การคัดเลือกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้จากพื้นที่หุบป่าตาด จังหวัดอุทัยธานี

ณพัชรา ดำรงแดน[1], ทิพย์วิมล ดอนหลิมไพร[1] และ เมธานี หอมทอง[1*]
[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม, นครปฐม
*ผู้รับผิดชอบบทความ: email methanee@webmail.npru.ac.th

บทคัดย่อ

การคัดเลือกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียจากพื้นที่หุบป่าตาดจังหวัดอุทัยธานี พบว่า ดินมีลักษณะเป็นดินร่วน สีดำ และน้ำตาล และจากการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วยเทคนิค spread plate และเจือจางสารละลายดินถึงระดับความเจือจาง 10^{-4} พบว่าดิน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง $0.07 \pm 1.41 \times 10^{6}$ - $0.46 \pm 2.05 \times 10^{6}$ CFU/ml เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบจำนวนแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง A กับตัวอย่าง B มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient Agar (NA) สามารถคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 28 ไอโซเลต และนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้มาตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี (สี ผิวหน้า และ ขอบ) และการย้อมสีแบบแกรม ผลการย้อมแกรม พบแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 27 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ไอโซเลต การศึกษานี้เป็นขั้นตอนแรกในการนำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: การย้อมสีแบบแกรม แบคทีเรีย ลักษณะสัณฐานวิทยา

Screening and Preliminary Characterization of Bacteria Isolated from Huppatat Area of Uthaithani Province

Napatchara Dumrongdan[1], Tipwimon Donlimprai [1] and Methanee Homthong[1*]
[1]Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Nakhon Pathom
*corresponding author: email methanee@webmail.npru.ac.th

Abstract

The soil was collected from Huppatat Area of Uthaithani Province. The soil texture was black loamy soils. The bacterial count was used by spread plate technique and diluted soil solution to dilution level 10^{-4}. The results of bacteria counting were ranges from $0.07 \pm 1.41 \times 10^{6}$ –$0.46 \pm 2.05 \times 10^{6}$ CFU/ml. Sample A and sample B was a significant difference ($p \leq 0.05$) when determined by comparing between bacterial populations. Bacterial species were isolated following standard methods. The isolates were cultured on Nutrient Agar (NA). In the study found different 28 bacterial isolates. Out of 28 isolates were tested morphology (color, surface ,and margin) and gram staining. The result showed that 27 isolates were gram-positive bacteria and 1 isolate was gram-negative bacteria. This study is the first step in the implementation of a bacterial and this information will be enlarged in the future.

Keywords: bacteria, Gram staining, morphology

1. บทนำ

แบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมากที่สุดในดิน ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ และปล่อยธาตุอาหารออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืช แบคทีเรียหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ การตรึงไนโตรเจน หมายถึง การเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนมาเป็นสารประกอบเพื่อใช้ประโยชน์ในตัวจุลินทรีย์ และต่อมาได้ปล่อยออกมาให้พืชใช้ประโยชน์ นอกจากนี้สารเหนียวต่าง ๆ ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมายังช่วยให้อนุภาคดินเกาะกลุ่มเป็นเม็ดดิน และเกิดโครงสร้างดิน

จุลินทรีย์ในดิน ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีส สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส ในดินที่อุดมสมบูรณ์จะพบกลุ่มจุลินทรีย์ในดินเหล่านี้ได้มากถึงพันล้านเซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม และจุลินทรีย์ที่มีในดินมากที่สุด คือ แบคทีเรีย จำนวนในดินสวนทั่ว ๆ ไป 1 กรัมจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณล้านเซลล์ซึ่งประกอบด้วยมากกว่า 400 สกุล และ 10,000 ชนิด แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา โพรโตซัว และสาหร่าย มีรูปร่างแบบง่าย ๆ 3 รูปร่าง คือ กลม (cocci) ท่อน (rod) และเกลียว (spiral) ไม่มีรงควัตถุภายในเซลล์ คือ เซลล์มักจะใส มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่เคลื่อนที่ (พฤกษา หล้าวงษา, 2018)

