



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาและจัดจำแนกแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas*
sp. 1048

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
หา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาและจัดจำแนกแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048

แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 ถูกนำมาศึกษาลักษณะเบื้องต้นต่างๆ ทางด้านจีโนมไทป์ พิโนไทป์ และซีโมไทป์ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* และมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 96.6% ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* และมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 97.4% การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 พบว่าชนิด iso-C_{15:0} (56.1%), C_{16:1} ω6c และ/หรือ C_{16:1} ω7c (14.3%) และ iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%) มีมากที่สุด ส่วนในสายพันธุ์ 1048 พบว่าชนิด summed feature 8 (C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c; 66.0%) และ C_{16:0} (10.1%) มีปริมาณมากที่สุด การวิเคราะห์ลักษณะทางพิโนไทป์พบว่าสายพันธุ์ 1017 และ 1048 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตรวจพบในสายพันธุ์ 1017 ไม่พบในสายพันธุ์ 1048 และตรวจไม่พบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ การวิเคราะห์การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 สามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้ 27 และ 24 ชนิดตามลำดับ

คำสำคัญ : *Sphingomonas*, *Pedobacter*, cellular fatty acid, 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Study and characterization of *Pedobacter* sp. 1017 and *Sphingomonas* sp. 1048

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

Bacterial strains 1017 and 1048 were characterized for their genotypes, phenotypes and chemotypes. The analysis of the 16S rRNA gene showed that strain 1017 was a member of the genus *Pedobacter* and closely related to *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T with the sequence similarity level at 96.6%. Strain 1048 belonged to the genus *Sphingomonas*, and its closely related relative was *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T with the sequence similarity value of 97.4%. The analysis of cellular fatty acids indicated that the predominant fatty acids in strain 1017 were iso-C_{15:0} (56.1%), C_{16:1} ω6c and/or C_{16:1} ω7c (14.3%) and iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%). In contrast, the major fatty acids found in strain 1048 included summed feature 8 (C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c; 66.0%) and C_{16:0} (10.1%). Study of the phenotypes of these two strains showed that they were Gram-negative, rod-shaped and non-motile. Formation of endospores was not observed in both strains. Catalase was detected in strain 1017 but not in strain 1048. Both strains were tested negative for amylase. Acid production of strain 1017 and 1048 was positive with 27 and 24 different carbon sources, respectively.

Keywords : *Sphingomonas*, *Pedobacter*, cellular fatty acid, 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 สมมติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
3.1 การศึกษา multiple alignment	7
3.2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	7
3.3 การศึกษา cellular fatty acid	7
3.4 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือของแบคทีเรีย	7
3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ	8
3.6 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ	8
3.7 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตาเลสโดยแบคทีเรีย	8
3.8 การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส	8
3.9 การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย	9
3.10 การเตรียมสารละลายเชื้อเพื่อทดสอบการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ	9
3.11 การทดสอบการสร้างกรดด้วยชุดทดสอบ API 50CH	9
3.12 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี lyophilization	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย	11
4.2 การวิเคราะห์ cellular fatty acid ในแบคทีเรีย	23
4.3 ลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย	25
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสและอะไมเลส	27
4.5 การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	28
5.1 สรุปผลการวิจัย	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ.....	28
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....	29
6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้.....	29
เอกสารอ้างอิง.....	31
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย.....	33
ประวัตินักวิจัย.....	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	23
4.1	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	12
4.2	14
4.3	16
4.4	18
4.5	20
4.6	22
4.7	26
4.8	26



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยจัดอยู่ในตำแหน่งที่ตั้งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในระดับสูงของโลก ดังนั้นแล้วจึงมีสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแบคทีเรียเป็นจำนวนมากที่ยังรอการค้นพบ ศึกษา และจัดจำแนก การศึกษาเบื้องต้นและเชิงลึกที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่ยังไม่เป็นที่รู้จักจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่นการผลิตสารประกอบ secondary metabolites ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ดังนั้นแล้วเราจึงสามารถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้นับเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อประเทศและควรได้รับการศึกษาอย่างละเอียด ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยเรื่อง “การคัดแยกและการศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย endophytes จากข้าว (*Oryza sativa*)” และในกลุ่มของแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกได้มีแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีความน่าสนใจคือสายพันธุ์ 1017 และ 1048 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้อยู่ในสกุล *Pedobacter* และสกุล *Sphingomonas* ตามลำดับ และแบคทีเรียดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับการศึกษาและจัดจำแนกมาก่อนด้วย อย่างไรก็ตามการยืนยันว่าแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งๆ เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่หรือไม่จำเป็นต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้มากขึ้น ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกัน โดยการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ความยาวประมาณ 1,400 คู่เบส นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์จะถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับลักษณะฟีโนไทป์, ลักษณะทางคีโมไทป์ และ ลักษณะทางชีวเคมีเพิ่มเติมด้วย ผลการทดลองที่ได้จะช่วยยืนยันว่าแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ตามลำดับ และเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่อย่างแท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการใช้ลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ในฐานข้อมูล
- เพื่อศึกษาลักษณะฟีโนไทป์, ลักษณะทางคีโมไทป์ และลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 จากการใช้ลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง 16S rRNA ความยาวประมาณ 1,400 คู่เบสโดยวิธีการ neighbour-joining, maximum likelihood และ maximum parsimony ลำดับเบสของยีนดังกล่าวของแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ถูกนำมาจากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 ได้แก่การเจริญเติบโตในสภาพ pH, ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตลอดจนความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ในการสร้างกรด

- ศึกษาลักษณะทางคีโมไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 ได้แก่ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

- 1.4.1 การศึกษา multiple alignment
- 1.4.2 การศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
- 1.4.3 การศึกษา cellular fatty acid
- 1.4.4 การศึกษาการทนเกลือของแบคทีเรีย
- 1.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอุณหภูมิต่างๆ
- 1.4.6 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ
- 1.4.7 การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส
- 1.4.8 การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย
- 1.4.9 การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย
- 1.4.10 การศึกษาการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ
- 1.4.11 การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธี lyophilization

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่มีค่าความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* น้อยกว่า 98.5% แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้ น่าที่จะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อน เพื่อยืนยันสมมติฐานนี้จึงต้องตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์และคีโมไทป์อื่นๆ เพิ่มเติม

