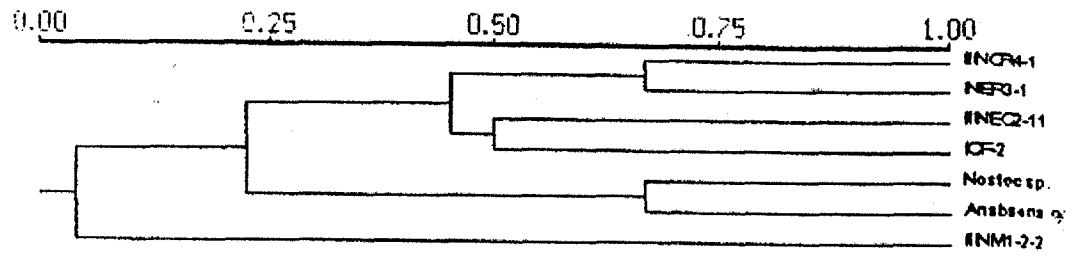
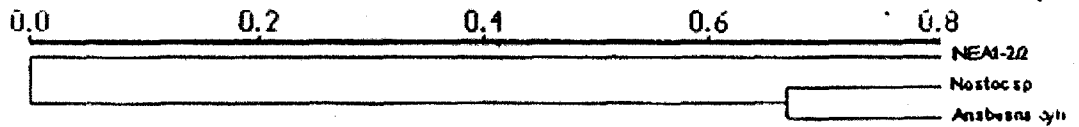
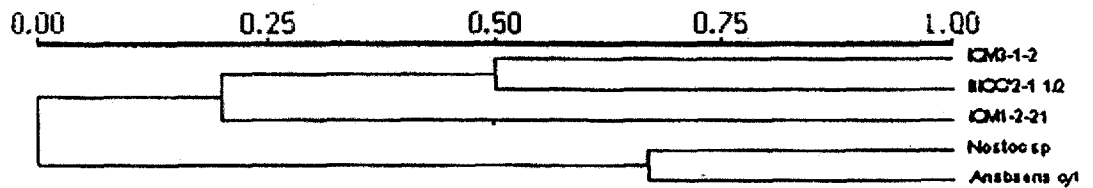
**D****E****F**

Fig. 2.13 Dendrograms (UPGMA) of similarities between DNA amplification fingerprint (DAF8.7b) primer; all cyanobacterial isolates (A), *Nostoc* sp. group (B), *Anabaena* sp. group (C), *Anabaenopsis* sp. group (D), *Nodularia* sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.

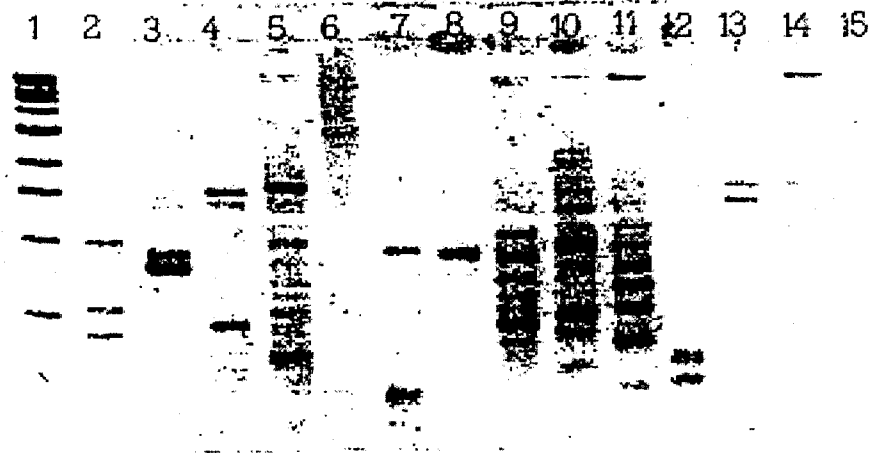


Fig. 2.14A DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, *Nostoc* sp., *A. cylindrica*, *Hapalosiphon* sp. DASH 05101, *Calothrix* sp. DASH 02101, *Scytonema* sp., III NM 1-4-1, III NM 2-1-9, III NM 2-4-1, I CM 2-3-7, I NM 3-1-1, I NEM 3-1-3, I NEM 3-1-4, I NEM 3-3-11 and III NEM 3-2-40, respectively.

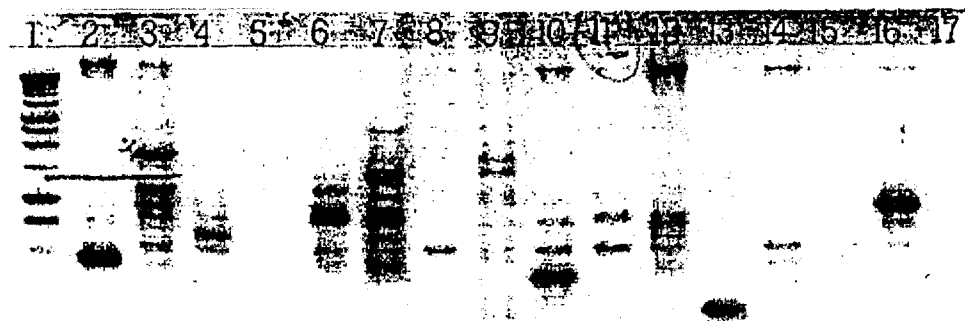


Fig. 2.14B DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1 kb ladder marker, III NEA 1-1, III NEA 2-11, III NEA 2-5, III CA 1-33, I NB 2-3, I NB 1-20, III NB 1-3, I NEB 1-1, I NEB 2-20, II CB 2-27, III NC\* 1-4, II NEC\* 1-20, III NEC\* 1-3, I CD 2-2, I CD 1-1 and III CD 1-17, respectively.

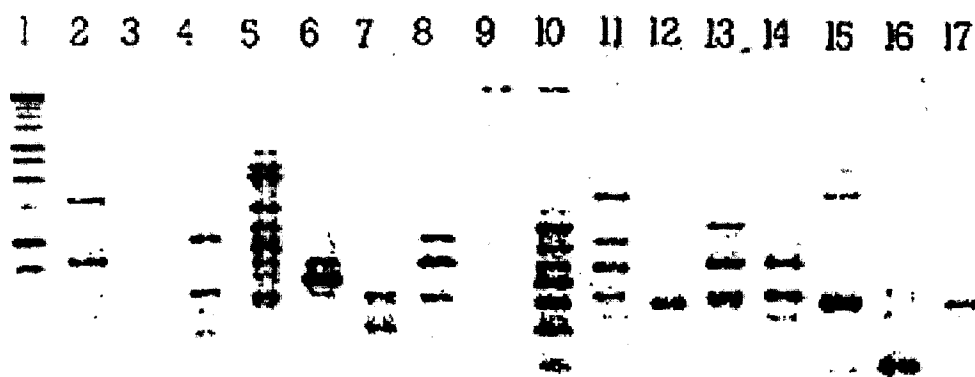


Fig. 2.14C DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Nostoc* sp. group (Table 1A) with genomic DNA as the template. Lane 1-17; 1 kb ladder marker, I NF, I NEF 4-2, III NEF 3-4, I CF 3-22, I CF 2-2, II NEC 4-21, III NEC 3-29, III NEC 2-13, I CC 2-2, I NECR 3-9, I NECR 3-4, I CCR 3-22, III NR 4-8, III NR 2-2, I CR 1-1 and III CR 2-1, respectively.

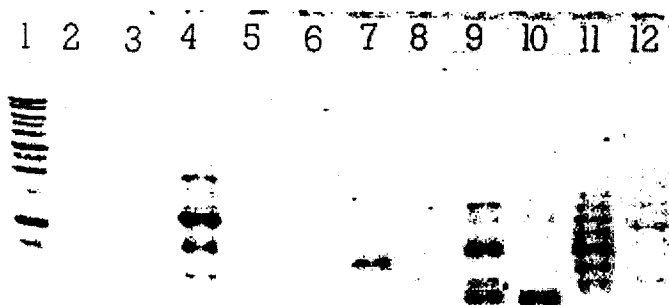


Fig. 2.14D DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-12; 1 kb ladder marker, *Nostoc* sp., *A. cylindrica*, *Hapalosiphon* sp. DASH 05101, *Calothrix* sp. DASH 02101, *Scytonema* sp., I NM 1-1-3, II CM 1-3-40, I NM 3-1-3, III NM 3-3-13, II NM 3-3-22 and I CM 3-1-1, respectively.

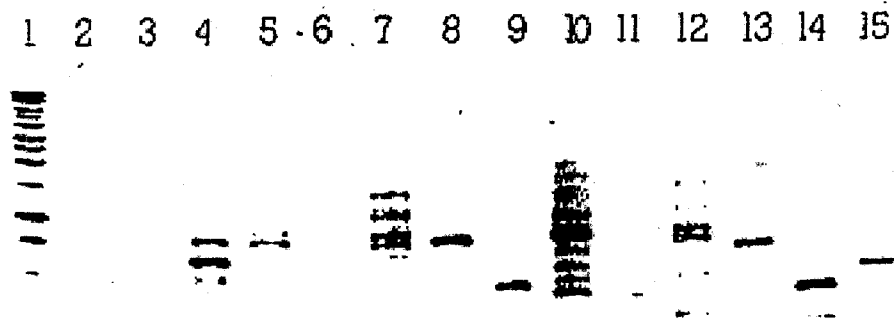


Fig. 2.14E DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-15; 1 kb ladder marker, I NA 2-1, II NA 2-2, III NEA 2-6<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, I CA 2-1, III NEB 2-2, III CB 2-2, I NC\* 2-6, III CC\* 2-10, I ND-2, I ND 1-14, I ND 2-3, III ND 2-1, I NED 1-6 and III NED 2-9, respectively.

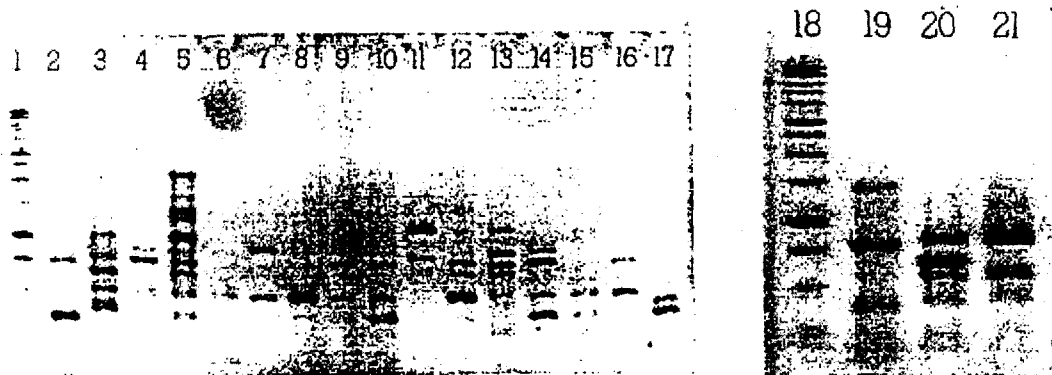


Fig. 2.14F DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of *Anabaena* sp. group (Table 1B) with genomic DNA as the template. Lane 1-21; 1 kb ladder marker, III NF 1-4, III CF 3-20, I NC 4-21, I NC 2-1, II NC 3-20, I NEC 4-1, I CC 3-1, III CC 1-22, I NCR 2-3, I NCR 4-2, I NCR 3-1, III NCR 1-11, III NECR 4-22, I CCR 3-2, III CCR 4-24, I NR 1-6, 1 kb ladder marker, IV NR 3-9, III NER 2-7 and II CR 1-2, respectively.

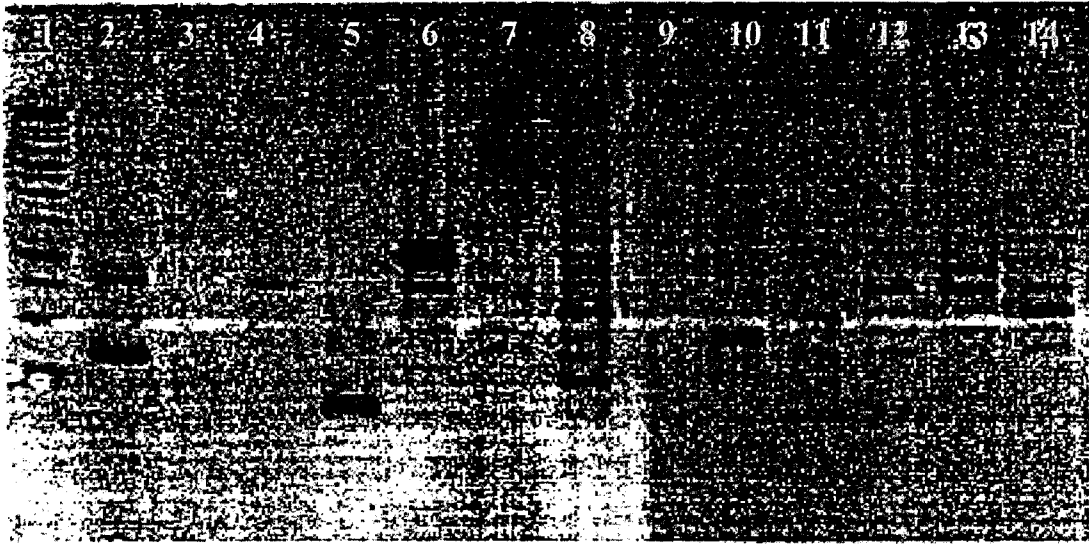


Fig. 2.14G DAF 10.6e-PCR fingerprint patterns of other sp. group (Table 1C, 1D and 1E) with genomic DNA as the template. Lane 1; 1 kb ladder marker, lane 2-6 (branching group); I CM 3-1-2, I CM 3-4-2, I CM 1-2-21, I NER 4-4, III CC\* 2-1 1/2, lane 7 (*Nodularia* sp.); I CM 3-1-5, lane 8 (*Anabaenopsis* sp.); II CM 2-1-3, lane 9 (*Nodularia* sp.); I NEA 1-2/2, lane 10-14 (*Anabaenopsis* sp.); I CF-2, III NCR 4-1, III NM 1-2-2, I NER 3-1 and III NEC 2-11, respectively.

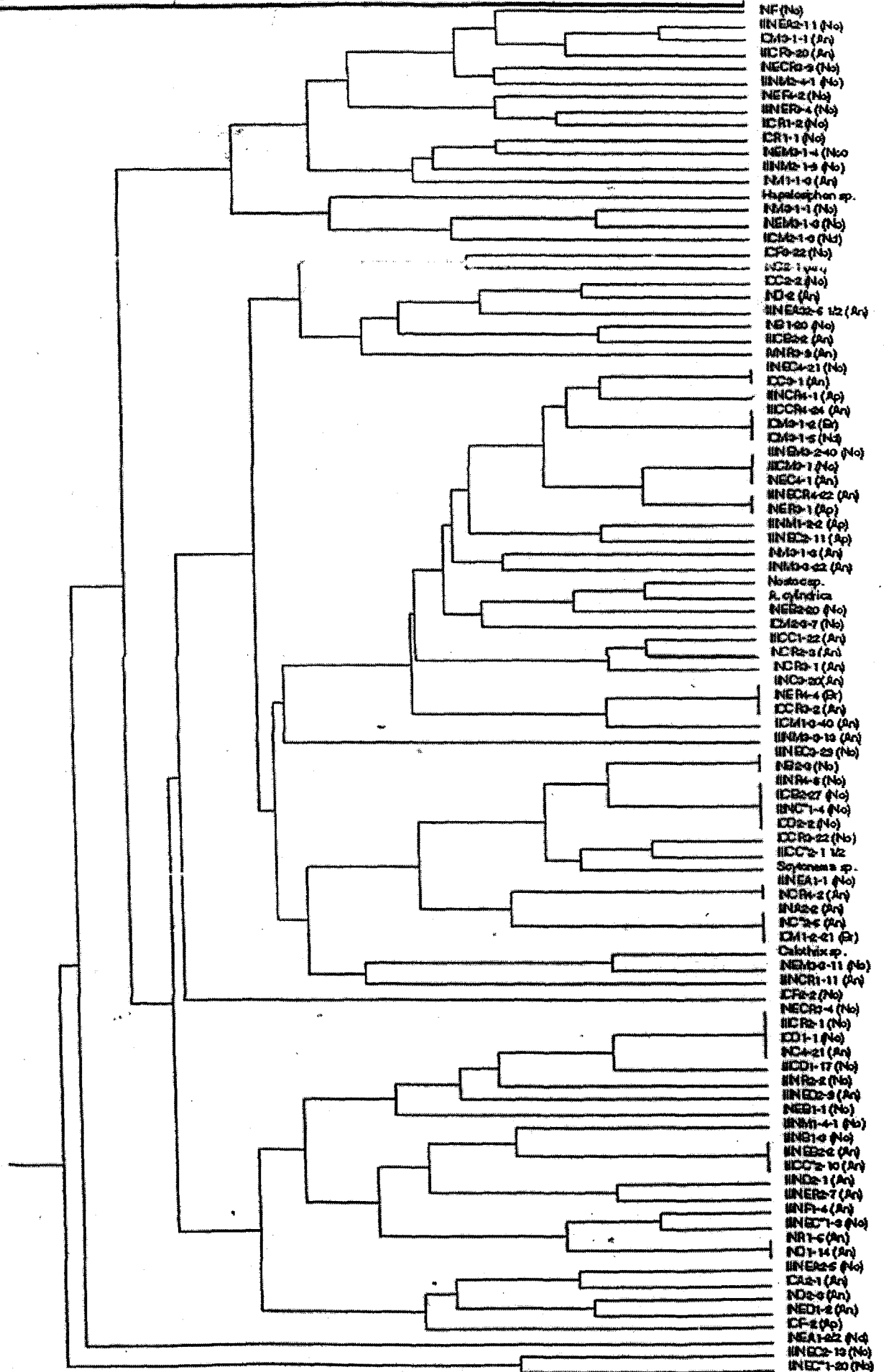
0.00

0.25

0.50

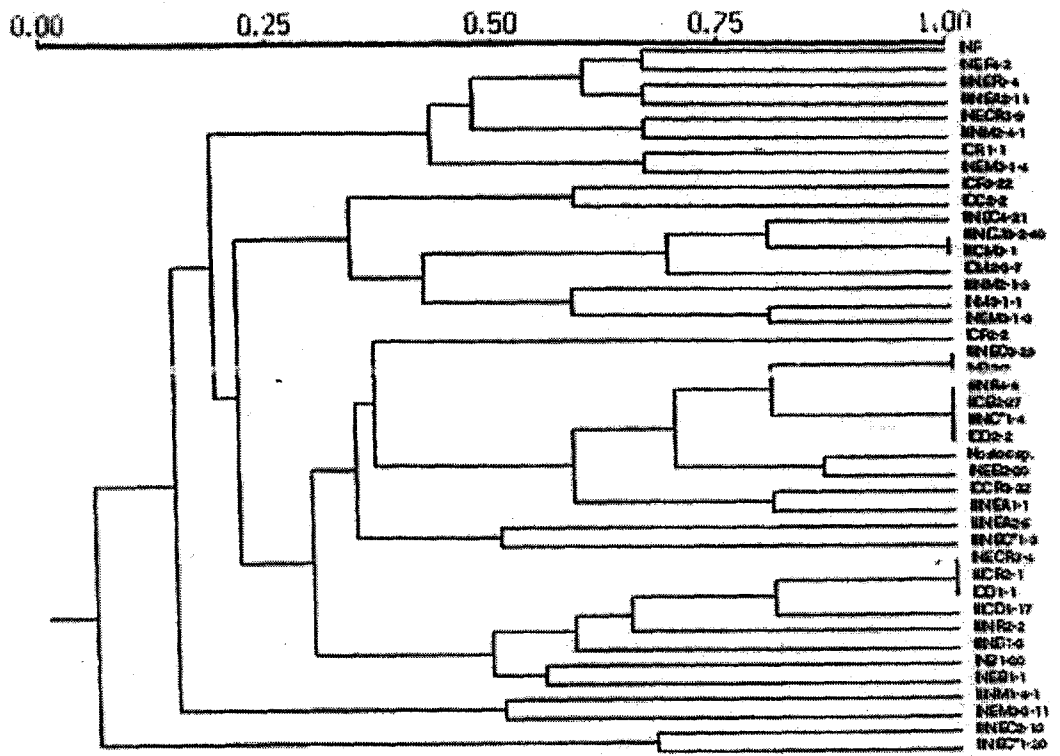
0.75

1.00

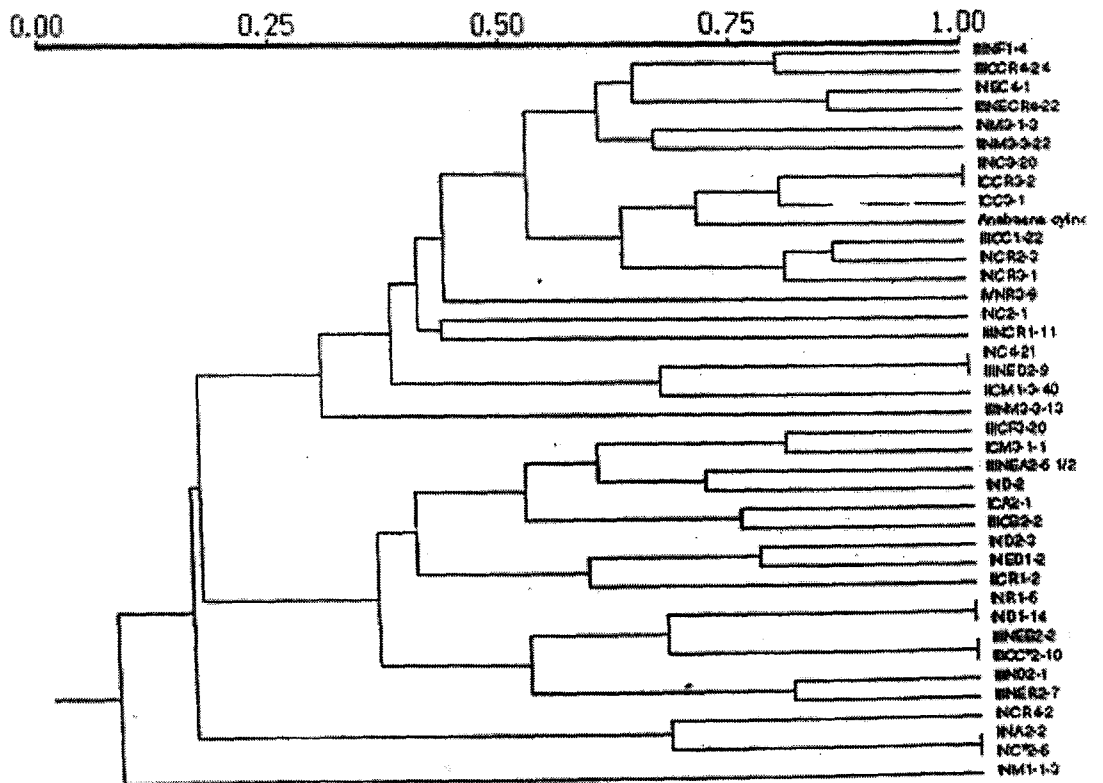




B



C



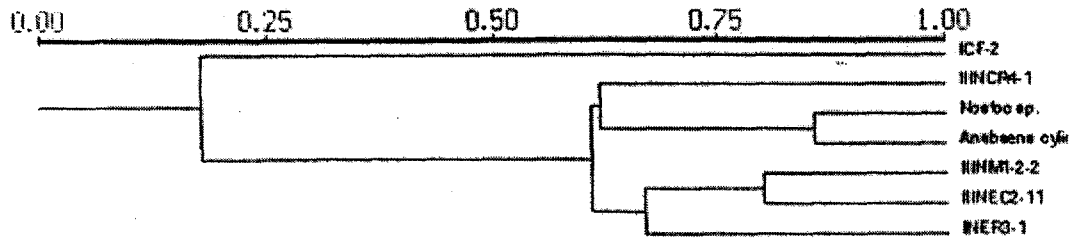
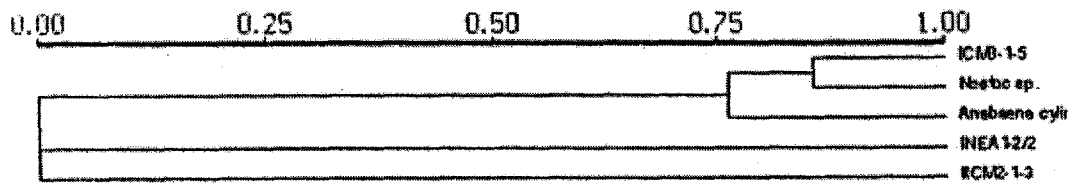
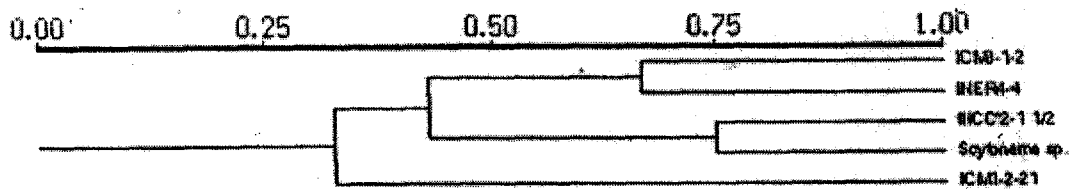
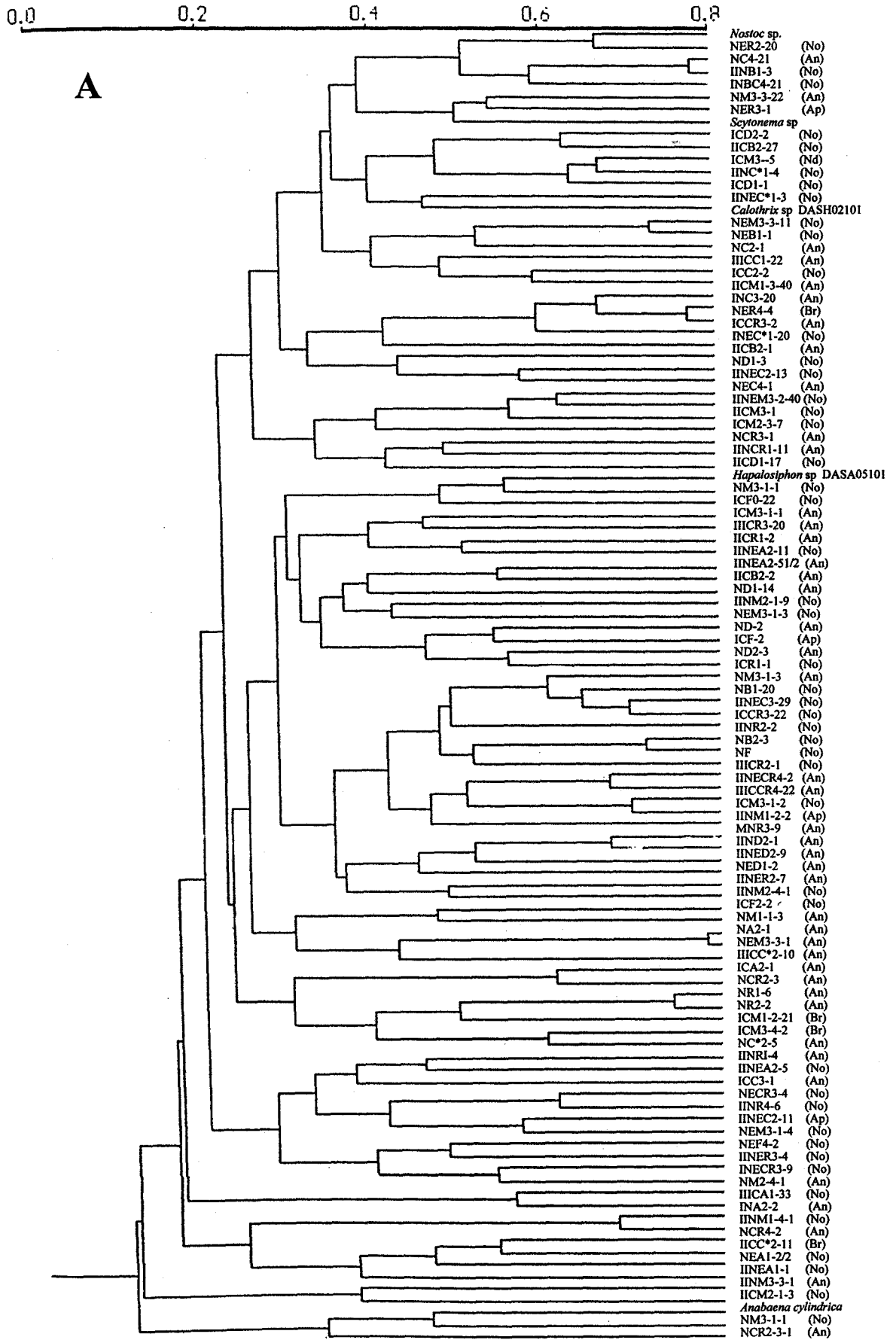
**D****E****F**

Fig. 2.15 Dendrograms (UPGMA) of similarities between DNA amplification fingerprinting (DAF10.6e); all cyanobacterial isolates (A), *Nostoc* sp. group (B), *Anabaena* sp. group (C), *Anabaenopsis* sp. group (D), *Nodularia* sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.

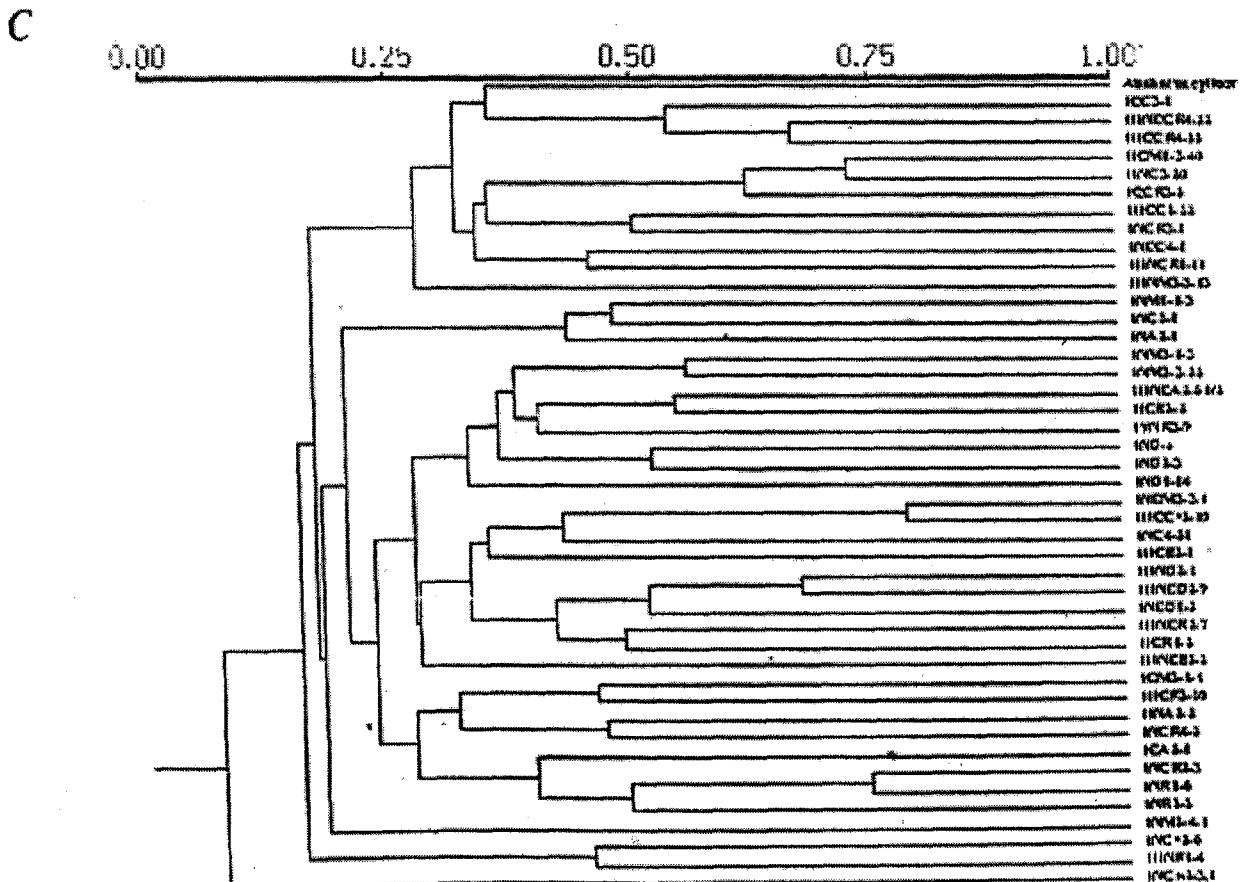
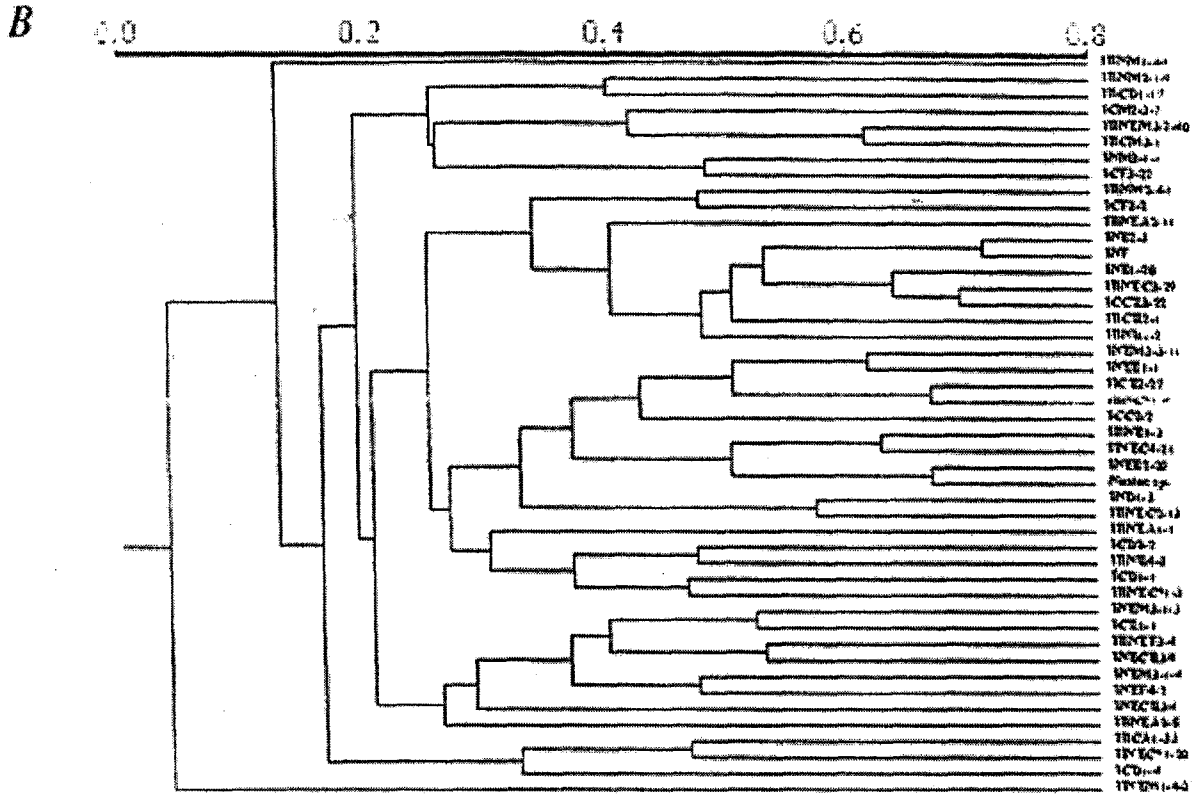
## 6. การนำ PCR product จากทั้ง 3 primers มารวมกัน

การนำผลของ PCR product จากการใช้ random primer ยาวประมาณ 8-10 base เป็นวิธีที่รวดเร็ว และไวต่อการจำแนกสัตว์, พืช, เชื้อรา, สาหร่ายและแบคทีเรีย (Akopyang, Bukanov, Westblom, Kresovich และ Berg, 1992, Kresovich, Williams, McFerson, Routman และ Schaal, 1992, Scott, Haymes และ Williams, 1992, Welsh และ McClelland, 1990 และ Williams, Kubelik, Livak, Rafalski และ Tingey, 1990) นอกจากนี้การศึกษา PCR product จาก RAPD primer มักใช้ในการศึกษา taxonomic และใช้ทำ Phylogenetic tree (Neilan, 1995) การศึกษานี้ได้นำ PCR product จาก STRR, DAF8.7b และ DAF10.6e primer มารวมกันเพื่อแบ่งกลุ่มโดยแสดงความสัมพันธ์ในรูป dendrogram ซึ่งสามารถจำแนก cyanobacteria ทั้ง 107 ตัวอย่าง (รวมสายพันธุ์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง) ได้อย่างชัดเจนแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ (รูปที่ 2.16A) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น INC4-21 และ IINB1-3 หรือ INEM3-3-1 และ IIIC\*2-10 เมื่อนำมาแปลงกลุ่มตาม genus พบว่ากลุ่มของ *Nostoc* sp. (รูปที่ 2.16B) สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ และจำแนกออกจากกันได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับกลุ่มของ *Anabaena* sp. (รูปที่ 2.16C), กลุ่มของ *Anabaenopsis* sp. (รูปที่ 2.16D), กลุ่มของ *Nodularia* sp. (รูปที่ 2.16E) และ branching group (รูปที่ 2.16F) สามารถแบ่งได้เป็น 5, 2, 2 และ 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่าการใช้ primer เพียงชนิดเดียวไม่เพียงพอในการจำแนกหาความหลากหลายของ cyanobacteria แต่ละชนิดได้

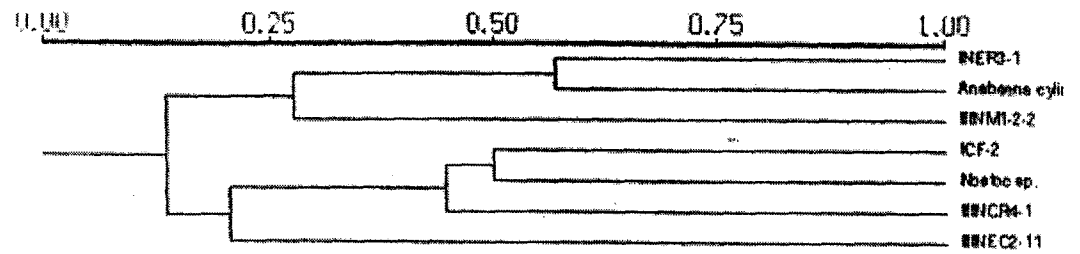
นอกจากนี้ยังพบ cyanobacteria ที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าอยู่ใน genus ใดได้แก่ IVNR3-4 (รูปที่ 2.17) มีโคโลนีมีวง-แดง มีลักษณะเป็นเส้นสายประกอบด้วย vegetative cell ขนาดประมาณ 1-2  $\mu\text{m}$ , heterocyst cell มีลักษณะเป็นวงกลมขนาดประมาณ 0-1  $\mu\text{m}$  และพบ akinete cell จำนวนมากมีขนาดใหญ่มากกว่า 5  $\mu\text{m}$ , ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) (รูปที่ 2.18) มีจำนวนประชากรประมาณ 10 เซลล์/กรัมของดิน โดยส่วนใหญ่จะพบในทุกๆ พื้นที่ทำการเพาะปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องภาคกลาง, พื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าวภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพื้นที่แปลงผักของภาคตะวันออกเฉียงเหนือสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระดับต่ำประมาณ 0.462 และ 0.291  $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4 / \text{mg}$  ของ chlorophyll a / ชม. ในสภาวะที่สว่างและมีดตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาโดยเทคนิค PCR ด้วย primer STRR, DAF8.7b และ DAF10.6e พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์อ้างอิงใดอย่างชัดเจนแต่ใกล้เคียงกับ genus *Anabaena* มากที่สุด



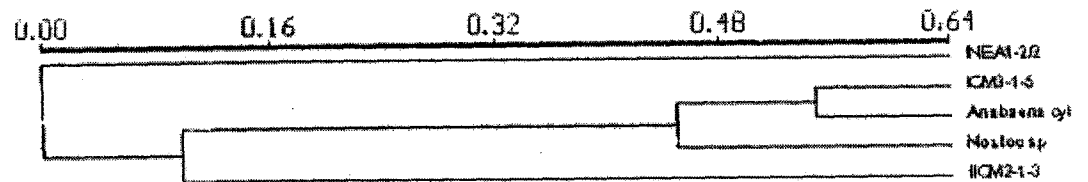
Note : No : *Nostoc* sp., Nd : *Nodularia* sp., An : *Anabaena* sp., Ap : *Anabaenopsis* sp. and Br : unidentified Branching species.