หุบป่าตาดเป็นสถานที่ที่เต็มไปด้วยความสวยงามแปลกตาของทางธรรมชาติ หุบป่าตาด ได้ถูกประกาศจากกรมอุทยานแห่งชาติให้เป็นพื้นที่อนุรักษ์ เนื่องจากมีสภาพทางภูมิศาสตร์ที่แปลกตาด้วยพันธุ์ไม้หายากมากมายหลายชนิด เช่น เต่าร้าง เปล้า

คัดค้าวเล็ก และขนุนดิน เป็นต้น โดยหุบป่าตาดมีลักษณะเป็นโถงถ้ำขนาดใหญ่ที่ภายในคือผืนป่าที่เต็มไปด้วยต้นตาด และพืชพันธุ์โบราณแปลกตา และถ้ำนี้ถูกค้นพบโดยพระครูสันติธรรมโกศล เจ้าอาวาสวัดถ้ำทอง เมื่อปี พ.ศ. 2522 พระครูได้ปีนลงไปในหุบเขานี้จึงพบว่ามีต้นตาดจำนวนมาก บริเวณปล่องขนาดใหญ่ที่แสงส่องลงมาได้ และป่าตาดในบริเวณหุบเขานี้มีลักษณะคล้ายป่าดงดิบ และยังมีความชุ่มชื้นสูง แสงจะส่องถึงพื้นได้เฉพาะตอนเที่ยงวัน เพราะมีเขาหินปูนสูงชันล้อมรอบมีความร่มรื่นเหมาะแก่การเดินชมธรรมชาติ (สำนักงานวัฒนธรรมจังหวัดอุทัยธานี, 2020)

ต้นไม้ที่ขึ้นบริเวณหุบป่าตาด เป็นต้นไม้ที่ค่อนข้างแปลกตา สามารถพบเห็นโดยทั่วไปน้อย และดินบริเวณหุบป่าตาดมีลักษณะที่แข็ง ยากต่อการเพาะปลูกพืชชนิดอื่น ๆ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในดินจากพื้นที่หุบป่าตาด

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในดินจากพื้นที่หุบป่าตาด จังหวัดอุทัยธานี

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบหุบป่าตาดที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างบรรจุในถุงพลาสติกที่ผนึกและติดฉลากโดยกำหนดสถานที่ และรหัสตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่าง ระบุเป็น A, B, C, D และ E จากนั้นนำมาผึ่งลมให้แห้งและนำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการทดลองต่อไป

3.2 การนับปริมาณแบคทีเรีย

ชั่งตัวอย่างดินบริเวณละ 10 กรัม ใส่ดินในบีกเกอร์ที่เติมน้ำกลั่นนึ่ง ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนจะได้สารละลายส่วนใส (suspension) เชื้อในบีกเกอร์ที่เจือจางลง 10 เท่า จะได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1} ใช้ปิเปตที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนใสจากบีกเกอร์ เพื่อย้ายไปใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่ง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 จะได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-2} กระจายเชื้อด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) แล้วใช้ปิเปตที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร อันใหม่ดูดสารละลายส่วนใสจากหลอดทดลองหลอดที่ 1 เพื่อย้ายสารละลายส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่ง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 จะได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-3} กระจายเชื้อด้วยเครื่องเขย่าสารและทำแบบนี้จนถึงตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-6} ทำซ้ำเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-4} ซึ่งคาดว่ามีความเข้มข้นของเชื้อพอเหมาะที่จะสามารถนับจำนวนโคโลนีได้ นำสารละลายส่วนใสแต่ละความเข้มข้นมาเกลี่ยบนบนอาหาร Nutrient Agar (NA) โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วนใสของเชื้อในหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-4} อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร หยดในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Nutrient Agar (NA) แข็งตัวดีแล้ว และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว กวาดให้สารละลายส่วนใสกระจายทั่วบนผิวหน้าอาหารทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24- 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณเชื้อจากดินในแต่ละตัวอย่าง (สุภัทรา จามกระโทก, 2545)