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลักษณะทางฟีโนไทป์และคีโมไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 ที่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มว่าแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้ น่าที่จะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่หรือไม่ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัวหลายประการคือไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีออร์แกเนลล์ ไรโบโซมที่สังเคราะห์โปรตีนมีขนาด 70S และ ribosomal RNA (rRNA) ที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมมีขนาดเท่ากับ 16S และเรียกว่า 16S rRNA การศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง 16S rRNA ในแบคทีเรียหลายชนิดแสดงให้เห็นว่าลำดับเบสของยีนดังกล่าวประกอบไปด้วยชิ้นส่วนที่เรียกว่า “hypervariable regions” ทั้งหมด 9 ชิ้นส่วนที่มีความหลากหลายแตกต่างกันไปและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด นอกจากนี้ลำดับเบสในบางบริเวณยังถูกพบว่าถูกอนุรักษ์เอาไว้และมีความคล้ายคลึงกันระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกัน ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ ดังนั้นไพรเมอร์ดังกล่าวจึงมีลักษณะเป็น universal primers ที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมาใช้ในการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียที่ถูกเก็บเอาไว้ในฐานข้อมูลต่างๆ เช่น NCBI, EzTaxon เป็นต้น (Chakravorty et al., 2007; Vétrovský and Baldrian, 2013) ด้วยเหตุนี้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จึงถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ด้วย ตัวอย่างเช่นงานวิจัยที่ผ่านมาชิ้นหนึ่งซึ่งวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรากของต้นข้าวที่ปลูกในประเทศจีนโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ (59.26%) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Gallionella* และ *Burkholderia* ซึ่งเป็นสมาชิกในไฟลัม *Proteobacteria* ในขณะที่แบคทีเรียที่เหลือจัดอยู่ในไฟลัม *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus* และ *Acidobacteria* (Sun et al., 2008) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งเป็นการศึกษาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรากของข้าวที่ปลูกในประเทศบราซิลก็ให้ผลที่สอดคล้องกันคือแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่พบในรากข้าวนี้อยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* (Sessitsch et al., 2012) ตัวอย่างงานวิจัยทั้งสองชิ้นนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ผลพลอยได้อีกประการหนึ่งของการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพด้วยยีน 16S rRNA คือการค้นพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน โดยการวิเคราะห์ค่า similarity ระหว่างลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่จะมีลำดับเบสที่มีค่า similarity ต่ำกว่า 98.5% เมื่อเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน Stackebrandt และ Ebers (2006) ได้ทำการสำรวจงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมาและพบว่าค่า similarity ที่ค่อนข้างต่ำของแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่า DNA-DNA relatedness ซึ่งใช้ในการศึกษาความคล้ายคลึงกันระหว่างจีโนมของแบคทีเรีย โดยถ้าหากแบคทีเรียสองสายพันธุ์แสดงค่า similarity ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ต่ำกว่า 99% แล้วการวิเคราะห์ค่า DNA-DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

relatedness จะได้ค่าต่ำกว่า 70% ซึ่งถูกใช้ในการแบ่งแยกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ว่าเป็นแบคทีเรียคนละสปีชีส์กัน (Wayne et al., 1987)

การจัดจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียยังจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาลักษณะในด้านอื่นๆ ของแบคทีเรียที่เรียกว่าการศึกษาแบบ polyphasic study ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะด้านต่างๆ ของแบคทีเรีย ได้แก่ลักษณะทางจีโนมไทป์, ลักษณะทางฟีโนไทป์ และลักษณะทางคีโมไทป์ การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์คือการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และค่า DNA-DNA relatedness ที่กล่าวไปข้างต้น รวมไปถึงการศึกษาเกี่ยวกับ G+C content ของดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ส่วนตัวอย่างของการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์เช่น ลักษณะรูปร่างของเซลล์และโคโลนีของแบคทีเรีย, การติดสีแกรม, ความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ, ผลกระทบของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, ความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย, กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่แบคทีเรียผลิตได้ เป็นต้น ส่วนการศึกษาลักษณะทางคีโมไทป์เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้แก่ fatty acid, polar lipid และ ผลของการศึกษา ลักษณะทางฟีโนไทป์และคีโมไทป์ที่ได้มาจะต้องถูกนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะเดียวกันของแบคทีเรียในสกุลเดียวกันที่มีความใกล้เคียงกันซึ่งทราบจากการวิเคราะห์จีโนมไทป์ และต้องแสดงความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียด้วย (Vandamme et al., 1996)

แบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* ถูกนำเสนอครั้งแรกโดย Steyn et al. ในปี ค.ศ. 1998 โดยถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Sphingobacteriaceae*, ออร์เดอร์ *Sphingobacteriales*, คลาส *Sphingobacteriia* และไฟลัม *Bacteroidetes* .,0ในปัจจุบันมีแบคทีเรียจำนวน 55 สปีชีส์ที่ถูกจัดอยู่ในสกุลนี้ โดยมีสปีชีส์ *Pedobacter heparinus* เป็นแบคทีเรีย type species ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียในสกุลนี้คือเป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแบบแกรมลบ ใช้อากาศในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) กรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบภายในเซลล์ได้แก่กรดไขมันชนิด iso-C_{15:0}, iso-C_{15:0} 3-OH, C_{16:0}, C_{16:1} ω7c, iso-C_{17:1} ω9c และ iso-C_{17:0} 3-OH สารประกอบ menaquinone ภายในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นชนิด menaquinone-7 (MK-7) สร้าง sym-homospermidine และมีค่า G+C content อยู่ในช่วง 36-45 mol% ชนิดของ polar lipid ที่พบโดยทั่วไปในแบคทีเรียสกุลนี้คือ phosphatidylethanolamine แบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* หลายสปีชีส์ถูกพบในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณสารอาหารต่ำ ตัวอย่างเช่น ตะกอนดินใต้แหล่งน้ำ, พื้นที่ป่าสนแบบ alpine เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย *Pedobacter* ในน้ำดื่มและปุ๋ยหมัก อย่างไรก็ตามแหล่งที่อยู่อาศัยที่พบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pedobacter* คือดินหรือส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน (Ngo et al., 2015) แบคทีเรียบางสปีชีส์ถูกคัดแยกจากต้นพืชด้วย เช่น *Pedobacter trunci* และ *Pedobacter daejeonensis* (Du et al., 2015)

แบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Sphingomonadaceae*, ออร์เดอร์ *Sphingomonadales*, คลาส *Alphaproteobacteria* และไฟลัม *Proteobacteria* สกุล *Sphingomonas* ถูกนำเสนอครั้งแรกโดย Yabuuchi et al. ในปี ค.ศ. 1990 โดยลักษณะสำคัญของแบคทีเรียในสกุลนี้คือเป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแบบแกรมลบ เคลื่อนที่ไม่ได้ ใช้อากาศในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) ชนิดของกรดไขมันที่พบภายในเซลล์ได้แก่กรดไขมันประเภท C_{18:1} ω7c, C_{16:0} และ C_{14:0} 2-OH แบคทีเรียในสกุลนี้สร้างสารประกอบ polyamine ชนิด sym-homospermidine เป็นส่วนใหญ่ มีการสร้างสารประกอบ ubiquinone ประเภท Q-10 ภายในเซลล์ และมี sphingoglycolipid เป็นองค์ประกอบหลักของ polar lipid ภายในเซลล์ ในปัจจุบันมีแบคทีเรียที่ถูกศึกษาและจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Sphingomonas* อย่างเป็นทางการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมด 73 สปีชีส์ *Sphingomonas paucimobilis* เป็น type species ของแบคทีเรียสกุลนี้ เดิมทีแบคทีเรีย *S. paucimobilis* ถูกจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Pseudomonas* โดยมีชื่อสปีชีส์คือ *Pseudomonas paucimobilis* แบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ถูกพบในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น แหล่งน้ำแร่, ดิน, สัตว์ และตัวอย่างที่เก็บมาจากโรงพยาบาล เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ยังถูกพบทั้งบนพื้นผิวและภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชด้วยตัวอย่างเช่น *Sphingomonas roseoflava* ที่ถูกพบในพืชวงศ์ Gramineae, *Sphingomonas rosa* ซึ่งถูกคัดแยกจากกุหลาบ และ *Sphingomonas gei* ที่ถูกพบในรากของพืชในสกุล *Geum* เป็นต้น (Yun et al., 2000; Akeuchi et al., 1995; Zhu et al., 2015)