D



E



F

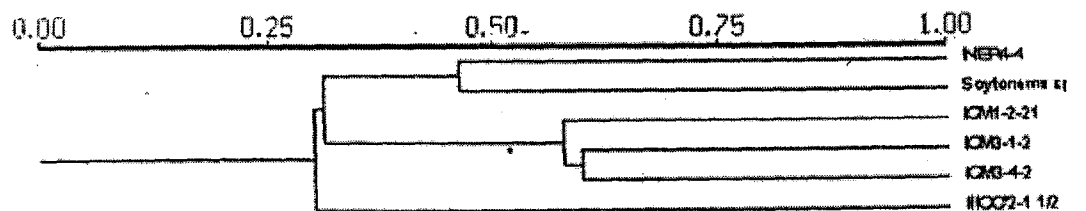


Fig. 2.16 Dendrograms (UPGMA) of similarities between combined PCR products from three primers (STRR, DAF8.7b and DAF10.6e); all cyanobacterial isolates (A), *Nostoc* sp. group (B), *Anabaena* sp. group (C), *Anabaenopsis* sp. group (D), *Nodularia* sp. group (E) and branching group (F) by NTSYS-pc package version 1.8.



Fig. 2.17 Cell morphology of cyanobacterial isolate IV NR3-9 under 400X magnification microscope (A), on solid (B) and liquid BG11 medium (C)



Fig. 2.18 Cell morphology of cyanobacterial isolate IV NR3-9 from 30000X magnification under Scanning Electron Microscope.

## ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสุ่มแยกเชื้อ cyanobacteria จากดินในระบบนิเวศต่างๆ กันของภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 102 ตัวอย่าง (จากทั้งหมด 853 ตัวอย่าง) แล้วทำการศึกษาความหลากหลายในลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การจัดเรียงตัวของเซลล์, ลักษณะโคโลนิบนอาหารแข็งและการเจริญของ cyanobacteria บนอาหารเหลว ได้ทั้งสิ้น 102 ตัวอย่างที่เป็น heterocystous cyanobacteria โดยพื้นที่ยอดเขาจะมีความหลากหลายของ cyanobacteria สูงเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ทำการเพาะปลูก จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเห็นได้ว่ากลุ่มของ *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็น genus ที่พบในดินของประเทศไทยเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเมื่อใช้วิธี Acetylene reduction assay (ARA) ในการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน พบว่า cyanobacteria สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทั้งในสภาวะมืดและสว่าง โดยจะตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่สว่างได้สูงกว่าที่มีมืด ยกเว้นบางสายพันธุ์ เช่น INM3-1-3 ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีมืดได้สูงกว่าที่สว่าง

การศึกษาความหลากหลายของ cyanobacteria ในระดับ DNA โดยเทคนิค PCR มี DNA fingerprint ที่ได้จาก primer ดังนี้เริ่มจาก *nifH*-PCR product จะแบ่ง cyanobacteria ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยที่ cyanobacteria บางชนิดยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ แต่อย่างไรก็ตามจากความสัมพันธ์ในลักษณะ dendrogram ด้วย primer ชุดนี้สามารถแบ่งกลุ่มของ cyanobacteria ที่ตรึงไนโตรเจนในระดับสูงได้ จากนั้นใช้ random primers เพื่อให้จำแนกความหลากหลายได้มากขึ้น ได้แก่ STRR, DAF8.7b และ DAF10.6 ซึ่งแต่ละ primer ยังคงไม่สามารถจำแนก cyanobacteria แต่ละตัวได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งได้เป็น 2, 6 และ 7 กลุ่มใหญ่ๆ ที่แตกต่างกันตามลำดับ แต่เมื่อนำ PCR product ของแต่ละ primer มารวมกันสามารถแบ่ง cyanobacteria ได้เป็น 5 กลุ่ม และแต่ละสายพันธุ์สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน นั่นคือ วิธีนี้สามารถจำแนก cyanobacteria ทั้งหมดได้ในระดับ intraspecies

เมื่อพิจารณาการใช้ *nif H* เป็น primer ในการสำรวจความหลากหลายพบว่าจะมีอยู่กลุ่มหนึ่งปรากฏใน dendrogram ใน cluster ที่ 2 ที่พบว่ากลุ่มเชื้อใน cluster นี้มีไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรียใน cluster อื่น ๆ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดนี้กับแหล่งที่แยกเชื้อได้ พบว่า การกระจายตัวของกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงพบได้เกือบทุกภาคและทุกฤดูกาล เช่น มีกลุ่ม *Nostoc* ที่มีลักษณะ *nif H* product เหมือนกัน ในบริเวณปลูกผัก ทำนา และเชิงเขาในภาคกลาง จะเหมือนกับที่พบในที่นาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือในกรณีที่ใช้ STRR เป็น primer ในการตรวจสอบก็พบ *Nostoc* สายพันธุ์เดียวกันในพื้นที่ที่มีการปลูกพืชไร่ และที่ที่มีการทำลายป่าเพื่อการเกษตร 1-2 ปี ในภาคกลางและพื้นที่ปลูกพืชไร่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือ *Anabaena* สายพันธุ์เดียวกันในบริเวณเชิงดอยอินทนนท์กับพื้นที่ปลูกพืชไร่ภาคเหนือ และยิ่งไปกว่านั้นการใช้ STRR บางครั้งพบว่าลักษณะของ DNA ที่ได้ระหว่าง 2



สายพันธุ์แม้จะเหมือนกันแต่เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางฐานพันธุศาสตร์พบว่าไม่ใช่ตัวเดียวกัน เช่น *Anabaena* และ *Nostoc* เหตุการณ์นี้ทำให้น่าจะสมมติฐานได้ถึงการมีสายวิวัฒนาการของทั้ง 2 สกุลที่ใกล้เคียงกันมาก ในส่วนกรณีของการใช้ชุด DAF เป็น primer ก็ให้ผลไปในทำนองเดียวกันกับการใช้ STR

ดังนั้นเมื่อทำการรวบรวมลักษณะ DNA ที่ได้จาก primer ทั้งสามเข้าด้วยกันสามารถบอกได้ว่าเชื้อทั้งหมดที่ทำการสุ่มมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับ DNA สูง คือไม่มีตัวใดซ้ำกันเลย จึงอาจกล่าวได้ว่าดินในประเทศไทยมีความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียสูงมาก และการแพร่กระจายตัวเป็นไปอย่างกว้างขวางไม่จำเพาะเจาะจงต่อระบบนิเวศ เช่น ในกลุ่ม *Anabaena* และ *Nostoc* ที่พบว่าเป็น dominant genera ของดินในประเทศไทย สามารถพบได้ในทุกภาคและทุกฤดูกาลด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมาก

ในการเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ขั้นต่อไปน่าจะมีการศึกษาในเชิงลึกซึ่งอาจพิจารณากลุ่มเฉพาะของไซยาโนแบคทีเรีย หรือวิเคราะห์ในระบบนิเวศใดระบบหนึ่ง เช่น การนำมาใช้เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพมีโอกาที่จะได้สายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่กดดัน และมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูง แต่ควรมีการคำนึงถึงปัจจัยการแก่งแย่ง (จะเห็นได้จากดินในประเทศไทยมีความหลากหลายสูงจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดโอกาที่จะเกิดการแก่งแย่งสูง) เช่น มีการพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Fischerella* สามารถสร้างสารพิษที่ชื่อ Fischerellin ไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียตัวอื่นได้ เป็นต้น หรืออาจมีการคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่มีบทบาทในการลดโลหะหนักในบ่อน้ำบาดาลเสียก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง หรือการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มักเกิดควบคู่กับกระบวนการตรึงไนโตรเจน เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองต่อไป

ภาคผนวก (2)

จุดยืนที่แท้จริงในโครงการกลุ่มไฮยาโนแบคทีเรีย

ตารางที่ ผ. 2.1 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M1)	POPNI = 1.278 + 0.0436**(Ts) - 0.01458(Ta) - 0.004641(OM) - 1.022**(EC) - 0.06084(pH) + 0.004006*(Moist)	0.03342	0.402
กลางเขา (M2)	POPNI = -0.963 + 0.007136(Ts) - 0.01214(Ta) + 0.06138(OM) - 1.159(EC) + 0.00336(pH) + 0.01572*(Moist)	0.126	0.237
เชิงเขา (M3)	POPNI = 0.963 + 0.02818(Ts) - 0.0148(Ta) + 0.02726(OM) - 0.128(EC) - 0.006192(pH) + 0.003569**(Moist)	0.132	0.229
พืชไร่ต่อเนื่อง (C)	POPNI = 2.358 + 0.006357(Ts) - 0.04499(Ta) + 0.0246(OM) - 1.397(EC) - 0.004953(pH) + 0.03316**(Moist)	0.164	0.407
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POPNI = 0.259 + 0.03332(Ts) - 0.004984(Ta) - 0.06492(OM) + 1.346(EC) + 0.106(pH) + 0.002665(Moist)	0.268	0.155
พืชไร่สลับข้าว (CR)	POPNI = 1.440 - 0.03855(Ts) + 0.02363(Ta) - 0.137(OM) + 6.154*(EC) + 0.157(pH) + 0.003073(Moist)	0.362	0.241
พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (F)	POPNI = 0.981 - 0.0007506(Ts) + 0.007035(Ta) + 0.007226(OM) + 0.01453(EC) - 0.005599(pH) - 0.0008081(Moist)	0.03624	0.042

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ

หมายเหตุ: POP = ประชากร

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

pH = ความเป็นกรดต่าง

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

EC = การนำไฟฟ้า

Moist = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

ตารางที่ ผ. 2.2 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M1)	POPCM1 = 0.863 - 0.001048(Ts) + 0.014322(Ta) + 0.007181(OM) - 1.951(EC) + 0.02491(pH) - 0.0003835* (Mois)	0.02957	0.315
กลางเขา (M2)	POPCM2 = 1.035 + 0.01603(Ts) + 0.005443(TA) - 0.005119(OM) - 0.378(EC) - 0.07318(pH) + 0.001016(Mois)	0.02711	0.215
เชิงเขา (M3)	POPCM3 = 2.456 + 0.02818(Ts) - 0.0148(Ta) + 0.02726(OM) - 0.128(EC) - 0.006192(pH) + 0.003569**(Mois)	0.007	0.151
พีชไร่ต่อเนื่อง (C)	POPCC = 0.818 - 0.0008586(Ts) + 0.01890(Ta) + 0.08043(OM) - 2.328(EC) - 0.0005925(pH) + 0.01030(Mois)	0.186	0.157
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POPCC = 1.877 - 0.03805(Ts) - 0.01479(Ta) + 0.566**(OM) - 0.720(EC) + 0.165(pH) - 0.007761(Mois)	0.176	0.458
พีชไร่สลับข้าว (CR)	POPCCR = 3.231 - 0.008867(Ts) - 0.01033(Ta) + 0.165(OM) + 3.468(EC) - 0.303(pH) + 0.007362(Mois)	0.155	0.277
พื้นที่กร้างว่างเปล่า (F)	POPCCF = 1.197 - 0.02176(Ts) + 0.003842(Ta) + 0.007666(OM) - 0.110(EC) + 0.09848(pH) + 0.0009593 (Mois)	0.04471	0.163

\*\*\* มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

หมายเหตุ: POP = ประชากร

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

pH = ความเป็นกรดต่าง

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

EC = การนำไฟฟ้า

Mois = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

ตารางที่ ผ. 2.3 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างประชากร Cyanobacteria พื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M1)	POPNEM1 = 1.255 - 0.01629 (Ts) + 0.003822(Ta) + 0.01776 (OM) - 2.366**(EC) + 0.3554 (pH) - 0.007907** (Moist)	0.01648	0.310
กลางเขา (M2)	POPNEM2 = 0.902 + 0.01179 (Ts) + 0.005372(Ta) - 0.008009(OM) - 3.999** (EC) - 0.02901(pH) + 0.005661** (Moist)	0.0105	0.457
เชิงเขา (M3)	POPNEM3 = 0.741 + 0.03128(Ts) - 0.01476(Ta) + 0.007614(OM) + 0.510(EC) - 0.008951 (pH) + 0.004301 (Moist)	0.02817	0.141
พืชไร่ต่อเนื่อง (C)	POPNEC = 1.858 - 0.02434**(Ts) + 0.01849 (Ta) - 0.03157(OM) - 1.675(EC) - 0.04435 (pH) + 0.01073 (Moist)	0.04755	0.278
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POPNER = 0.273 + 0.02124 (Ts) + 0.002683(Ta) + 0.01959 (OM) - 0.402*(EC) + 0.816(pH) + 0.01196** (Moist)	0.06895	0.531
พืชไร่สลับข้าว (CR)	POPNECR = 1.600 - 0.04041 (Ts) + 0.06614(Ta) - 0.340(OM) + 3.726 (EC) - 0.156(pH) + 0.01145 *Moist	0.313	0.177
พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (F)	POPNEF = 0.879 - 0.009321 (Ts) + 0.01183 (Ta) + 0.008581(OM) + 0.547 (EC) + 0.01725 (pH) + 0.004809 (Moist)	0.02729	0.093

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ

หมายเหตุ: POP = ประชากร

pH = ความเป็นกรดต่าง

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = การนำไฟฟ้า

Moist = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

ตารางที่ พ. 2.4 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ต่างๆ ในภาคเหนือ, ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับคุณสมบัติทางเคมีบางประการของดิน

ภาค	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ภาคเหนือ	POP <sub>N</sub> = 4.995 + 0.001055(P) - 0.004795(K) + 0.001476 (Ca) - 0.002110(Mg) + 0.009606(Ts) + 0.03147(Ta) - 0.03770(OM) - 2.660(EC) - 0.979*(pH) + 0.03416*(mois)	0.560	0.459
ภาคกลาง	POP <sub>C</sub> = 0.351 - 0.0009609(P) + 0.003589(K) - 0.00001788(Ca) - 0.0008338(Mg) + 0.206*(Ts) - 0.175 (Ta) - 0.0282(OM) - 2.589(EC) + 0.08188(pH) + 0.004112 (Mois)	0.166	0.605
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	POP <sub>NE</sub> = 0.03548 - 0.007257(P) + 0.004418(K) + 0.0001108(Ca) - 0.0004709(Mg) + 0.004023(Ts) + 0.05671(Ta) - 0.537**(OM) - 4.754(EC) - 0.04178(pH) + 0.07008**(Mois)	0.122	0.752

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

หมายเหตุ : pop = ประชากร

N = ภาคเหนือ

C = ภาคกลาง

NE = ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

P = Available P (Bray no.2) (ppm.)

K = Exchangeable K (ppm.)

Ca = Extractable Ca (ppm.)

Mg = Extractable Mg (ppm.)

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = ค่าการนำไฟฟ้า

pH = ความเป็นกรดด่าง

Mois = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

ตารางที่ พ. 2.5 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่าและพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่อง ในภาคเหนือกับ อุณหภูมิดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POPNA= 1.643 – 0.06606(Ts) + 0.04857(Ta) + 0.01154 (Mois)	0.238	0.053
พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	POPNB= 3.370 + 0.004891(Ts) – 0.06039(Ta) – 0.03093 (Mois)	0.09995	0.184
พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C.)	POPNC. = -0.267 + 0.005137(Ts) + 0.04705(Ta) + 0.03112(Mois)	0.407	0.084
พื้นที่ปลูกผัก (D)	POPND = 1.834 – 0.01744(Ts) + 0.02439(Ta) – 0.003138(Mois)	0.490	0.007

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

หมายเหตุ : POP= ประชากร

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

Mois = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

ตารางที่ พ. 2.6 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่าและพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องในภาคกลางกับอุณหภูมิ ดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POPCA= 0.664 - 0.02448(Ts) + 0.03390(Ta) + 0.01686 (Mois)	0.0299	0.258
พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	POPCB= 1.372 - 0.005678(Ts) - 0.007713(Ta) + 0.02418**(Mois)	0.01116	0.0578
พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C.)	POPCC <sub>s</sub> = 2.433 - 0.06354*(Ts) + 0.02513(Ta) + 0.005442(Mois)	0.0531	0.418
พื้นที่ปลูกผัก (D)	POPCD = 0.578 + 0.09882(Ts) - 0.04024(Ta) - 0.002354(Mois)	0.334	0.123

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

หมายเหตุ : POP= ประชากร

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

Mois = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)



ตารางที่ ผ. 2.7 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างปริมาณประชากร Cyanobacteria ในพื้นที่ป่า และพื้นที่ปลูกพืชอย่างต่อเนื่องในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับอุณหภูมิดิน, อุณหภูมิอากาศ และเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POPNEA = 1.679 - 0.001882(Ts) - 0.003535(Ta) - 0.01759(Mois)	0.247	0.136
พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (B)	POPNEB = 0.840 + 0.103* (Ts) - 0.07033(Ta) - 0.003779(Mois)	0.124	0.381
พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี (C <sub>*</sub> )	POPNEC <sub>*</sub> = 1.506 + 0.02365 (Ts) - 0.03574(Ta) + 0.003570(Mois)	0.098	0.116
พื้นที่ปลูกผัก (D)	POPNE D = 1.476 + 0.09844(Ts) - 0.106 (Ta) + 0.01388 (Mois)	0.385	0.145

\*,\*\* มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

หมายเหตุ : POP= ประชากร

Ts = อุณหภูมิดิน (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

Mois = เปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

## ส่วนที่ 3

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ  
(Free-living Nitrogen Fixing Bacteria)

## กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (วัตถุประสงค์ที่ 1-3)

### บทนำ

กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากที่สุดแม้ว่าประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจะไม่สูงเท่ากับกลุ่ม symbiosis เช่นไรโซเบียมก็ตาม โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบได้ทั้งใน kingdom eubacteria และ archaeobacteria ดังแสดงสรุปในตารางที่ 3-1 (Dalton, 1980) ส่วนใหญ่จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาเป็นแบบ heterotrophic บางกลุ่มจัดเป็น autotrophic ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ได้ สภาพแวดล้อมที่สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่สภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยทั่วไปพบว่าบริเวณสิ่งแวดล้อมที่เป็นทุ่งน้ำท่วมขังจะเป็นแหล่งรวมการตรึงไนโตรเจนในปริมาณสูงให้กับระบบนิเวศ (Keeney และ Sahrawat 1986) นอกจากนี้ยังได้มีการประยุกต์นำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี เช่นในการปลูกอ้อย เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งที่จะทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตพลวัตประชากร และความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในแต่ละพื้นที่ในประเทศ เพื่อเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์ และรักษาทรัพยากรทางชีวภาพให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องและยั่งยืนต่อไป

**Table 3.1.** Diversity of free-living nitrogen fixing bacteria (Dalton, 1980).

Family	Genus	Species	
Acetobacteriaceae	<i>Acetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>	
Azotobacteraceae	<i>Azotobacter</i>	<i>beijerinckii</i>	
		<i>chroococcum</i>	
		<i>paspali</i>	
		<i>vinelandii</i>	
		<i>insignis</i>	
	<i>Azomonas</i>	<i>macrocytogenes</i>	
	<i>Azotococcus</i>	<i>agilis</i>	
	<i>Beijerinckia</i>	<i>indica</i>	
		<i>fluminesis</i>	
		<i>derxii</i>	
	<i>Derxia</i>	<i>gummosa</i>	
	<i>Xanthobacter</i>	<i>autotrophicus</i>	
		<i>flavus</i>	
	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>macerans</i>
			<i>polymyxa</i>
<i>Clostridium</i>		<i>pasteurianum</i>	
		<i>saccharobutyricum</i>	
		<i>acetobutyricum</i>	
		<i>beijerinckia</i>	
		<i>tyrobutyricum</i>	
		<i>acetobutylicifelsin</i>	
		<i>lactoacetophilum</i>	
		<i>madisoriii</i>	
		<i>pectinovorum</i>	
		<i>tetanomorphum</i>	
<i>pytyricum</i>			
<i>Desulfotomaclum</i>	<i>orientis</i>		

Table 3.1. (continued)

Family	Genus	Species
		<i>ruminis</i>
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
		<i>aerogenes</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
		<i>cloacae</i>
		<i>agglomerans</i>
	<i>Erwinia</i>	<i>herbicola</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>intermedius</i>
Corynebacteriaceae	<i>Arthrobacter</i>	<i>fluorescens</i>
Rhodospirillaceae	<i>Rhodomicrobium</i>	<i>vannielii</i>
	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>palustris</i>
		<i>capsulata</i>
		<i>gelatinosa</i>
		<i>spheroides</i>
	<i>Rhodospirillum</i>	<i>rubrum</i>
Chromatiaceae	<i>Amoebobacter</i>	<i>roseus</i>
	<i>Chromatium</i>	<i>minus</i>
		<i>minutissimum</i>
		<i>gracile</i>
		<i>vinosum</i>
		<i>warmingii</i>
	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>shaposhnikovii</i>
	<i>Thiocapsa</i>	<i>fennigii</i>
		<i>roseopercicina</i>
	<i>Thiocystis</i>	<i>violacea</i>
Chlorobacteriaceae	<i>Chlorobium</i>	<i>thiosulfatophilum</i>
	<i>Pelodictyon</i>	<i>luteulum</i>
Methanomnadaceae	<i>Methylosinus</i>	<i>richosporium</i>

Table 3.1. (continued)

Family	Genus	Species
		<i>sporium</i>
	<i>Methylococcus</i>	<i>capsulatus</i>
Thiobacteriaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>ferro-oxidans</i>
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>diazotrophic</i>
		<i>pseudoflava</i>
		<i>saccharophila</i>
		<i>stutzeri</i>
Spirillaceae	<i>Azospirillum</i>	<i>lipoferum</i>
		<i>brasilense</i>
		<i>amazonense</i>
	<i>Aquaspirillum</i>	<i>peregrinum</i>
		<i>fasciculus</i>
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>campylobacter</i>
Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>diazotrophicus</i>
		<i>natrie gens</i>
Uncertain family	<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i>
		<i>vulgaris</i>
		<i>gigas</i>
	<i>Alcaligenes</i>	<i>latus</i>
Methanobacteriaceae	<i>Methanococcus</i>	<i>hermolithotrophicus</i>
		<i>voltae</i>

## วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

### 1. ตัวอย่างดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ

การนับจำนวนแบคทีเรียตรงในโตรเจนอย่างอิสระในตัวอย่างดินโดยวิธี MPN โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. บริเวณยอดเขา	4	ตัวอย่าง
2. บริเวณส่วนกลางเขา	4	ตัวอย่าง
3. บริเวณเชิงเขา	4	ตัวอย่าง
4. พื้นที่ทำการปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง	4	ตัวอย่าง
5. พื้นที่ทำการปลูกข้างต่อเนื่อง	4	ตัวอย่าง
6. พื้นที่ทำการปลูกพืชไร่สลับข้าว	4	ตัวอย่าง
7. พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	4	ตัวอย่าง

รวมตัวอย่างดินทั้ง 3 ภาค เท่ากับ 84 ตัวอย่างต่อการเก็บ 1 ครั้ง และเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าและพื้นที่เพาะปลูก โดยเก็บ 3 เดือนต่อ 1 ครั้ง ดังนี้

1. พื้นที่ป่า	2	ตัวอย่าง
2. พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี	2	ตัวอย่าง
3. พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี	2	ตัวอย่าง
4. พื้นที่ปลูกผัก	3	ตัวอย่าง

ชั่งดินหนักตัวอย่างละ 50 กรัม เขย่าใน flask ที่มีน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร นำมาทำ 10 foil dilution technique จาก  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  โดยดูตัวอย่างจาก dilution ที่ 1 ใน flask จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน test tube ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อมอยู่ 9 มิลลิลิตร เป็น dilution ที่ 2 หรือ  $10^{-2}$  ทำเช่นเดียวกันจนถึง  $10^{-6}$

### 2. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี MPN

เตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนอิสระ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปลอดแหล่งอาหารไนโตรเจนประกอบไปด้วย  $K_2HPO_4$  0.1 g,  $KH_2PO_4$  0.4 g,  $MgSO_4$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $FeCl_3$  0.01 g,  $MoNa_2PO_4$  0.002 g, Glucose 10g ในน้ำกลั่น 1 ลิตร pH 6.8 เตรียมในหลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ 9 มิลลิลิตร กระจายละลายดินที่เตรียมไว้ใส่ลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ แล้วนำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน หลอดที่มีแบคทีเรียขึ้นนำไปเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย จากตาราง MPN แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม พร้อมกับวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

### 3. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอิสระ

เพื่อให้แบคทีเรียแยกออกเป็นชนิดเดี่ยว ๆ จำเป็นต้องทำ dilution plating technique โดยทำการเท plate ด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2 ที่จุ่มไว้นาน 7 วัน แล้วนำตัวอย่างอิสระลงใน dilution ตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-6}$  จากตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน dilution ละ 1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารวุ้นแล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วให้ทั่วผิวของ medium ทำ dilution ละ 3 plate นำไป incubate นาน 3-7 วัน โดยสังเกตว่าไม่มี colony ใหม่ของแบคทีเรียเกิดขึ้นแล้วจึงนำมาแยก colony ที่เกิดขึ้นเดี่ยว ๆ เก็บไว้ใน test tube ที่มี slant agar medium อยู่เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและศึกษาการตรึงไนโตรเจนต่อไป



## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

**วัตถุประสงค์จำเพาะที่ 1 : เพื่อให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ**

1. ผลของการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินภูมิภาคแตกต่างกัน และมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

### 1.1 ภาคเหนือ

จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่สามารถนับได้พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติตามความแตกต่างกันของพื้นที่ที่สุ่มเก็บตัวอย่างดิน พื้นที่ปลูกข้าวอย่างต่อเนื่อง (NR) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้ง (log number cell/g. dry soil) เฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.74 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงไปได้แก่พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (NF) พื้นที่เพาะปลูกพืชไร่สลับข้าว (NCR), พื้นที่เพาะปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง (NC), พื้นที่บริเวณเชิงเขา (NM3) และพื้นที่บริเวณกลางเขา (NM2) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งเท่ากับ 3.67, 3.53, 3.52, 3.46 และ 3.35 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พื้นที่ที่บริเวณยอดเขา (NM1) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งต่ำที่สุด คือ 3.26 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1) นอกจากนี้ยังพบว่าในบริเวณเชิงเขาคอยอินทนนท์พบว่าดินบางแห่งมีค่า pH ต่ำคืออยู่ในช่วง 4.3-4.6 ซึ่งมีผลกระทบต่อจำนวนประชากรบ้างแต่ไม่มากนัก นอกจากนี้มีบางปัจจัยที่มีผลกระทบบ้างแต่ไม่ชัดเจน ได้แก่ ความชื้น ปริมาณอินทรีย์วัตถุและความสูงของพื้นที่ (ดังแสดงในตาราง ผ.3.1 ในภาคผนวก)

### 1.2 ภาคกลาง

จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่สามารถตรวจนับได้พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติตามความแตกต่างกันของพื้นที่ที่สุ่มเก็บตัวอย่างดิน พื้นที่บริเวณเชิงเขา (CM3) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.68 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงไปได้แก่ พื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว (CCR), พื้นที่กลางเขา (CM2), พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (CF), พื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง (CC) และพื้นที่ยอดเขา (CM1) จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ที่มีการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งต่ำที่สุดคือ 3.02 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงผลในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.2) นอกจากนี้ปัจจัยทางกายภาพบางส่วนที่มีผลกระทบต่อประชากรแบคทีเรียในพื้นที่ในภาคนี้ได้แก่ค่า EC (ดังแสดงในตารางที่ ผ.3.2 ในภาคผนวก)

### 1.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่สามารถตรวจนับได้ พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติตามความแตกต่างกันของพื้นที่ชุ่มเก็บตัวอย่างดิน พื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่อง (NER) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมแห้งมากที่สุดคือ 3.48 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงไปได้แก่ พื้นที่ปลูกพืชไร่สลับข้าว (NECR), พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (NEF), พื้นที่ปลูกพืชไร่ต่อเนื่อง (NEC), พื้นที่เชิงเขา (NEM3) และพื้นที่กลางเขา (NEM2) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งเท่ากับ 3.44, 3.34, 3.07, 3.00 และ 2.97 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พื้นที่ยอดเขา (NEM1) มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งต่ำที่สุดคือ 2.93 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงผลในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.3) สำหรับในภาคนี้พบว่าไม่มีปัจจัยใดทางกายภาพที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อจำนวนประชากร (ดังแสดงในตารางที่ ผ.3.3 ในภาคผนวก)

กล่าวโดยสรุป พื้นที่เก็บตัวอย่างดินที่แตกต่างกันของแต่ละภูมิภาคมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่แตกต่างกัน พื้นที่ที่มีการเขตกรรมจะมีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งมากกว่าพื้นที่รกร้างว่างเปล่า และพื้นที่บริเวณภูเขาซึ่งเป็นพื้นที่ป่า เช่น Wever (1980) แสดงให้เห็นว่าความชื้นมีผลในทางบวกต่อประชากรของกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ ในขณะที่ผลการทดลองของ Watanabe (1981) ก็ให้ผลสอดคล้องกับการที่การศึกษาครั้งนี้มักพบจำนวนประชากรในพื้นที่เขตกรรมที่ค่อนข้างสูง กล่าวคือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระเช่น *Azospirillum* sp. และกลุ่ม *Enterobacteriaceae* จำนวนมากมักอาศัยอยู่บริเวณรอบรากของต้นข้าว เป็นต้น

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวนโคโตนเบบที่เรียต่อกับดินแห้งของภาคเหนือ

พื้นที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7	ครั้งที่ 8	ครั้งที่ 9	ครั้งที่ 10	ครั้งที่ 11	ครั้งที่ 12	ครั้งที่ 13	ครั้งที่ 14	ครั้งที่ 15	เฉลี่ย**
NM1	1.60 d ก.ค.40	3.86 cd ก.ย.40	3.46 bcd พ.ย.40	3.75 cd ม.ค.41	3.75 cd มี.ค.41	3.03 e พ.ค.41	3.40 bc ก.ค.41	3.29 a ก.ย.41	3.45 bc พ.ย.41	3.51 ม.ค.42	3.37 c มี.ค.42	3.42 abc พ.ค.42	3.63 a ก.ค.42	3.13 ก.ย.42	3.09 พ.ย.42	3.26
NM2	2.40 b	3.53 d	3.39 cd	3.45 d	3.45 d	3.88 bc	3.89 ab	3.23 ab	3.20 c	3.31	3.41 bc	3.13 c	3.58 a	3.30	3.25	3.35
NM3	3.70 a	3.52 d	3.27 d	3.39 d	3.39 d	3.34 de	3.8 ab	3.05 ab	3.62 abc	3.69	3.57 abc	3.59 ab	3.80 a	3.08	3.09	3.46
NC	2.00 c	4.54 ab	4.02 abc	4.13 bc	4.13 bc	3.96 d	3.97 a	2.93 b	3.48 abc	3.52	3.31 c	3.23 bc	3.43 a	3.30	3.33	3.52
NR	2.30 bc	4.94 a	4.45 a	4.74 a	4.74 a	4.02 b	3.79 ab	2.91 b	3.92 a	3.95	3.86 a	3.85 a	2.73 b	3.50	3.50	3.74
NCR	2.40 b	4.36 b	3.76 bcd	4.30 ab	4.30 ab	3.54 cd	3.14 c	2.91 b	3.89 ab	3.79	3.74 ab	3.77 a	3.35 ab	3.38	3.43	3.53
NF	2.20 bc	4.2 bc	4.12 ab	4.10 bc	3.95 a	4.61 a	3.78 ab	3.12 ab	3.53 abc	3.87	3.42 bc	3.67 a	3.43 a	3.58	3.5	3.67
Mean	2.37	4.14	3.78	3.98	3.45	3.77	3.68	3.06	3.58	3.66	3.53	3.52	3.42	3.32	3.31	
CV(%)	9.97	6.78	11.64	6.30	5.90	4.84	6.75	6.55	5.77	9.21	4.43	5.68	9.21	8.43	7.66	
F-Test	**	**	*	**	**	**	**	*	**	Ns	**	**	**	ns	ns	

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Sirichai statistic analysis) ตามแนวนั่ง ( Column )

\* Significantly different at p = 0.05

\*\* Significantly different at p = 0.01

NM1 = ยอดเขา

NR = ข้าวอย่างตอเนื่อง

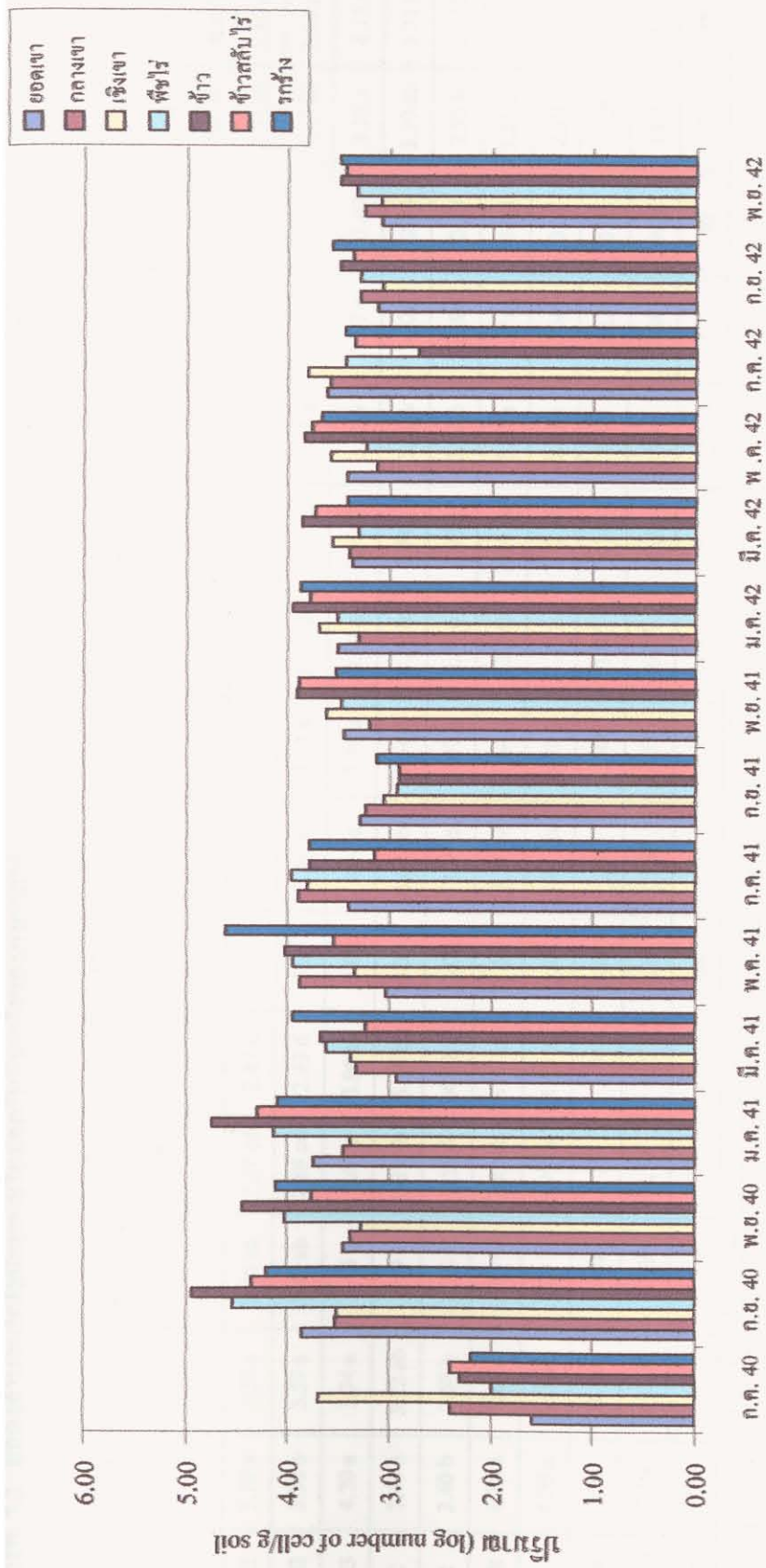
NM2 = กลางเขา

NCR = พืชไร่สลับข้าว

NM3 = เจริงเขา

NF = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า

NC = พืชไร่อย่างตอเนื่อง



รูปที่ 3.1 ปริมาณ cell ในพื้นที่เกิดตัวอย่างดินในภาคเหนือ ครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนโคไลมีแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งของภาคกลาง

พื้นที่	ครั้งที่1 <sup>*</sup> ก.ค.40	ครั้งที่2 <sup>*</sup> ก.ย.40	ครั้งที่3 <sup>**</sup> พ.ย.40	ครั้งที่4 <sup>*</sup> ม.ค.41	ครั้งที่5 <sup>*</sup> มี.ค.41	ครั้งที่6 <sup>*</sup> พ.ค.41	ครั้งที่7 <sup>*</sup> ก.ค.41	ครั้งที่8 <sup>*</sup> ก.ย.41	ครั้งที่9 <sup>*</sup> พ.ย.41	ครั้งที่10 <sup>**</sup> ม.ค.42	ครั้งที่11 <sup>*</sup> มี.ค.42	ครั้งที่12 <sup>*</sup> พ.ค.	ครั้งที่13 <sup>**</sup> ก.ค.42	ครั้งที่14 <sup>*</sup> ก.ย.42	ครั้งที่15 <sup>**</sup> พ.ย.42	เฉลี่ย <sup>**</sup>
CM1	3.10 b	3.58 a	3.35 ab	2.57 cd	2.87 d	3.18	3.58 abc	3.67 a	2.55 c	3.12 bc	2.65 b	2.88 bc	3.43	3.33 ab	3.40 ab	3.15
CM2	3.50 b	3.57 a	3.27 ab	2.89 cd	2.93 d	3.26	3.80 ab	3.54 a	3.25 ab	3.45 ab	3.46 a	3.43 a	2.95	3.45 ab	3.36 ab	3.34
CM3	4.20 a	3.74 a	3.44 a	3.66 a	3.96 ab	3.02	3.96 a	3.74 a	3.54 a	3.61 ab	3.15 a	3.47 a	3.40	4.18 a	4.15 a	3.68
CC	3.40 b	3.12 ab	2.49 c	3.39 ab	3.48 bc	3.31	3.63 abc	3.54 a	3.00 b	3.74 a	3.58 a	3.52a	2.93	3.20 ab	3.21 b	3.30
CR	3.40 b	2.68 b	2.38 c	2.53 d	4.29 a	3.07	3.29 c	2.97 b	2.32 c	2.75 c	2.73 b	2.59c	3.50	2.75 b	2.84 b	3.02
CCR	4.20 a	3.60 a	3.04 b	3.42 ab	3.29 cd	3.36	3.34 bc	3.64 a	3.33 ab	3.54 ab	3.45 a	3.28ab	3.08	3.25 ab	3.28 b	3.41
CF	4.30 a	3.18 ab	3.00 b	2.99 bc	3.49 bc	3.20	3.63 abc	3.01 b	3.51 a	3.32 ab	3.22 a	3.35ab	3.35	2.90 b	3.06 b	3.29
Mean	3.73	3.35	3.00	3.06	3.48	3.20	3.60	3.44	3.07	3.36	3.18	3.22	3.23	3.29	3.33	
CV(%)	7.16	10.22	5.91	6.74	6.97	5.25	7.82	6.48	6.17	10.09	6.31	7.86	9.78	14.45	11.76	
F-Test	**	**	**	**	**	ns	*	**	**	*	**	**	ns	*	**	**