3.3 การคำนวณปริมาณแบคทีเรีย

นับจำนวนโคโลนีที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนับเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่า ดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)} = \frac{\sum C}{(v1n1 + 0.1n2)\, d}$$

$\sum C$ = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

v1 = ปริมาณของ inoculum ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

n1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนีในระดับความเข้มข้นแรก

n2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง30-300 โคโลนี

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธีการของ Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

3.5 คัดเลือกแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน เช่น รูปร่าง ลักษณะผิวหน้า และริมขอบ เป็นต้น โดยใช้เทคนิค streak plate บนอาหาร Nutrient Agar (NA) แล้วบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ในหลอดอาหาร Nutrient Agar (NA) ชนิดเอียง แล้วบ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียแต่ละชนิด มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาโครงสร้างพิเศษของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแกรม ดังนี้

1. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อลนกับเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปแตะเชื้อแบคทีเรียที่จะย้อมผสมกับหยดน้ำที่แยกไว้บนสไลด์ที่สะอาด
2. เกลี่ย (smear) เชื้อที่อยู่บนสไลด์ให้กระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ
3. ปล่อยสไลด์ในอากาศให้แห้ง (air dry)
4. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ด้วยความร้อน (heat-fixed) คือ นำสไลด์ไป ผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม่ควรให้สไลด์ร้อน เพราะจะทำให้เซลล์ไหม้ ลองเอาสไลด์แตะบนหลังมือ ถ้าสไลด์อุ่น ๆ แสดงว่าใช้ได้
5. หยดสี crystal violet ให้ท่วมบริเวณรอยเกลี่ย เป็นเวลานาน 1 นาที
6. ล้างสีออกด้วย Gram' s iodine solution แล้วหยด Gram's iodine solution ให้ท่วมบริเวณเกลี่ย เป็นเวลานาน 1 นาที
7. เท Gram's iodine solution ออกแล้วล้างทันทีด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 15-20 วินาที
8. ล้างน้ำทันที ด้วยน้ำกลั่น
9. Counter stain ด้วยสี safranin O เป็นเวลานาน 15-30 วินาที หลังจากนั้น ล้างสีออกด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง

10. ตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin O ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet

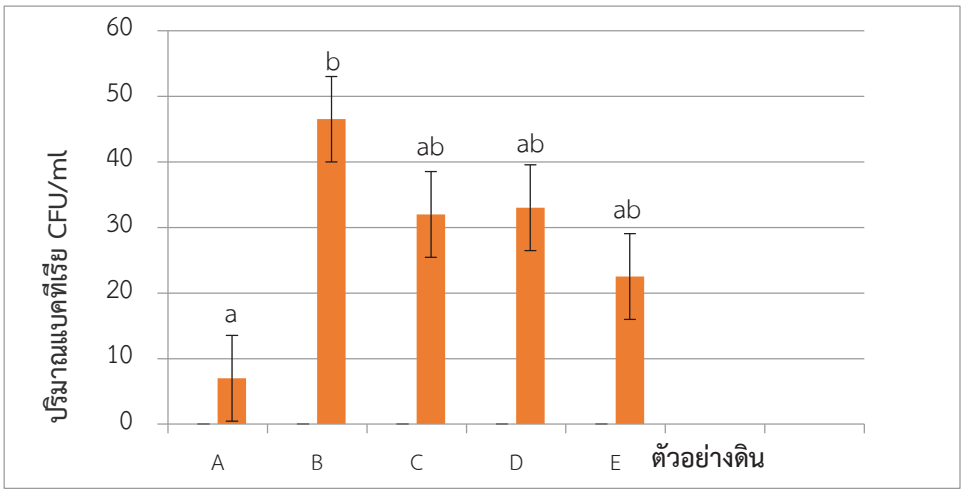
4. ผลการวิจัย

4.1 จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณพื้นที่หุบป่าตาด จังหวัดอุทัยธานี ผลการนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย พบว่าดินในพื้นที่หุบป่าตาดมีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอยู่ในช่วง $0.07 \pm 1.41 \times 10^6$ - $0.46 \pm 2.05 \times 10^6$ CFU/ml (ภาพที่ 1)