การศึกษาหาสปีชีส์ใหม่ของแบคทีเรียเป็นงานวิจัยที่มีความสำคัญต่อการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในกลุ่มจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก การศึกษาแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่สามารถนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ หรือนำไปสู่การประยุกต์ใช้แบคทีเรียเหล่านี้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไปได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อม แบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* เองก็ถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยด้านต่างๆ เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ *K-Carrageenase* จากแบคทีเรีย *Pedobacter hainanensis* ซึ่งถูกคัดแยกได้จากดินที่มีการทับถมของสาหร่ายสีแดง เอนไซม์ดังกล่าวนี้มีความสำคัญต่อการศึกษาโครงสร้างของสารประกอบ Carrageenan ซึ่งผลิตโดยสาหร่ายสีแดงและมีการใช้งานในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเอนไซม์จะย่อยสลาย Carrageenan ให้เป็นสารประกอบ oligosaccharide ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง (Sun et al., 2014) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* ในงานวิจัยทางสิ่งแวดล้อม โดย *Pedobacter* sp. สายพันธุ์ MCC-Z ถูกพบว่ามีความสามารถในการผลิตสารประกอบกลุ่ม polysaccharide และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) ที่เรียกว่า Pdb-Z ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) และมีความสามารถในการเป็น emulsifier เพื่อใช้ในการแก้ไข้ปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบกลุ่ม aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon ได้ (Beltrani et al., 2015)

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Sphingomonas* ถูกนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษกลุ่ม aromatic ได้แก่ toluene, xylene, *p*-cresol, naphthalene, biphenyl, dibenzothiphenene, fluorine, salicylate และ benzoate คุณสมบัติดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นถึงลักษณะพิเศษของสายพันธุ์ต่างๆ ดังกล่าวในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีการเจือปนของสารประกอบที่เป็นพิษ อย่างไรก็ตามการศึกษาก็ยังชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังกล่าวในแบคทีเรีย *Sphingomonas* มีความซับซ้อนและมีลักษณะที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ ที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่น *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์มีพลาสมิด 2 ชนิดได้แก่ pNL1 และ pNL2 โดยพลาสมิด pNL1 มีความจำเป็นต่อกระบวนการทำลายวงแหวน catechol *meta* ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการย่อยสลายสารประกอบ aromatic (Romine et al., 1999) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ ERG5 ยังถูกพบด้วยว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) ซึ่งเป็นสารปราบวัชพืชที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในพื้นที่เพาะปลูกพืชทั่วโลก อย่างไรก็ตามการใช้สารชนิดนี้ในการเกษตรกรรมส่งผลให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในแหล่งน้ำจืดด้วย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ ERG5 เพื่อนำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่นการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของจีโนมของแบคทีเรียที่แสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย MCPA มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดที่จำเป็นต่อกระบวนการคอนจูเกชันในแบคทีเรีย (Neilsen et al., 2015)

ตัวอย่างต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ดังนั้นแล้วการศึกษาแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ๆ จึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เพื่อก่อให้เกิดความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษา multiple alignment

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ความยาวประมาณ 1,400 คู่เบสของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันของแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI ในลักษณะของการทำ multiple alignment โดยการใช้โปรแกรม Clustal W ที่อยู่ในโปรแกรม Bioedit ผลการทำ multiple alignment นี้จะถูกนำมาปรับปรุงแก้ไขในบริเวณที่เป็นช่องว่าง (gap) และบริเวณที่มีลำดับเบสที่ไม่ถูกต้อง จากนั้นทำการคำนวณและสร้าง identity matrix ระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันระหว่างลำดับเบสและรายงานผลออกมาเป็นค่า similarity ระหว่างแบคทีเรีย

3.2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ผลการทดลองที่ได้จากการทำ จากนั้นนำผลการเปรียบเทียบนี้ไปสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbour-joining, Maximum parsimony และ Maximum likelihood โดยการใช้โปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6 และวิเคราะห์ค่า evolutionary distance โดยวิธี Kimura-2 parameter พร้อมทั้งคำนวณความน่าเชื่อถือของการสร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์ bootstrap โดยทำการสุ่มทั้งหมด 1,000 ครั้ง

3.3 การศึกษา cellular fatty acid

แบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptic soya agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดหา cellular fatty acid โดยการใช้ methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยก cellular fatty acid โดยการใช้ petroleum ether แล้ววิเคราะห์ชนิดด้วยเครื่อง gas liquid chromatography ตามวิธีการที่กำหนดโดย Microbial Identification System (MIDI) Sherlock เวอร์ชัน 6.0 โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล TSBA6 database ของ MIDI ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์แบคทีเรียจะถูกรายงานออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันแต่ละชนิดต่อกรดไขมันทั้งหมดที่เซลล์แบคทีเรียสร้างได้

3.4 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml ทำการฆ่าเชื้อภายในอาหารด้วยการใช้ความร้อนขั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเชื้อซึ่งผ่านการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วมาเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีใส่ลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ใส่ลงในขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยให้ อาหารแข็งตัว เพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเชื้อซึ่งผ่านการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วมาเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีมาลากลงไปบนผิวหน้าของอาหาร nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20, 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงแล้วตรวจสอบการ เจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหน้าของอาหาร

3.6 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่มีค่า pH ต่างได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml ทำการฆ่าเชื้อภายในอาหารด้วยการใช้ความร้อนขึ้นที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเชื้อซึ่งผ่านการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วมาเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีใส่ลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.7 การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยแบคทีเรีย

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเชื้อซึ่งผ่านการเผาไฟจนร้อนแดง แล้วมาเชื้อเชื้อแบคทีเรียลงไปบนกระຈกสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลง ไปที่เชื้อแบคทีเรียแล้วสังเกตปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อะไมเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยแบคทีเรียที่ สร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดฟองอากาศขึ้นมา