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Srichai statistic analysis) ตามแนวดิ่ง ( Column )

\* Significantly different at p = 0.05

CM1 = ยอดเขา

CM2 = กลางเขา

CM3= เขิงเขา

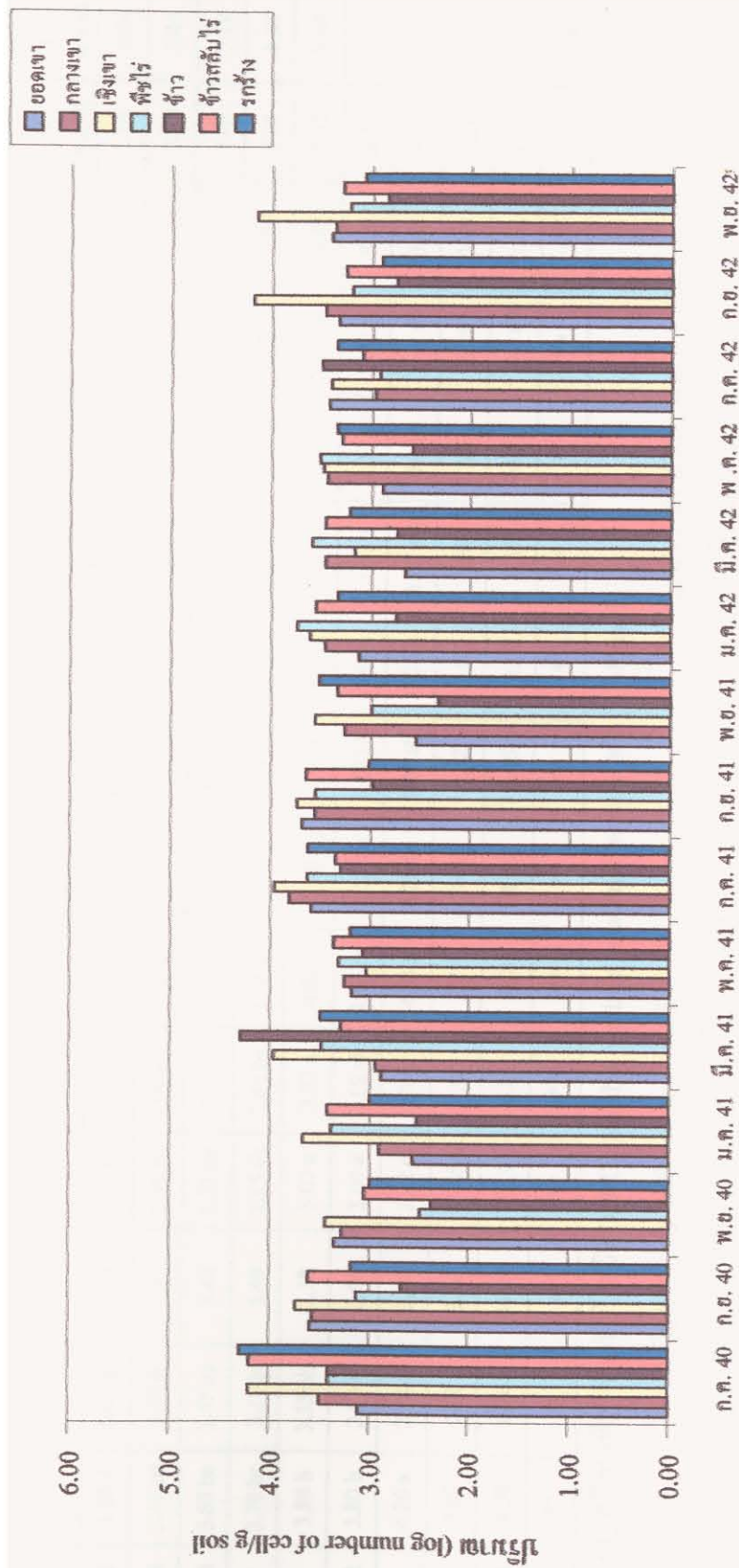
CC = พืชไร่อย่างต่อเนื่อง

\*\* Significantly different at p = 0.01

CR = ข้าวอย่างต่อเนื่อง

CCR = พืชไร่สลับข้าว

CF = พื้นที่รกร้างว่างเปล่า



รูปที่ 3.2 ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในภาคกลาง ครั้งที่ 1-15

ตารางที่ 3.4 แสดงจำนวนโคโด้ที่เรียต่อไร่ดินแห้งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

พื้นที่	ครั้งที่ 1 <sup>*</sup> ก.ค.40	ครั้งที่ 2 <sup>*</sup> ก.ย.40	ครั้งที่ 3 <sup>**</sup> พ.ย.40	ครั้งที่ 4 <sup>*</sup> ม.ค.41	ครั้งที่ 5 <sup>*</sup> มี.ค.41	ครั้งที่ 6 <sup>*</sup> พ.ค.41	ครั้งที่ 7 <sup>*</sup> ก.ค.41	ครั้งที่ 8 <sup>*</sup> ก.ย.41	ครั้งที่ 9 <sup>*</sup> พ.ย.41	ครั้งที่ 10 <sup>**</sup> ม.ค.42	ครั้งที่ 11 <sup>*</sup> มี.ค.42	ครั้งที่ 12 <sup>*</sup> พ.ค.42	ครั้งที่ 13 <sup>**</sup> ก.ค.42	ครั้งที่ 14 <sup>*</sup> ก.ย.42	ครั้งที่ 15 <sup>**</sup> พ.ย.42	เฉลี่ย <sup>**</sup>
NEM1	3.20 d	2.63 cd	3.35	2.52 bc	2.96 abc	3.03 e	2.72 c	1.95 e	2.74 b	2.52 b	2.75 c	2.68 abc	3.65	3.63	3.64	2.93
NEM2	3.40 cd	2.37 d	3.27	2.48 bc	2.99 abc	3.88 bc	2.61 c	2.73 d	2.91 ab	2.96 bcd	2.54 c	2.85 bc	3.60	2.93	3.04	2.97
NEM3	3.60 bc	2.47 cd	3.44	2.51 bc	2.75 c	3.34 de	2.54 c	3.39 c	2.81 ab	2.78 cd	2.56 c	2.77 c	3.85	3.03	3.19	3.00
NEC	3.70 bc	3.17 b	2.49	2.85 ab	2.84 bc	3.96 bc	2.70 c	3.75 bc	2.79 ab	2.84 cd	2.98 bc	2.63 c	2.70	3.28	3.30	3.07
NER	3.80 b	3.33 ab	2.38	3.07 a	3.22 a	4.02 b	3.99 a	4.34 a	3.31 a	3.55 ab	3.56 a	3.25 abc	3.45	3.45	3.46	3.48
NECR	3.80 b	3.63 a	3.04	3.04 a	3.15 ab	3.54 cd	3.52 ab	3.69 bc	3.42 a	3.63 a	3.37 ab	3.51 a	3.33	3.45	3.48	3.44
NEF	4.20 a	2.78 c	3.00	2.32 c	2.74c	4.61 a	3.08 bc	4.08 ab	3.20 a	3.23 abc	3.48 a	3.42 ab	3.48	3.23	3.23	3.34
Mean	3.67	2.91	3.00	2.68	2.95	3.77	3.02	3.42	3.02	3.07	3.03	3.06	3.44	3.28	3.33	
CV(%)	4.50	6.36	44.26	7.13	4.86	5.40	8.50	5.46	12.69	9.12	6.81	9.14	7.52	9.06	8.22	
F-Test	**	**	ns	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	*	**	ns

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโคโด้วิธี DMRT (Sirichai statistic analysis) ตามแนวตั้ง (Column)

\* Significantly different at p = 0.05

NEM1 = ยอดเขา

NEM2 = กลางเขา

NEM3 = เหนือเขา

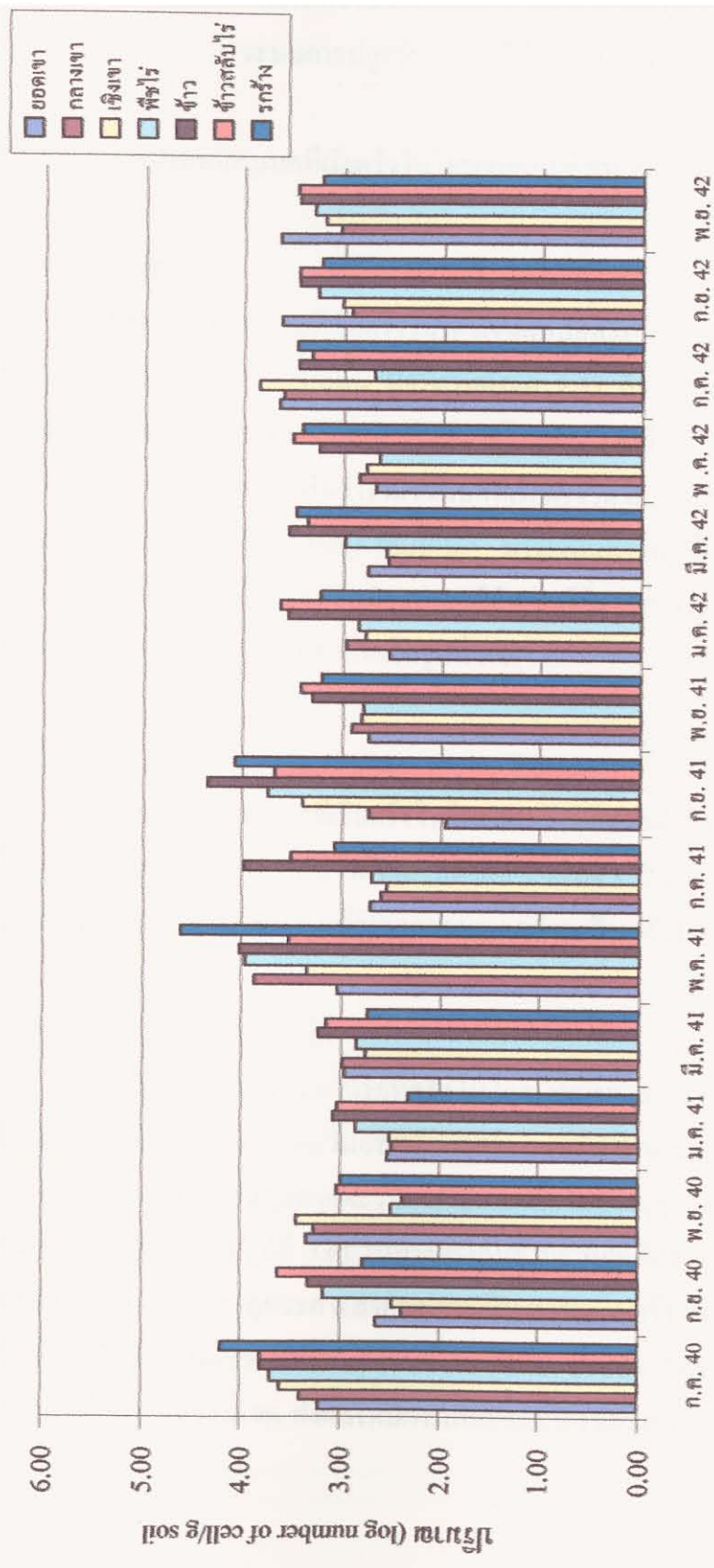
NEC = พืชไร่อย่างตอเนื่อง

\*\* Significantly different at p = 0.01

NER = ไร่ข้าวอย่างตอเนื่อง

NECR = ไร่ข้าวไร่สลับข้าว

NEF = ไร่พื้นที่กว้างว่างเปล่า



รูปที่ 3.3 ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-15



**วัตถุประสงค์จำเพาะที่ 2 : เพื่อให้ทราบถึงพลวัตรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่มีอยู่ในระบบการปลูกพืช และที่มีอยู่ในระบบธรรมชาติที่ไม่ถูกรบกวน**

**2. การเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระตลอดช่วงระยะ 3 ปี ต่างภูมิภาคกัน**

**2.1 ภาคเหนือ**

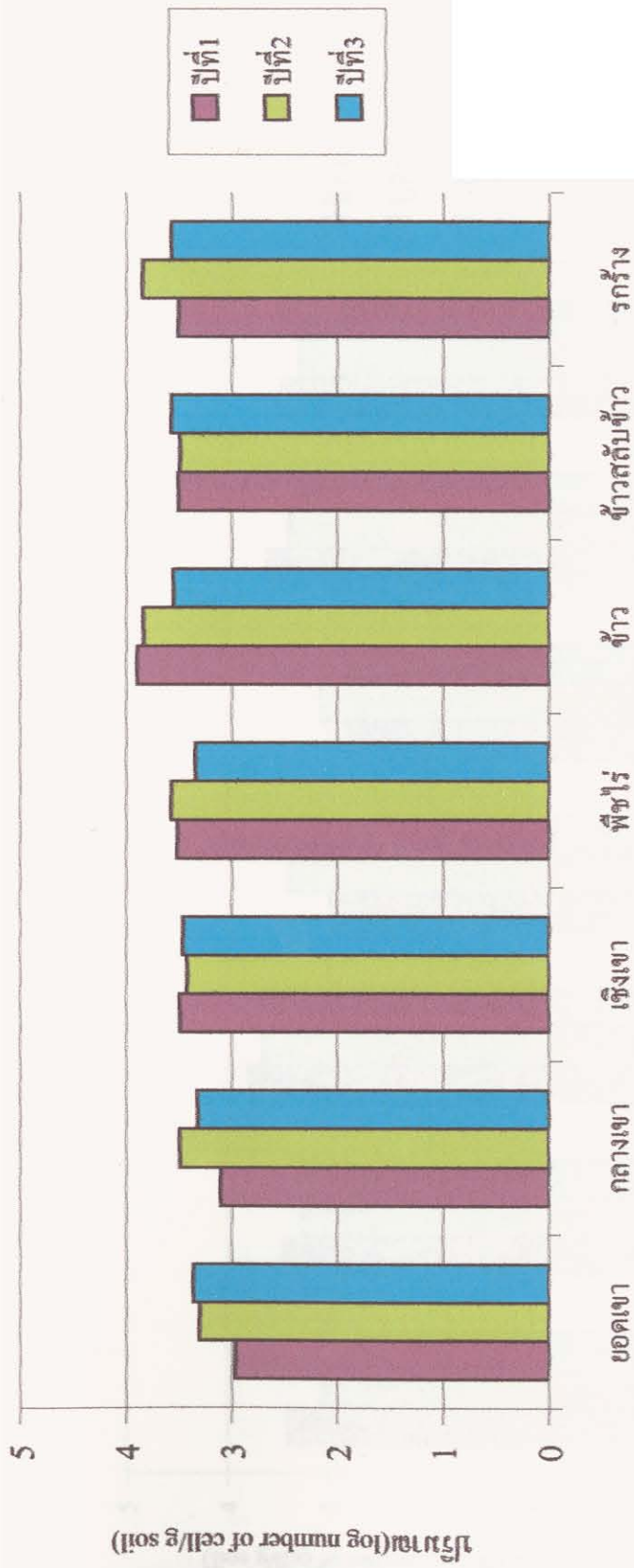
ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้ง ตลอดช่วงเก็บตัวอย่างดิน 3 ปี อย่างต่อเนื่องในภาคเหนือนั้น มีจำนวนตั้งแต่ 2.37 ถึง 4.14 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง แต่อย่างไรก็ตามจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมดินอยู่ในช่วง 3.4 ถึง 3.7 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ซึ่งไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งนั้นไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลมากนัก น่าจะเป็นสาเหตุเนื่องมาจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระมีความสามารถในการปรับตัวอยู่รอดได้อย่างดีซึ่งต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางนิเวศของภาคเหนือประเทศไทย (ดังแสดงในรูปที่ 3.4)

**2.2 ภาคกลาง**

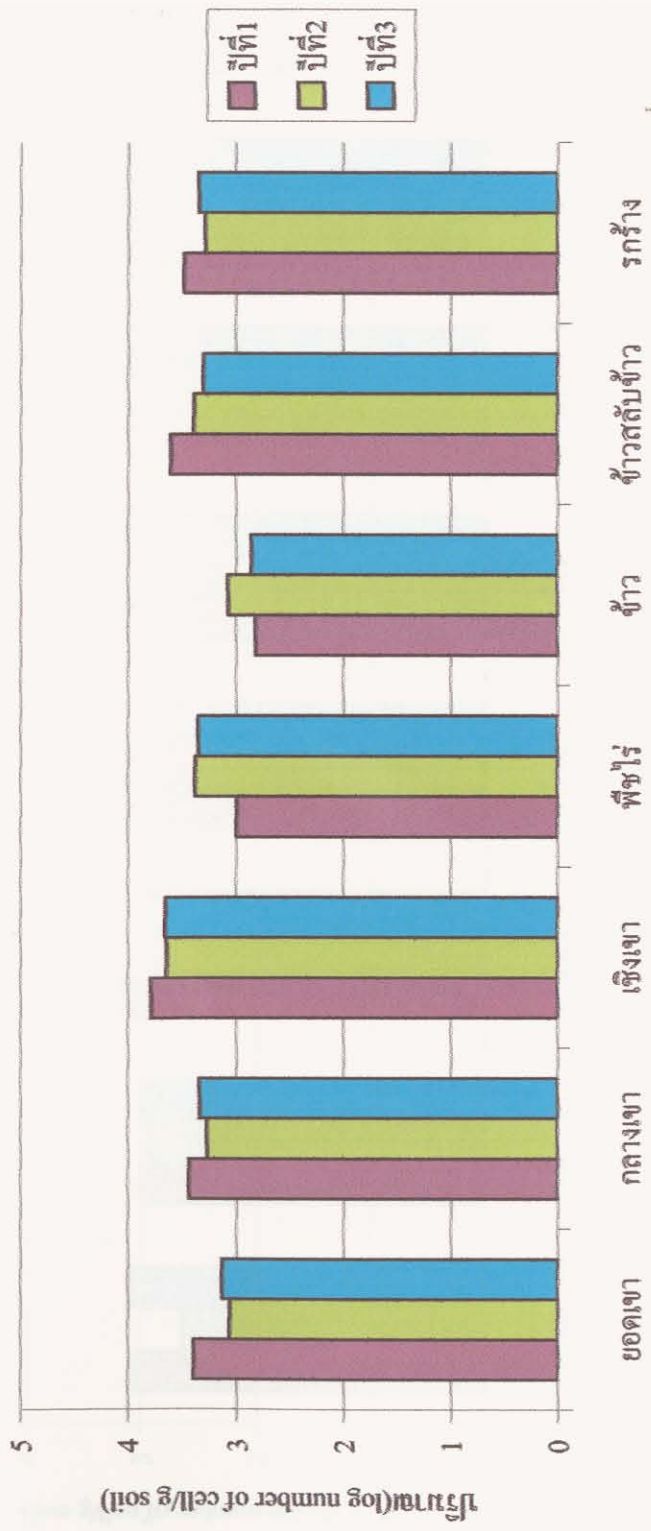
ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งตลอดช่วงเก็บตัวอย่างดิน 3 ปีอย่างต่อเนื่องในภาคกลางพบว่ามีจำนวนตั้งแต่ 3.00 ถึง 3.73 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ แม้ว่าฤดูกาลจะแตกต่างหรือเปลี่ยนแปลงไป (ดังแสดงในรูปที่ 3.5)

**2.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**

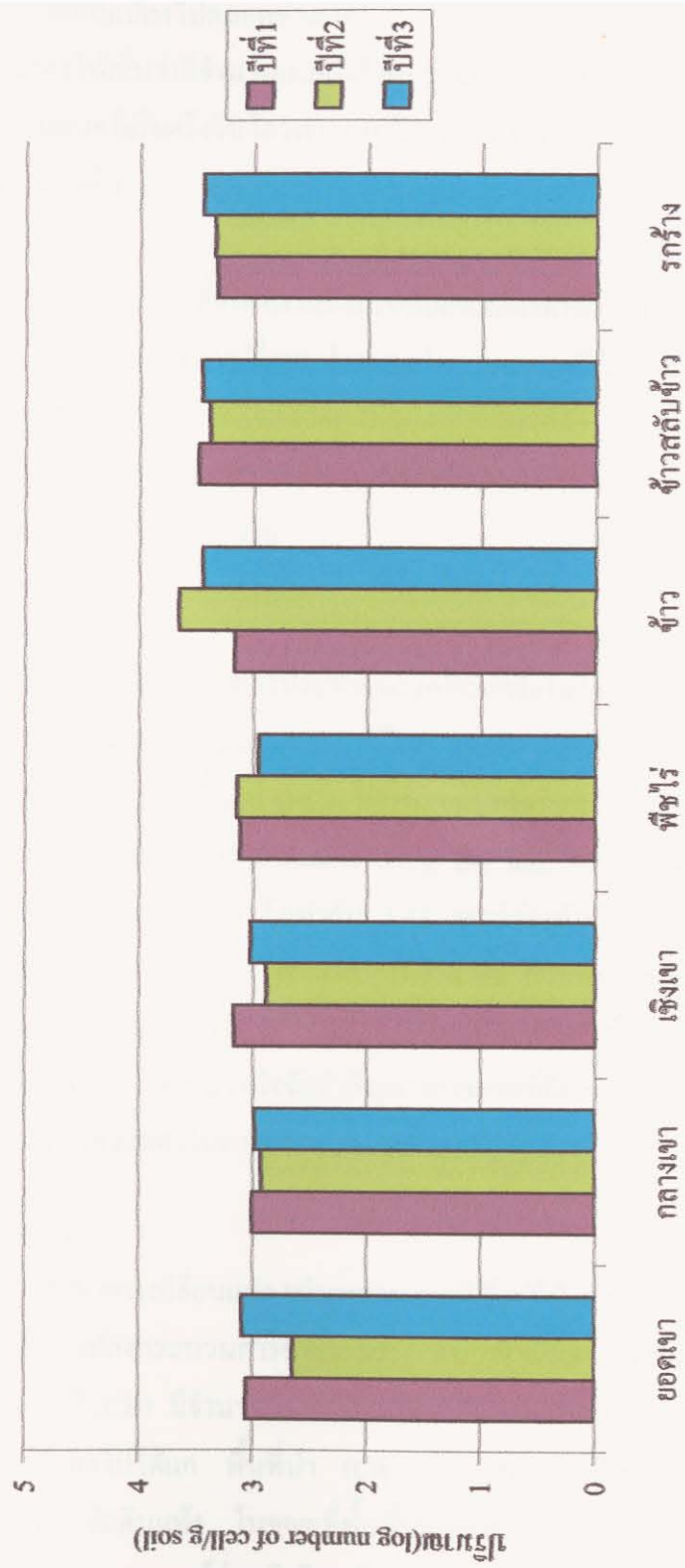
ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งตลอดช่วงเก็บตัวอย่างดิน 3 ปีอย่างต่อเนื่องในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีจำนวนตั้งแต่ 2.68 ถึง 3.77 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงฤดูแล้งจะมีจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งค่อนข้างต่ำ (ดังแสดงในรูปที่ 3.6) ในทางตรงกันข้ามช่วงฤดูฝนจำนวนแบคทีเรียจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่มากนัก สาเหตุประการสำคัญน่าจะเป็นเพราะเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดินเพิ่มขึ้น แม้ว่าเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดินจะมีปริมาณค่อนข้างต่ำก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ishac, 1986 ที่ว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในช่วง 2-4% ส่งผลให้มีการเพิ่มประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มนี้



รูปที่ 3.4 ปริมาณ cell ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคเหนือ ปีที่1-3



รูปที่ 3.5 ปริมาณcellในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคกลาง ปีที่1-3



รูปที่ 3.6 ปริมาณcellในพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปีที่1-3

กล่าวโดยสรุปได้ว่า จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยมาก เมื่อฤดูกาลเปลี่ยนแปลงไปตลอดช่วงเวลา 3 ปีของการทดลองวิจัย แต่อย่างไรก็ตามช่วงฤดูฝนของแต่ละภูมิภาคก็แสดงให้เห็นว่ามีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสูงมากกว่าช่วงฤดูแล้ง โดยเฉพาะแล้วภาคเหนือมีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระตรึงไนโตรเจนสูงมากกว่าภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตามลำดับ

**วัตถุประสงค์จำเพาะที่ 3 : เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางกระบวนการทางระบบนิเวศว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ**

3. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระภูมิภาคต่างกัน

### 3.1 ภาคเหนือ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในภาคเหนือ ซึ่งเป็นสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศ พบว่า จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในพื้นที่ที่เพาะปลูกตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป (NC) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ 3.63 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (log number cell/g. dry soil) รองลงไปได้แก่ พื้นที่ปลูกผักต่อเนื่อง (ND) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 3.43 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ในขณะที่พื้นที่ป่า (NA) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 3.31 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ส่วนพื้นที่เพาะปลูกตั้งแต่ 1-2 ปี (NB) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่ำที่สุดคือ 3.31 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.5 โดยพบว่าปัจจัยสำคัญทางกายภาพที่มีผลกระทบต่อจำนวนประชากร ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้น (ดังแสดงในภาคผนวกตารางที่ ผ.3.4)

### 3.2 ภาคกลาง

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในภาคกลาง ซึ่งเป็นสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศ พบว่าจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในพื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (CB) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดคือ 3.71 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงไปได้แก่ พื้นที่ป่า (CA) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 3.40 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ในขณะที่พื้นที่ปลูกผักต่อเนื่อง (CD) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 3.20 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ส่วนพื้นที่เพาะปลูกตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป (CC) มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่ำที่สุด 2.88 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงผลในตารางที่ 3.5

และรูปที่ 3.6) โดยปัจจัยทางกายภาพที่มีผลเป็นปัจจัยเดียวกับที่พบในภาคเหนือ (ดังแสดงผลในตาราง ภาคผนวกตารางที่ ผ.3.5)

### 3.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศ พบว่าจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระในพื้นที่ปลูกผักต่อเนื่อง (NED) มีจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งมากที่สุด คือ 3.29 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงไปได้แก่ พื้นที่ปลูกผักตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป (NEC) มีจำนวนเซลล์ต่อกรัมดินแห้งเท่ากับ 3.14 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ในขณะที่พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี (NED) และบริเวณพื้นที่ป่า (NEA) มีจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งต่ำที่สุดคือ 2.75 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังแสดงผลในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.7) นอกจากนี้ยังพบว่าความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อประชากรด้วย (ดังแสดงในภาคผนวกตารางที่ ผ.3.6)

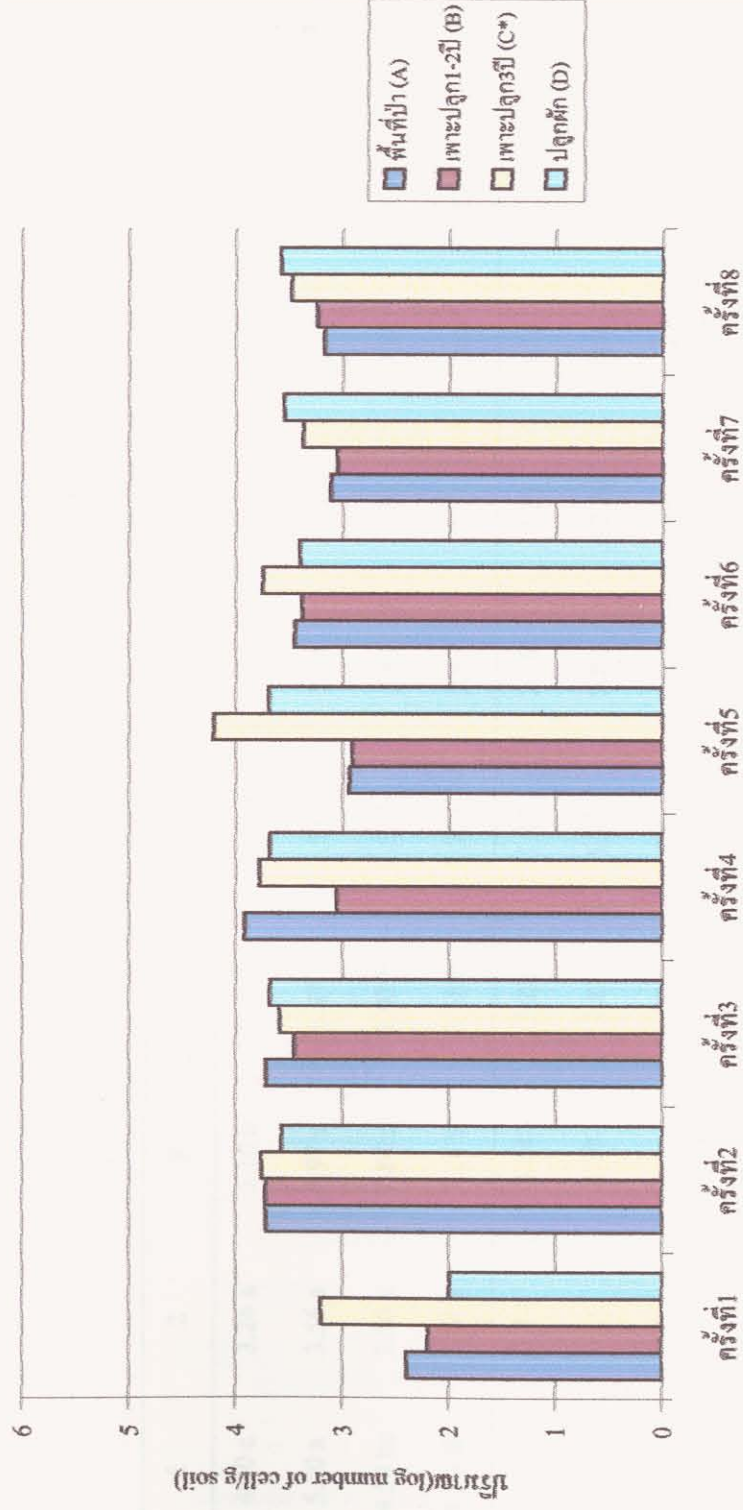
โดยสรุปพบว่า พื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศที่แตกต่างกัน จะมีปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งแตกต่างกัน ซึ่งภูมิภาคต่างกันก็มีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระแตกต่างกันด้วย ซึ่งจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 2.75 ถึง 3.71 log number ของเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง โดยเฉลี่ยแล้วพื้นที่ที่มีการเพาะปลูก หรือมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางนิเวศของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระมากกว่าพื้นที่ป่าซึ่งไม่ถูกรบกวน ไม่ทำให้นิเวศวิทยาสูญหายไป (ดังในรูปที่ 3.8-3.10) สามารถกล่าวได้ว่าการไถพรวนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดินมีการเปลี่ยนแปลงไป การใส่ปุ๋ยเคมีหรือสารเคมีกำจัดวัชพืชและศัตรูพืช ตลอดจนชนิดของพืชที่ปลูกในพื้นที่นั้น ๆ มีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระต่อกรัมดินแห้งเพิ่มปริมาณมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ป่าดั้งเดิมซึ่งสอดคล้องและเป็นไปตามการศึกษาของ Borneman และคณะ (1996) ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดและปรับตัวได้ดี แม้ว่าบางครั้งยาฆ่าวัชพืชและยาป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะทำให้การหายใจของแบคทีเรียลดลง แต่แบคทีเรียมีการปรับตัวระดับอื่นเกิดขึ้น และนอกจากนี้พบว่าพืชยังมีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียกลุ่มนี้มากเพราะแบคทีเรียสามารถได้รับประโยชน์จากสารอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาทางราก (Okon และ Kapulnik, 1986, Ishac และคณะ 1986)

ตารางที่ 3.5 แสดงจำนวนโคโดนิแบบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งของภาคเหนือ

สถานที่เก็บ	ครั้งที่									Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	2.40 b	3.72	3.72	3.92 a	2.94 c	3.45	3.11	3.17	3.04	3.31
B	2.20 b	3.72	3.45	3.05 b	2.91 c	3.38	3.05	3.24	3.41	3.16
C	3.20 a	3.76	3.59	3.78 a	4.21 a	3.75	3.37	3.48	3.52	3.63
D	2.00 b	3.57	3.68	3.68 a	3.69 b	3.4	3.55	3.58	3.68	3.43
Mean	2.45	3.69	3.61	3.61	3.44	3.5	3.27	3.37	3.41	
CV(%)	9.2	5.73	7.76	4.81	2.8	6.55	8.46	9.36	9.81	
F-Test	**	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Sirichai statistic analysis) ตามแนวดิ่ง (Column)

A = พื้นที่ป่า  
 B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี  
 C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี  
 D = พื้นที่ปลูกผัก



รูปที่ 3.7 ปริมาณcellในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคเหนือ ครั้งที่1-8

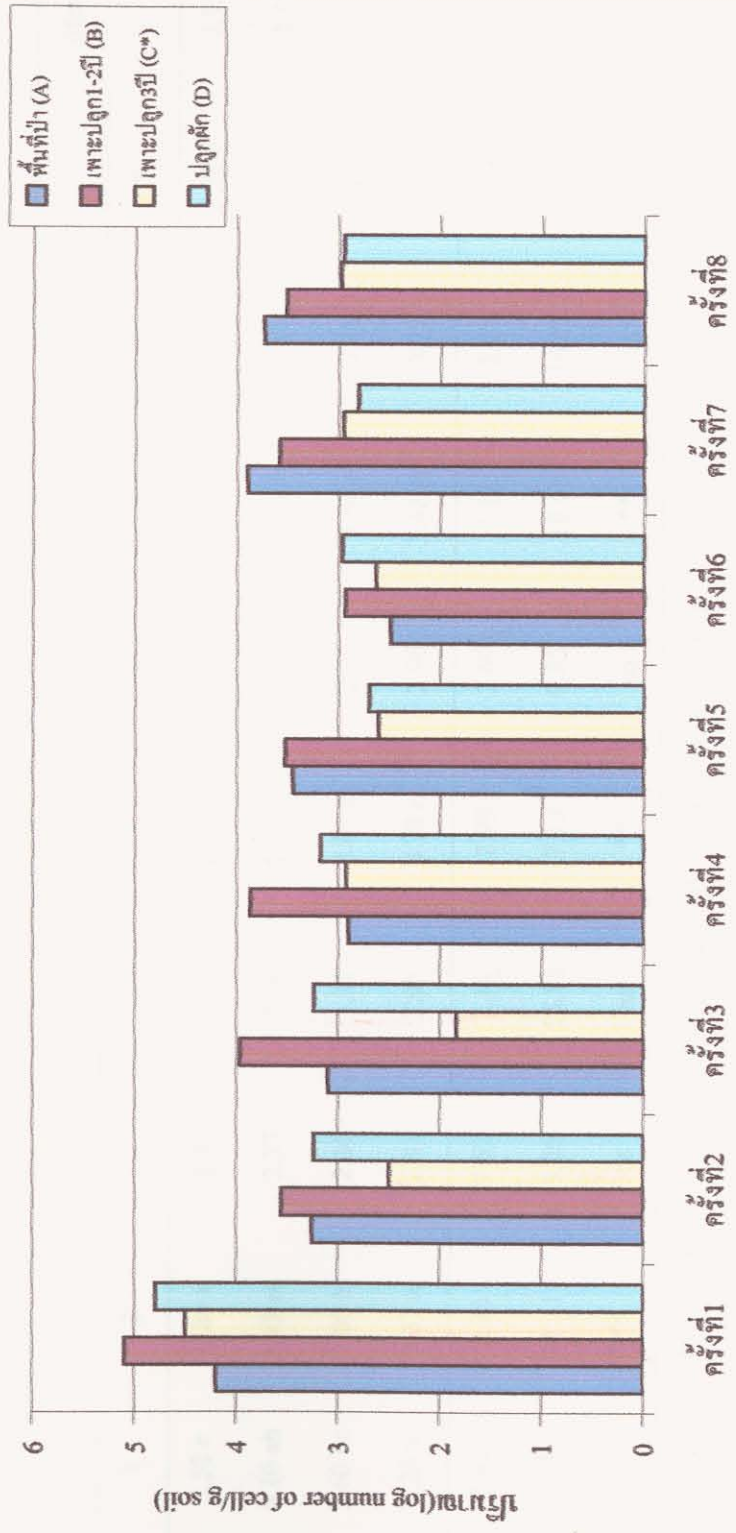


ตารางที่ 3.6 แสดงจำนวนโคโด้มีแบบคที่เรียต่อกรั้มดินแห้งของภาคกลาง

สถานทีเก็บ	ครั้งที									Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	4.20 c	3.26 a	3.10 b	2.90 b	3.45 a	2.49	3.90	3.74	3.59 a	3.40
B	5.10 a	3.56 a	3.97 a	3.87 a	3.53 a	2.94	3.59	3.52	3.34 ab	3.71
C	4.50 bc	2.50 a	1.84 c	2.92 b	2.61 b	2.63	2.95	2.98	2.93 b	2.88
D	4.80 ab	3.24 a	3.24 b	3.18 b	2.70 b	2.97	2.81	2.95	2.89 b	3.20
Mean	4.65	3.14	3.04	3.22	3.07	2.76	3.31	3.30	3.19	
CV(%)	5.01	11.37	4.50	4.83	6.35	8.82	13.40	10.81	7.85	
F-Test	*	*	**	**	**	ns	ns	ns	*	

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Sirichai statistic analysis) ตามแนวตั้ง (Column)

A = พื้นที่ป่า  
 B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี  
 C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี  
 D = พื้นที่ปลูกผัก