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์และการจำแนกแบคทีเรีย

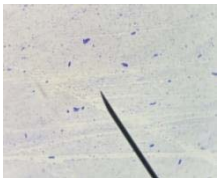
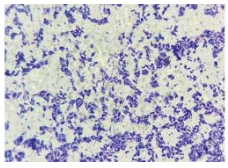
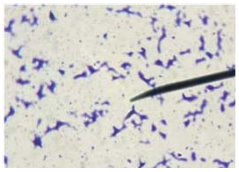
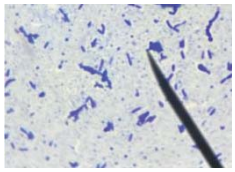
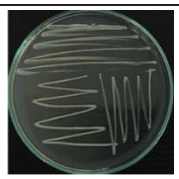
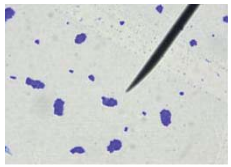
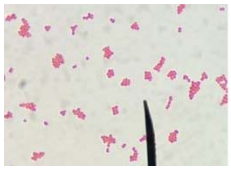
จากการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้จำนวน 28 ไอโซเลต ส่วนการจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมสีแกรม พบแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 27 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ไอโซเลต แยกได้เป็นแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณ A พบแบคทีเรีย จำนวน 3 ไอโซเลต และจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด มีลักษณะรูปร่างแบบท่อนสั้น จำนวน 2 ไอโซเลต และรูปร่างไม่แน่นอน 1 ไอโซเลต บริเวณ B พบแบคทีเรีย จำนวน 7 ไอโซเลต โดยจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 6 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ไอโซเลต มีรูปร่างแบบท่อนสั้น จำนวน 5 ไอโซเลต และรูปกลม 2 ไอโซเลต บริเวณ C พบแบคทีเรีย จำนวน 4 ไอโซเลต จำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด มีลักษณะรูปร่างแบบท่อนสั้นทั้งหมด บริเวณ D พบแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลต จัดเป็นแบคทีเรียแบบแกรมบวกทั้งหมด มีรูปร่างแบบท่อนสั้น จำนวน 5 ไอโซเลต ท่อนยาว จำนวน 2 ไอโซเลต รูปกลม จำนวน 1 ไอโซเลต และรูปร่างไม่แน่นอน จำนวน 1 ไอโซเลต และบริเวณ E พบแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมดมีลักษณะรูปร่างแบบท่อนสั้น จำนวน 4 ไอโซเลต และรูปกลม จำนวน 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)



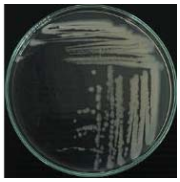
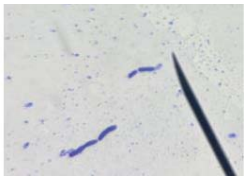
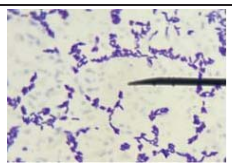
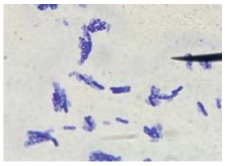
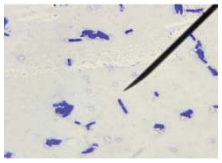
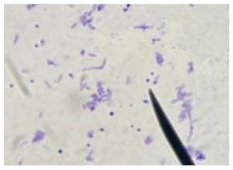
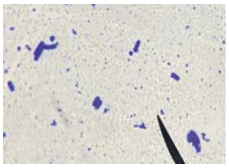
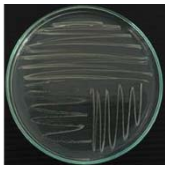
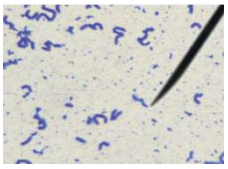
*ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ โดยวิธี DMR