3.8 การศึกษาการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห้วงเชื้อซึ่งผ่านการเผาไฟจนร้อนแดง แล้วมาเชื้อเชื้อใส่ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar ที่มีส่วนผสมของแป้ง แล้วเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนลงไปให้ท่วมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงของสีของไอโอดีนเมื่อทำปฏิกิริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าหากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์อะไมเลส สารละลายไอโอดีนจะไม่เปลี่ยนสี และถ้าหากแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับแป้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

3.9 การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยเตรียม nutrient semi-solid agar แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง นำอาหารไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแล้วแทงลงไป ในอาหาร nutrient semi-solid agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยสังเกตจากรอยการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญของเชื้อแผ่ออกไปจากบริเวณที่เข็มแทงลงไป ในอาหาร

3.10 การเตรียมสารละลายเชื้อเพื่อทดสอบการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้หัวเข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรียขูดเอาเซลล์ออกมาใส่ลงในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 3 ml แล้วนำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex สารละลายเชื้อที่ได้จะถูกปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐาน McFarland หมายเลข 4 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเชื้อปริมาณ 1 ml ใส่ลงในอาหาร API 50 CHB/E medium ซึ่งมีสีแดงแล้วผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปใช้ทดสอบกับแผ่นทดสอบชุด API 50CH

3.11 การทดสอบการสร้างกรดด้วยชุดทดสอบ API 50CH

เตรียมภาตใส่แผ่นทดสอบโดยใส่น้ำกลั่นลงไป ในหลุมให้ครบ แกะเอาแผ่นทดสอบ API 50 CH ออกมาใช้พาสเจอร์ปีเปตดูดสารละลายเชื้อที่ผสมกับอาหารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในช่องของแผ่นทดสอบ API 50 CH โดยใช้ปลายปีเปตแตะที่ด้านข้างของช่องแล้วค่อยๆ ปล่อยสารละลายเชื้อลงไปโดยระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศและเติมให้เต็มช่องแต่ไม่ล้นออกมาที่บริเวณหลุม เมื่อเติมสารละลายครบทุกช่องแล้วใส่แผ่นทดสอบลงไป ในภาตจากนั้นปิดฝาเพื่อป้องกันน้ำระเหย นำชุดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเชื้อโดยถ้าหากแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการสร้างกรดได้ สารละลายเชื้อจะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าหากแบคทีเรียไม่สามารถสร้างกรดได้ สารละลายเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี

3.12 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี lyophilization

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร nutrient agar จากนั้นเตรียมสารละลาย skim milk ความเข้มข้น 10% และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อใช้เป็น lyophilization medium จากนั้นขูดเอาเชื้อแบคทีเรียมาละลายในสารละลาย skim milk ปริมาตร 2 ml ทำการผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดสารละลายเชื้อปริมาณประมาณ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 มว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

μl ใส่ลงในหลอดเก็บเชื้อขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ใน ethanol ความเข้มข้น 95% ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายเชื้อแข็งตัวดีแล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง lyophilizer เพื่อทำให้เซลล์แห้งในสภาพสุญญากาศและอุณหภูมิต่ำ เมื่อสารละลายแห้งแล้วปิดหลอดโดยการใช้ไฟความร้อนสูงหลอมหลอดแก้ว และเก็บหลอดแก้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
แม้ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย

แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 ถูกนำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* โดยนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วยวิธี multiple alignment ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึง (% similarity) เท่ากับ 96.6% นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ยังมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุลนี้ด้วย ได้แก่ *Pedobacter daechungensis* Dae13^T (93.1%), *Pedobacter luteus* N7d-4^T (93%), *Pedobacter roseus* CL-GP80^T (92.8%), *Pedobacter ruber* W1^T (92.7%) และ *Pedobacter lentus* DS-40^T (92.6%) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยวิธี multiple alignment ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ต่อไปเพื่อสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม (clade) เดียวกันกับ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T ผลการวิเคราะห์นี้มีความน่าเชื่อถือทางสถิติสูงเนื่องจากค่า bootstrap value มีค่าเท่ากับ 100% จากการทำซ้ำทั้งหมด 1,000 ครั้ง (ภาพที่ 4.1) นอกจากนี้การวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum parsimony (ภาพที่ 4.2) และ maximum likelihood (ภาพที่ 4.3) ก็ให้ผลสอดคล้องกับวิธี neighbor-joining เช่นเดียวกัน โดยค่า bootstrap value มีค่าเท่ากับ 100% และ 99% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree นี้สอดคล้องตรงกันกับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีความคล้ายคลึงกับ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันนี้ยืนยันว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 นั้นน่าที่จะเป็นสมาชิกในสกุล *Pedobacter* จริงและมีแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการมากที่สุด

ภาพที่ 4.1 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 กับแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining เครื่องหมายดอกจัน (*) บนแผนภูมิแสดงถึงผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood และ maximum-parsimony เครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัสบนแผนภูมิแสดงถึงผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับการแทนที่บนดีเอ็นเอ 0.02 นิวคลีโอไทด์