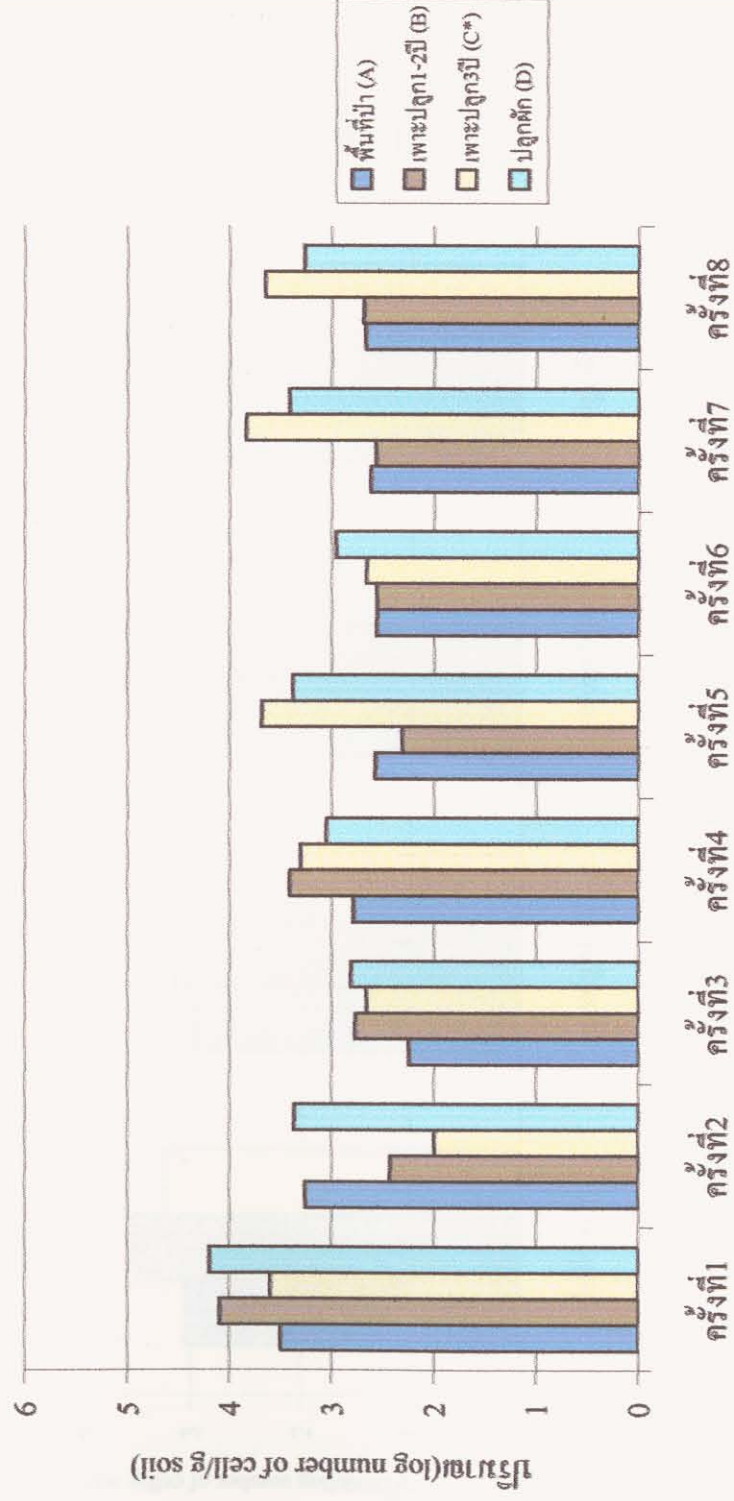
รูปที่ 3.8 ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคกลาง ครั้งที่ 1-8

ตารางที่ 3.7 แสดงจำนวนโคโลนีแบคทีเรียต่อกรัมดินแห้งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

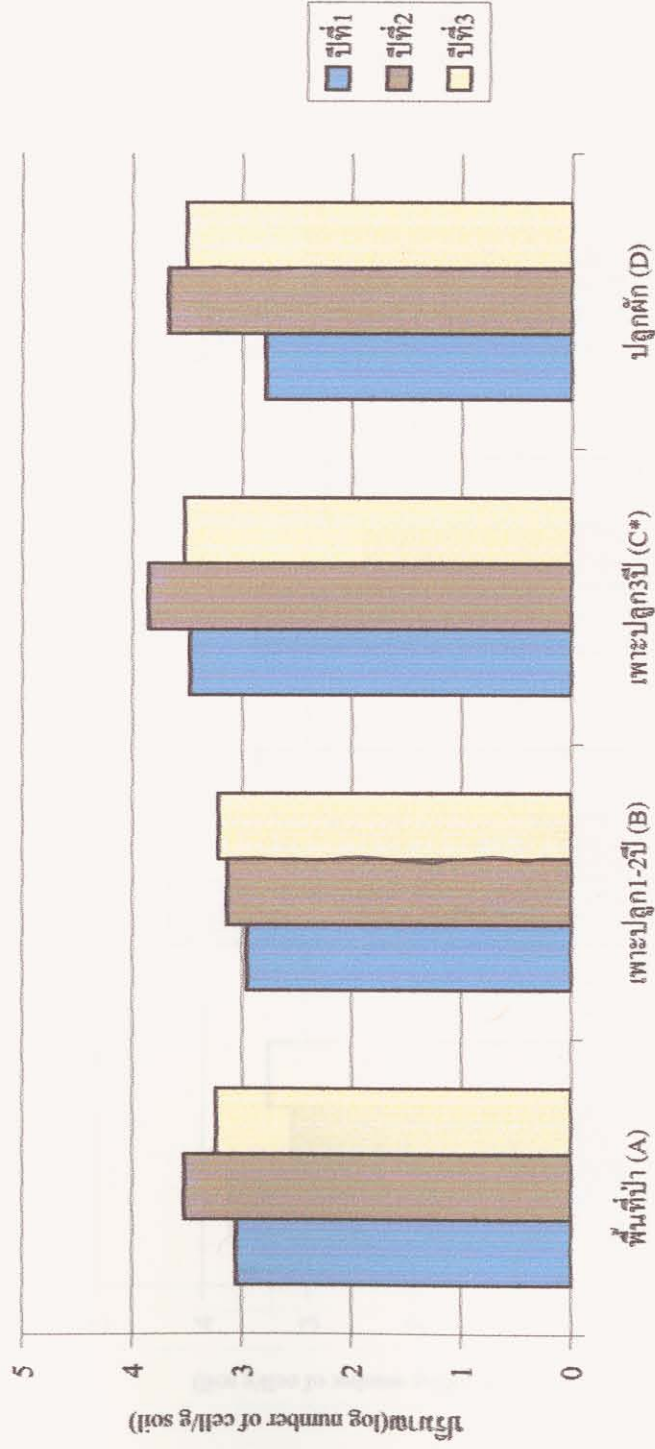
สถานที่เก็บ	ครั้งที่									Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A	3.50 c	3.26 a	2.25	2.79	2.58 b	2.56	2.62 b	2.67	2.72 b	2.75
B	4.10 ab	2.43 ab	2.77	3.41	2.31 b	2.56	2.57 b	2.69	2.46 b	2.75
C	3.60 bc	2.00 b	2.66	3.31	3.69 a	2.66	3.84 a	3.65	3.12 a	3.14
D	4.20 a	3.37 a	2.81	3.05	3.38 a	2.96	3.42 ab	3.27	3.13 a	3.29
Mean	3.85	2.76	2.62	3.14	2.99	2.69	3.11	3.07	2.86	
CV(%)	6.75	11.11	9.26	15.81	7.13	9.85	10.62	16.51	6.33	
F-Test	*	**	ns	ns	**	ns	**	ns	*	

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Sirichai statistic analysis) ตามแนวนั่ง ( Column )

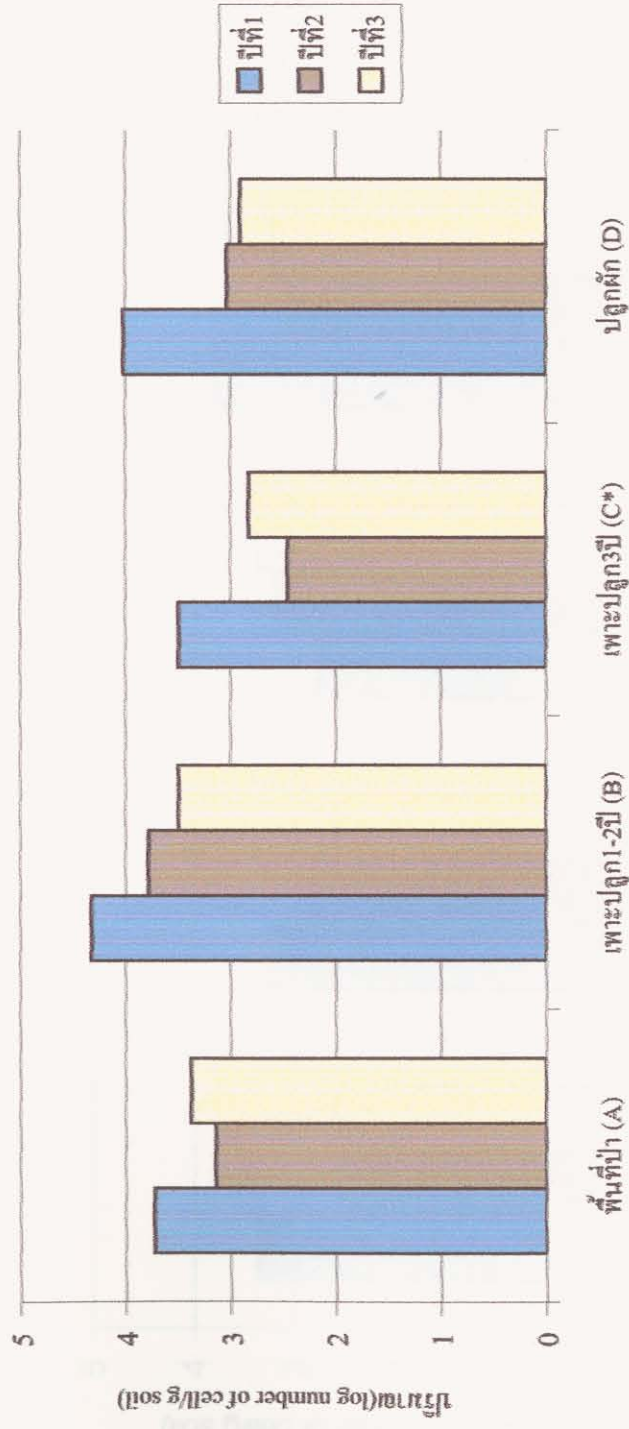
A = พื้นที่ป่า  
 B = พื้นที่เพาะปลูก 1-2 ปี  
 C = พื้นที่เพาะปลูก 3 ปี  
 D = พื้นที่ปลูกผัก



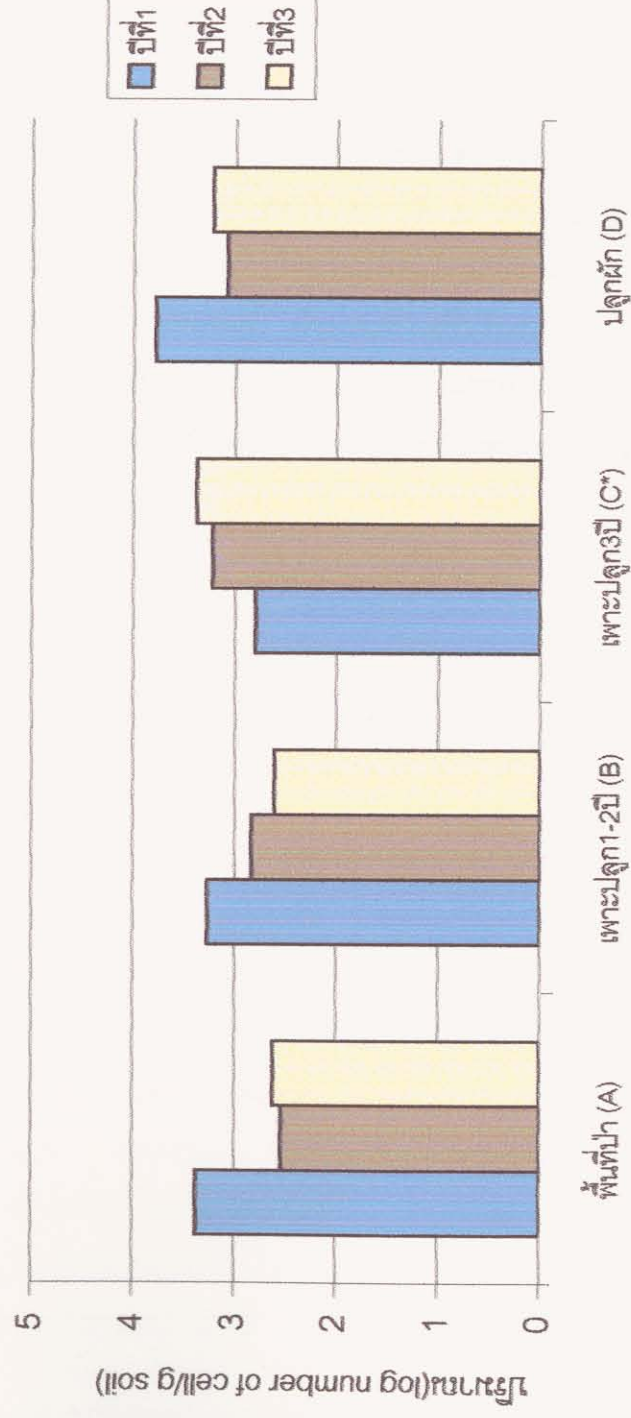
รูปที่ 3.9 ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 1-8



รูปที่ 3.10 ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคเหนือ ปีที่ 1-8



รูปที่ 3.11 ปริมาณ cell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคกลาง ปีที่ 1-8



รูปที่ 3.12 ปริมาณcell ในพื้นที่เพาะปลูกและพื้นที่ป่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือปีที่1-8

**วัตถุประสงค์ที่ 4 : เพื่อให้ทราบถึงความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน  
อิสระ ในกลุ่มเดียวกับที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันว่าเป็นอย่างไร**

**บทนำ**

แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนแบบอิสระพบได้ทั้งใน kingdom Eubacteria เช่น *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. และ Archaeobacteria เช่น *Methanococcus* sp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้พบอยู่ใน 15 สกุล 36 จินัส ดังแสดงในตารางที่ 3.1 (Dalton, 1980) ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะทำการศึกษาแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การติดสีแกรม ขนาดและรูปร่างของเซลล์ ลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น การตรวจสอบทางเคมี และลักษณะทางพันธุศาสตร์ เช่น รูปแบบของ *nif* gene และความหลากหลายในแต่ละกลุ่มของ *nif* gene โดยใช้ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) เป็น DNA primer (Jayarao และคณะ 1992)



## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้ออ้างอิงที่ใช้ได้แก่ *Azospirillum brasilense* sp. 7, *A. lipoferum* CCM3863, *Azospirillum* sp. UPMB 10 และ UPMB 13 (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Zulkifli H. Shamsuddin, มหาวิทยาลัย Putra, มาเลเซีย) ส่วน *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. จาก ดร.เศรษฐา ศิริพิณฑู มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่ทำการแยกได้จากดินทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ 222 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียเหล่านี้ทำการเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nitrogen free agar ( $K_2HPO_4$  0.1 g,  $KH_2PO_4$  0.4 g,  $CaCl_2$  0.02 g,  $MgSO_4$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $FeCl_3$  0.01 g,  $MoNa_2O_4$  0.002 g, Glucose 10 g, น้ำกลั่น 1 ลิตร pH 6.8)

### 2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการ

#### 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบนที่กัลักษณะการสร้างโคโลนี สี ขนาด จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรม และวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

#### 2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ

##### 2.2.1 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส

นำแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากแหล่งอาหารไนโตรเจนในหลอดขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีอาหารบรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปิดด้วยจุกยางตามด้วยคูดอากาศในหลอดออก แล้วอัดด้วยก๊าซอะเซทิลีนที่มีความเข้มข้น 10% ลงไปแทนที่ให้ได้ปริมาตรเท่ากับอากาศที่ถูกคูดออกมาในครั้งแรก จากนั้นนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชม. ที่ 30°C คึงก๊าซในหลอดออกมาในปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงฉีดก๊าซวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ใช้วิธีของ Lowry (Robert 1989)

##### 2.2.2 การจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี

ใช้หลักของ Voges-Proskauer การเปลี่ยนสีของโคโลนีบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) และการเปลี่ยนสีของโคโลนีอันเนื่องมาจากการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ Manitol, Malate, Bensoate, Glucose และ Arabinose (ใช้หลักการของ Krieg, 1981, Terrand et al., 1978, Buchanan and Gibbons, 1974)

### 3. การจำแนกกลุ่มโดยใช้ PCR-based technique

#### 3.1 การสกัด chromosomal DNA

นำเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวมาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีที่ 4°C จากนั้นใส่สารละลาย TNE (10 mM Tris

pH 8, 1 mM EDTA และ 0.1 M NaCl) ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งก่อนเติม สารละลายไลโซโซม (2 มก. ไลโซโซม/ มิลลิลิตร ละลายใน 25 mM Tris pH 8, 12.5 mM EDTA และ 12.5% ซูโครส) 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย 10% SPS นำไปบ่มต่อที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นทำการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 24: 1) สารละลาย DNA นำมาตกตะกอนด้วย 99% เอทานอล แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ที่มี Rnase/A ต่อไป

### 3.2 การเพิ่มจำนวนชุด DNA ด้วยวิธี PCR

Primer ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 ชุด ได้แก่

#### 3.2.1 *nifD* primer

ลำดับเบสของ primer ที่ใช้คือ Primer 1: 5'-AT(TC)AGGT(TCGA)AC(TCGA)GCCTT-3' และ Primer 2 : 5' AT(GC)GA(AG)T(AT)CAACTTCTCCGG-3' การเพิ่มจำนวนชุดจะใช้ DNA template ในปริมาณ 50 นก., primer 1 และ 2 ในปริมาตร 0.95 และ 1.025 พิโคโมลตามลำดับ, deoxynucleoside triphosphate 200 ไมโครโมล, MgCl<sub>2</sub> 1.5 มิลลิโมล และ PCR-buffer ปฏิกริยาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชุด DNA ประกอบด้วย 94°C, 4 นาที และ 72°C, 3 นาทีในรอบแรก 94°C, 30 วินาที 35°C เป็นเวลา 60 วินาที และ 60°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 5 รอบ ตามด้วย 35°C, 35 นาที และ 60°C, 2 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ ตามด้วย 1 รอบที่มีอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที

#### 3.2.2 Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)

ลำดับเบสของ primer คือ ERIC-IR : 5'GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT-3' และ ERIC-2 : 5'-AAGTAATGACTGGGGTGA GCC-3' ปริมาณ template ใช้เช่นเดียวกับการใช้ *nifD* primer ส่วนปริมาตร primer ERIC-IR และ -2 ใช้ความเข้มข้น 0.95 และ 0.8 พิโคโมลตามลำดับ ส่วน deoxy nucleoside triphosphate, MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase และ buffer ก็ใช้ในสัดส่วนเดียวกันกับ *nifD* primer ปฏิกริยาการเพิ่มจำนวนชุด DNA ที่ใช้ประกอบด้วย 95°C, 7 นาที 1 รอบ, 94°C, 1 นาที, 52°C, 8 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ 65°C, 16 นาที 1 รอบ การเพิ่มจำนวนชุดของ DNA ใช้เครื่อง PCR Sprint Temperature Cycling System ของ Hybrid, UK.

## 4. การวิเคราะห์ Phylogenetic

ทำเช่นเดียวกับ PCR product ที่ได้จากการศึกษาใน Cyanobacteria (วัตถุประสงค์ที่ 4)

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการ

#### 1.1 ขนาด รูปร่าง และการคิดสีแกรม

จากการศึกษาขนาดและรูปร่างของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 222 ไอโซเลต พบว่า ทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็น rod shape ถึง 63.51% ของประชากรทั้งหมด และมีลักษณะเป็น short-rod 31.98% (ดังแสดงผลในภาคผนวกตารางที่ ผ.3.7) ซึ่งพบว่าผลจากการทดลองครั้งนี้คล้ายคลึงกับการค้นพบของ Anchan (1986) ที่ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระในบริเวณดินที่เป็นกรดในประเทศไทย จำนวน 259 ไอโซเลตซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่พบบริเวณดินเค็มตอนเหนือของอเมริกา จำนวน 339 สายพันธุ์ทั้งหมดซึ่งอาศัยอยู่บริเวณรากของ *Spartina alterniflora* (smooth cord grass) เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดเช่นเดียวกัน

#### 1.2 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทุกไอโซเลตพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในช่วงที่กว้างตั้งแต่ 1-9,500 นาโนโมล  $C_2H_4$ /มก. โปรตีน/วัน (ดังแสดงผลในตารางที่ ผ.3.8) โดยพบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลตที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดคือมีค่า ARA ในช่วง 9,001-9,500 นาโนโมล  $C_2H_4$ /มก. โปรตีน/วัน รองลงมา มี 2 ไอโซเลตซึ่งมีค่า ARA ในช่วง 4,001-4,500 นาโนโมล  $C_2H_4$ /มก. โปรตีน/วัน ในขณะที่ส่วนใหญ่อีก 194 ไอโซเลตพบว่ามีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่ำคืออยู่ในช่วงค่า ARA 1-500 นาโนโมล  $C_2H_4$ /มก. โปรตีน/วัน ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่มีมากในแบคทีเรียกลุ่มนี้ นอกจากนี้ผลการศึกษาจึงคล้ายคลึงกับการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบริเวณรากต้นอ้อยที่พบว่า มีหลายจีโนสที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนต่างกันไป (Siripin, 1985) รวมไปถึงลักษณะคล้ายคลึงกับที่พบบริเวณรากของต้นข้าวด้วย (Archan, 1986)

#### 1.3 คุณสมบัติทางชีวเคมี

ในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้หลักการทางชีวเคมีเช่น Voges-Proskauer reaction การใช้อาหารแหล่งคาร์บอนแบบต่าง ๆ เช่น กูลโคส แมนิทอล แรมโนส เบนโซเอท อราซิโนส และ PDA ผลการทดสอบสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ดังนี้ *Beijerinckia* 16 สายพันธุ์, *Klebsiella* sp. 4 สายพันธุ์ *Azotobacter* sp. 1 สายพันธุ์, *Azomonas* sp. 18 สายพันธุ์, *Azospirillum* sp. 17 สายพันธุ์ และไม่สามารถนำแนกได้ด้วยวิธีนี้ 166 สายพันธุ์ (ดังแสดงผลในตารางที่ 3.8 และตารางที่ ผ.3.7)จากการทดลองของ Archan (1986) ที่ศึกษา Chemotaxonomy ของแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าว พบว่ามีได้แก่กลุ่มจีโนส *Klebsiella oxytoca* และ *Azospirillum* sp.

ตารางที่ 3.8 Biochemical characteristic of free-living  $N_2$ -fixing bacteria

Genus	Total No. of isolate	No. of free-living nitrogen fixing bacterial strains			Location of isolation		
		North	Central	North-Eastern	North	Central	North-eastern
<i>Beijerinckia</i> sp.	16	4	4	11	IVNM331, IVNM341, IVNC24 and IVNC31	ICC*25	INEM123, INEM133, INEM244, INEM314, INECR37, IVNEM112, IVNEM231, IVNEF31, VNED22 and VNEC*11
<i>Klebsiella</i> sp.	4	-	3	1	-	ICC42, IVCCR14 and IVCCR31	IVNEM133
<i>Azotobacter</i> sp.	1	-	-	-	-	-	INED23
<i>Azomonas</i> sp.	18	9	8	1	INM236, INM343, INCR11, INCR24, INR43, INF32 INC*16, IVNM311 and IVNFI1	ICM222, ICM235, ICM321 ICF43, IVCM341 IVCR41, VCA12 and VCC*22	IVNEM341

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

Genus	Total No. of isolate	No. of free-living nitrogen fixing bacterial strains			Location of isolation		
		North	Central	North-Eastern	North	Central	North-Eastern
<i>Azospirillum</i> sp.	17	5	11	1	INM11, INM314, INC29, INF16 and IVNB14	ICM137, ICM147, ICM249, ICM312, ICCR16, ICCR26, ICCR38, ICF15, ICF39, IVCM222 and VCD31	INEF14
Unidentified	166	57	51	58	-	-	-

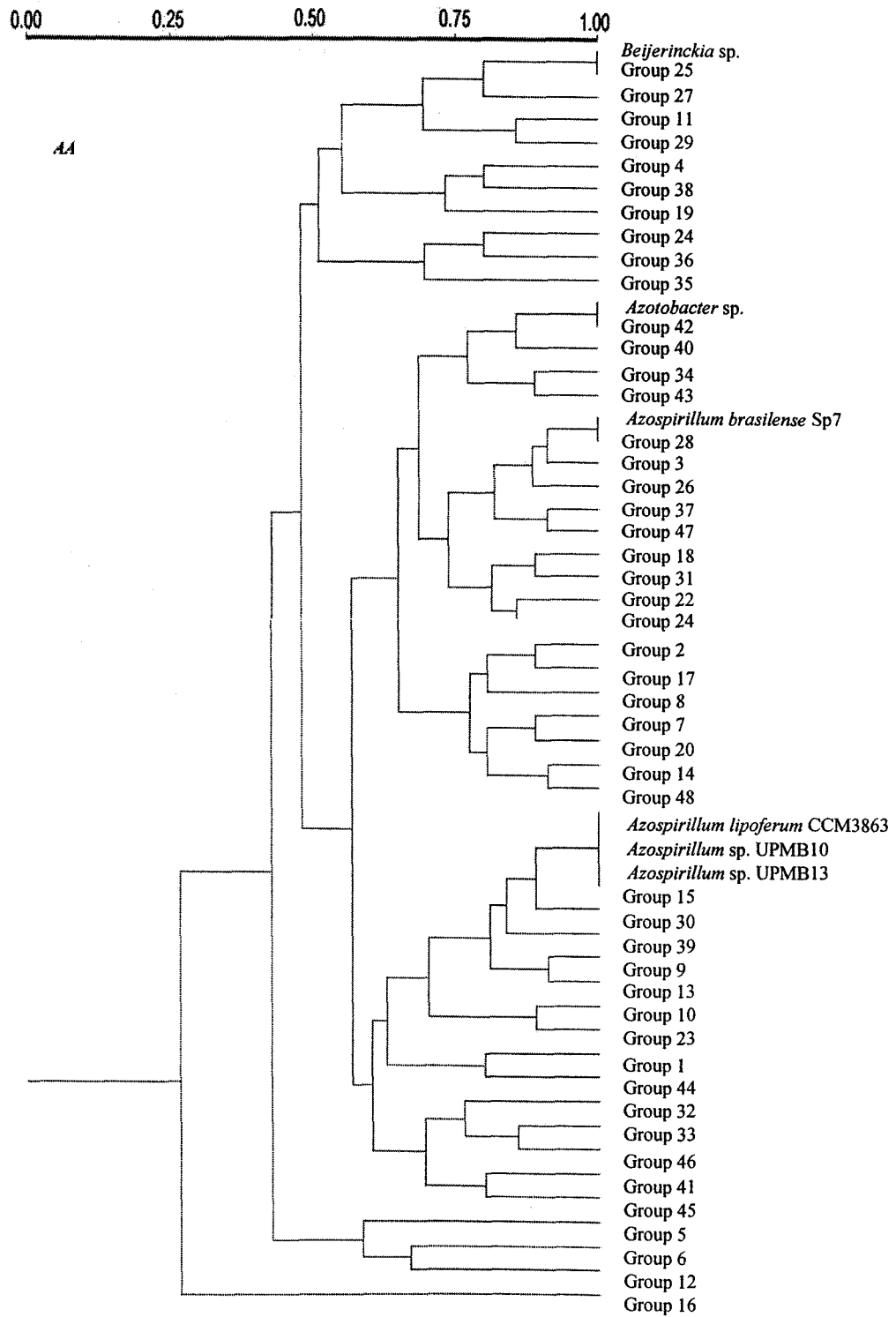
Symbol: M1, Highest mountain; M2, Middle mountain; M3, Foot hill of mountain; CR, Rice in rotation with other crop; R, Rice cultivation; C, Field crop cultivation; F, Uncultivated; A, Undisturbed forest; B, Forest clearance for crop cultivation for 1-2 years; C\* , Forest clearance for crop cultivation for 3 years; D, Intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers

#### 1.4 การวิเคราะห์ *nifD* gene profile

เมื่อนำ *nifD* primer มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR กับแบคทีเรียทุกไอโซเลต พบว่าสามารถจำแนกได้ออกเป็น 48 กลุ่ม (ดังแสดงในรูปที่ 3.11) และแต่ละกลุ่มเมื่อจำแนกตามภาคดังแสดงในตารางที่ 3.9 จากผลการทดลองพบแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *Azospirillum lipoferum* CCM 3863, *Azospirillum* sp. UPMB 10 และ UPMB 13 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่มที่ 15) ในขณะที่ *Azospirillum* sp. 7 จะต่างจากพวก (อยู่ในกลุ่ม 28) ส่วน *Beijerinckia* sp. และ *Azotobacter* sp. จะแตกต่างกันด้วย (อยู่ในกลุ่ม 25 และ 42 ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 6 ซึ่งไม่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เลยเนื่องจาก *nifD* gene ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง  $\alpha$ -subunit ของ nitrogenase ในกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Young, 1993) ดังนั้นจึงได้นำมาใช้ในการจำแนก (เช่นเดียวกับการวิจัยของ Ueda และคณะ 1995) แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการจำแนกโดยใช้วิธีนี้กับวิธีทางชีวเคมีมิได้ให้ผลสอดคล้องกันจากตารางที่ 3.9 เมื่อพิจารณาถึง *nifD* pattern กับลักษณะการปรากฏของแบคทีเรียในแต่ละระบบนิเวศในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็น dominant native strain ในทั้ง 2 ฤดู สามารถพบบนยอดและกลางคอกอินทนนท์ พื้นที่ปลูกพืชไร่สลัดข้าวในภาคกลาง พื้นที่รกร้างในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ป่าในภาคเหนือและพื้นที่ที่ผ่านการบุกรุกทำลายป่าและทำการเกษตรมากกว่า 3 ปี ในภาคเหนือ (รายละเอียดของ phylogenetic tree ในระบบนิเวศต่าง ๆ ดังแสดงในรูปภาคผนวกที่ ผ.3.1-ผ.3.33)

#### 1.5 การวิเคราะห์ด้วย ERIC primer

เมื่อนำแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มที่จำแนกตาม *nifD* pattern ทั้ง 48 กลุ่มมาทำการศึกษาความหลากหลายในแต่ละกลุ่มโดยใช้ EPIC primer ซึ่งเป็น primer ที่ถูกออกแบบมาจากแบคทีเรียแกรมลบ และได้มีการทดสอบมาแล้วว่าเหมาะสมที่ใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Frans, 1992 และ Versalovic และคณะ, 1991) และจากการทดลองนี้พบว่าเมื่อทำการจำแนกดูความหลากหลายภายในแต่ละกลุ่มของ *nifD* พบว่า *nifD* กลุ่มที่ 1 มีเพียง 2 คู่สายพันธุ์ที่มีโอกาสเป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ ICA16 และ IVCR 21 กับ INECR 44 และ INEB 11 (ดังแสดงในรูปภาคผนวกที่ ผ.3.34-ผ.3.81) ซึ่ง ICA 16 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากภาคกลางในพื้นที่ป่าในฤดูฝน ส่วน IVCR 21 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากภาคเดียวกันในบริเวณที่ทำการปลูกข้าวสลัดพืชไร่ในฤดูแล้ง ในขณะที่ INECR 44 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณที่ปลูกข้าวสลัดกับพืชไร่ในฤดูฝนและ INEB 11 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากภาคเดียวกันในพื้นที่บริเวณที่ผ่านการทำลายป่าและทำการเกษตรมาแล้ว 1-2 ปี ซึ่งจากการทดลองนี้เองทำให้เห็นถึงการกระจายตัวของแบคทีเรียในสายพันธุ์เดียวกันอาจแพร่กระจายและดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ กันในแต่ละภูมิภาคได้ ส่วน *nifD* กลุ่มอื่นที่เหลือพบว่าในแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายสูง ไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีแนวโน้มจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันเลย (ดังแสดงผลในภาคผนวกรูปที่ ผ.34) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำการแยกได้จากดินในประเทศมีความหลากหลายสูงมากกว่ากลุ่มอื่นที่ได้ทำการศึกษามา



រូបភាព 3.13 Dendrogram of 48 groups of free-living nitrogen fixing bacteria

ตารางที่ 3.9 *nifD*- PCR pattern of free-living nitrogen fixing bacteria was separated into different 48 groups from 3 parts of Thailand

Group	No. of isolate	Location		
		North	Central	North-Eastern
1	43	INM111 (AS), INM125 INCR11(AM), INCR24 (AM) INR33, INR43 (AM) IND13, IND24 INF47 INB24 INC*28 IVNC13, INC31 IVNEM116 IVNR32, IVNR44 VNC*24	ICM235 (AM) ICA16 ICCR26 (AS), ICCR38 (AS) ICB12, ICB27 ICD21, ICD31 IVCF24 IVCCR21 IVCR21, IVCR33	INEM236 INEA17, INEA27 INEC14 INEF47 INECR22, INECCR44 INEB11 IVNEM133 IVNEM314 (B), IVNEM333, IVNEM341 (AM), IVNEM133 (K) IVNEC33 IVNECR12
2	2	INM145	ICM249 (AS)	-
3	3	-	ICM123	INED23 (K) IVNECR33
4	11	INM133 IVNF41	ICM147 (AS), ICM321 (AM) ICC11 VCD21 VCB11	INED33 IVNEM224, IVNEM112 (B) VNED22 (B)
5	4	-	ICM118 VCR12 (AM)	VNEA11 VNED37
6	4	INCR36 INC31 INF25 IND39 INA19 INB13 INC*16 (AM) IVNC24 (B) IVNF31 IVNCR15, IVNCR43	ICM137 (AS), ICM332 ICM312 (AS), ICM347 ICCR48 ICR12, ICR24, ICR35 ICC34 ICF15 (AS), ICF24, ICF39 (AS)	INEM114, INEM323 INECR37 (B) INER15, INER24 INEF27 INED17 INEB21 IVNECR45 IVNER41 IVNEC12, IVNEC22, IVNEC42 IVNEF24



ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

Group	No. of isolate	Location		
		North	Central	North-Eastern
		IVNR26 VNA13	ICD13 IVCF32 IVCCR41 IVCR41 (AM)	VNED11 VNEB21 VNEC*21
7	2	INM248 IVNM331 (B)	-	-
8	6	INM213 INA23 INF47	VCA22	INEM133 (B) INEM314
9	1	IVNM212	-	-
10	1	-	IVCM243	-
11	2	-		IVNEM241 IVNER31
12	1	-	IVCF13	-
13	1	-	IVCCR31 (K)	
14	1	-	-	INEM123 (B)
15	1	-	-	INEM143 *Reference strains; <i>Azospirillum lipoferum</i> CCM 3863, <i>Azospirillum</i> sp. UPMB10 and <i>Azospirillum</i> sp. UPMB13
16	11	IVNM224 INR25 IVNM224	ICM219, ICM312 ICF43 (AM) VCC13, IVCC24, IVCC32 VCB23	INEM223 IVNEM231 (B) IVNECR22
17	2	INM236 (AM) INC15	-	-
18	1	-	VCD31 (AS)	-
19	1	IVNCR22	-	-
20	1	IVNCR34-	-	-
21	1	-	IVCM315	-

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

Group	No. of Isolate	Location		
		North	Central	North-Eastern
22	9	IVNF24 VND26	ICCR16 (AS) IVCM323, IVCM341 (AM), IVCM233	INEM244 (B), INEM345 IVNEM324
23	4	IVNM311 (AM), IVNM322, IVNM341 (B) IVNC41	-	-
24	2	INM314	IVCC45	
25	6	IVNM243 IVNF11 (AM) VNC*12	ICR44	INEF33 IVNEM211 (B) *Reference strain; <i>Beijerinckia sp.</i>
26	1	INC29 (AS)	-	-
27	1	-	IVCM213	-
28	5	-	VCD11	INEC27, INEC33 IVNEF12 VNEB14 *Reference strain; <i>Azospirillum brasilense Sp 7</i>
29	1	-	IVCF42	-
30	1	-	IVCM335	-
31	4	INCR410 VNB14 (AS)	ICC*13	INER46
32	1	-	-	IVNEF42
33	4	VNB21	ICM222 (AM)	INEC47 INEC*16
34	1	-	-	INEM332
35	2	-	ICC*25 (B) VCC*11	-
36	1	-	-	VNEC*11 (B)
37	1	INM324	-	-
38	7	INM336 VND31	ICC42 (K) VCC*22 (AM)	INEM216 INEC*23 IVNEF31 (B)

## ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

Group	No. of Isolate	Location		
		North	Central	North-Eastern
39	5	INC45 INF16 (AS) IVNF14	ICA23 ICC25	-
40	2		IVCM144	IVNER11
41	3	VNA23	-	IVNEM141 IVNER21
42	7	INM343 (AM) INF32 (AM) VND13	-	INECR11 INEF14 (AS) IVNEM121 VNEA21 *Reference strain; <i>Azotobacter sp.</i>
43	1	-	-	IVNEM121
44	3	INR12 IVNM232	IVCM222 (AS)	-
45	4	IVNM125, IVNM134, IVNM142	IVCM113	-
46	1	-	IVCM131	-
47	1	-	IVCCR14 (K)	-
48	1	-	IVCM123	-

Notes : Results of biochemical assay : AS, *Azospirillum sp.*; AM, *Azomonas sp.* ; B, *Beijerinckia sp.* ; K, *Klebsiella sp.*

Result of *nif D* -PCRproducts: \*reference strain; *Azospirillum lipoferum* CCM 3863, *Azospirillum sp.* UPMB10 and *Azospirillum sp.* UPMB13 were represented group 15, *A. brasilenese* Sp 7 represented group 28, *Beijerinckia sp.* was represented group 25, *Azotobacter sp.* was represented group 42.