ภาพที่ 1 ปริมาณแบคทีเรีย ($x10^6$ CFU/ml) จากตัวอย่างดิน 5 บริเวณ

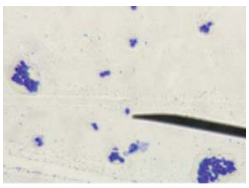
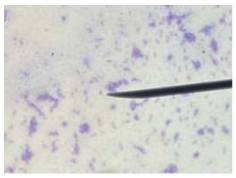
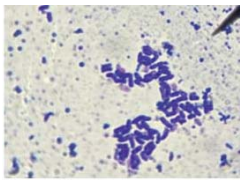
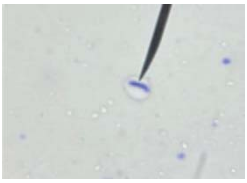
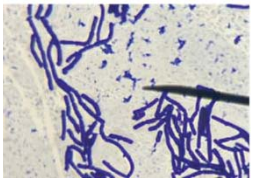
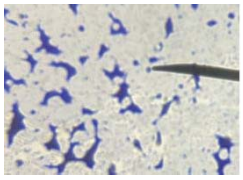
ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 28 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา			
	ลักษณะโคโลนี	**ชนิดแกรม**	**โคโลนี**	**รูปร่างเซลล์**
A-01	สีครีม มันวาว รูปร่างกลมขนาดเล็ก	แกรมบวก		
A-02	สีขาว ไม่เรียบและด้าน ขอบเป็นคลื่น รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
A-03	สีขาวไม่เรียบและด้าน รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
B-01	สีเหลือง โปร่งแสง มันวาว รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
B-02	สีขาวขุ่น ทึบแสง มันวาว ขนาดเล็ก	แกรมบวก		
B-03	สีขาว มันวาว รูปร่างกลมขนาดเล็ก	แกรมลบ		

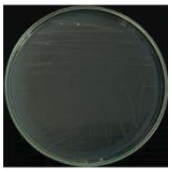
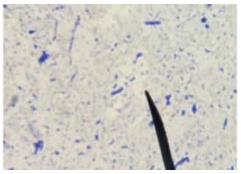
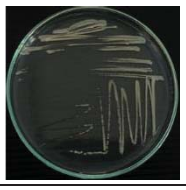
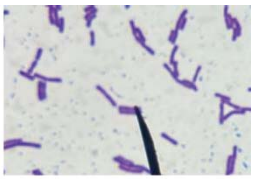
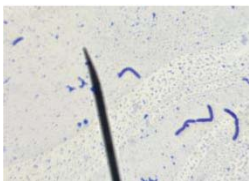
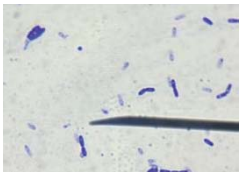
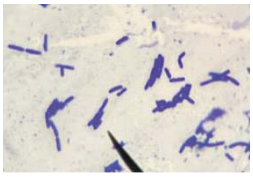
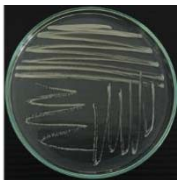
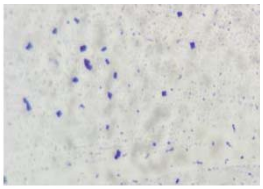
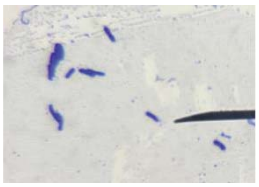
ตารางที่ 1 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 28 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา			
	ลักษณะโคโลนี	ชนิดแกรม	โคโลนี	รูปร่างเซลล์
B-04	สีขาวขุ่น ทึบแสง เรียบด้าน ขอบเป็นคลื่น	แกรมบวก		
B-05	สีครีม เรียบมันวาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ	แกรมบวก		
B-06	สีขาว เป็นเส้นใย รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
B-07	สีขาวขุ่น ทึบแสง เรียบและด้าน รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
C-01	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
C-02	สีครีม ไม่เรียบ มันวาว ขอบเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม	แกรมบวก		
C-03	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
C-04	สีขาว เรียบและมันวาว รูปร่างกลมขนาดเล็ก	แกรมบวก		