เอกสาร
 ม่ว่ากา
 เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 | ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 90 *Pedobacter nyackensis* NWG-III4^T (EU030686)
- 48 *Pedobacter trunci* THG-DN3.19^T (KM035944)
- Pedobacter heparinus* DSM 2366^T (CP001681)
- Pedobacter nutrimenti* J22^T (HF536497)
- Pedobacter panacterrae* Gsoil 042^T (AB245368)
- Pedobacter metabolipauper* WB2.3-71^T (AM491370)
- Pedobacter africanus* DSM 12126^T (AJ438171)
- Pedobacter duraquae* WB2.1-25^T (AM491368)
- Pedobacter caeni* LMG 22862^T (AJ786798)
- 86 *Pedobacter steynii* WB2.3-45^T (AM491372)
- 68 *Pedobacter ginsengisoli* Gsoil 104^T (AB245371)
- 99 *Pedobacter antarcticus* ATCC 51969^T (HM448033)
- Pedobacter piscium* DSM 11725^T (AJ438174)
- 98 *Pedobacter westerhofensis* WB3.3-22^T (AM491369)
- 75 *Pedobacter hartoni* WB3.3-3^T (AM491371)
- Pedobacter cryocometis* DSM 14825^T (AJ438170)
- Pedobacter himalayensis* HHS22^T (AJ583425)
- Pedobacter boryungensis* BR-9^T (HM640986)
- 99 *Pedobacter daejeonensis* THG-DN3.18^T (KM035945)
- Pedobacter insulae* DS-139^T (EF100697)
- Pedobacter koreensis* WPCB189^T (DQ092871)
- Pedobacter glaciatis* 8-24^T (KC569795)
- Pedobacter lotislagmi* THG-DN6.8^T (KM035962)
- Pedobacter ureilyncis* THG-T11^T (KF532135)
- 99 *Pedobacter sixisoli* S27^T (KJ150595)
- Pedobacter rhizosphaerae* 01-96^T (AM279214)
- 90 *Pedobacter aquatilis* AR107^T (AM114396)
- 94 *Pedobacter jejuensis* THG-DR3^T (KC252614)
- Pedobacter ginsengiterrae* DCY49^T (HM776704)
- 83 *Pedobacter kyangheensis* THG-T17^T (JN196132)
- Pedobacter sahi* 15-51^T (AM279215)
- 84 *Pedobacter alluvionis* NWER-III1^T (EU030688)
- 70 *Pedobacter roseus* CL-GP80^T (DQ112353)
- Pedobacter agri* PB92^T (EF660751)
- 51 *Pedobacter suwonensis* 15-52^T (DQ097274)
- 52 *Pedobacter terrae* DS-57^T (DQ889723)
- Pedobacter sundarakimus* DS-27^T (DQ235228)
- Pedobacter borealis* G-1^T (EU030687)
- 87 *Pedobacter ginsengsidimiam* THG-45^T (GU138374)
- Pedobacter huijiaensis* BZ42^T (GQ161990)
- 99 ***Pedobacter* sp. 1017**
- Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T (GU198945)
- Pedobacter oryzae* N7^T (EU109726)
- 96 *Pedobacter huanghensis* M1-27^T (KC569794)
- 86 *Pedobacter luteus* N7d-4^T (FJ377314)
- 83 *Pedobacter composti* TR6-06^T (AB267720)
- 65 *Pedobacter ruber* W1^T (HQ882803)
- Pedobacter saltans* DSM 12145^T (CP002545)
- Pedobacter arcticus* NRRL-B-59457^T (HM051286)
- Pedobacter rivuli* HME8457^T (JQ911707)
- Pedobacter sylvitoris* W-WS1^T (KM229740)
- Pedobacter daechungensis* Dae 13^T (AB267722)
- 59 *Pedobacter lentus* DS-40^T (EF446146)
- 56 *Pedobacter terricola* DS-45^T (EF446147)
- Pedobacter glucosidilyncis* DSM 23534^T (EU585748)
- Pedobacter pitutosus* MIC2002^T (JX978785)
- Balneola vulgaris* DSM 17893^T (AY576749)

0.050

ารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 , อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 กับแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับ การแทนที่บนดีเอ็นเอ 0.05 นิวคลีโอไทด์



วนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 81 *Pedobacter composti* TR6-06¹ (AB267720)
- 89 *Pedobacter ruber* W1¹ (HQ882803)
- 87 *Pedobacter luteus* N7d-4¹ (FJ377314)
- 98 *Pedobacter huanghensis* M1-27¹ (KC569794)
- Pedobacter oryzae* N7¹ (EU109726)
- Pedobacter* sp. 1017**
- 100 *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10¹ (GU198945)
- Pedobacter bauzanensis* BZ42¹ (GQ161990)
- Pedobacter pinutosus* MIC2002¹ (JX978785)
- 52 *Balneola vulgaris* DSM 17893¹ (AY576749)
- Pedobacter glucosidilyncus* DSM 23534¹ (EU585748)
- Pedobacter arcticus* NRRL-B-59457¹ (HM051286)
- Pedobacter saltans* DSM 12145¹ (CP002545)
- Pedobacter rivuli* HME8457¹ (JQ911707)
- Pedobacter sylvitioris* W-WS1¹ (KM229740)
- Pedobacter daechungensis* Dae 13¹ (AB267722)
- Pedobacter lentus* DS-40¹ (EF446146)
- Pedobacter terricola* DS-45¹ (EF446147)
- 90 *Pedobacter aquatilis* AR107¹ (AM114396)
- 96 *Pedobacter jejuensis* THG-DR3¹ (KC252614)
- Pedobacter ginsengiterrae* DCY49¹ (HM776704)
- Pedobacter rhizosphaerae* 01-96¹ (AM279214)
- 89 *Pedobacter suwonensis* 15-52¹ (DQ097274)
- Pedobacter terrae* DS-57¹ (DQ889723)
- 89 *Pedobacter kyungheensis* THG-T17¹ (JN196132)
- Pedobacter soli* 15-51¹ (AM279215)
- Pedobacter sundarakimus* DS-27¹ (DQ235228)
- Pedobacter agri* PB92¹ (EF660751)
- 81 *Pedobacter alluvionis* NWER-II11¹ (EU030688)
- Pedobacter roseus* CL-GP80¹ (DQ112353)
- Pedobacter borealis* G-1¹ (EU030687)
- 81 *Pedobacter ginsenosidimitans* THG-45¹ (GU138374)
- Pedobacter glacialis* 8-24¹ (KC569795)
- 50 *Pedobacter kareensis* WPCB189¹ (DQ092871)
- Pedobacter lonstagni* THG-DN6.8¹ (KM035962)
- Pedobacter insulae* DS-139¹ (EF100697)
- 99 *Pedobacter boryungensis* BR-9¹ (HM640986)
- Pedobacter daejeonensis* THG-DN3.18¹ (KM035945)
- 63 *Pedobacter cryoconitus* DSM 14825¹ (AJ438170)
- 83 *Pedobacter himalayensis* HHS22¹ (AJ583425)
- Pedobacter hartoni* WB3.3-3¹ (AM491371)
- 98 *Pedobacter westerhofensis* WB3.3-22¹ (AM491369)
- Pedobacter antarcticus* ATCC 51969¹ (HM448033)
- 100 *Pedobacter piscium* DSM 11725¹ (AJ438174)
- 96 *Pedobacter caeni* LMG 22862¹ (AJ786798)
- Pedobacter steynii* WB2.3-45¹ (AM491372)
- Pedobacter duraquae* WB2.1-25¹ (AM491368)
- Pedobacter africanus* DSM 12126¹ (AJ438171)
- Pedobacter metabolipauper* WB2.3-71¹ (AM491370)
- Pedobacter nutrimenti* J22¹ (HF536497)
- Pedobacter ginsengisoli* Gsoil 104¹ (AB245371)
- Pedobacter panacterrae* Gsoil 042¹ (AB245368)
- Pedobacter heparinus* DSM 2366¹ (CP001681)
- 72 *Pedobacter nyackensis* NWG-II14¹ (EU030686)
- 97 *Pedobacter iranci* THG-DN3.19¹ (KM035944)
- Pedobacter urectylicus* THG-T11¹ (KF532135)
- 98 *Pedobacter xixisoli* S27¹ (KJ150595)

การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

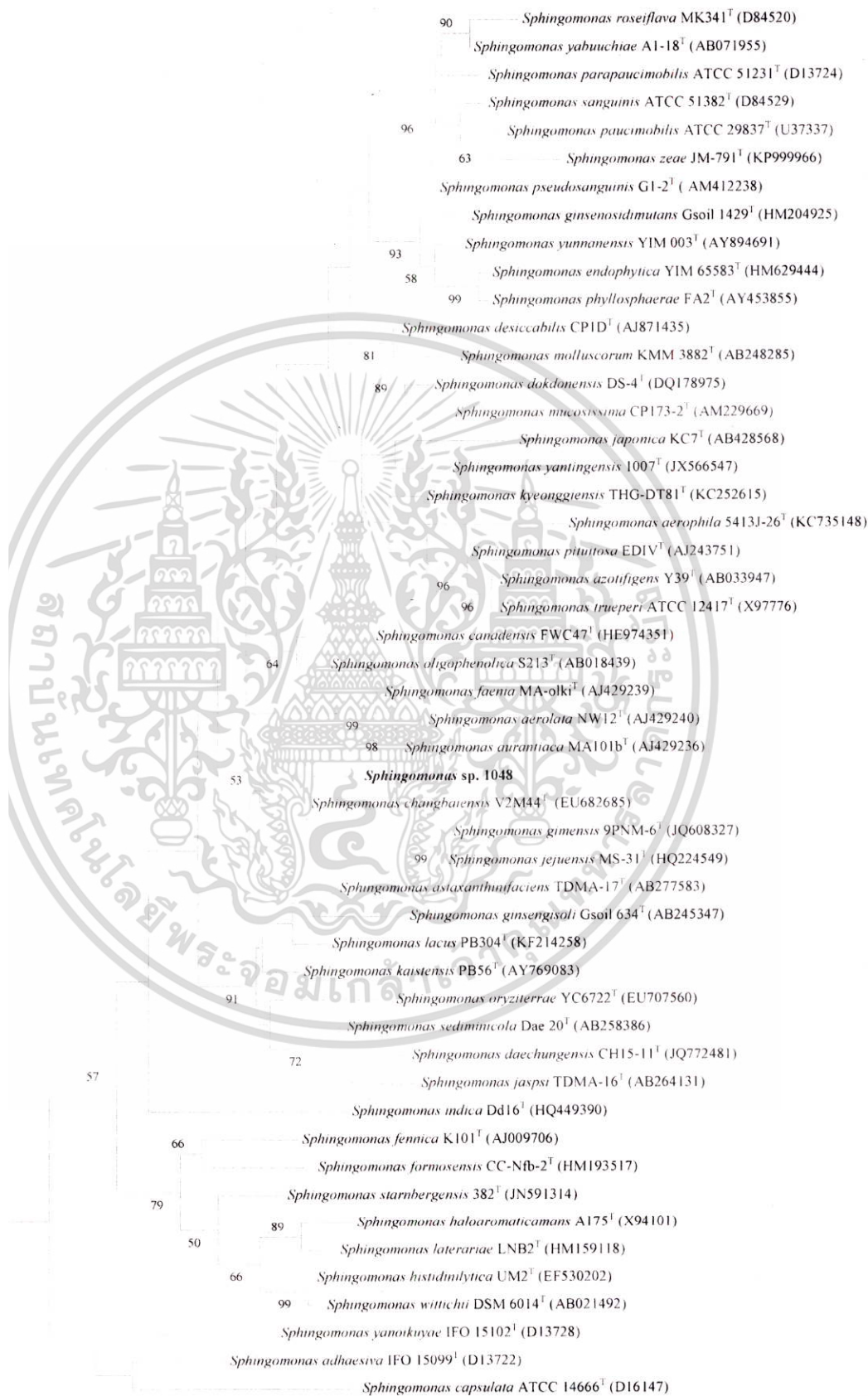
ภาพที่ 4.3 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 กับแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น

ผลการวิเคราะห์ multiple alignment ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Sphingomonas* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 97.4% นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ยังมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุลนี้ด้วย ได้แก่ *Sphingomonas canadensis* FWC47^T (97.2%), *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T (97.0%), *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T (96.7%), *Sphingomonas azotifigens* Y39^T (96.7%) และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T (96.7%) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยวิธี multiple alignment ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ต่อไปเพื่อสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม (clade) เดียวกันกับ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T ผลการวิเคราะห์นี้มีความน่าเชื่อถือทางสถิติเนื่องจากค่า bootstrap value มีค่าเท่ากับ 70% จากการทำซ้ำทั้งหมด 1,000 ครั้ง (ภาพที่ 4.4) นอกจากนี้การวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum parsimony (ภาพที่ 4.5) และ maximum likelihood (ภาพที่ 4.6) ก็ให้ผลสอดคล้องกับวิธี neighbor-joining เช่นเดียวกัน โดยค่า bootstrap value มีค่าเท่ากับ 53% และ 39% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree นี้สอดคล้องตรงกันกับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีค่าความคล้ายคลึงกับ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุด ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันนี้ยืนยันว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 นั้นน่าที่จะเป็นสมาชิกในสกุล *Pedobacter* จริงและมีแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการมากที่สุด

ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 กับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining เครื่องหมายดอกจัน (*) บนแผนภูมิแสดงถึงผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood และ maximum-parsimony เครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัสบนแผนภูมิแสดงถึงผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับเกณฑ์บนที่บนดีเอ็นเอ 0.02 นิวคลีโอไทด์



ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Acetobacter aceti DSM3508^T (X74066)