Symbol: M1, Highest mountain; M2, Middle mountain; M3, Foot hill of mountain; CR, Rice in rotation with other crop; R, Rice cultivation; C, Field crop cultivation; F, Uncultivated; A, Undisturbed forest; B, Forest clearance for crop cultivation for 1-2 years; C\*, Forest clearance for crop cultivation for 3 years; D, Intensive agricultural production using high rate of pesticides and fertilizers

การทดสอบความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เมื่อใช้วิธีการตรวจสอบทางชีวเคมีพบว่า กลุ่มที่คาดว่าจะอยู่ในจีโนม *Beijerinckia* มีการกระจายตัวในเกือบทุกภาคและระบบนิเวศเกือบทุกประเภท ยกเว้นภาคกลางซึ่งพบน้อยและพบเพียงในระบบนิเวศที่มีการปลูกแต่พืชไร่ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยใช้ *nif D* primer ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มจีโนม *Klebsiella* พบว่าไม่พบในภาคเหนือเลย แต่กลับพบในพื้นที่ทำการเกษตรแบบทำไร่หรือทำไร่สลับกับการทำนาในภาคกลาง ส่วนภาคอีสานพบเพียงบริเวณเชิงเขา แบคทีเรียในกลุ่มจีโนม *Azotobacter* พบว่ามีความหลากหลายน้อยมาก พบเป็นเพียงบางบริเวณ เช่น บริเวณที่ทำการปลูกผักในภาคอีสานเท่านั้น ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ *nif D* gene กับแบคทีเรียกลุ่มนี้ พบว่ากลุ่มที่มี *nif D* gene ที่สัมพันธ์กับ *Azotobacter* พบเป็นส่วนใหญ่ในภาคอีสาน ในภาคเหนือพบบริเวณพื้นที่เขา ป่า และที่มีการปลูกผัก แต่ไม่พบในพื้นที่ภาคกลางเลย ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มจีโนม *Azomonas* พบว่ามีความหลากหลายน้อยมากในภาคอีสานเมื่อเปรียบเทียบกับ *Beijerinckia* แต่พบในระบบนิเวศเกือบทุกประเภทในภาคเหนือและภาคกลาง ส่วนอีกกลุ่มได้แก่ *Azospirillum* พบว่ามีความหลากหลายน้อยมากในภาคอีสาน แต่พบมาในภาคเหนือและภาคกลาง แต่เมื่อพิจารณาจากกลุ่มที่มี *nif D* gene สัมพันธ์กับ *A. brasilense* sp. 7 พบว่าในภาคอีสานกลับมีความหลากหลายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการทำการเกษตร และพบว่ามี 1 สายพันธุ์จากบริเวณภูเรือที่มี *nif D* สัมพันธ์กับ *A. lipoferum*

เมื่อพิจารณาจากกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะของ *nif D* ที่มีความใกล้เคียงกันกับลักษณะของระบบนิเวศเพื่อที่จะดูว่าระบบนิเวศใดสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถดำรงชีวิตข้ามฤดูได้ พบว่าระบบนิเวศต่าง ๆ นี้ได้แก่ บริเวณคอกอินทนนท์ บริเวณภูเรือ พื้นที่ทำการเกษตรภาคกลาง, ภาคอีสาน และภาคเหนือ แต่เมื่อใช้ ERIC เป็น primer จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ในประเทศไทยมีความหลากหลายอยู่สูงมาก และไม่พบว่ามีความสัมพันธ์แบบจำเพาะเจาะจงกับระบบนิเวศแต่ละระบบโดยตรงเมื่อพิจารณาจาก ERIC-PCR products

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้จะพบว่าถ้าอาศัยเกณฑ์ของการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ ระบบนิเวศจะเป็นตัวกำหนดการปรากฏของกลุ่มจีโนมของแบคทีเรียได้ระดับหนึ่ง และบางครั้งการใช้ลักษณะของ *nif D* gene ในการร่วมพิจารณาก็ให้ผลสอดคล้องกันในบางประการ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความหลากหลายสูง เช่น มีมากกว่า 37 genera และมีความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูงมาก ดังนั้นถ้าต้องการจะทราบความหลากหลายในระดับจีโนมและสปีชีส์ จำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคการอ่านลำดับเบสของยีนกลุ่ม 16S rRNA ซึ่งเป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายสูง ข้อเสนอแนะในการศึกษาขั้นต่อไปควรทำในเชิงลึกเช่นเดียวกับการศึกษาในไซยาโนแบคทีเรีย

ภาคผนวก

กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ

ตารางที่ ๓.3.1 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบบที่เรีขตรีงในโตรเจนอย่างอิสระในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	POP(N) M <sub>1</sub> = 2.045 - 0.0042 (Moist) - 0.042 (Ts) + 0.0249 (Ta) - 0.0027 (OM) - 0.0469 (EC) - 0.226 (pH) + 0.00109 (level)	0.300	0.121
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	POP(N) M <sub>2</sub> = 2.042 - 0.00061 (Moist) - 0.026 (Ts) + 0.0114 (Ta) + 0.059 (OM) + 1.231 (EC) - 0.056 (pH) + 0.00144 (level)	0.189	0.083
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	POP(N) M <sub>3</sub> = 3.938 + 0.00048 (Moist) + 0.0184 (Ts) - 0.0071 (Ta) - 0.013 (OM) - 0.474 (EC) - 0.182* (pH) + 0.000859 (level)	0.114	0.143
พีชไรต์ต่อเนื่อง (C)	POP(N) C = 4.773 - 0.00029 (Moist) - 0.016 (Ts) + 0.0138 (Ta) - 0.058 (OM) - 3.25 (EC) - 0.096 (pH) - 0.00082 (level)	0.384	0.077
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POP(N) R = 2.813 - 0.0026 (Moist) - 0.058 (Ts) + 0.0732* (Ta) + 0.0317 (OM) - 1.013 (EC) + 0.194 (pH) - 0.0018 (level)	0.551	0.116
ไรต์ลับข้าว (CR)	POP(N) CR = 3.025 - 0.00535 (Moist) + 0.0038 (Ts) - 0.0137 (Ta) + 0.0238 (OM) - 2.80 (EC) + 0.00946 (pH) + 0.000256 (level)	0.305	0.083
พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (F)	POP(N) F = 2.404 - 0.018** (Moist) + 0.021 (Ts) - 0.022 (Ta) + 0.0835** (OM) - 0.113 (EC) - 0.059 (pH) + 0.0052** (level)	0.229	0.409

หมายเหตุ

POP = ประชากร

Moist = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = ค่าการนำไฟฟ้า

pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ๓.3.2 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างเบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	POP(C) M <sub>1</sub> = 21.404 - 0.00039 (Moist) - 0.036* (Ts) - 0.0136 (Ta) + 0.00245 (OM) + 1.876 (EC) - 0.149 (pH) - 0.025 (level)	0.130	0.335
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	POP(C) M <sub>2</sub> = -1.250 - 0.0052 (Moist) - 0.019 (Ts) + 0.0236 (Ta) + 0.0228 (OM) - 0.013 (EC) + 0.0111 (pH) + 0.0136 (level)	0.104	0.108
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	POP(C) M <sub>3</sub> = 6.295 + 0.00726 (Moist) - 0.043* (Ts) + 0.0359 (Ta) + 0.103 (OM) - 1.618 (EC) + 0.328** (pH) - 0.028 (level)	0.143	0.225
พีชไรต์ต่อเนื่อง (C)	POP(C) C = 3.688 - 0.0015 (Moist) - 0.018 (Ts) - 0.020 (Ta) - 0.052 (OM) - 2.445 (EC) + 0.112 (pH) + 0.0032 (level)	0.154	0.141
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POP(C) R = 0.939 - 0.013 (Moist) + 0.0535* (Ts) - 0.023 (Ta) - 0.312 (OM) - 2.168 (EC) + 0.394* (pH) - 0.076 (level)	0.275	0.249
ไรต์สับข้าว (CR)	POP(C) CR = 2.063 - 0.0021 (Moist) - 0.012 (Ts) + 0.00925 (Ta) - 0.099 (OM) - 0.337 (EC) + 0.321* (pH) - 0.013 (level)	0.172	0.113
พื้นที่กรังกว้างเปล่า (F)	POP(C) F = 2.228 - 0.00074 (Moist) - 0.013 (Ts) + 0.0218 (Ta) + 0.0266 (OM) - 0.955 (EC) + 0.134 (pH) + 0.000462 (level)	0.208	0.077

หมายเหตุ

POP = ประชากร

Moist = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

OM = อินทรีย์วัตถุ

EC = ค่าการนำไฟฟ้า

pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ผ.3.3 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแผนที่เรียลไทม์ในโทรเจนอย่างอิสระในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับ สภาพแวดล้อมทาง ภายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
ยอดเขา (M <sub>1</sub> )	POP(NE) M <sub>1</sub> = -9.362 + 0.00665 (Mois) + 0.0172 (Ts) - 0.083 (Ta) - 0.069 (OM) + 0.0449 (EC) + 0.504* (pH) - 0.00896 (level)	0.410	0.186
กลางเขา (M <sub>2</sub> )	POP(NE) M <sub>2</sub> = -31.241 - 0.064 (Mois) + 0.00405 (Ts) - 0.023 (Ta) - 0.028 (OM) + 1.54 (EC) - 0.306 (pH) + 0.0302 (level)	0.535	0.054
เชิงเขา (M <sub>3</sub> )	POP(NE) M <sub>3</sub> = -23.521 - 0.0021 (Mois) + 0.0883 (Ts) - 0.074 (Ta) - 0.0026 (OM) - 0.821 (EC) + 0.104 (pH) + 0.0362 (level)	0.630	0.044
พืชไร่ต่อเนื่อง (C)	POP(NE) C = 2.682 - 0.00269 (Mois) + 0.029 (Ts) - 0.037 (Ta) - 0.032 (OM) - 0.38 (EC) + 0.153 (pH) - 0.0015 (level)	0.261	0.107
ข้าวต่อเนื่อง (R)	POP(NE) R = 4.483 - 0.00013 (Mois) - 0.0072 (Ts) - 0.013 (Ta) + 0.00656 (OM) - 0.219 (EC) + 0.0702 (pH) - 0.003 (level)	0.322	0.037
ไร่สลับข้าว (CR)	POP(NE) CR = 3.324 + 0.000826 (Mois) + 0.00544 (Ts) - 0.0072 (Ta) + 0.184 (OM) + 1.122 (EC) + 0.131 (pH) + 0.0045 (level)	0.134	0.087
พื้นที่รกร้างว่างเปล่า (F)	POP(NE) F = 3.082 + 0.0413 (Mois) - 0.051 (Ts) + 0.0459 (Ta) + 0.0236 (OM) - 4.434 (EC) - 0.189 (pH) - 0.0038 (level)	0.436	0.108

หมายเหตุ POP = ประชากร Mois = % ความชื้น Ts = อุณหภูมิ (°C)  
 Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C) OM = อินทรีย์วัตถุ EC = ค่าการนำไฟฟ้า  
 pH = ความเป็นกรดเป็นด่าง level = ความสูงของพื้นที่



ตารางที่ ๓.3.4 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแผนที่เรียตริง ใน โตรเจนอย่างอิสระในภาคเหนือกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคเหนือ (N)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POP (N) A = 5.849 - 0.008524 (Moist) - 0.02075 (Ts) + 0.07118 (Ta) + 0.005418 (level)	0.362	0.180
ปลูกพืช 1 ปี (B)	POP (N) B = -13.771 - 0.01092* (Moist) + 0.182* (Ts) - 0.08145 (Ta) + 0.04197 (level)	0.112	0.615
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	POP (N) C* = 2.937 - 0.01052 (Moist) - 0.02431 (Ts) + 0.03111 (Ta) + 0.002021 (level)	0.126	0.304
ปลูกผัก (D)	POP (N) D = 2.608 - 0.0155** (Moist) + 0.108 (Ts) - 0.08819 (Ta) + 0.002703 (level)	0.254	0.362

หมายเหตุ

POP = ประชากร

Moist = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ผ.3.5 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแมคทีเรียคิงโน ไตรเจนอย่างอิสระในภาคกลางกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และ คุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคกลาง (C)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POP (C) A = 13.319 + 0.007322 (Moist) - 0.136 (Ts) + 0.07005 (Ta) - 0.471 (level)	0.316	0.329
ปลูกพืช 1 ปี (B)	POP (C) B = 5.231 - 0.0000845 (Moist) - 0.07484 (Ts) - 0.06906 (Ta) + 0.184 (level)	0.320	0.445
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	POP (C) C* = 14.865 - 0.01357 (Moist) - 0.162 (Ts) - 0.04242 (Ta) - 0.215 (level)	0.309	0.539
ปลูกผัก (D)	POP (C) D = 5.759 + 0.05174** (Moist) + 0.212* (Ts) - 0.325** (Ta) + 0.307* (level)	0.239	0.610

หมายเหตุ

POP = ประชากร

Moist = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ผ.3.6 ความสัมพันธ์แบบถดถอยพหุคูณ (Multiple regression) ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพื้นที่กับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และคุณสมบัติบางประการของดิน

พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)	Regression equation	MSE	R <sup>2</sup>
พื้นที่ป่า (A)	POP (NE) A = 1.394 + 0.01989** (Mois) - 0.01941 (Ts) + 0.006714 (Ta) + 0.005408 (level)	0.074	0.798
ปลูกพืช 1 ปี (B)	POP (NE) B = -1.313 + 0.01421 (Mois) - 0.04144 (Ts) + 0.05092 (Ta) + 0.003578 (level)	0.409	0.306
ปลูกพืช > 2 ปี (C*)	POP (NE) C* = 2.797 + 0.006239 (Mois) - 0.253 (Ts) + 0.209 (Ta) + 0.01108 (level)	0.343	0.427
ปลูกผัก (D)	POP (NE) D = 2.402 + 0.01436** (Mois) - 0.002815 (Ts) + 0.00127 (Ta) + 0.002223 (level)	0.208	0.326

หมายเหตุ

POP = ประชากร

Mois = % ความชื้น

Ts = อุณหภูมิ (°C)

Ta = อุณหภูมิอากาศ (°C)

level = ความสูงของพื้นที่

ตารางที่ ๓.3.7 Characteristic of free-living nitrogen fixing bacteria isolates in each area

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Biochemical assay												
		Colony		Gram staining			Voges Proskauer test	C-sources					PDA						
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas		Glu	Arb				
INM111	M	circular	white	0.3	⊕	0.45x3.84	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	white	
INM125	CCM	circular	white	0.06	⊕	0.88x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INM133	CCM	circular	white	0.4	⊕	0.48x1.92	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INM145	M	circular	clear	0.2	⊕	1.15x1.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
IVNM116	M	circular	orange	0.05	⊕	0.96x1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	orange
IVNM125	S	circular	pink	0.05	⊕	0.46x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pink
IVNM134	S	circular	pink	0.1	⊕	0.46x0.96	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pink
IVNM142	S	circular	pink	0.1	⊕	0.46x1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pink
INM213	G	circular	white	0.1	⊕	0.80x1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INM224	G	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INM236	S	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INM248	CCM	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNM212	S	circular	pink	0.1	⊕	0.96x1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pink
IVNM224	M	circular	pink	0.05	⊕	0.96x1.92	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pink

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Mophology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA								
		Colony		Gram staining				Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu	Arb									
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing										Size of Cell ( $\mu$ m)							
IVNM232	S	circular	clear	0.1	⊕	0.46x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear			
IVNM243	S	circular	pink	0.05	⊕	0.76x1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink	
INM314	M	circular	white	0.1	⊕	0.48x0.96	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INM324	G	circular	white	0.2	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INM336	M	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.96	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INM343	CCM	circular	clear	0.01	⊕	0.96x2.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
IVNM311	S	circular	white	0.02	⊕	0.46x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
IVNM322	S	circular	white	0.02	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNM331	S	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNM341	S	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INCR11	G	circular	clear	0.2	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INCR24	G	circular	clear	0.1	⊕	0.48x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INCR36	M	circular	clear	0.2	⊕	0.81x1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INCR410	CCM	circular	white	0.1	⊕	0.48x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNCR15	M	circular	white	0.1	⊕	0.92x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA				
		Colony		Gram staining				Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu	Arb					
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining										Size of Cell ( $\mu$ m)			
IVNCR22	S	circular	yellow	0.1	⊕	0.92x1.92	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	yellow	
IVNCR34	M	circular	pink	0.1	⊕	0.48x0.76	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	pink
IVNCR43	S	circular	white	0.05	⊕	1.05x1.92	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	white
INR12	S	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	white
INR25	CCM	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	white
INR33	S	circular	clear	0.1	⊕	0.48x1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INR43	G	circular	white	0.2	⊕	0.96x2.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNR13	M	circular	yellow	0.15	⊕	0.48x0.50	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	yellow
IVNR26	M	circular	clear	0.2	⊕	0.48x0.92	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	clear
IVNR32	S	circular	pink	0.1	⊕	0.96x1.48	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	pink
IVNR44	M	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	white
INC15	G	circular	white	0.2	⊕	0.48x1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INC29	M	circular	white	0.1	⊕	0.96x2.88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INC31	G	circular	white	0.3	⊕	0.96x1.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INC45	G	circular	white	0.15	⊕	0.96x2.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white

ตารางที่ ๓.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay					PDA	
		Colony		Gram staining				Mon	Mal	Rhm	Bas	Isolat e		Arb
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing									
IVNC13	S	circular	white	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNC24	S	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNC31	S	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNC41	S	circular	yellow	0.15	⊕	0.96x1.96	+	-	-	-	-	+	+	yellow
INF16	M	circular	pink	0.01	⊕	0.96x1.92	-	+	-	-	-	+	+	pink
INF25	S	circular	white	0.2	⊕	0.77x0.96	+	-	-	-	-	+	+	white
INF32	S	circular	clear	0.1	⊕	0.45x0.76	-	-	-	-	-	+	+	clear
INF47	S	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNF11	S	circular	clear	0.2	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	+	+	clear
IVNF24	S	circular	white	0.08	⊕	0.96x1.96	+	-	-	-	-	+	+	white
IVNF31	S	circular	clear	0.4	⊕	0.48x1.44	-	-	-	-	-	+	+	clear
IVNF41	S	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.96	+	-	-	-	-	+	+	white
IND13	G	circular	white	0.1	⊕	0.288x1.24	-	-	-	-	-	+	+	white
IND24	S	circular	white	0.3	⊕	0.30x0.48	-	-	-	-	-	+	+	white
IND39	CCM	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	+	-	-	-	-	+	+	white
VND13	S	circular	white	0.09	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	+	+	white







ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay							
		Colony		Gram staining				Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu	Arb	PDA	
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing										Size of Cell ( $\mu$ m)
ICM332	G	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	+	-	-	-	+	+	+	+	white
ICM347	M	circular	yellow	0.1	⊕	0.86x0.96	-	+	-	-	+	+	+	+	yellow
IVCM315	M	circular	pink	0.1	⊕	0.76x1.96	-	+	-	-	+	+	+	+	pink
IVCM323	S	circular	clear	0.07	⊕	0.48x0.96	-	+	-	+	+	+	+	+	clear
IVCM335	S	circular	white	0.01	⊕	0.48x0.57	-	+	-	-	+	+	+	-	pink
IVCM341	S	circular	clear	0.1	⊕	0.96x1.96	-	+	-	-	+	+	+	-	clear
ICCR16	M	circular	yellow	0.1	⊕	0.76x1.92	-	+	-	+	+	+	+	-	yellow
ICCR26	M	circular	white	0.01	⊕	0.48x1.96	+	-	-	+	+	+	+	-	white
ICCR38	M	circular	white	0.2	⊕	0.96x1.92	+	-	-	+	+	+	+	-	white
ICCR41	S	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.92	-	+	-	+	+	+	+	+	white
IVCCR14	S	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.96	+	+	-	+	+	+	+	+	white
IVCCR21	S	circular	clear	0.1	⊕	0.64x1.96	-	+	-	-	+	+	+	+	clear
IVCCR31	S	circular	clear	0.1	⊕	0.74x1.11	+	+	-	+	+	+	+	+	white
IVCCR41	S	circular	clear	0.1	⊕	0.35x0.96	-	+	-	-	+	+	+	+	clear
ICR12	G	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.96	-	+	-	+	+	+	+	-	white

## ตารางที่ ๓.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Biochemical assay									
		Colony		Gram staining			Voges Proskauer test	C-sources					PDA			
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas		Glu	Arb	
ICR24	S	circular	white	0.03	⊕	0.96x2.40	-	-	+	-	-	-	-	+	-	white
ICR35	M	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.78	-	-	+	-	-	-	-	+	-	white
ICR44	S	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	+	-	-	-	-	-	-	+	-	white
IVCR12	S	circular	pink	0.03	⊕	0.28x0.48	+	-	-	-	-	-	-	+	-	pink
IVCR21	M	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.96	+	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
IVCR33	M	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.15	-	-	+	-	-	-	-	+	+	white
IVCR41	S	circular	clear	0.08	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
ICC11	G	circular	white	0.3	⊕	0.48x0.54	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICC25	S	circular	clear	0.1	⊕	0.19x0.29	-	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
ICC34	S	circular	white	0.1	⊕	0.77x0.96	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICC42	G	circular	white	0.07	⊕	0.48x1.92	+	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVCC13	M	circular	pink	0.1	⊕	0.96x1.05	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
IVCC24	M	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVCC32	S	circular	white	0.02	⊕	0.96x1.15	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVCC45	S	circular	pink	0.08	⊕	0.48x2.88	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
ICF15	M	circular	white	0.2	⊕	0.76x1.15	+	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICF24	S	circular	white	0.2	⊕	0.96x2.40	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Mophology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA		
		Colony		Gram staining				C-sources								
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu		Arb	
ICF39	M	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.92	+	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICF43	G	circular	clear	0.05	⊕	1.44x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
IVCF13	M	circular	clear	0.1	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear
IVCF24	S	circular	pink	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
IVCF32	S	circular	white	0.05	⊕	0.48x0.96	+	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVCF42	M	circular	white	0.05	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
ICD13	S	circular	white	0.09	⊕	0.54x0.79	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICD21	S	circular	pink	0.01	⊕	0.76x1.72	-	-	-	-	-	-	-	+	-	pink
ICD31	G	circular	white	0.08	⊕	0.28x0.48	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
VCD11	S	circular	white	0.05	⊕	0.981x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
VCD21	S	circular	white	0.1	⊕	0.981x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
VCD31	M	circular	clear	0.05	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICA16	M	circular	white	0.02	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white
ICA23	M	circular	white	0.01	⊕	0.84x1.92	+	-	-	-	-	-	-	+	-	white
VCA12	S	circular	clear	0.05	⊕	0.76x0.96	-	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
VCA22	S	circular	orange	0.1	⊕	0.48x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	-	orange
ICB12	G	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	-	white

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Mophology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA				
		Colony		Gram staining				C-sources										
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu		Arb			
ICB27	M	circular	clear	0.1	⊕	0.96x1.17	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	white	
VCB11	S	circular	white	0.1	⊕	0.48x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
VCB23	S	circular	yellow	0.01	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	yellow
ICC*13	S	circular	white	0.01	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
ICC*25	S	circular	white	0.35	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
VCC*11	S	circular	clear	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
VCC*22	S	circular	clear	0.3	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INEM114	S	circular	white	0.01	⊕	0.76x1.46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INEM123	S	circular	white	0.2	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INEM133	S	circular	white	0.1	⊕	0.98x1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INEM143	S	circular	clear	0.5	⊕	0.48x1.14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
IVNEM112	S	circular	white	0.1	⊕	0.48x1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNEM121	S	circular	white	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNEM133	S	circular	clear	0.05	⊕	0.76x0.96	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
IVNEM141	M	circular	white	0.1	⊕	0.76x1.05	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
INEM216	M	circular	white	0.01	⊕	0.98x1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Mophology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA								
		Colony		Gram staining				C-sources														
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu		Arb							
INEM223	S	circular	white	0.05	⊕	0.98x1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white		
INEM236	M	circular	white	0.02	⊕	0.79x1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
INEM244	S	circular	white	0.02	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNEM211	S	circular	white	0.15	⊕	0.96x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNEM224	S	circular	pink	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
IVNEM231	S	circular	white	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNEM241	S	circular	clear	0.05	⊕	0.57x1.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	clear
INEM314	S	circular	white	0.1	⊕	0.76x1.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
INEM323	S	circular	clear	0.1	⊕	0.98x1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear
INEM332	S	circular	white	0.1	⊕	0.79x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
INEM345	M	circular	white	0.08	⊕	0.48x1.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
IVNEM314	S	circular	pink	0.1	⊕	0.76x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNEM324	M	circular	clear	0.1	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
IVNEM333	S	circular	pink	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear
IVNEM341	S	circular	clear	0.15	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	pink
INECR11	G	circular	gray	0.05	⊕	0.96x1.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Morphology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA
		Colony		Gram staining				Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu	Arb	
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining									
INECR22	S	circular	white	0.08	⊖	0.96x1.08	+	-	-	-	+	+	+	white
INECR37	M	circular	white	0.09	⊖	0.96x1.92	-	-	-	-	+	+	+	white
INECR43	G	circular	white	0.07	⊖	1.96x3.36	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNECR12	S	circular	white	0.15	⊖	0.96x1.41	-	-	-	-	-	+	+	white
IVNECR22	S	circular	pink	0.1	⊖	0.96x1.24	-	-	+	-	+	+	+	pink
IVNECR33	M	circular	white	0.1	⊖	0.48x0.96	-	-	-	+	+	+	+	pink
IVNECR44	S	circular	pink	0.1	⊖	0.48x1.44	-	-	-	-	+	+	+	pink
INER15	M	circular	white	0.01	⊖	0.96x1.96	-	-	-	+	+	+	+	white
INER24	M	circular	white	0.01	⊖	0.96x1.96	-	-	-	+	+	+	+	white
INER34	M	circular	yellow	0.15	⊖	0.48x0.96	-	-	-	+	+	+	+	yellow
INER46	M	circular	white	0.07	⊖	0.48x0.96	-	-	-	+	+	+	+	white
IVNER11	S	circular	clear	0.05	⊖	0.96x1.92	-	-	+	-	+	+	+	clear
IVNER21	S	circular	white	0.15	⊖	0.48x1.92	+	-	-	-	+	+	+	white
IVNER31	S	circular	yellow	0.08	⊖	0.48x0.96	-	-	-	-	+	+	+	yellow
IVNER42	S	circular	yellow	0.1	⊖	0.29x0.48	-	-	+	-	+	+	+	yellow
INEC14	S	circular	clear	0.21	⊖	0.86x1.96	-	-	+	-	+	+	+	clear

ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

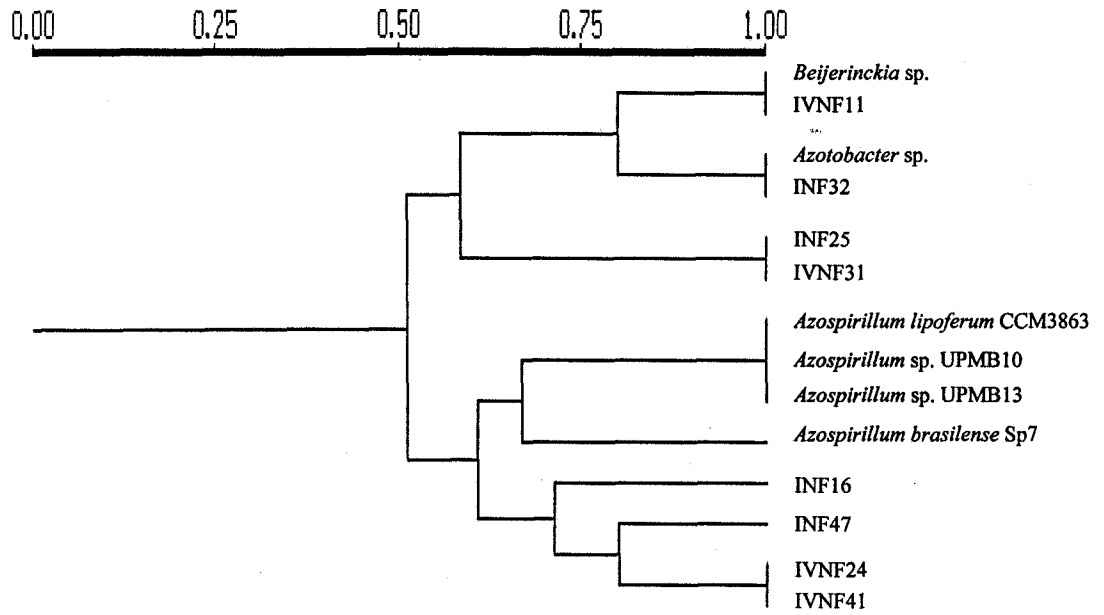
Isolate	Media	Mophology				ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA		
		Colony		Gram staining				C-sources								
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staing			Size of Cell ( $\mu$ m)	Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu		Arb	
INEC23	S	circular	white	0.01	⊕	0.28x0.47	-	-	-	-	+	+	-	+	+	white
INEC33	G	circular	yellow	0.09	⊕	0.37x0.47	-	-	-	-	-	+	+	-	-	yellow
INEC48	M	circular	white	0.01	⊕	0.76x0.96	+	-	-	-	+	+	-	+	+	white
IVNEC12	S	circular	clear	0.2	⊕	0.48x1.48	-	-	-	-	+	+	-	+	+	clear
IVNEC22	S	circular	white	0.08	⊕	0.48x1.44	-	-	-	-	+	+	-	+	-	white
IVNEC33	S	circular	clear	0.15	⊕	0.48x1.15	-	-	-	-	+	+	-	+	+	clear
IVNEC42	S	circular	white	0.25	⊕	0.76x1.44	-	-	-	-	-	+	+	-	+	white
INEF14	M	circular	white	0.05	⊕	0.98x1.84	-	-	-	-	-	+	+	-	-	white
INEF27	M	circular	yellow	0.05	⊕	0.76x1.84	-	-	-	-	+	+	-	+	+	white
INEF33	G	circular	White	0.15	⊕	0.76x0.96	+	-	-	-	+	+	-	+	+	white
INEF47	M	circular	Clear	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	-	+	+	-	+	clear
IVNEF12	M	circular	Clear	0.1	⊕	0.48x0.96	-	-	-	-	+	+	-	+	+	white
IVNEF24	S	circular	Orange	0.1	⊕	0.92x1.92	-	-	-	-	-	+	+	-	-	orange
IVNEF31	S	circular	White	0.2	⊕	0.92x1.92	-	-	-	-	+	+	-	+	+	white
IVNEF42	M	circular	white	0.05	⊕	0.96x1.92	-	-	-	-	-	+	+	-	+	white
INED17	S	circular	white	0.1	⊕	0.96x1.48	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white



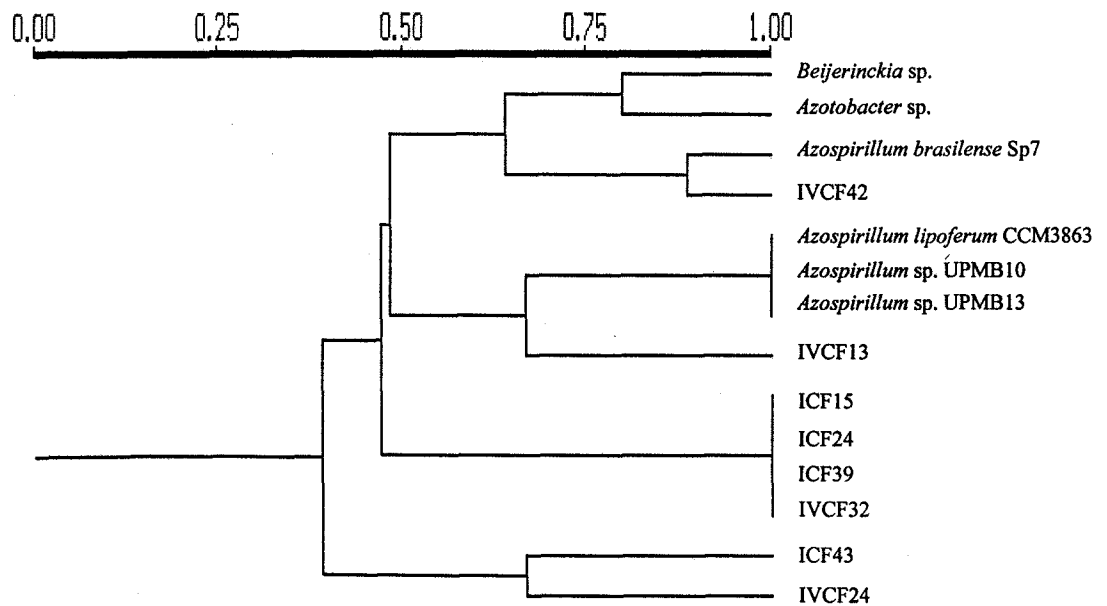
ตารางที่ ผ.3.7 (ต่อ)

Isolate	Media	Mophology					ARA (nmol/mg/ day)	Voges Proskauer test	Biochemical assay						PDA		
		Colony			Gram staining				C-sources								
		Form	Color	Size (cm)	Gram Staining	Size of Cell ( $\mu$ m)			Mon	Mal	Rhm	Bas	Glu	Arb			
INED23	G	circular	orange	0.2	⊖	0.76x0.96	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	orange
INED33	S	circular	clear	0.01	⊖	0.48x1.96	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	clear
VNED11	S	circular	clear	0.05	⊖	0.96x1.92	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	white
VNED22	S	circular	white	0.06	⊖	0.96x1.92	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
VNED37	M	circular	white	0.05	⊖	1.44x2.48	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
INEA17	M	circular	White	0.01	⊖	0.96x1.96	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
INEA27	M	circular	White	0.01	⊖	0.96x1.96	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
VNEA11	S	circular	White	0.04	⊖	0.86x0.96	⊖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	white
VNEA21	S	circular	White	0.06	⊖	0.96x1.92	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
INEB11	G	circular	White	0.1	⊖	0.96x1.92	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	white
INEB21	G	circular	Clear	0.3	⊖	0.48x0.96	⊖	-	-	-	-	-	-	-	+	+	white
VNEB14	M	circular	Yellow	0.08	⊖	0.48x0.96	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	+	yellow
VNEB21	S	circular	Yellow	0.15	⊖	0.96x1.92	⊖	+	-	-	-	-	-	-	+	+	yellow
INEC*16	M	circular	White	0.1	⊖	0.48x1.84	⊖	+	-	-	-	+	-	-	+	-	white
INEC*23	S	circular	clear	0.1	⊖	0.96x1.44	⊖	+	-	-	-	-	-	-	+	-	clear
VNEC*11	S	circular	white	0.08	⊖	0.96x2.95	⊖	+	-	-	-	-	-	-	+	+	white
VNEC*21	S	circular	clear	0.05	⊖	0.57x0.76	⊖	-	-	-	-	-	-	-	+	+	clear

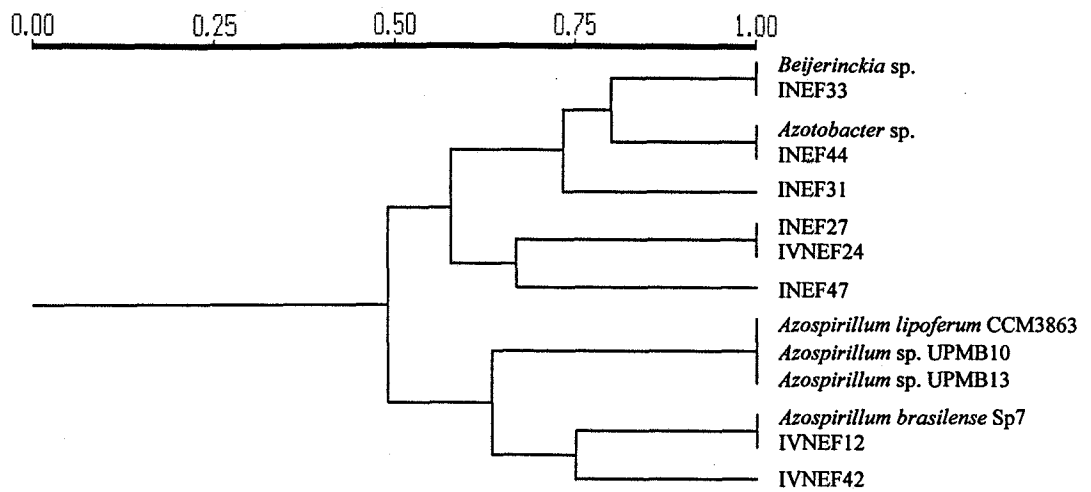




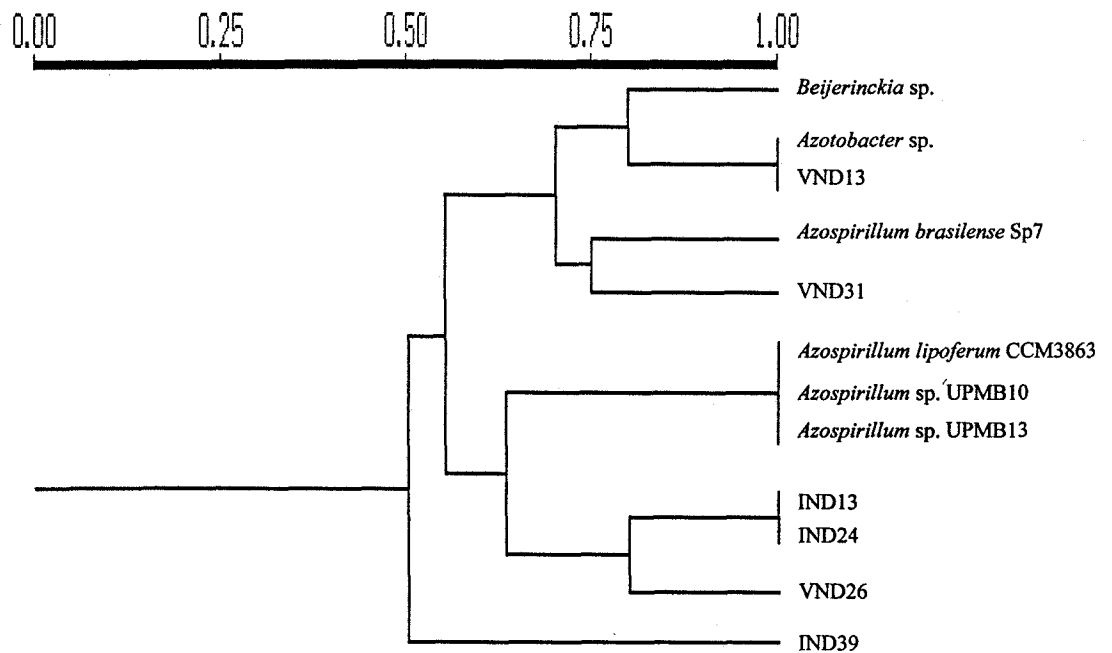
รูปที่ ๓.๓.๑๙ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from uncultivated area



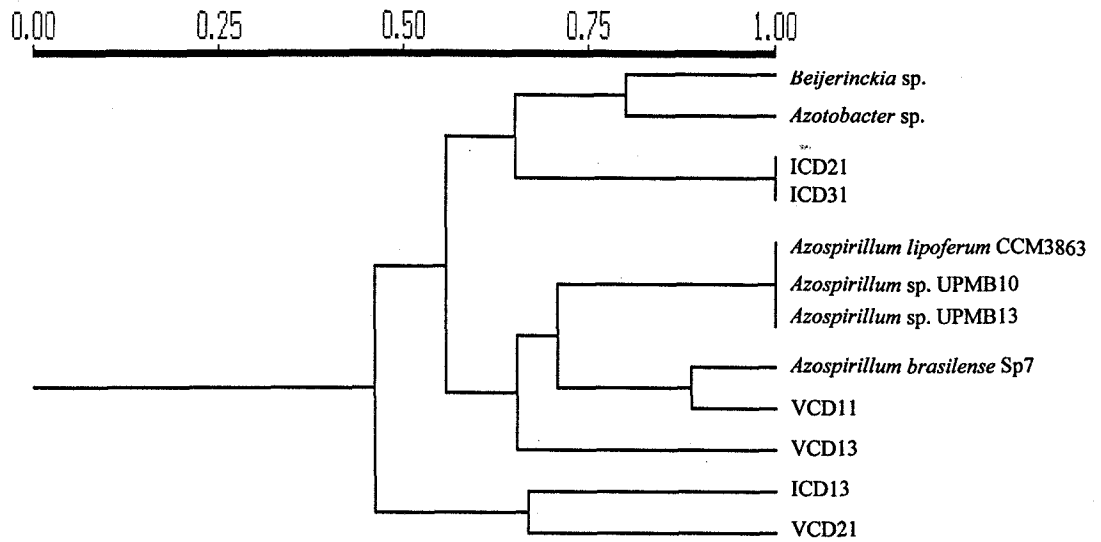
รูปที่ ๓.๓.๒๐ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from uncultivated area