ตารางที่ 1 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 28 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา			
	ลักษณะโคโลนี	**ชนิดแกรม**	**โคโลนี**	**รูปร่างเซลล์**
D-01	สีขาวเรียบและด้าน รูปร่างกลมขนาดเล็ก	แกรมบวก		
D-02	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
D-03	สีเหลืองไม่เรียบและด้าน ขอบเรียบ รูปร่างกลม	แกรมบวก		
D-04	สีขาวขุ่น ไม่เรียบมันวาว ขอบหยัก รูปร่างค่อนข้างกลม	แกรมบวก		
D-05	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก	แกรมบวก		
D-06	สีครีมเรียบและมันวาว ขอบเรียบ รูปร่างกลม	แกรมบวก		
D-07	สีครีม ไม่เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างกลม	แกรมบวก		

ตารางที่ 1 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 28 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา			
	ลักษณะโคโลนี	**ชนิดแกรม**	**โคโลนี**	**รูปร่างเซลล์**
D-08	สีขาว เรียบและมันวาว โปร่งแสง ขนาดเล็ก	แกรมบวก		
D-09	สีขาว เรียบและมันวาว ขอบหยัก รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก	แกรมบวก		
E-01	สีครีม เรียบและมันวาว ขอบเรียบ	แกรมบวก		
E-02	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
E-03	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน	แกรมบวก		
E-04	สีครีม เรียบและมันวาว รูปร่างกลมขนาดเล็ก	แกรมบวก		
E-05	สีขาวขุ่น เรียบและด้าน ขอบหยัก รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดเล็ก	แกรมบวก		

5. อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดเลือกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียจากดินพื้นที่หุบป่าตาด จังหวัดอุทัยธานี พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แสดงว่าพื้นที่หุบป่าตาดมีความหลากหลายทางจุลินทรีย์ในด้านลักษณะรูปร่างและการจัดจำแนกโดยการย้อมสีแกรม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh and Prasad (2014) ได้คัดแยก และคัดกรองจุลินทรีย์ไรซ์โซสเฟียร์ในดินเพื่อผลิต IAA ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวจาก 9 พื้นที่ของจังหวัด Kolar, Hoskote, Ramnagar และMysore มาเจือจาง และแยกเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) และการจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากที่สุด ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน 57 ไอโซเลต แกรมบวกรูปร่างกลม 47 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน 6 ไอโซเลต และแอคติโนแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต

6. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยเทคนิค streak plate พบว่าสามารถแยกโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน จำนวน 28 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นตัวอย่างดิน A, B, C, D และ E มีจำนวนแบคทีเรีย 3, 7, 4, 9 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยสามารถจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีการย้อมแกรมได้ 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 27 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ไอโซเลต

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหัวหน้าและเจ้าหน้าผู้ดูแลหุบป่าตาดที่ได้อนุญาตให้เข้าไปเก็บตัวอย่างดิน ขอขอบคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ บุคลากรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และช่วยให้คำปรึกษาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง (References)

สุภัทรา จามกระโทก. (2545). **การจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Envinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี.** นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Singh, R and Prasad, M. P. (2014). Isolation and screening of rice rhizosphere soil microorganisms for the production of IAA. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3 (9), 993-998.

พฤกษา หล้าวงษา. (2018). **จุลินทรีย์ในดิน.** ค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2564 จาก https://ag.kku.ac.th/land/FileCours/1503591905002505.pdf.

สำนักงานวัฒนธรรมจังหวัดอุทัยธานี. (2020). **หุบป่าตาด**. ค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2564 จาก https://www.mculture.go.th/uthaithani/ewt_news.php?nid=227&filename=index.