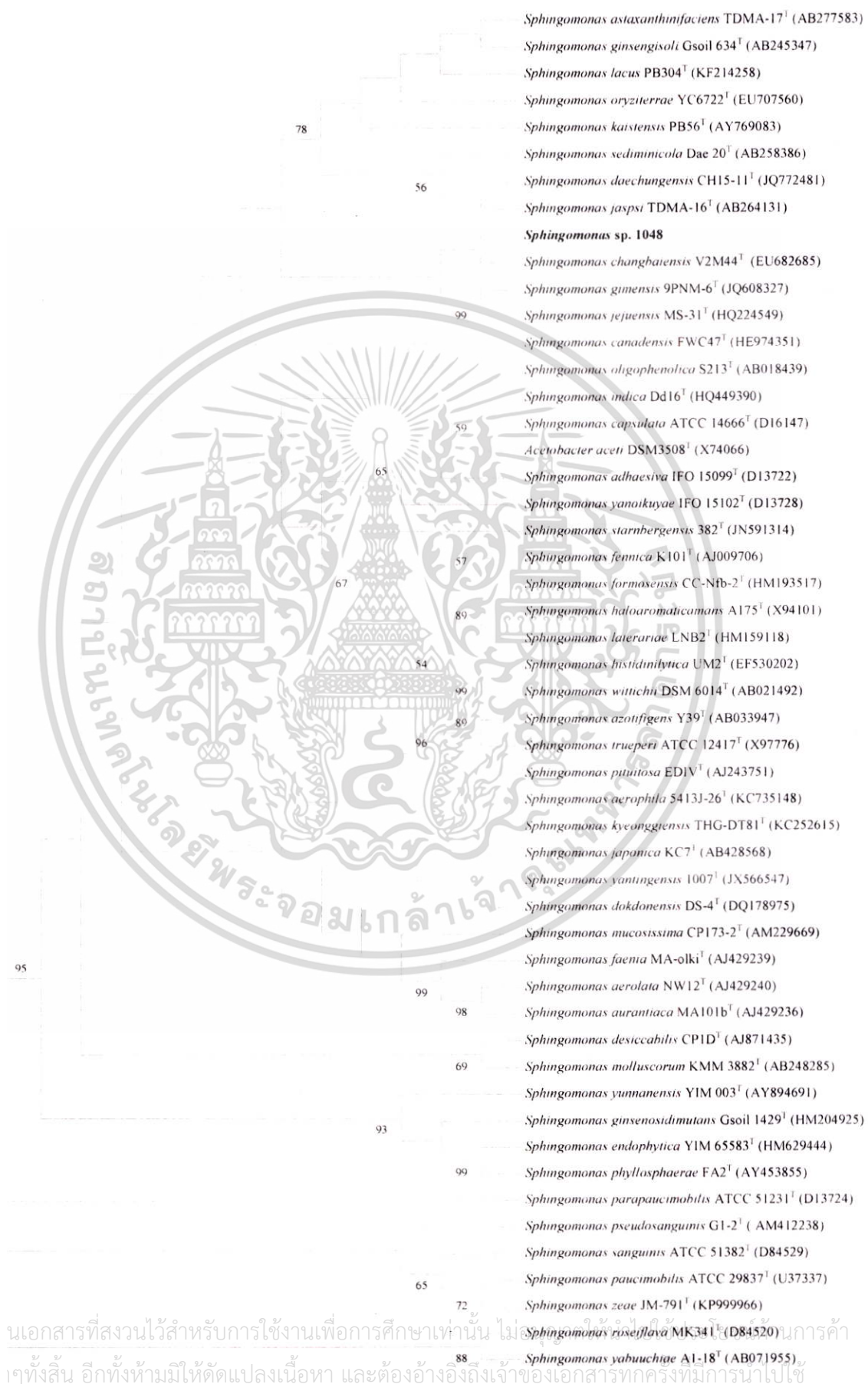
ารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ัน อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.5 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 กับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับการแทนที่บนดีเอ็นเอ 0.02 นิวคลีโอไทด์



เอกสาร
ไม่ว่า

กสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
งสินค้า อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุยู่การดัดแปลงหรือการนำ
 ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 กับแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ค่า bootstrap values แสดงไว้ตรงด้านบนของกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียบนแผนภูมิ โดยแสดงเพียงค่า bootstrap value ที่มีค่ามากกว่า 50% เท่านั้น

4.2 การวิเคราะห์ cellular fatty acid ในแบคทีเรีย

เซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อนำมาสกัด cellular fatty acid ภายในเซลล์ ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ cellular fatty acid ต่างๆ พบว่า cellular fatty acid ชนิดที่มีปริมาณสูงกว่า 10% ในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ได้แก่ iso-C_{15:0} (56.1%), C_{16:1} ω6c และ/หรือ C_{16:1} ω7c (14.3%) และ iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%) กรดไขมันที่พบในปริมาณปานกลาง (ร้อยละ 5 – 10) ได้แก่ summed feature 9 (iso-C_{17:1} ω9c และ/หรือ 10-methyl C_{16:0}; 5.0%) ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ทั้งหมดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ในส่วนของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 นั้นพบว่าภายในเซลล์มี cellular fatty acid ที่อยู่ในปริมาณสูงกว่า 10% ได้แก่ summed feature 8 (C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c; 66.0%) และ C_{16:0} (10.1%) ชนิดที่มีปริมาณอยู่ระหว่าง 5%-10% ได้แก่ C_{14:0} 2-OH (6.5 %) ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ทั้งหมดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017

Fatty acids	ปริมาณที่พบ (%)
Saturated	
C _{12:0}	0.4
C _{14:0}	0.3
C _{16:0}	2.2
C _{17:0}	0.1
C _{18:0}	0.7
Unsaturated	
C _{15:1} ω6c	0.6
C _{17:1} ω8c	0.2
C _{18:1} ω9c	0.4

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fatty acids	ปริมาณที่พบ (%)
Branched	
iso-C _{11:0}	0.1
iso-C _{13:0}	0.2
iso-C _{15:0}	56.1
iso-C _{16:0}	0.1
iso-C _{17:0}	0.8
iso-C _{15:1} F	0.2
anteiso-C _{14:0}	0.1
anteiso-C _{15:0}	0.4
anteiso-C _{16:0}	0.1
anteiso-C _{17:0}	0.1
Hydroxylated	
C _{15:0} 2OH	0.2
C _{16:0} 2OH	0.2
C _{16:0} 3OH	0.3
iso-C _{15:0} 3OH	3.0
iso-C _{16:0} 3OH	0.2
iso-C _{17:0} 3OH	12.0
Summed Feature	
Summed Feature 1	0.5
Summed Feature 2	0.1
Summed Feature 3	14.3
Summed Feature 4	0.7
Summed Feature 5	0.1
Summed Feature 8	0.5
Summed Feature 9	5.0

หมายเหตุ summed feature 1 ประกอบด้วย iso-C_{15:1} และ/หรือ C_{13:0} 3OH, summed feature 2 ประกอบด้วย C_{12:0} aldehyde, iso-C_{16:1} I และ/หรือ C_{14:0} 3-OH และ/หรือ unidentified fatty acid, summed feature 3 ประกอบด้วย C_{16:1} ω7c และ/หรือ C_{16:1} ω6c, summed feature 4 ประกอบด้วย iso-C_{17:1} I และ/หรือ anteiso B, summed feature 5 ประกอบด้วย anteiso C_{18:0} และ/หรือ C_{18:2} ω6,9c, summed feature 8 ประกอบด้วย C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c, summed feature 9 ประกอบด้วย C_{16:0} 10-methyl และ/หรือ C_{17:1} iso ω9c

รับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ัดดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048

Fatty acids	ปริมาณที่พบ (%)
Saturated	
C _{12:0}	0.4
C _{14:0}	0.6
C _{16:0}	10.1
C _{17:0}	0.5
C _{18:0}	2.1
Unsaturated	
C _{16:1} ω5c	0.7
C _{17:1} ω6c	3.9
C _{17:1} ω8c	0.5
C _{18:1} ω5c	3.7
Branched	
iso-C _{14:0}	0.4
iso-C _{16:0}	0.7
iso-C _{19:0}	0.3
anteiso-C _{15:0}	0.3
anteiso-C _{17:0}	0.2
anteiso-C _{17:1} A	0.6
Hydroxylated	
C _{14:0} 2OH	6.5
C _{15:0} 2OH	0.7
C _{16:0} 2OH	0.4
Summed Feature*	
Summed Feature 3	0.5
Summed Feature 8	66.9
C _{18:0} 10-methyl	0.2