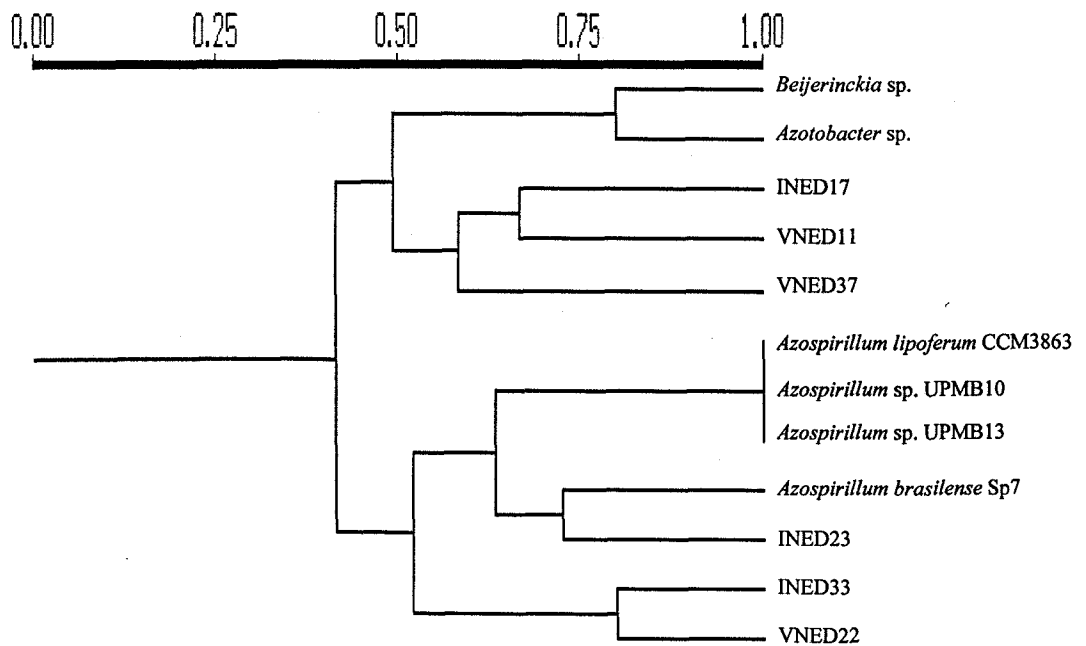
รูปที่ ๓.๒๑ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from uncultivated area



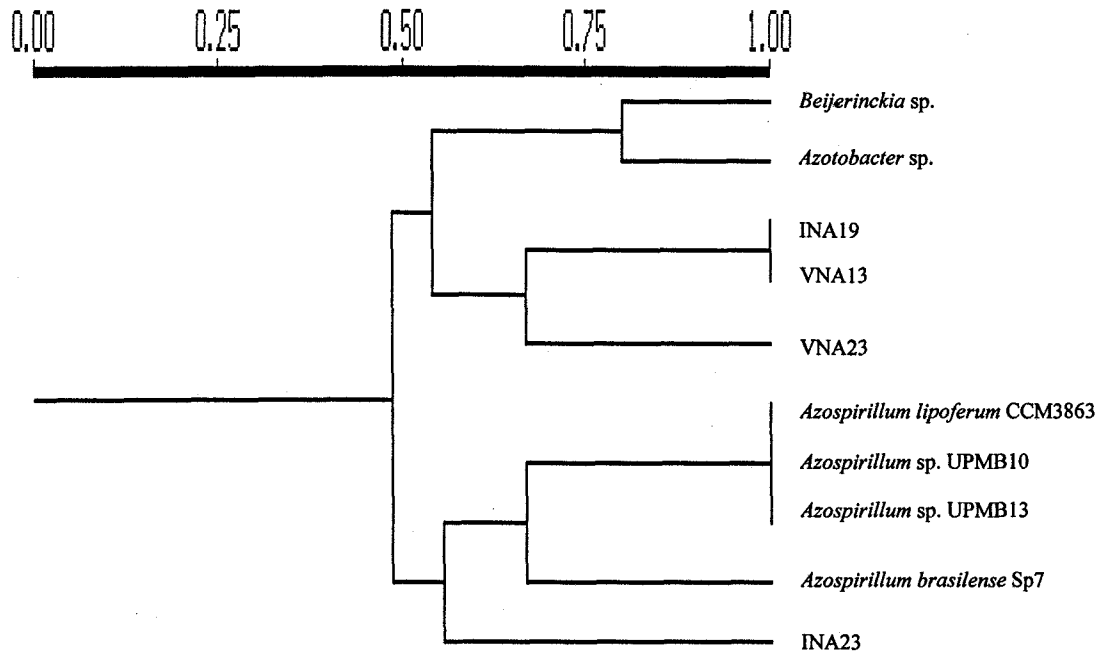
รูปที่ ๓.๒๒ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area



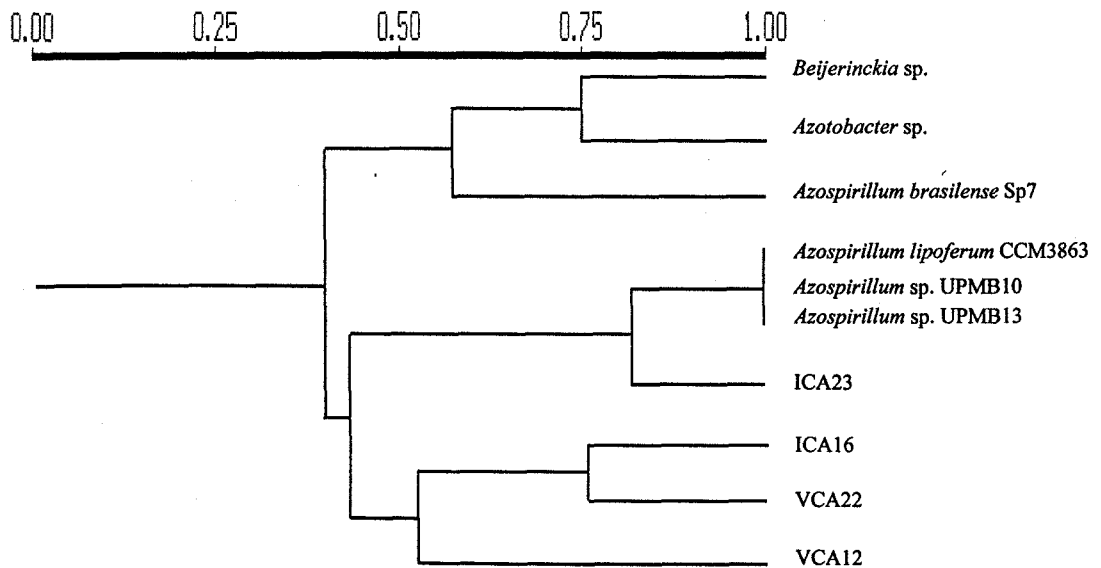
รูปที่ ๓.๒๓ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area



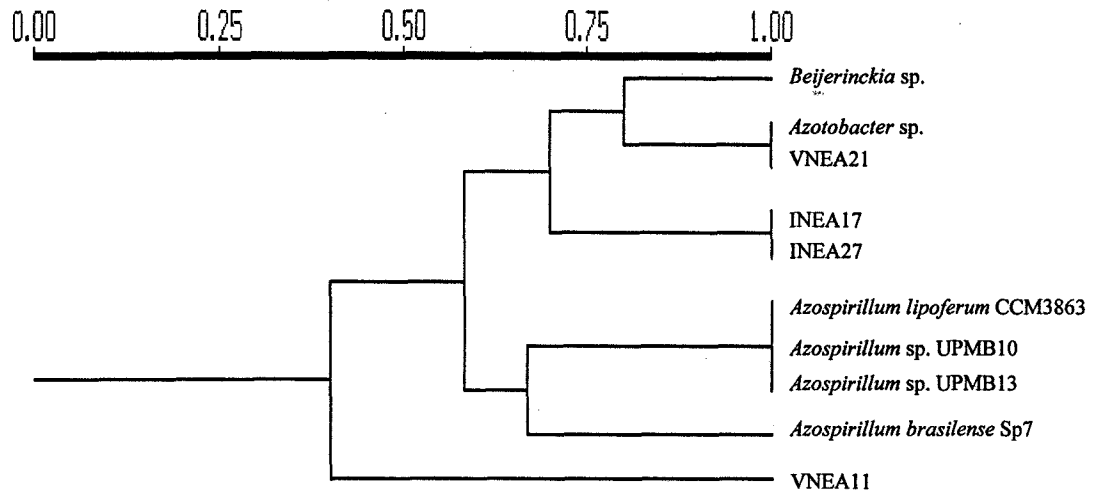
รูปที่ ๓.๒๔ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from intensive agriculture production using high rate of pesticides and fertilizers area



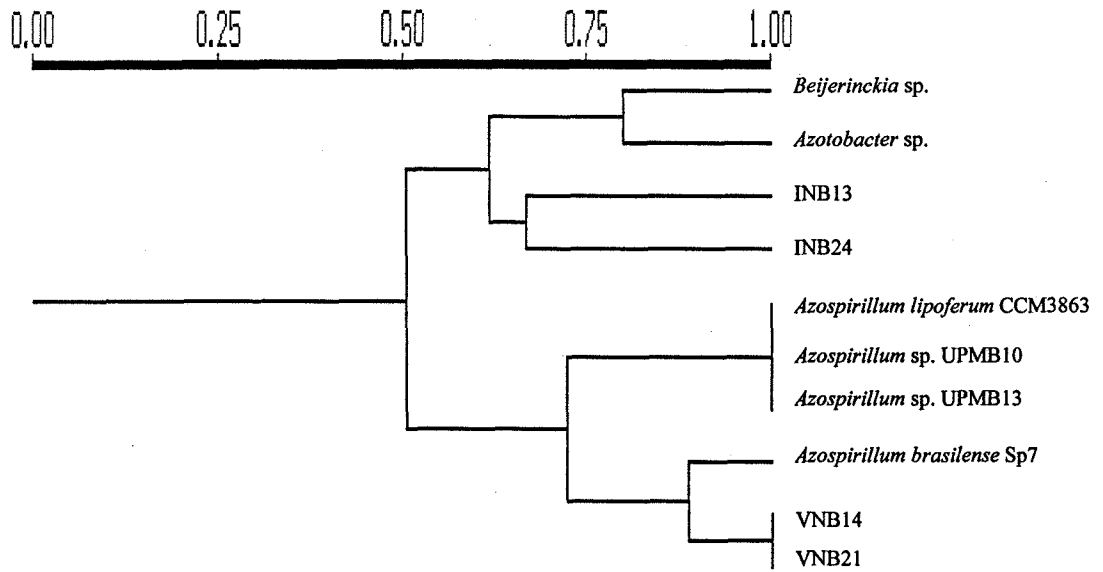
รูปที่ ๓.3.25 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from undisturb forest area



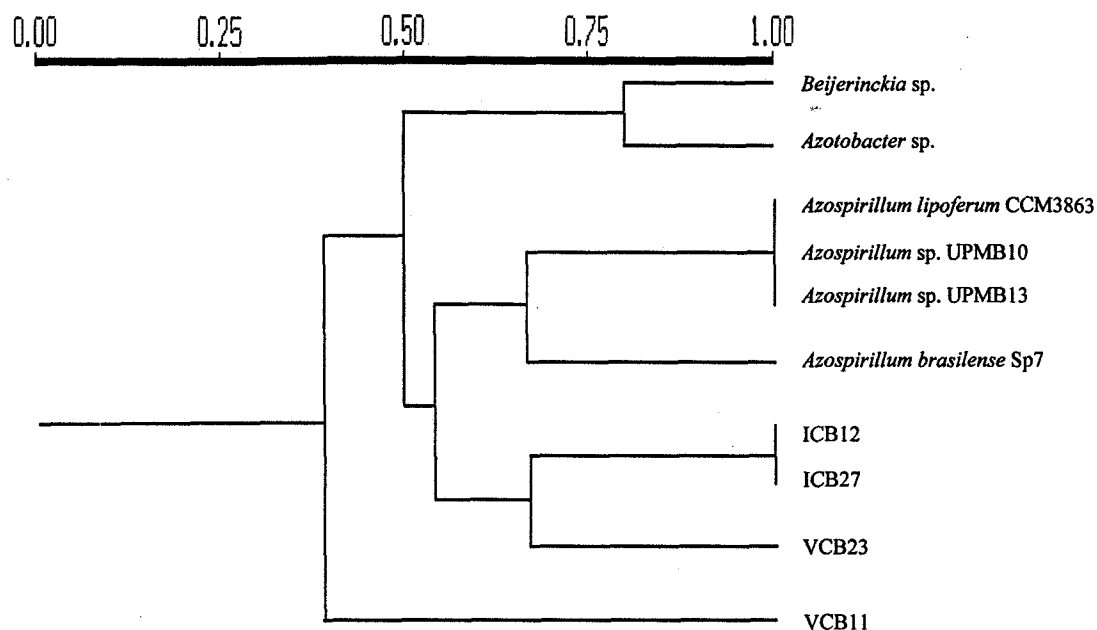
รูปที่ ๓.3.26 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from undisturb forest area



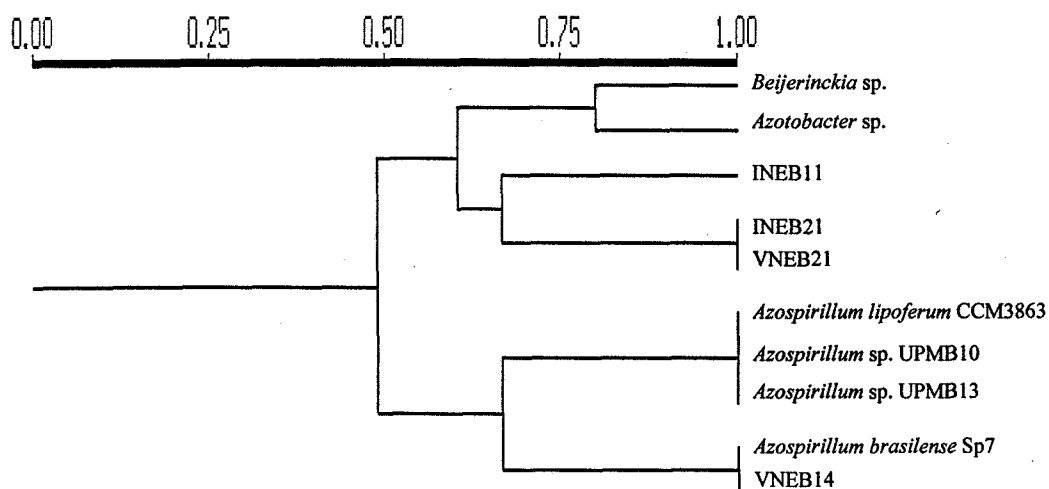
รูปที่ ๓.๓.๒๗ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from undisturb forest area



รูปที่ ๓.๓.๒๘ Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and hot season in the North region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area.

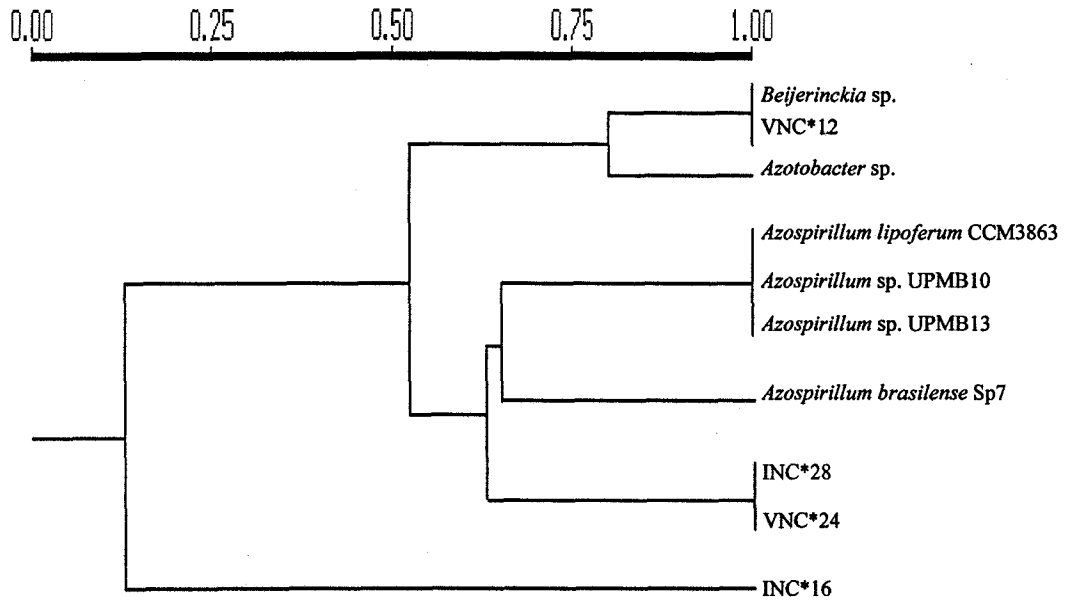


รูปที่ ๓.3.29 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and hot season in the Central region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area.

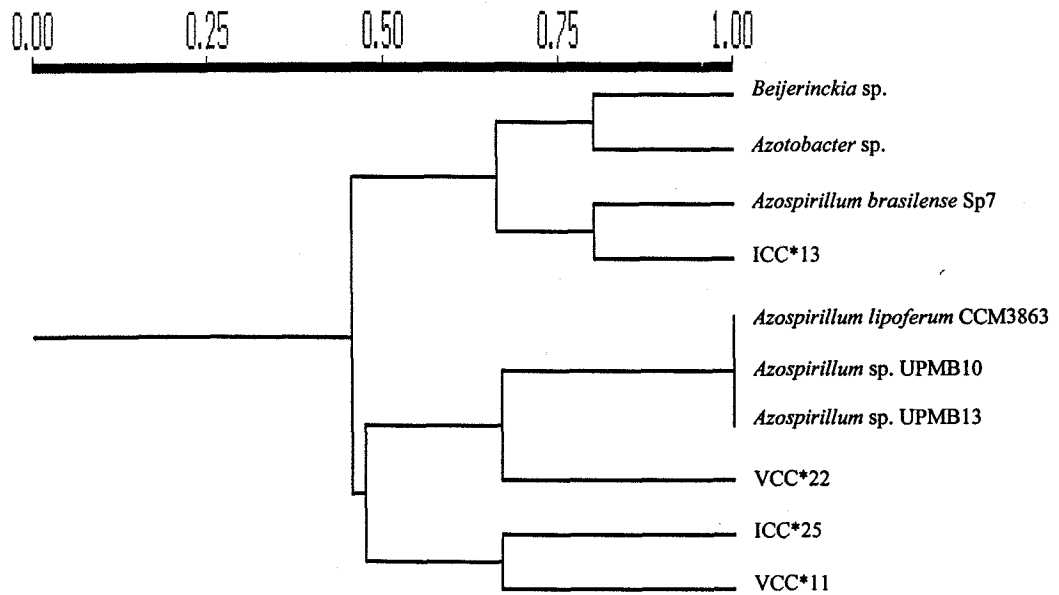


รูปที่ ๓.3.30 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from forest clearance for crop cultivation for 1-2 years area

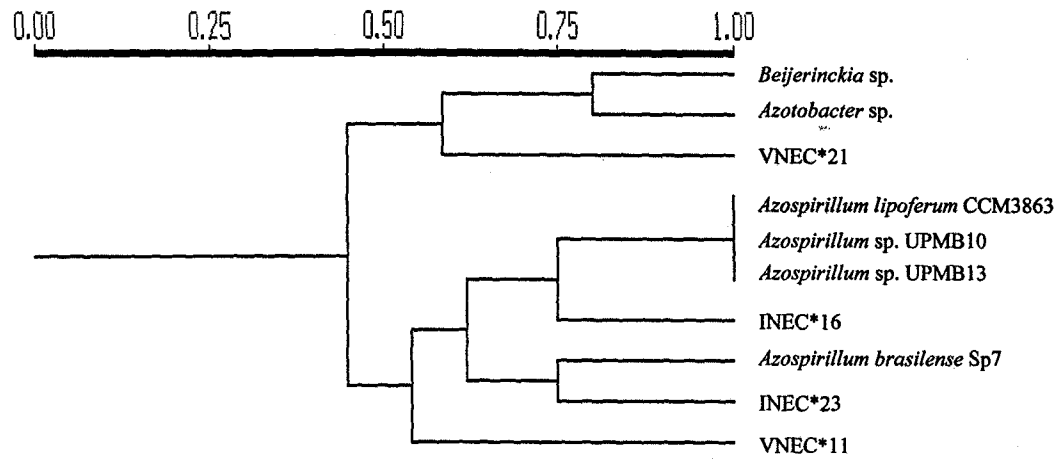




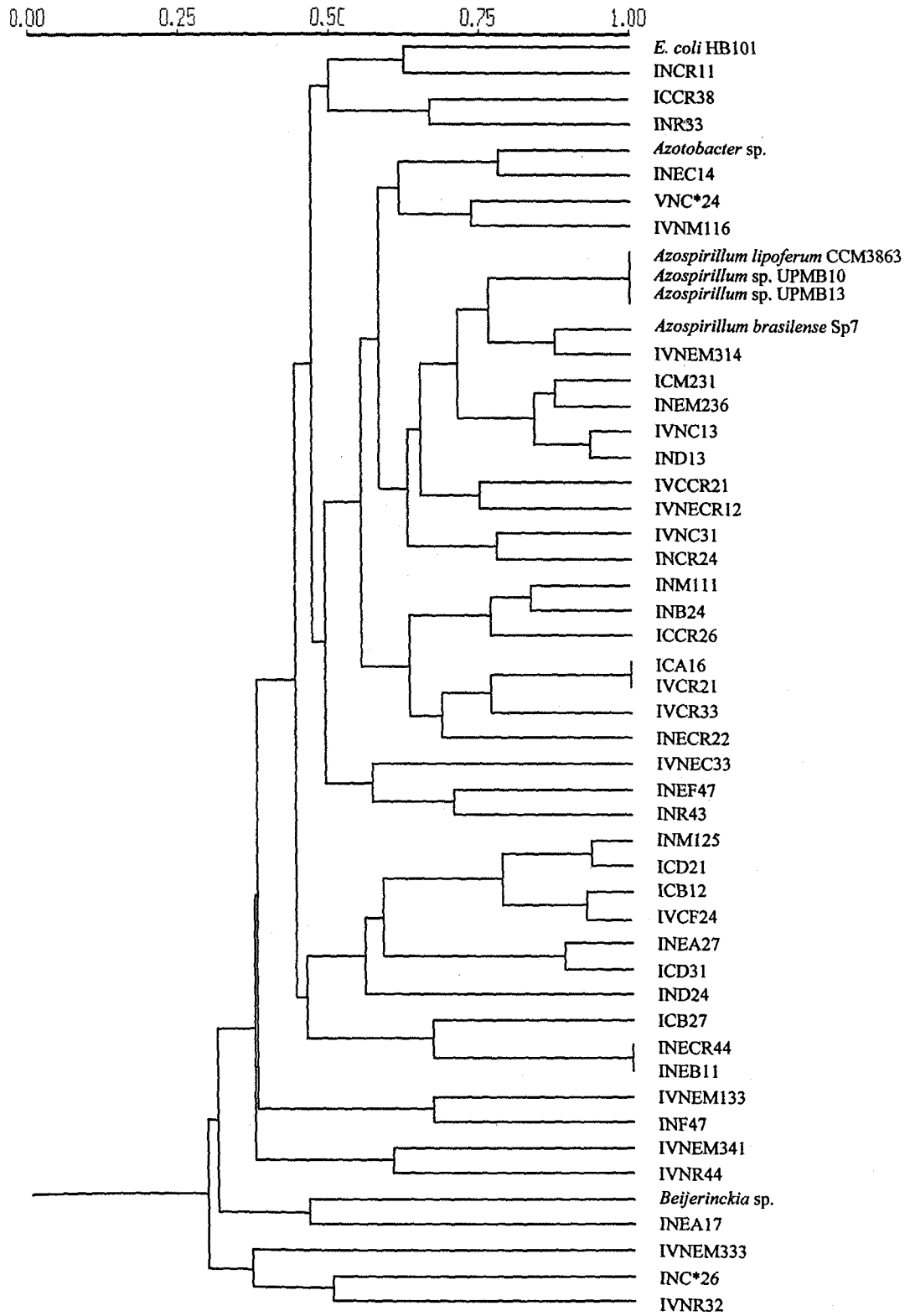
รูปที่ ๓.31 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area



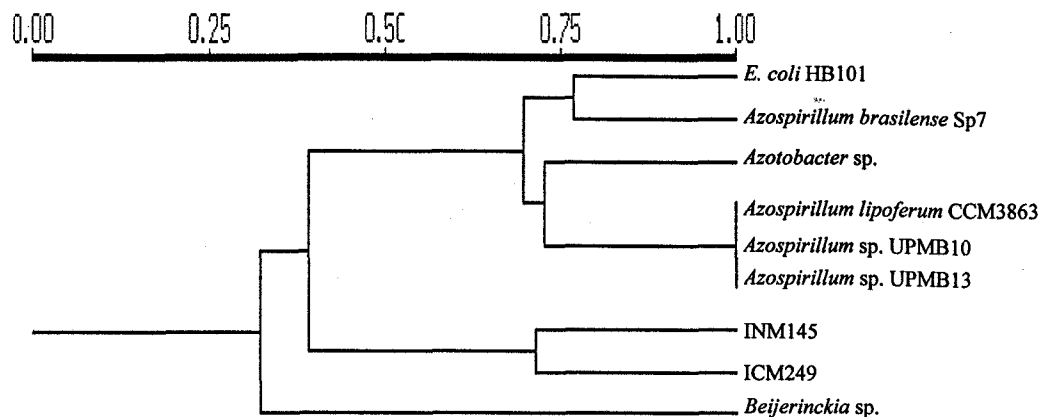
รูปที่ ๓.32 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the Central region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area



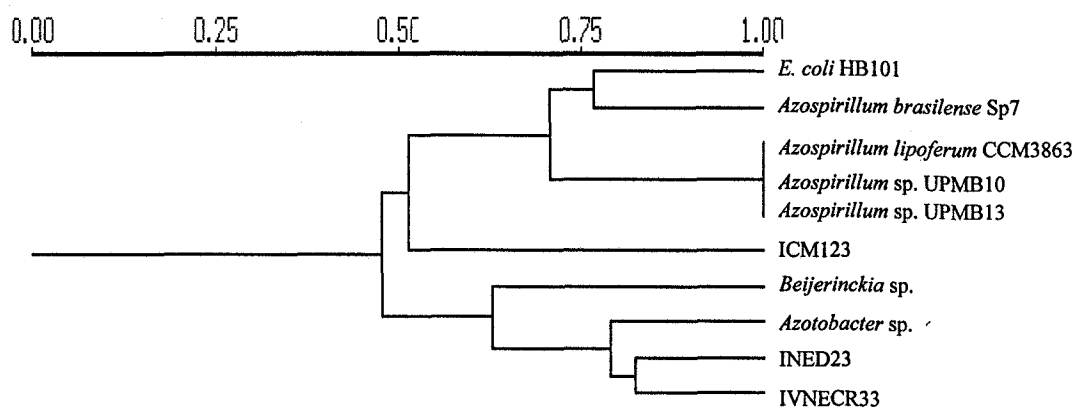
รูปที่ ๓.33 Dendrogram of free-living nitrogen fixing bacteria isolate compared between rainy season and dry season in the North Eastern region from forest clearance for crop cultivation for 3 years area



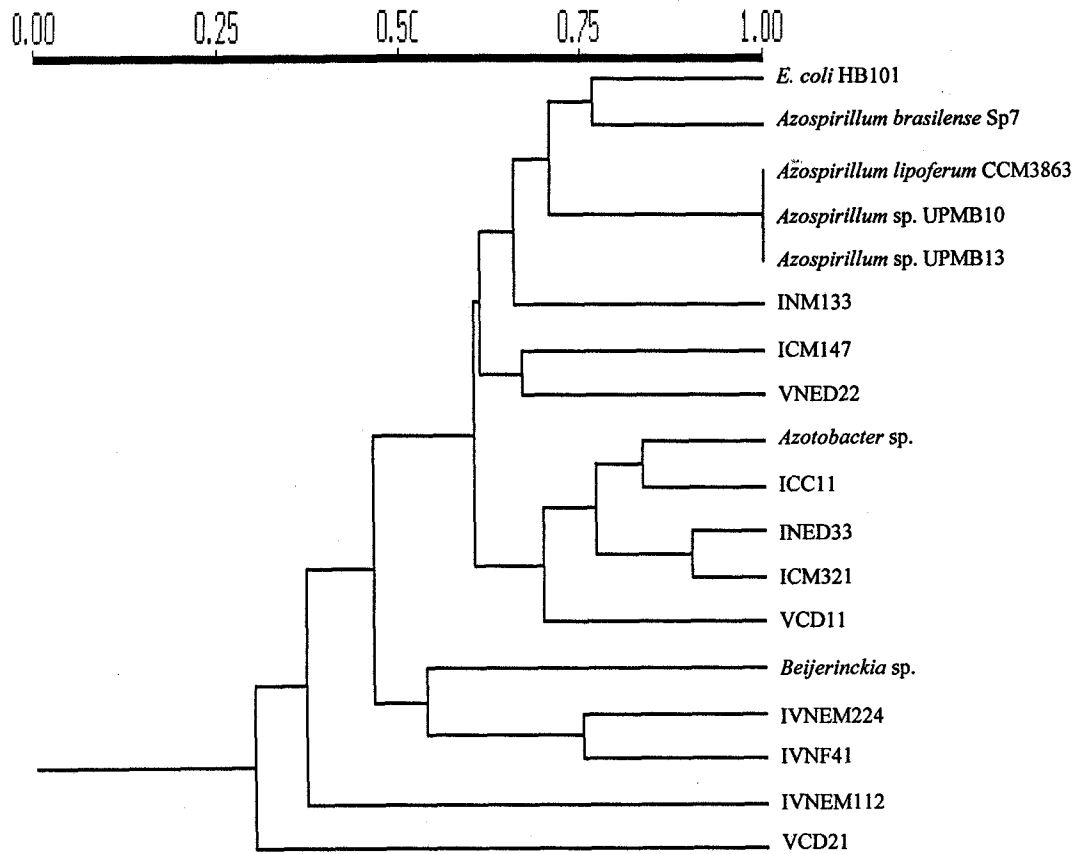
รูปที่ ๓.34. Dendrogram of group 1 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



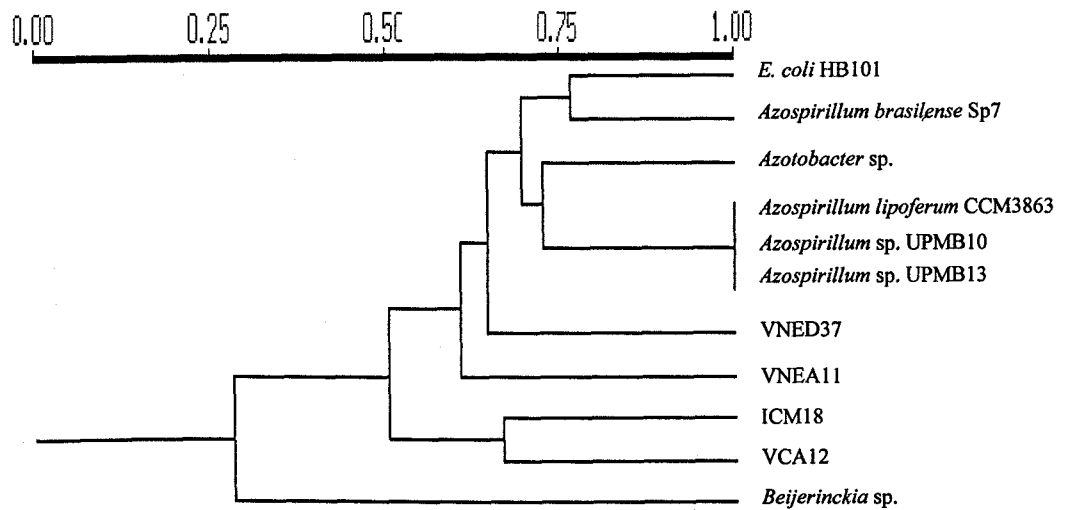
รูปที่ ๓.3.35 Dendrogram of group 2 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



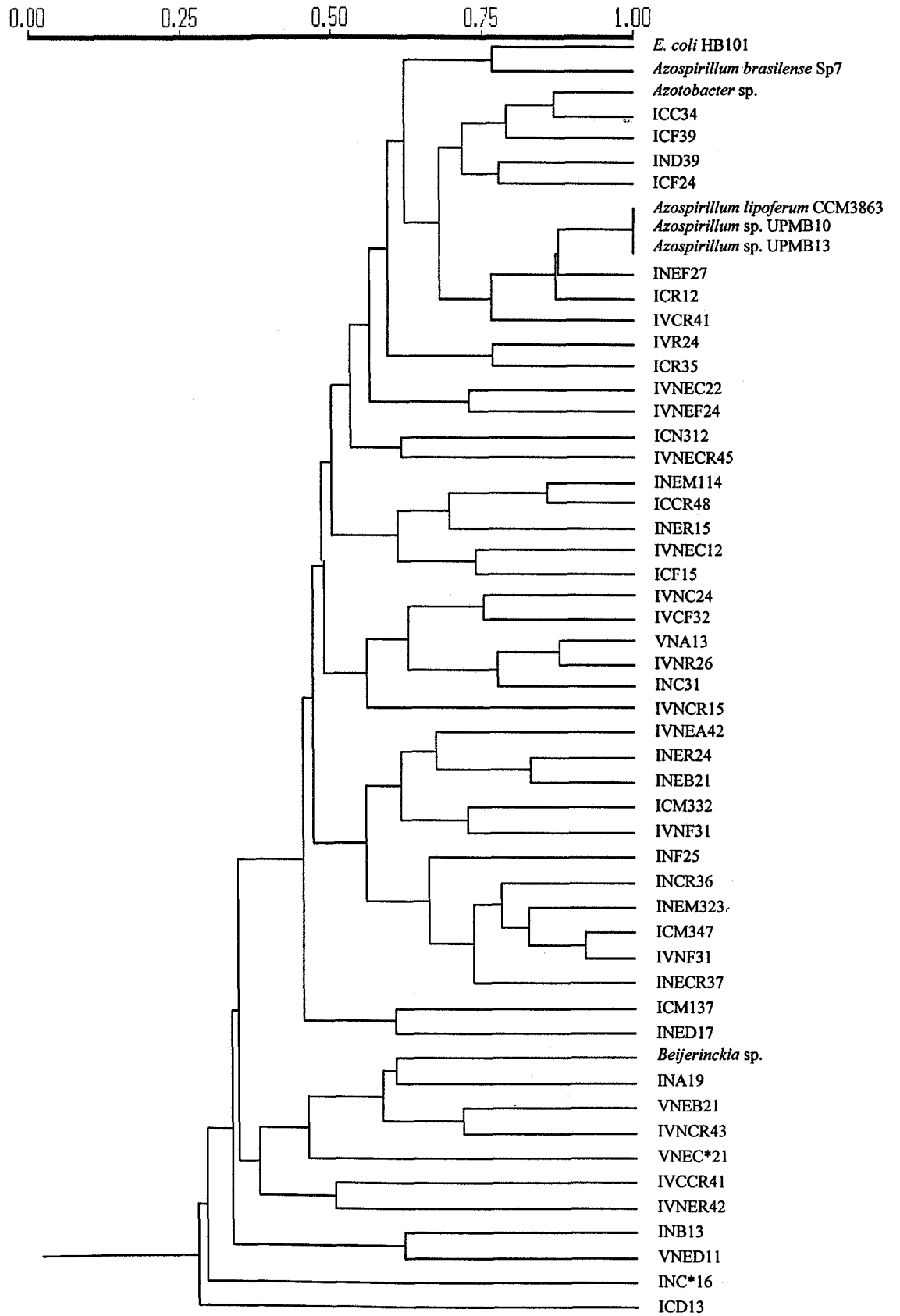
รูปที่ ๓.3.36 Dendrogram of group 3 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.37 Dendrogram of group 4 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

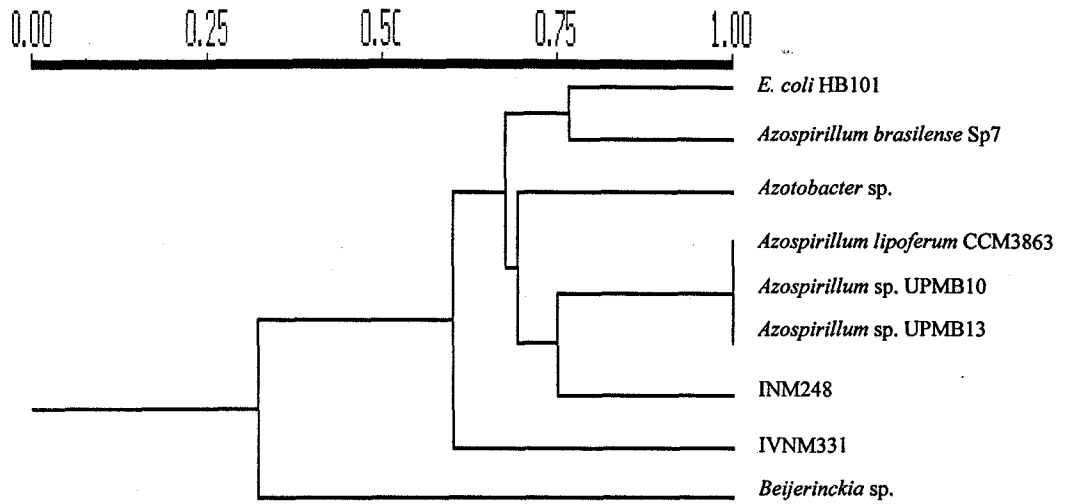


รูปที่ ๓.38 Dendrogram of group 5 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

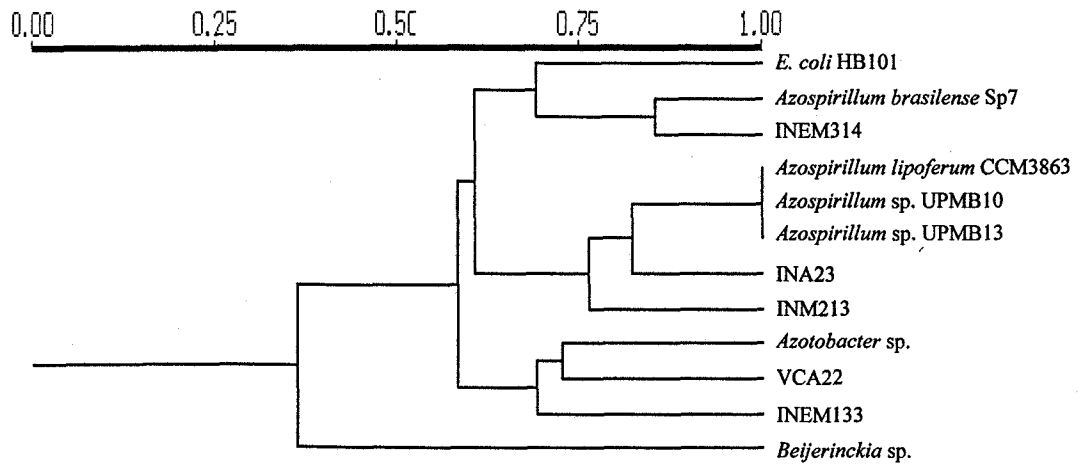


รูปที่ ผ.3.39 Dendrogram of group 6 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen

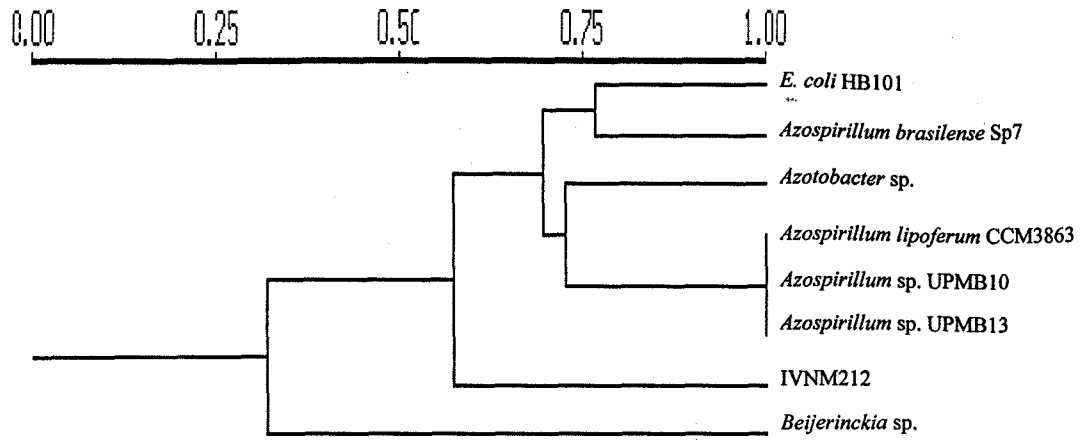
fixing bacterial isolates by using ERIC primer



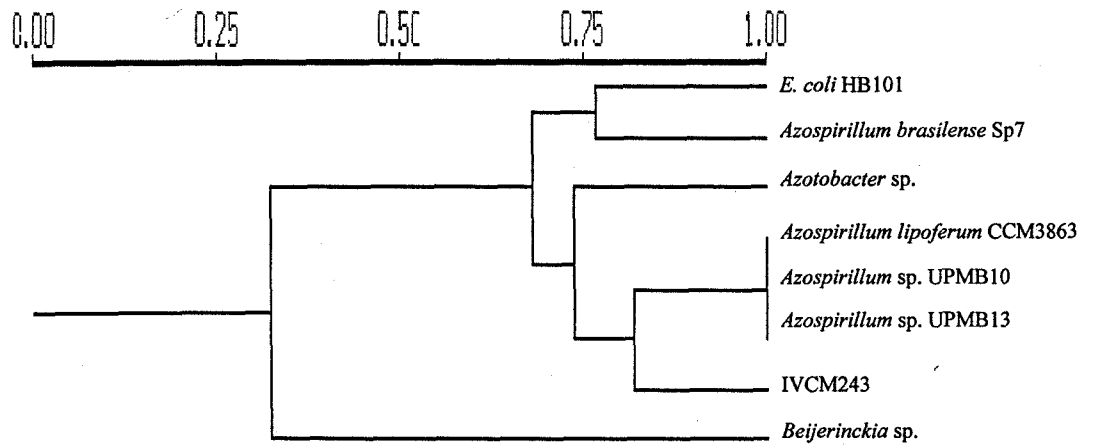
รูปที่ ๓.๓๐ Dendrogram of group 7 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.๓๑ Dendrogram of group 8 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

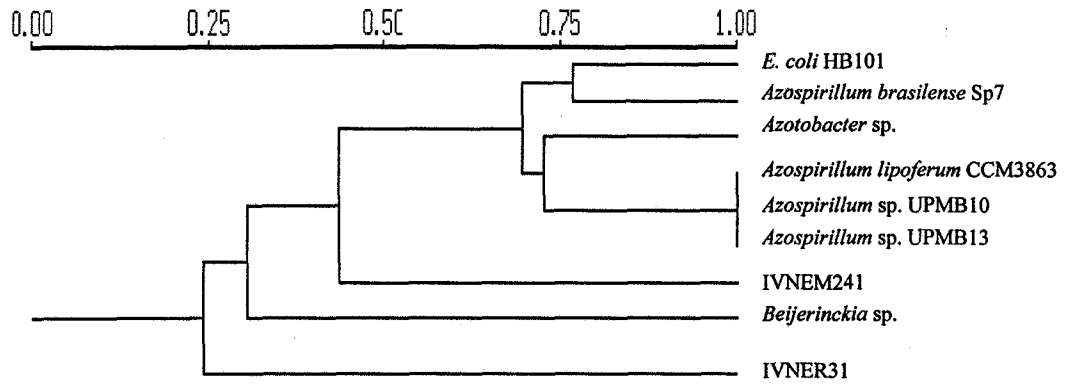


รูปที่ ผ.3.42 Dendrogram of group 9 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

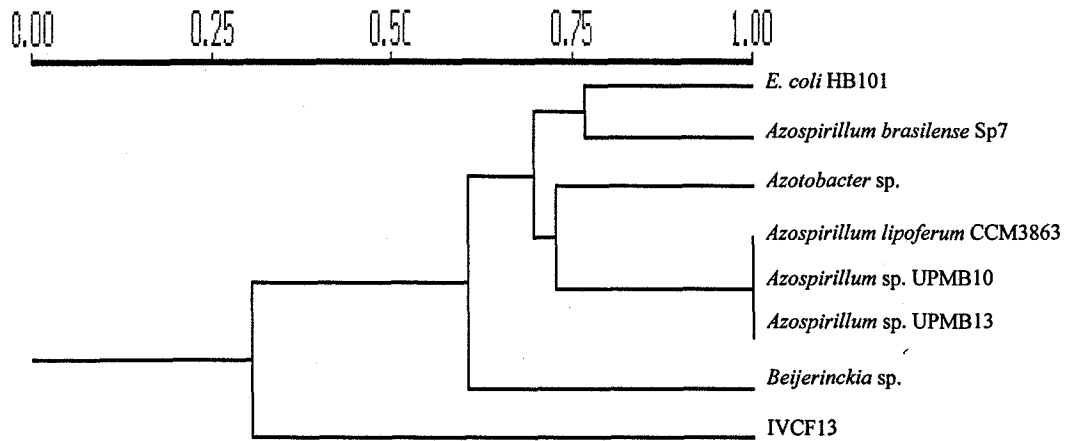


รูปที่ ผ.3.43 Dendrogram of group 10 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

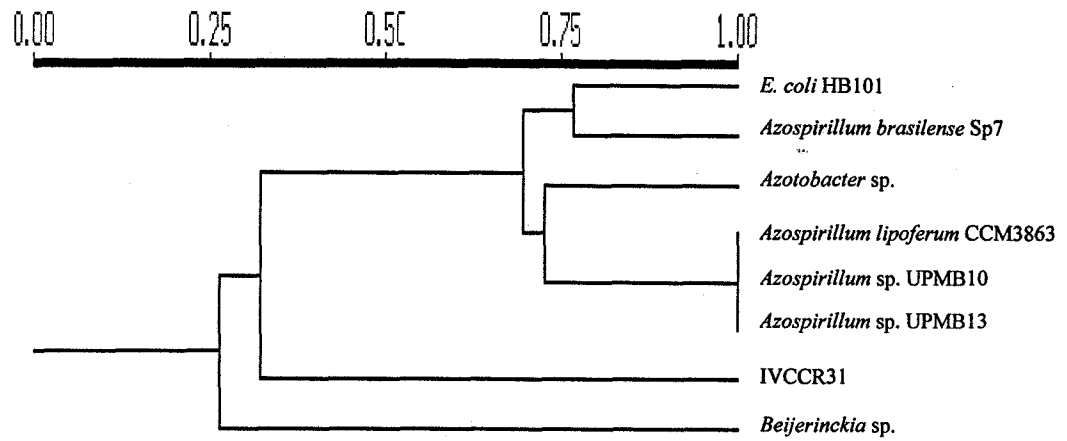




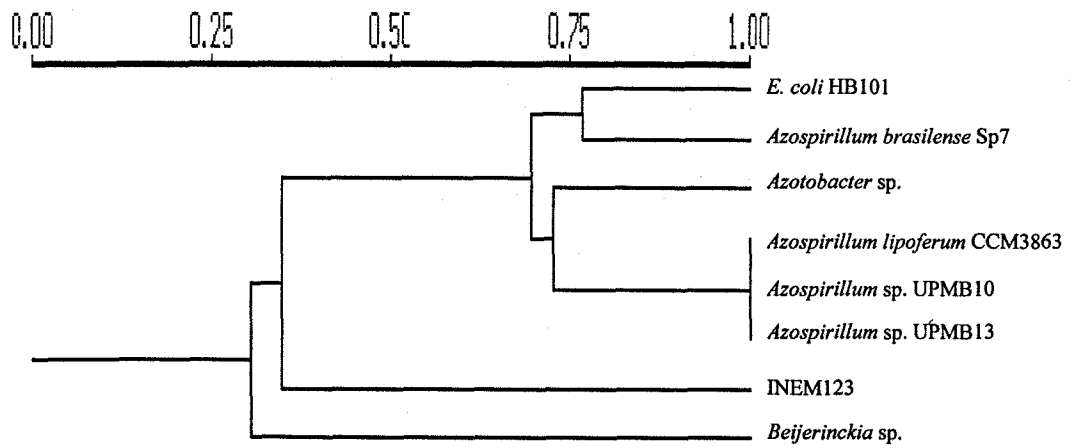
รูปที่ ๓.๓๔ Dendrogram of group 11 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



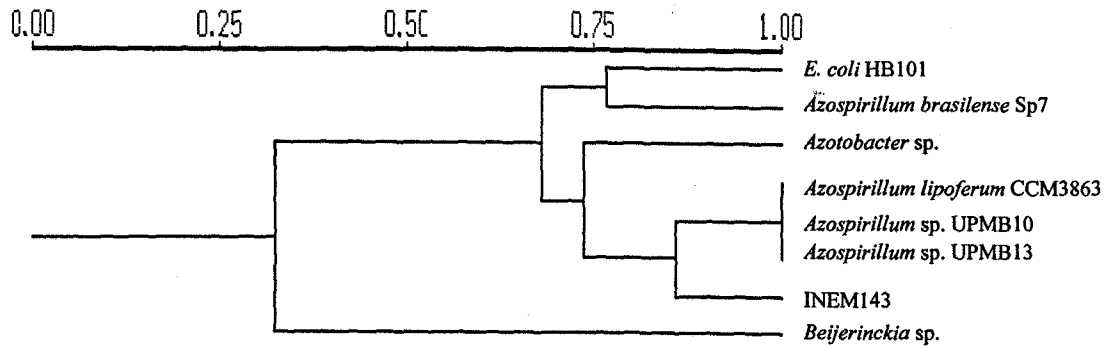
รูปที่ ๓.๓๕ Dendrogram of group 12 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



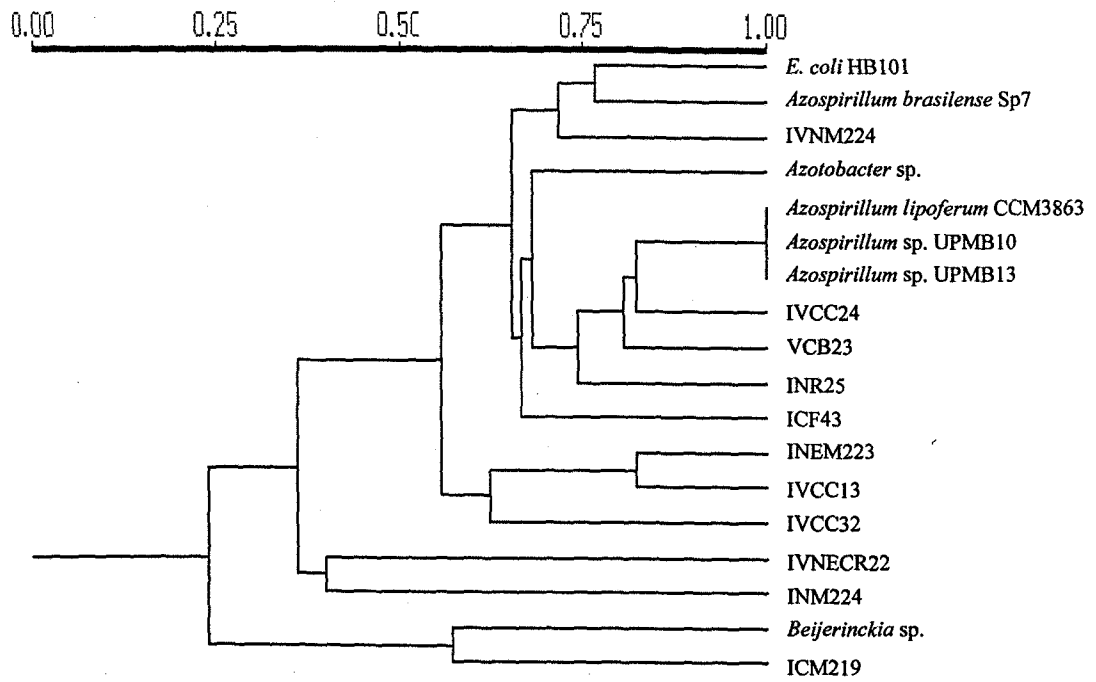
รูปที่ ๓.๔๖ Dendrogram of group 13 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



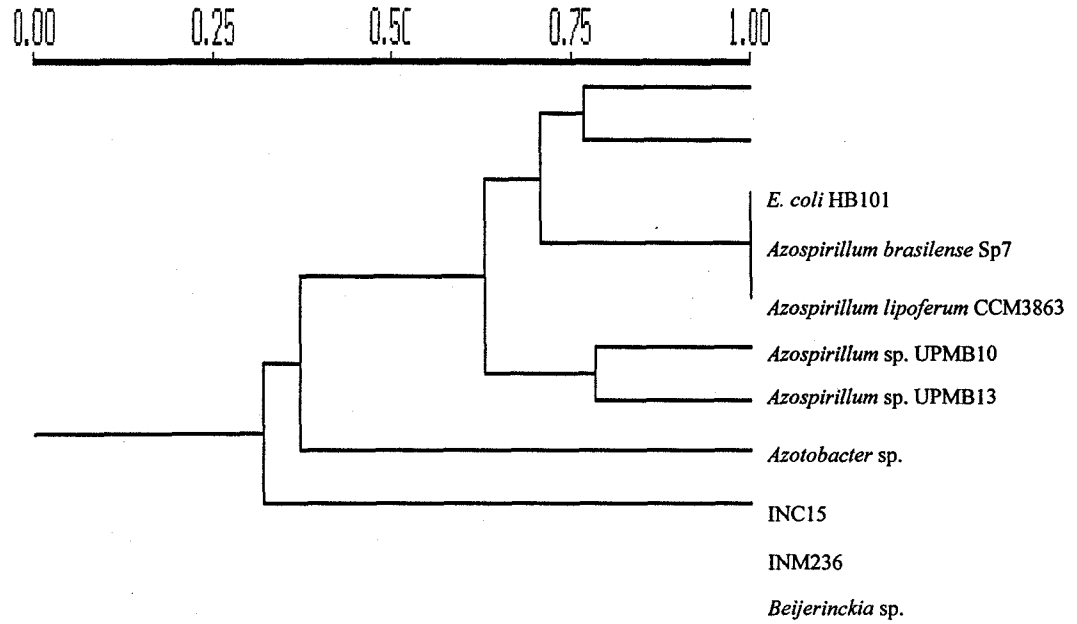
รูปที่ ๓.๔๗ Dendrogram of group 14 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



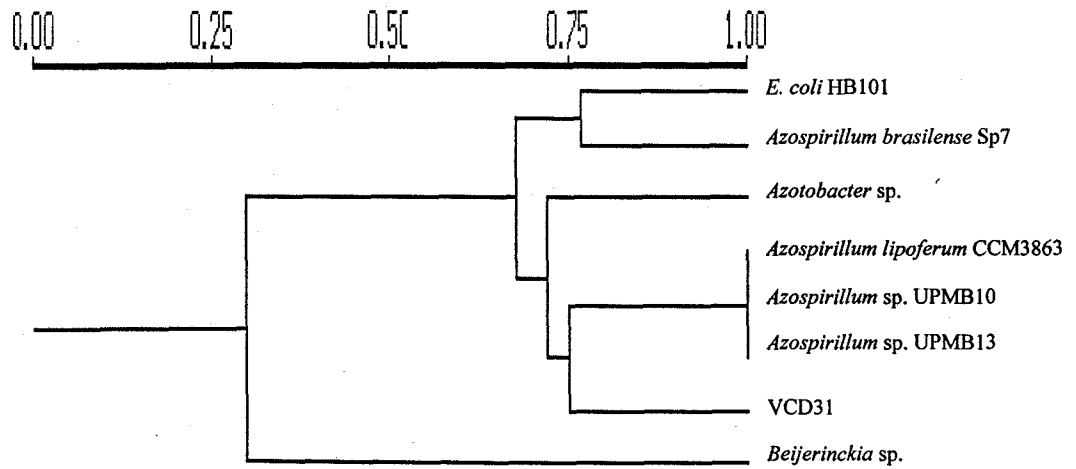
รูปที่ ๓.3.48 Dendrogram of group 15 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.3.49 Dendrogram of group 16 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

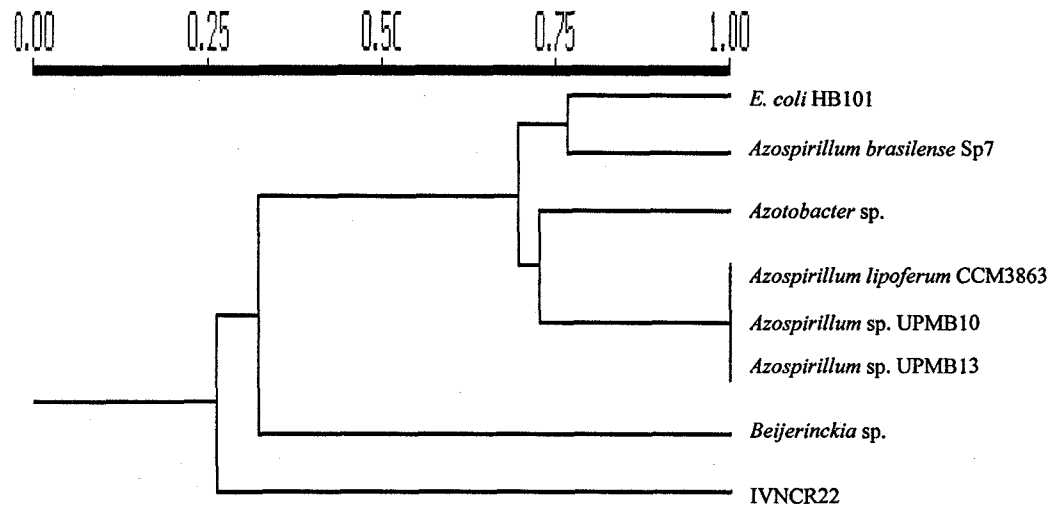


รูปที่ ๓.50 Dendrogram of group 17 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

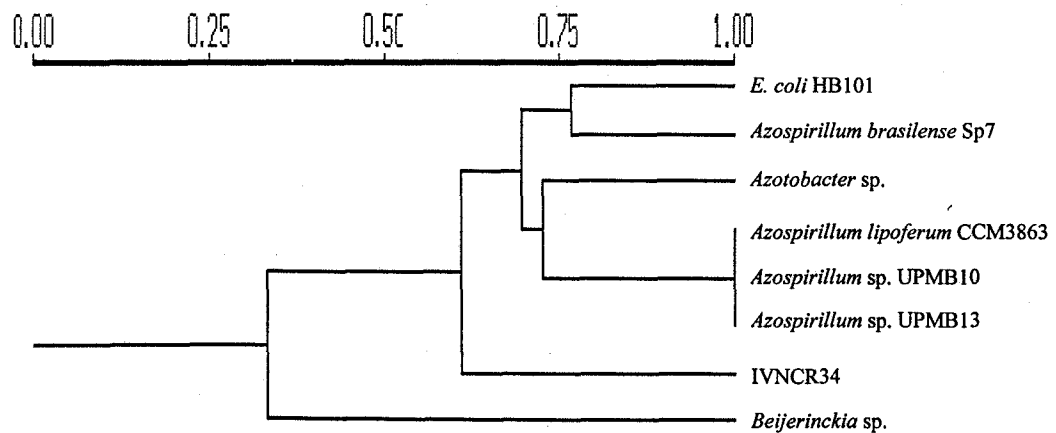


รูปที่ ๓.51 Dendrogram of group 18 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC prime

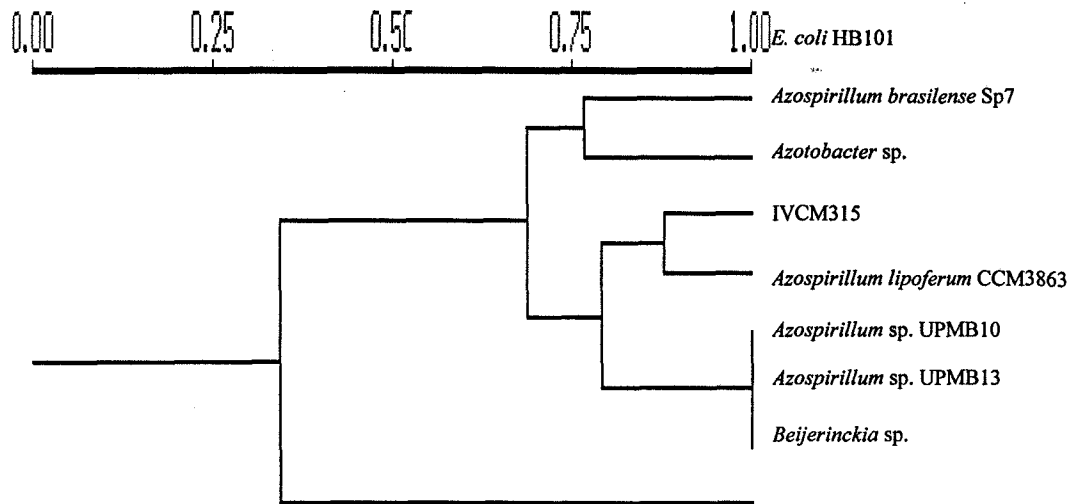
Dendrogram of group 19 was found that isolated strain as IVNCR22 was belong in an another different group (Fig. 53).



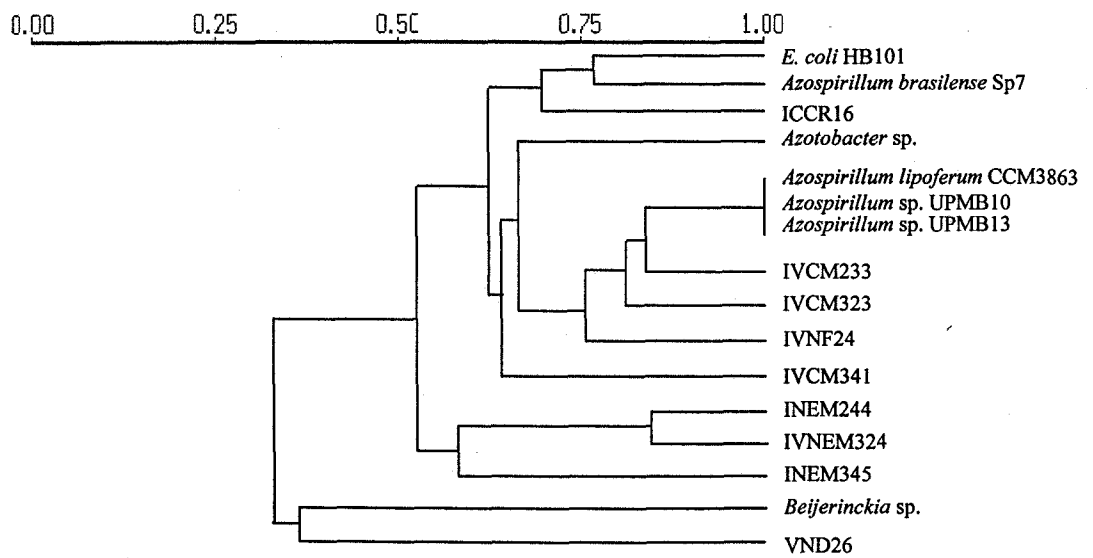
รูปที่ ผ.3. 52. Dendrogram of group 19 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



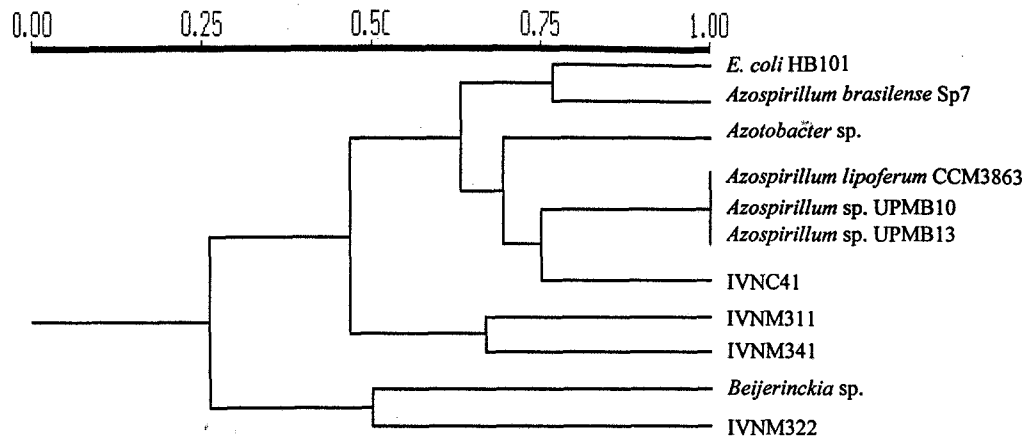
รูปที่ ผ.3. 53 Dendrogram of group 20 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



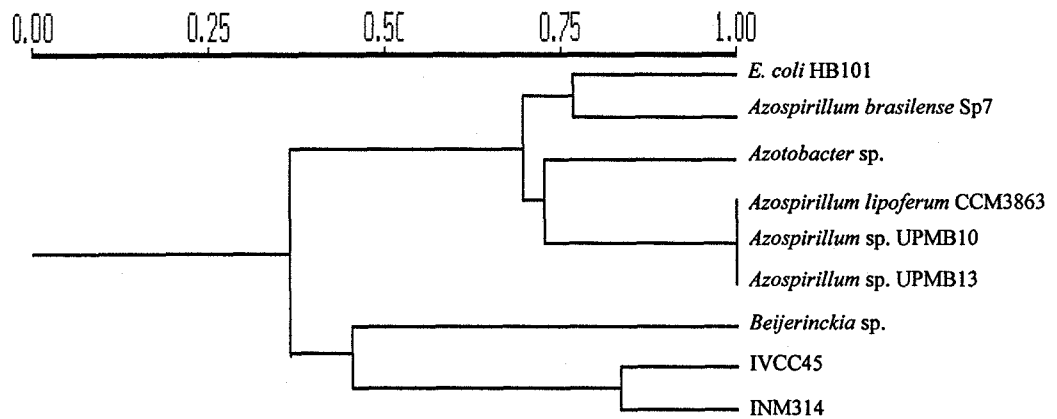
รูปที่ ผ.3.54. Dendrogram of group 20 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



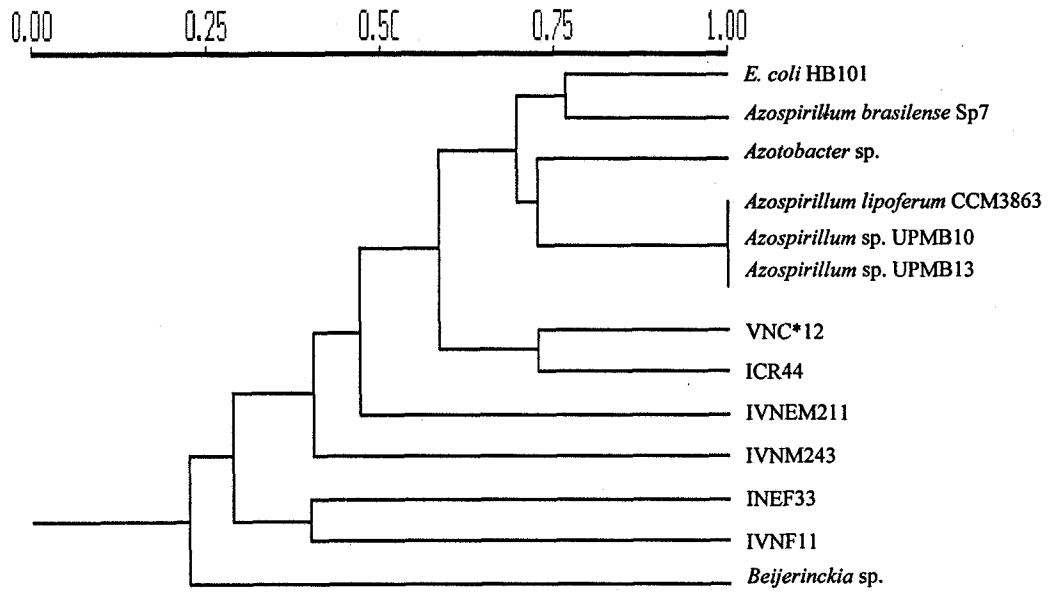
รูปที่ ผ.3.55 Dendrogram of group 22 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



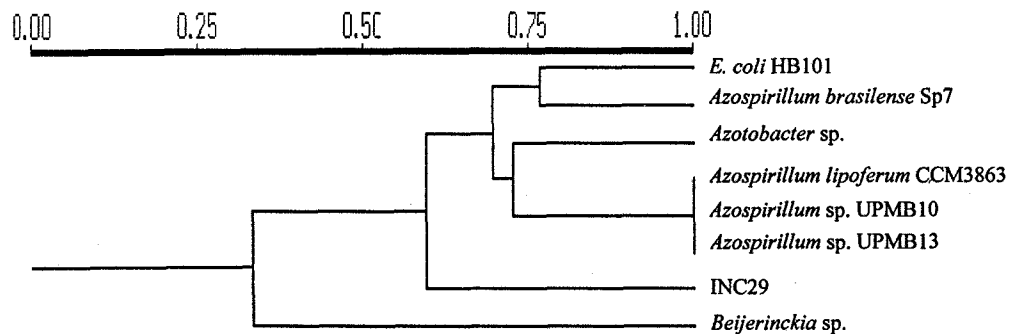
รูปที่ ๓.3. 56. Dendrogram of group 23 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.3. 57. Dendrogram of group 24 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

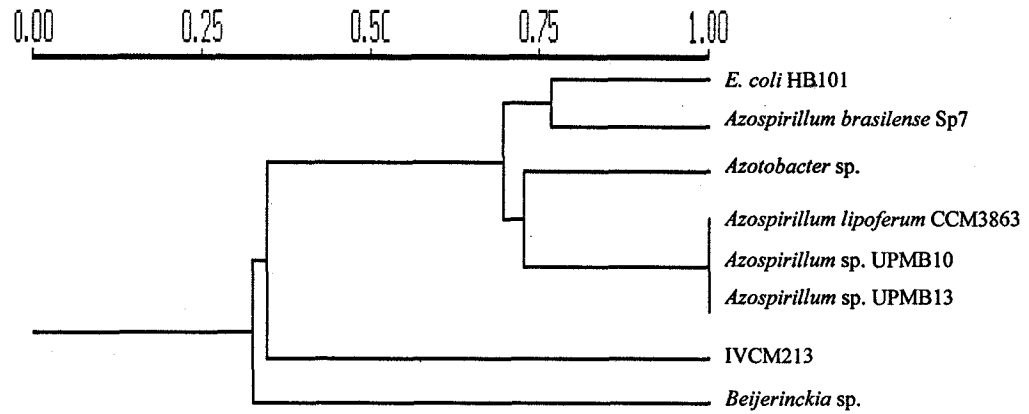


รูปที่ ๓.58. Dendrogram of group 25 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

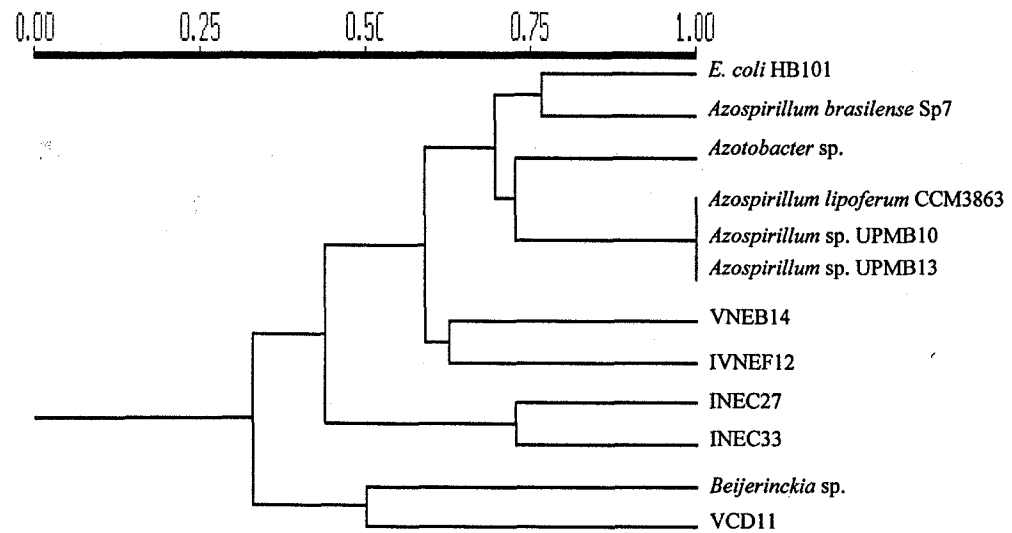


รูปที่ ๓.59 Dendrogram of group 26 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

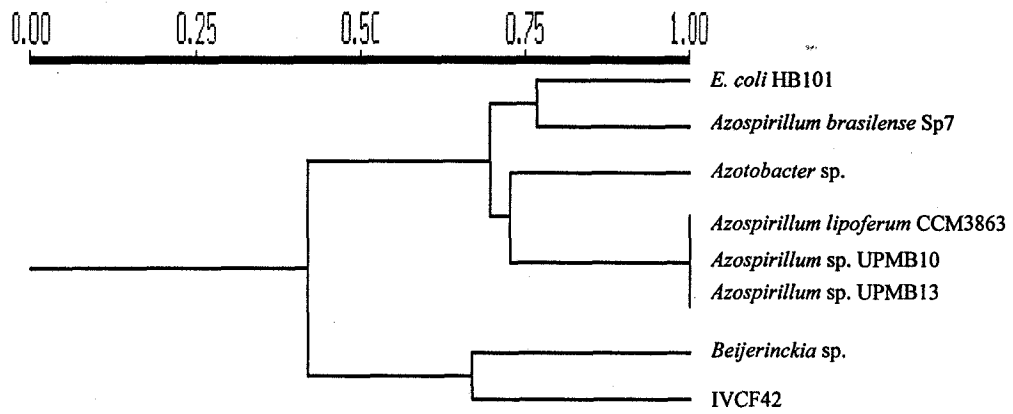




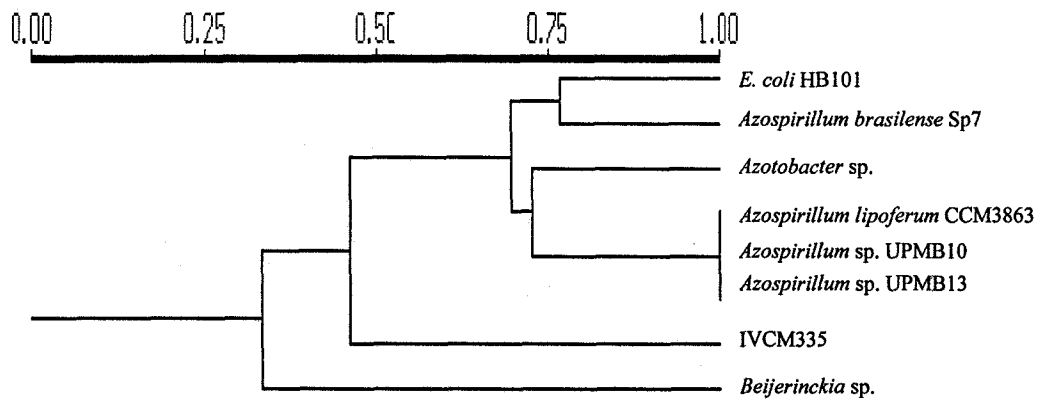
รูปที่ ๓.๖๐ Dendrogram of group 27 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



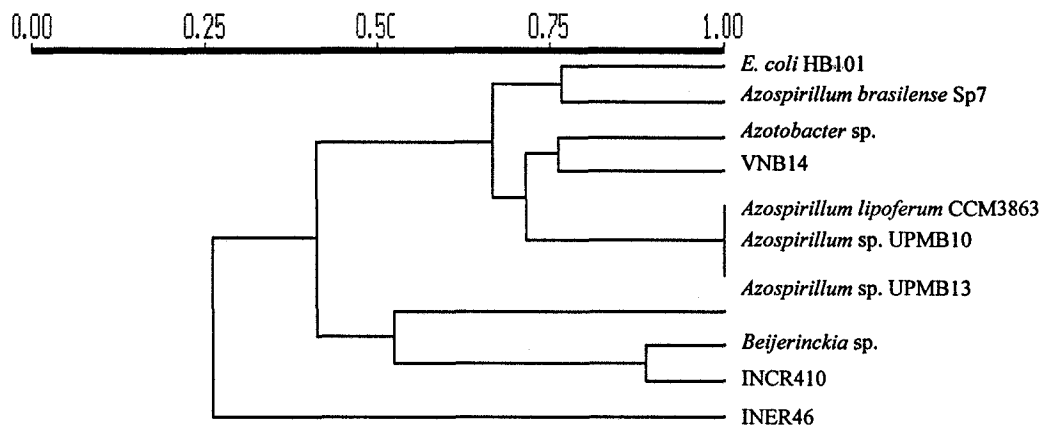
รูปที่ ๓.๖๑ Dendrogram of group 28 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



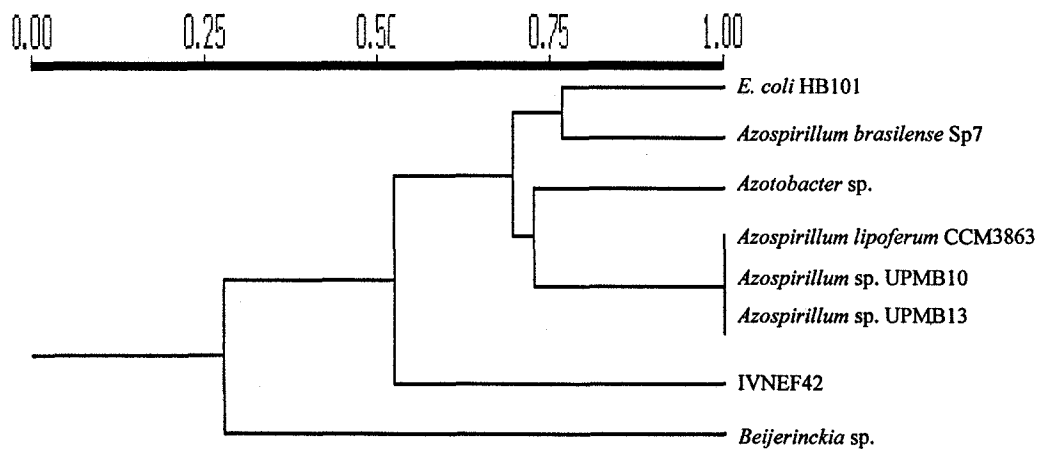
รูปที่ ๓.๖๒ Dendrogram of group 29 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



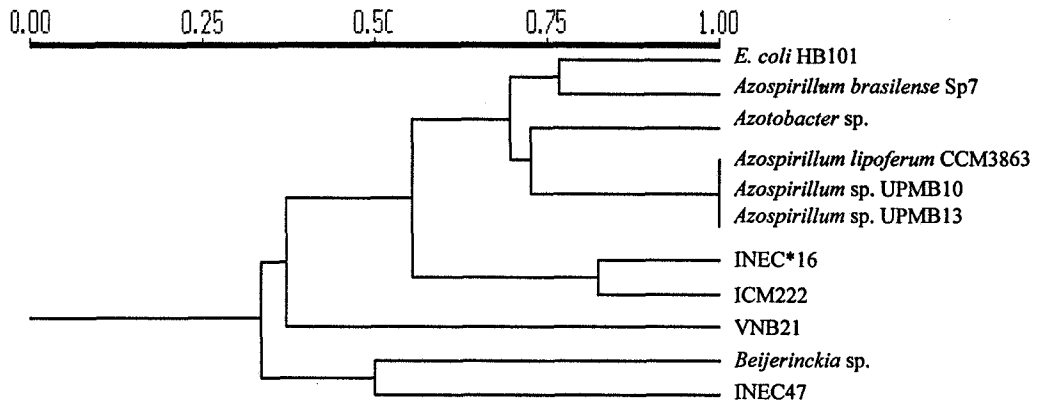
รูปที่ ๓.๖๓ Dendrogram of group 30 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



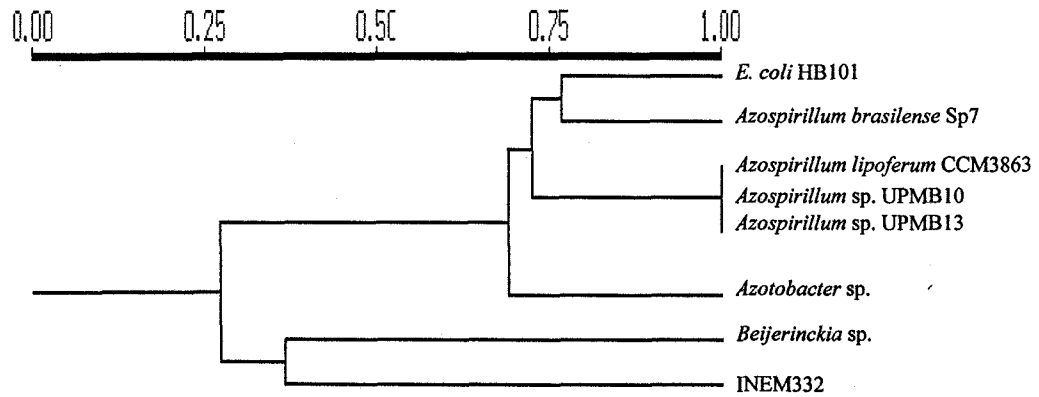
รูปที่ ๓.๓.๖๔ Dendrogram of group 31 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.๓.๖๕ Dendrogram of group 32 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

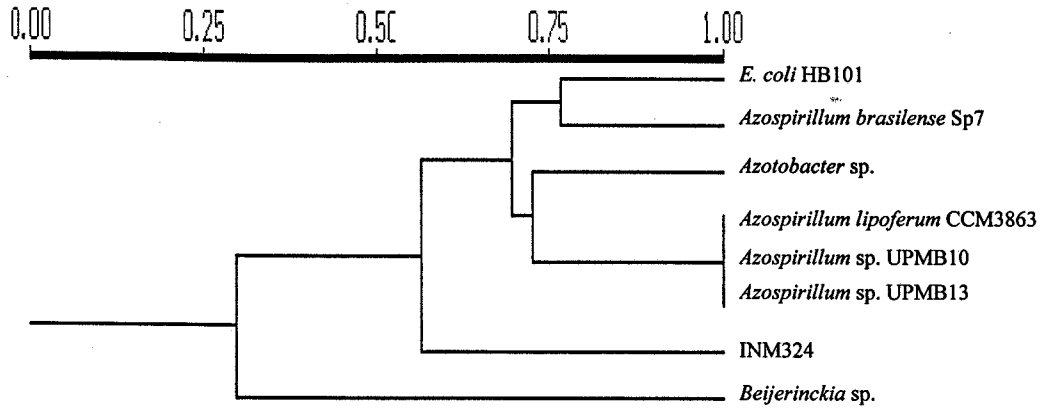


รูปที่ ๓.๖๖ Dendrogram of group 33 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

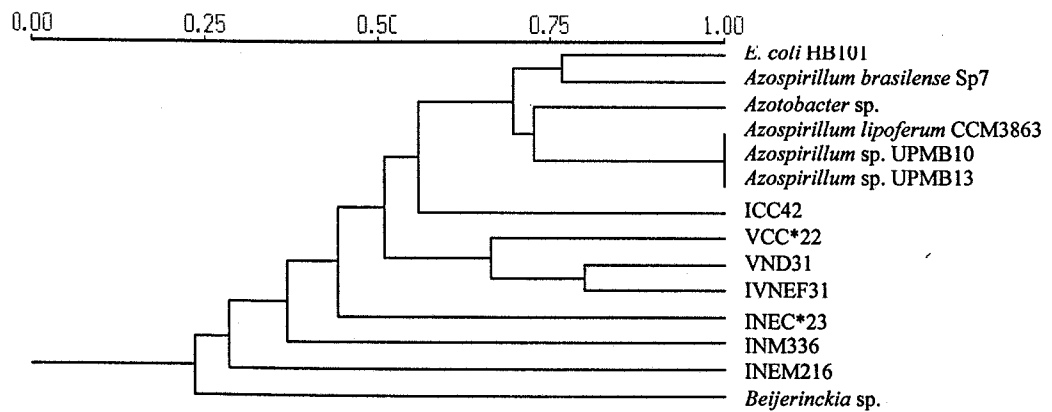


รูปที่ ๓.๖๗ Dendrogram of group 34 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

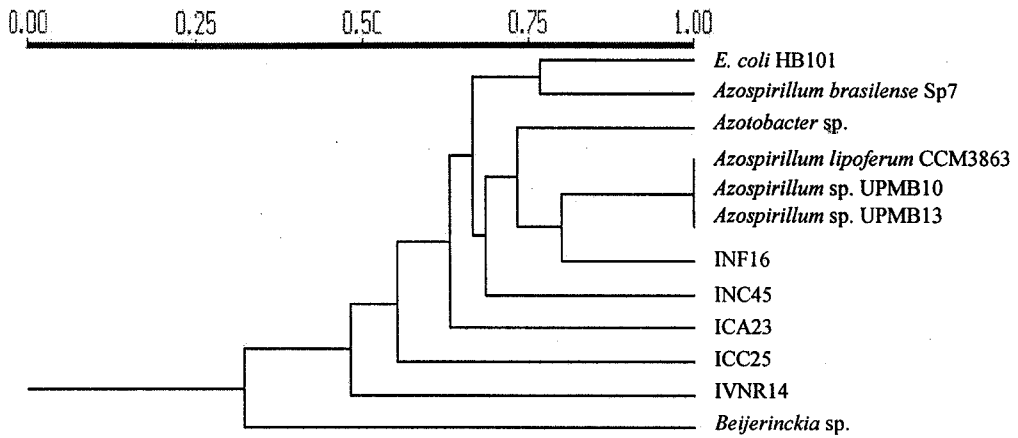




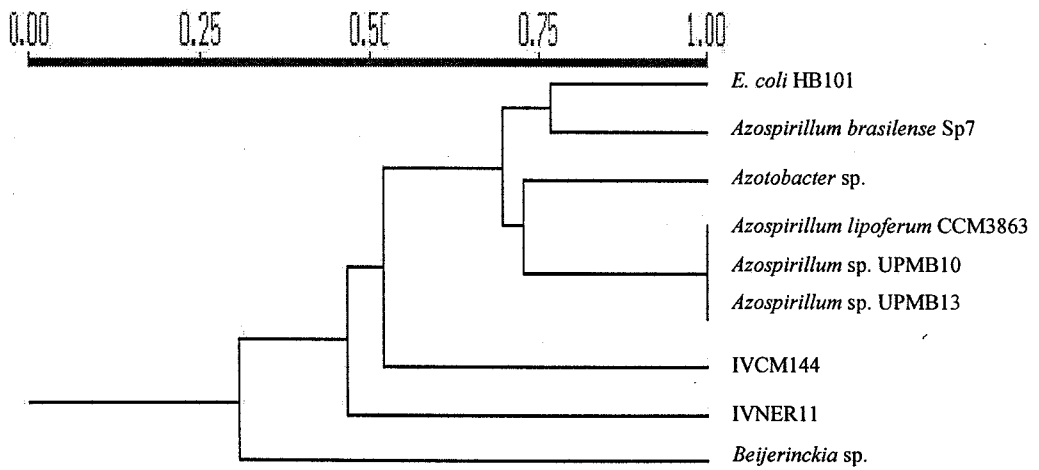
รูปที่ ๓.๓.๗๐ Dendrogram of group 37 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



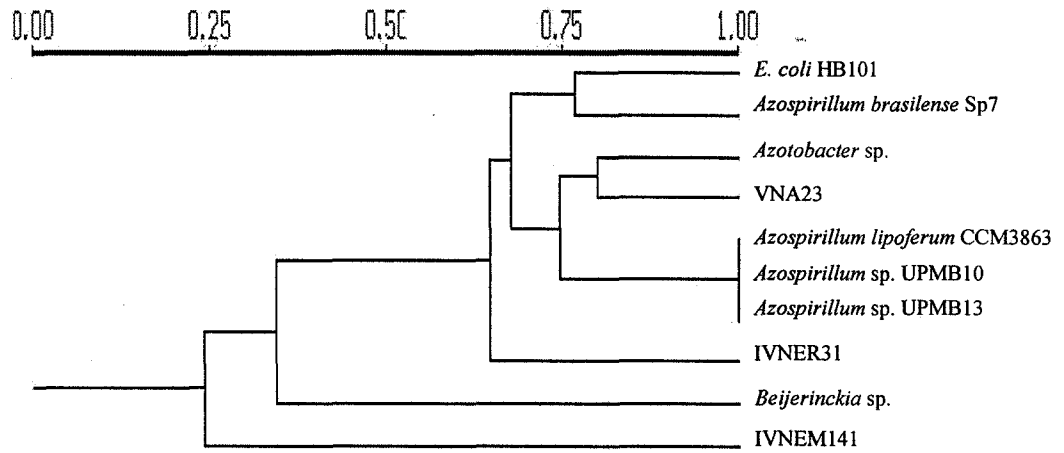
รูปที่ ๓.๓.๗๑ Dendrogram of group 38 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



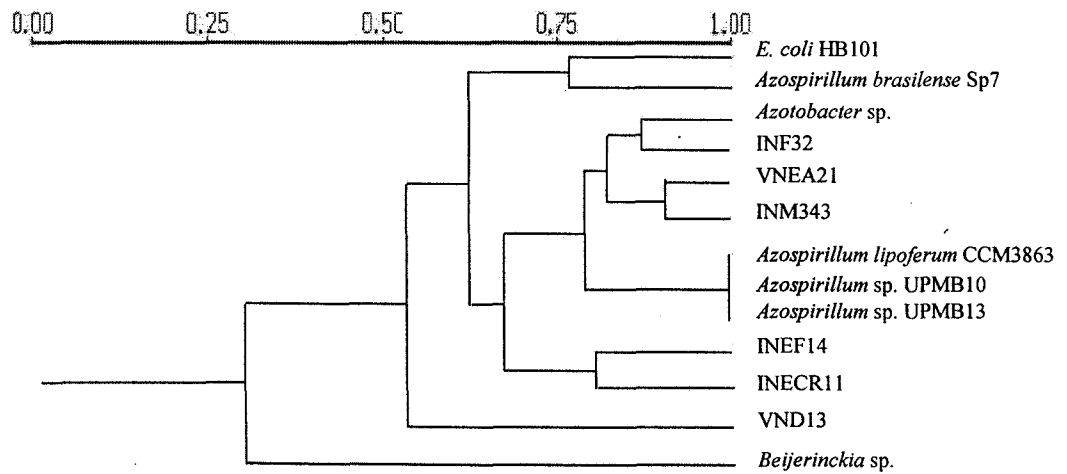
รูปที่ ๓.๓.๗๒ Dendrogram of group 39 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ๓.๓.๗๓ Dendrogram of group 40 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

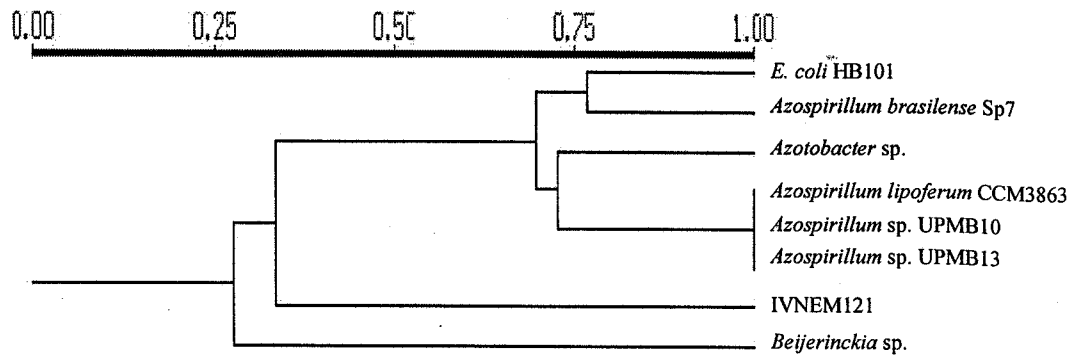


รูปที่ ผ.3.74 Dendrogram of group 41 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

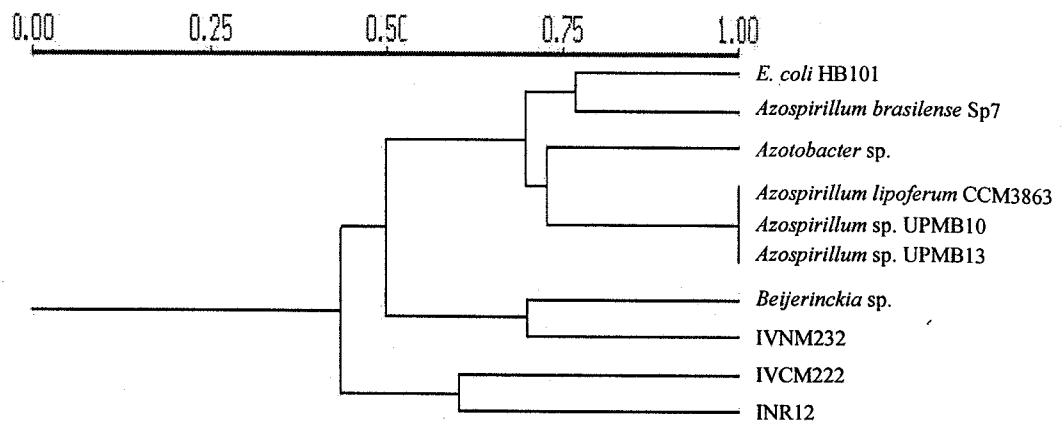


รูปที่ ผ.3.75 Dendrogram of group 42 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer

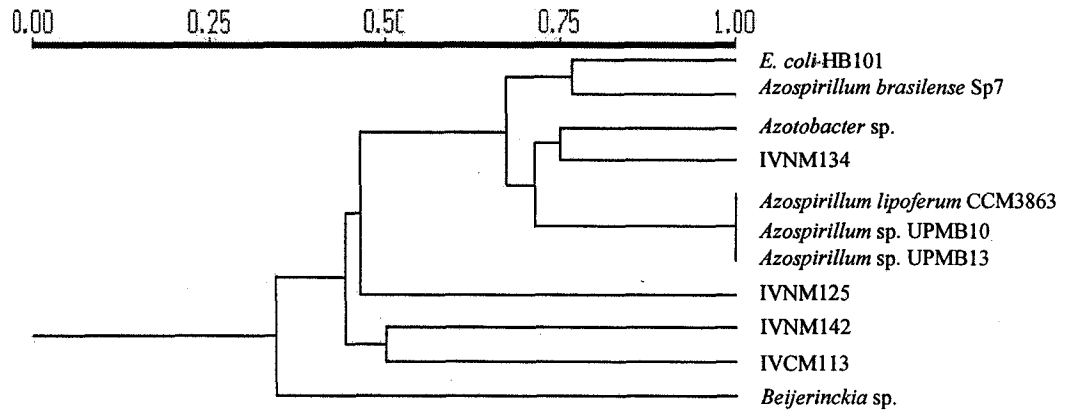




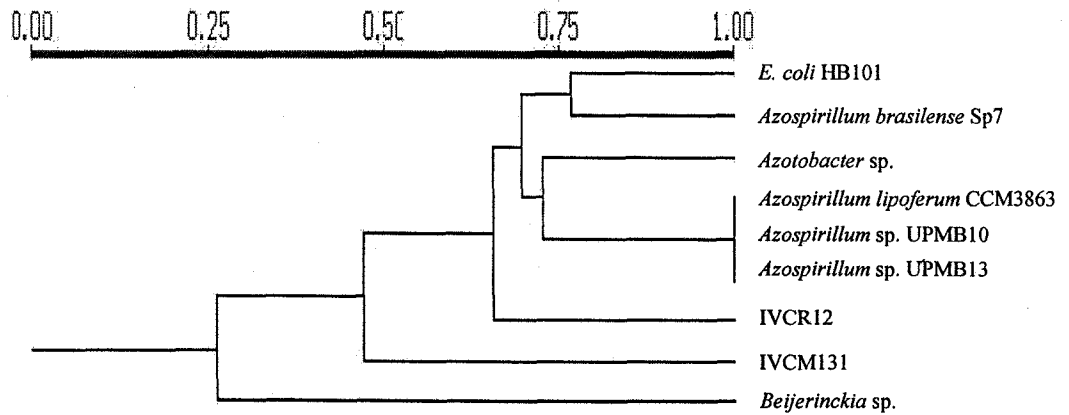
รูปที่ ผ.3.76 Dendrogram of group 43 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



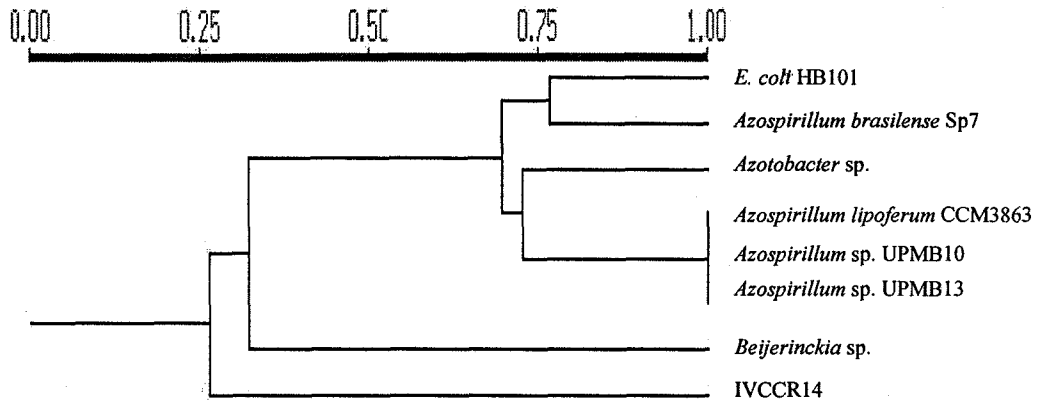
รูปที่ ผ.3.77 Dendrogram of group 44 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



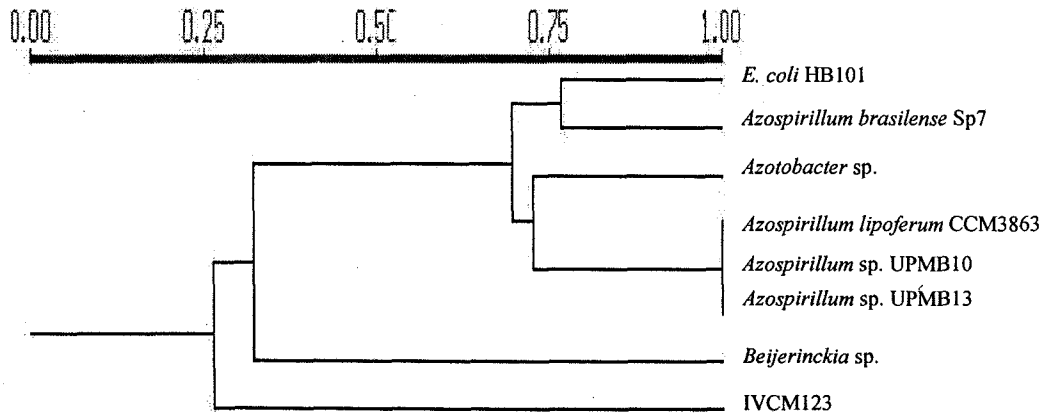
รูปที่ ๓.๓.๗๘ Dendrogram of group 45 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



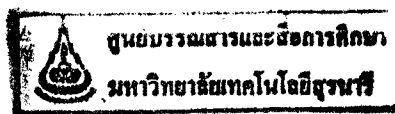
รูปที่ ๓.๓.๗๙ Dendrogram of group 46 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ผ.3.80 Dendrogram of group 47 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



รูปที่ ผ.3.81 Dendrogram of group 48 separated *nifD* gene pattern groups of free-living nitrogen fixing bacterial isolates by using ERIC primer



เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Weatbloom, T.U., Kresovich, S. and Berg, D.E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by Pcbased RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20: 5137-5142.
- Anchan Chocnahirum (1986). Chenetaxonomy of some nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of rice (*Oryza satira* L.) grow in Thailand. Master's thesis, Chulalonghorn University.
- Beynon, J. L. and Josey, D. P. (1980) Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in instrinc antibiotic resistance. *Journal of General Microbiology* 118: 437-442.
- Barraquio W.L., Ladha J.K. and Watanabe I. (1983). Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 29:867-873.
- Bronemon J., Skecch P. W., O'Sullivan K. M., Palus J. A. Rumijanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J. and Triplett E. W. (1996). Moleccular microbial diversity of on agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbial.* 62: 1935-1943.
- Boonkerd, N. 1991. Inoculant quality control standards in Thailand. In: Report in Expert Consultation on Legume Inoculant Production and quality Contril. FAO Rome, Italy. P. 121-129.
- Boonkerd, N. 1992. The application of bio and organic fertilizer in Thailand. P. 88-101. In: Proceedings of National Conference on the Conversion of Agro-Industrail Wastes in to Fertilizers Ayola Center, Manila, Philippines.
- Boonkerd, N. and B. Rerkasem. 1994. Soybean: Environmentally friend. In: Proceeding of World Soybean Research Conference V. Chiangmai, Thailand.
- Boonkerd, N. and D. Baker. 1989. Interaction between plants and microorganisms in nitrogen-fixing symbioses. In: Interactions Between Plants and Microorganisms. Proceedings of a JSPS-NUS Inter-faculty Seminar, Singapore. Eds. G. Lim and K. Katsuya. Science Faculty, National University of Singapore. P. 160-169.
- Boonkerd, N. and P. Singleton. 1994. Options to facilitate legume inoculant production and adoption. *Suranaree J. Sci. Technol.* 1: 35-38.

- Boonkerd, N. and R. W. Weaver. 1962. Survival of Cowpea *Rhizobia* in Soil as Affected by Soil Temperature and Moisture. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 43. No. 3. p. 585-587.
- Boonkerd, N. and R. W. Weaver. 1982. Cowpea *Rhizobia* : Comparison of plant infection and plate counts. *Soil Biol&Biochem* 14: 305-308.
- Boonkerd, N. and R. W. Weaver. 1982. Survival of cowpea *rhizobia* in soil as affected by soil temperature and moisture. *Appl. Envir. Microbiol* 4: 585-589.
- Boonkerd, N. D. F. Bezdicek and D. F. Weber. 1978. Comparative evaluation of *Rhizobium japonicum* strains by acetylene reduction and other methods. *Legume Research*. 2: 1-10.
- Boonkerd, N. D. F. Weber and D. F. Bezdicek. 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on methods on soybeans grown in *rhizobia*-populated soil. *Agron. J.* 70: 547-549.
- Boonkerd, N., P. Laosuwan, C. Saeng-un and W. Panuwas. 1995. <sup>15</sup>N-determined N<sub>2</sub> fixation in recommended mungbean cultivars and advanced breeding lines. *Suranaree J. Sci. Technol.* 2: 21-25.
- Boonkerd, N., C. Arunsri, W. Rungrattanakasin and Y. Vasuvat. 1985. Effects of post-emergence inoculation on field grown soybeans. *MIRCEN, J.* 1: 115-161.
- Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, G. Meromi and B. D. Kishinevsky. 1993. Population size and N<sub>2</sub>-fixing activity of native peanut *rhizobia* in soils of Thailand. *Biol. Fertil. Soils* 15 : 275-278.
- Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (1974). *Bergly's Manual of determinative bacteriology*. 8<sup>th</sup> edition, USA., Williams and Wilkins Company.
- Chen, K.C.K., Chen, J. S. and Johnson, J. L. (1986). Structural features of multiple *nifH*-like sequences and very biased codon usage in nitrogenase genes of *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* 166: 162-172.
- Dalton, H. and Postgate J. R. (1980). Effect of oxygen on the growth of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. *Journal of General Microbiology*. 54: 463-473.
- Desikachary, T. V. (1958). **Cyanophyta**. University Botany laboratory, Madras.
- Elkan, G. H. (1992) Taxonomy of the *rhizobia*. *Canadian Journal of Microbiology*. 30: 446-450.
- Eskew, DM., Anolles, G. C., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. (1993) DNA amplification fingerprinting of the *Azolla-Anabaena* symbiosis. **Plant Mol. Biol.** 21: 363-373.

- Frans, J. (1992). Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Micro. Environ.* 91: 2180-2185.
- Golden, J.W., Carrasco, C. D., Mulligan, M. E., Schneider, G. J. and Haselkorn, R. (1988). Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 170: 5034-5041.
- Graham, W. O'hara, N. Boonkerd and M. J. Dilworth. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, *Plant and Soil* 108 : 93-110.
- Hoben, H. J., P. Somasegarm, N. Boonkerd and Y. D. Gaur : 1994. Polyclonal antisera production by immunization with mixed cell antigens of different rhizobial species. *World J. Microbiol & Biotech* 10 : 538-542.
- Ishac Y. Z., M. E., M. J. Draft, E. M. Ramadan and M. E. Domerdash (1986). Effect of and inoculation, mycorrhizal infection and organic amendment on wheat growth. *Plant and Soil.* 90: 373-382.
- Kannaiyan and C. Somporn. 1989. Effect of high temperature on growth, nitrogen fixation and chlorophyll content of five species of *Azolla-Anabaena* symbiosis. *Biol. Fertil. Soils* 7 : 168-172.
- Kannaiyan and S. Choonluchanon. 1990. Effect of sodium chloride on growth rate, nitrogenase, photosynthesis, respiration and chlorophyll contents in four cultures of nitrogen fixing aquatic fern *Azolla*. *Thai J. Agric. Sci.* 23 : 100-110.
- Kaplan, D., A. E. Richmond, Z. Dubinsky and S. Aronson. 1986. Algal nutrition, pp. 147-198. In A. Richmond (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Kucey, R. M. N., P. Chaiwanakupt, T. Arayangkool, P. Snitwongse, C. Siripaibool, P. Wadisirisuk and N. Boonkerd. 1988. Nitrogen fixation ( $^{15}\text{N}$  dilution) with soybeans under Thai field conditions. (II. *Effect of herbicides and water application schedule*). Kluwer Academic Publishers, *Plant and Soil* 108 : 87-92.
- Kucey, R. M. N., P. Snitwongse, N. Boonkerd, P. Chaiwanakupt, P. Wadisirisuk, C. Siripaibool, T. Arayangkool and R. J. Rennie. 1988. Nitrogen fixation ( $^{15}\text{N}$  dilution) with soybeans under Thai field conditions : I. Effect of *Bradyrhizobium japonicum* strain. *Plant and Soil.* 108: 33-41.

- Liengen, T. and R. A. Olsen. 1997. Seasonal and site-specific variation in nitrogen fixation in a high Arctic area, NY-Alesund, Spitsbergen. *Can J. Microbiol.* 43(8) : 759-769.
- Liu, Y., D., Y. W. Shen, L. R. Sog, C. X. Hu, S. B. Hyuang, J. S. Lu, Y. Z. Zhy, H. R. Zhuang and S. W. Gin. 1998. Species composition and distribution on blue-green algae from soil in the middle reach of Yellow River China, pp. 392-401. *In* Asiam Network on Microbial Researches Gadjah Mada University (GMU). The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan.
- Lupski, J. R. and Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529.
- Masepohl, B., Gorlitz, K. and Bohmen, B. (1996). Long tandemly repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. Biophys. Acta* 1307: 26-30.
- Mazel, D., Houmard, J., Castets, A. M. and Taodeau de Marsac, N. (1990) Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* 172: 2755-2761.
- Mevarech, M., Rice, D. and Heselkorn, R. (1980). Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77: 6476-6480
- Mpepereki, S., Makonase, F. and Wollum, A. C. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in zimbabwean soil *Symbiosis*, 22: 75-292.
- Mueller, J. G., Skipper, H. D., Shipe, E. R., Grimes, L. W. and Wagner, S. C. (1988) Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 879-882.
- Neilan, B. A. (1995). Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2286-2291.
- Nuntagij, A., Abe., M., Uchium, T., Seki, Y., Boonkerd, N. and Higashi, S. (1997). Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43 pp.
- O'Hara, G. W., N. Boonkerd and M. J. Dilworth. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil.* 108: 93-110.
- Okon, Y. and Y. Kapulnike. (1986). Development and function of *Azospirillum* inoculated root. *Plant and Soil.* 90: 3-6.



- Porath, J. B. and Zehr, J. P. (1994). Detection and Characterization of cyanobacterial nif H genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 880-887.
- Rasmussen, U. and Svenning, M. M. (1998) Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 265-272.
- Rennie, R. J., D. A. Rennie, C. Siripaibool, N. Boonkerd and P. Snitwongse. 1988. N<sub>2</sub> fixation in Thai soybeans: Effect of tillage and inoculation on <sup>15</sup>N-determined N<sub>2</sub> fixation in recommended cultivars and advanced lines. *Plant and Soil.* 112: 183-193.
- Richmond, A. 1986. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture.* CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. 528 p.
- Rippka, R., J. Deruelles, B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stainer. 1979. Generic assignment strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11 : 1-61.
- Rippka, R. (1988). Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods in Enzymol.** 167: 28-67.
- Robinson, N. J., Robinson, P. J., Gupta, A., Bleasby, A. J. , Whitton, B. A. and Morby, A. P. (1995). Singular over-representation of an octameric palindrome. HIP 1, in DNA from many cyanobacteria. **Nucleic Acids Research.** 23: 729-735.
- Somasegaran, P., R. Woolfenden, and J. Halliday (1983). Suitability of oven-dried root nodules for *Rhizobium* strain identification by immunofluorescence and agglutination. *J. Appl. Bacteriol.*
- Stewart, W.D.P. (1980). Some aspects of structure and function in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 34: 497-536.
- Sundaresan, V and Ausubel, F. M. (1981). Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron from *Klebsiella pneumoniae*. **J. Biol. Chem.** 256: 2808-2812.
- Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (1998) Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by primer-pased technology and direct DNA extraction. *Plant and soil* 204: 127-134.
- Terrand J.J., Kerieg, N.R. and Dobereiner J. (1978). A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) Comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.

- Torik, I. And Kondorosi, A. (1981). Nucleotide sequence of *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. **Nucleic Acids Res.** 9: 5711-5723.
- Ueda, T., Segi Y., Yahiro N. and Matsuguchi T. (1995). Genetic diversity of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with rice root by molecular evolutionary analysis of *nifD* library. **Can. J. Microbiol.** 41: 235-240.
- Versalovic J. and J. R. Lupski (Baylor College of Medicine) (1991). Personal communication.
- Watanabe, A., S. Nishigaki and C. Konishi. 1951. Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plant. **Nature.** 168 : 748-749.
- West, N. J. and Adams, D. G. (1997). Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4479-4484.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18: 6531-6535.
- Yoneyama, T., T. Murakami, N. Boonkerd, P. Wadisirisuk, S. Siripin and K. Kouno. 1990. Natural <sup>15</sup>N abundance in shrub and tree legumes, Casuarina and non N<sub>2</sub> fixing plants in Thailand. **Plant and Soil.** 128: 287-292.
- Young J. P. W. (1993). Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In *New horizons in nitrogen fixation*. Edited by R. Palacios. J. and Mora and W. E. Newton. Klumer Academic Publishers, London. Pp 587-597.

ภาคผนวก

## การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

ในขั้นแรกหากสนใจต้องการข้อมูลหรือขอเชื้อเพื่องานวิจัยโปรดติดต่อ

### 1. กลุ่มเชื้อไรโซเบียม :

นายสมศักดิ์ โคตรพงศ์ หรือ นางอังฉรา นันทกิจ  
กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน (ตึกไรโซเบียม)  
กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร  
ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900  
โทรศัพท์ : 02-5797522-3 โทรสาร : 02-5614763

### 2. กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย :

รศ. ดร. สมพร ชูณหลือชานนท์  
ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง  
จ. เชียงใหม่ 50002  
โทรศัพท์ : 053-944037 โทรสาร : 053-944666  
E-mail : [agischnl@chiangmai.ac.th](mailto:agischnl@chiangmai.ac.th)

### 3. กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ:

ดร. เศรษฐา ศิริพิณฑุ์  
ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมเกษตร  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ. สันทราย  
จ. เชียงใหม่ 50210  
โทรศัพท์ : 053-498169 โทรสาร : 053-498171

### 4. ข้อมูลอื่น ๆ :

ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด  
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ : 044-224750-1 โทรสาร : 044-224750  
E-mail : [nantakon@ccs.sut.ac.th](mailto:nantakon@ccs.sut.ac.th)  
ผศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง  
สถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ต. สุรนารี  
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ : 044-224279, 216345 โทรสาร : 044-224150  
E-mail : [neung@ccs.sut.ac.th](mailto:neung@ccs.sut.ac.th)

## การผลิตบุคลากรของโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	ระดับ/สาขาวิชา/มหาวิทยาลัย ที่ศึกษา	ชื่อวิทยานิพนธ์
นางสาวศศิธร อินทร์นอก	มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยี ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี	ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึง ไนโตรเจนในระบบนิเวศวิทยา ต่าง ๆ ในประเทศไทย
นางสาวอรรวรรณ ปิยะบุญ	มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยี ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี	ความหลากหลายทางด้านพันธุ กรรมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบบอิสระในระบบนิเวศวิทยาที่ ต่างกันของประเทศไทย
นางสาวคนยา มาศปถวี	มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยี ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี	ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของไรโซเบียมที่แยกได้จากดินใน ระบบนิเวศวิทยาที่แตกต่างกันของ ประเทศไทย
นายอภิชาติ สุขสว่าง	มหาบัณฑิต สาขาวิชาปรัชญาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พลวัตของประชากรสาหร่ายสี เขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ ในระบบนิเวศที่ต่างกัน

## การตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการ

(อยู่ในระหว่างการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสาร Australian Journal of Plant Physiology)

Neung Teaumroong, Sasidhorn Innok, Somporn Chunleuchanon and Nantakorn Boonkerd (2001). Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand : I. Morphological, physiological and genetic diversity. In-press : Australian Journal of Plant Physiology.

Somporn Chunleuchanon, Apichat Sooksawang, Neung Teaumroong and Nantakorn Boonkerd. (2001). Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand : II. Population dynamics as affected by environmental factors. In-press : Australian Journal of Plant Physiology.

## รายละเอียดการเสนอผลงานวิจัย

Innok S., N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1998. Polygenetic Diversity of Nitrogen Fixing Cyanobacteria from Various Ecosystems in Thailand. Proceeding : Research Reports on Biodiversity in Thailand, Biodiversity Research and Training Program (BRT). 12-15 October 1998, Khon-Khan, Thailand. P 133.

Piyaboon O., N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1998. Polygenetic Diversity of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria Isolated from Various Ecosystems in Thailand. Proceeding : Research Reports on Biodiversity in Thailand, Biodiversity Research and Training Program (BRT). 12-15 October 1998, Khon-Khan, Thailand. P 134.

Matpatawee D., N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1998. Polygenetic Diversity of Rhizobial Strains Isolated from Diversed Ecosystem of Thailand. Proceeding : The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998. Bangkok, Thailand. P 53.

Piyaboon O., N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1998. Polygenetic Diversity of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria Isolated from Various Ecosystems in Thailand. Proceeding : The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998. Bangkok, Thailand. P 54.

Innok S., N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1998. Diversification of Nitrogen Fixing Heterocystous Cyanobacteria Isolated from Soil in Thailand. Proceeding : The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998. Bangkok, Thailand. P 63.

- Innok S., N. Teaumroong, S. Choonhaleuchanon and N. Boonkerd. 1999. Biodiversity of Nitrogen Fixing Cyanobacteria from Thai Soil. Proceeding : Research Reports on Biodiversity in Thailand, Biodiversity Research and Training Program (BRT). 11-14 October 1999, Sungkha, Thailand. P 180.
- Piyaboon O., N. Teaumroong, S. Siripin and N. Boonkerd. 1999. Polygenetic diversity of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from various ecosystems in Thailand. Proceeding : Research Reports on Biodiversity in Thailand, Biodiversity Research and Training Program (BRT). 11-14 October 1999, Sungkha, Thailand. P 181.
- Piyaboon O., S. Siripin, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Determination and Characterization of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria in Thai Soil. Proceeding: The 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 15-18 November 1999. Phuket, Thailand. P. 245.
- Innok S., S. Choonluchanon, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Diversity of Nitrogen Fixing Cyanobacteria from Cultivated Soil in Thailand. Proceeding: The 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 15-18 November 1999. Phuket, Thailand. P. 253.
- Matpatawee D., S. Kotepong A. Nantagij, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Detection of Dominant Native Rhizobia in Filed Crop Cultivation Area on Basis of Direct PCR from Root Nodule. Proceeding: The 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 15-18 November 1999. Phuket, Thailand. P. 282.
- Matpatawee D., S. Kotepong, A. Nantagij, N. Teaumroong And Nantakorn Boonkerd. 1999. Polygenetic Diversity Of Rhizobial Strains Isolated From Diversed Ecosystems In Thailand. Proceeding: International Conference on Asian Network on Microbial Research. November 29 - December 1, 1999, Chiang Mai, Thailand. P. 811-819.
- Teaumroong N., S. Innok, S. Choochaleuchanon and N. Boonkerd. 1999. Genetic Diversity of N<sub>2</sub>-Fixing Heterocystous Cyanobacteria in Thai Soil. Proceeding: International Conference on Asian Network on Microbial Research. November 29 - December 1, 1999, Chiang Mai, Thailand. P. 152.
- Innok S., S. Choonluchanon, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Diversity of Nitrogen Fixing Cyanobacteria from Cultivated Soil in Thailand. Proceeding: Nitrogen Fixation Seminar Under Programme of Large Scale Cooperation (NRCT-JSPS/DOST/LIPI/VCC) 1-5 December 1999. Chiang Mai, Thailand.
- Matpatawee D., S. Kotepong A. Nantagij, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Detection of Dominant Native Rhizobia in Filed Crop Cultivation Area on Basis of Direct PCR from Root Nodule. Proceeding: Nitrogen Fixation Seminar Under Programme of Large Scale Cooperation (NRCT-JSPS/DOST/LIPI/VCC) 1-5 December 1999. Chiang Mai, Thailand.

Piyaboon O., S. Siripin, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 1999. Determination and Characterization of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria in Thai Soil. Proceeding: Nitrogen Fixation Seminar Under Programme of Large Scale Cooperation (NRCT-JSPS/DOST/LIPI/VCC) 1-5 December 1999. Chiang Mai, Thailand.