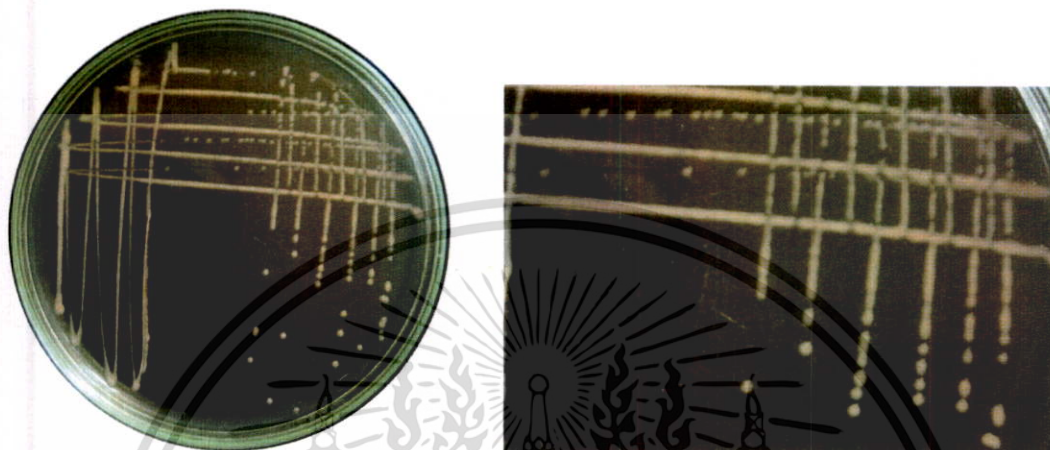
หมายเหตุ summed feature 3 ประกอบด้วย C_{16:1} ω7c และ/หรือ C_{16:1} ω6c และ summed feature 8 ประกอบด้วย C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c

4.3 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย

ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 คือเซลล์ย้อมติดสีแบบแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 ที่เจริญบนอาหาร NA มีสีชมพู โปร่งแสง ผิวหน้ามันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน (รูปที่ 4.7) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42

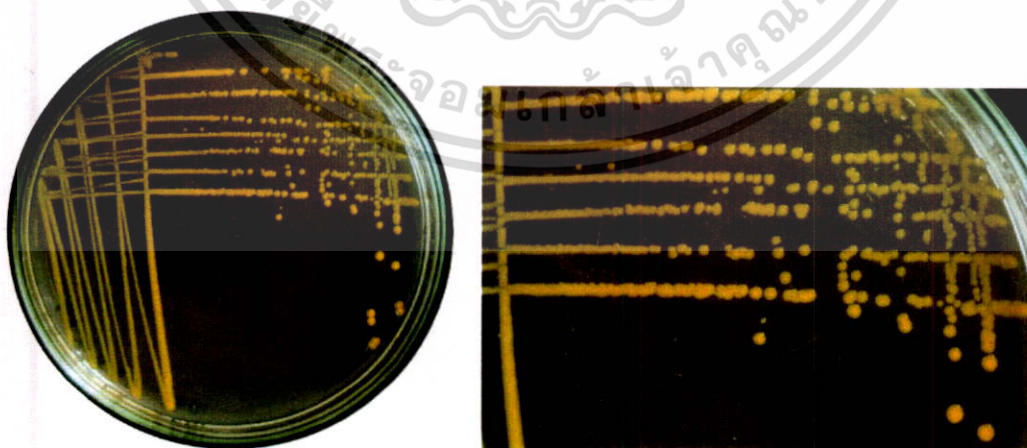
เรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ้ลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 6-10 และที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-2% ในอาหารเหลว NB สถานะการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-1%



ภาพที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ได้แก่ เซลล์ย้อมติดสีแบบแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ที่เจริญบนอาหาร NA มีสีเหลือง ทึบแสง ผิวหน้ำมันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน (ภาพที่ 4.8) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 5-10 และที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% ในอาหารเหลว NB สถานะการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-0.5%



ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1048 บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

งานนี้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและอะไมเลส

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและอะไมเลสในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ให้ผลบวกกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสคือเกิดฟองอากาศขึ้นเมื่อหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงไปบนโคโลนีของแบคทีเรีย และให้ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสเป็นลบคือเมื่อหยดน้ำยาไอโอดีนลงบนอาหารแล้วอาหารที่อยู่โดยรอบโคโลนีของแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ในส่วนของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ให้ผลลบกับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและอะไมเลส

4.5 การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50CH โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 สร้างกรดได้จาก D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, methyl- α D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, inulin, D-raffinose, amidon (starch), glycogen, gentiobiose, D-turanose, L-fucose และไม่สามารถสร้างกรดได้จาก glycerol, erythritol, L-xylose, D-adonitol, methyl- β D-xylopyranoside, L-sorbose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- α D-mannopyranoside, D-melezitose, xylitol, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate, potassium 5-ketogluconate ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 สามารถสร้างกรดได้จาก glycerol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, L-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, methyl- α D-mannopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-melibiose, D-trehalose, D-melezitose, amidon (starch), D-fucose, potassium 5-ketogluconate และไม่สามารถสร้างกรดได้จาก erythritol, D-xylose, D-adonitol, methyl- β D-xylopyranoside, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- α D-glucopyranoside, D-lactose (bovine origin), D-saccharose (sucrose), inulin, D-raffinose, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 โดยการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย 1017 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T โดยมีค่าเท่ากับ 96.6% และแผนภูมิ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T มากที่สุดด้วย ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 นั้นเป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* โดยค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 97.4% เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T และแผนภูมิ phylogenetic tree ก็ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีตำแหน่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ cellular fatty acid ในแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มี cellular fatty acid ชนิด iso-C_{15:0} (56.1%), C_{16:1} ω6c และ/หรือ C_{16:1} ω7c (14.3%) และ iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%) มากที่สุดภายในเซลล์ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มี cellular fatty acid ชนิดที่มีปริมาณสูงได้แก่ summed feature 8 (C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c; 66.0%) และ C_{16:0} (10.1%)

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 พบว่าเซลล์แบคทีเรียเป็นแบบแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนิบนอาหาร NA มีสีชมพู แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสแต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 คือเซลล์เป็นแบบแกรมลบ ท่อนสั้นไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนิบนอาหาร NA มีสีเหลือง แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสและอะไมเลส

การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างกรดได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 27 ชนิด ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 สร้างกรดได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 24 ชนิด

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 และ 1048 กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ตลอดจนลักษณะทางฟีโนไทป์และคีโมไทป์ต่างๆ เบื้องต้นของแบคทีเรีย เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่อย่างแท้จริงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางคีโมไทป์อื่นๆ เพิ่มเติมเช่น polar lipid, G+C content, ชนิดของ quinone ที่พบในเซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องนำแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงทางวิวัฒนาการมาศึกษาลักษณะทั้งหมดเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 1017 และ 1048 ต่อไปด้วย

การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
เปล่งเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การนำเสนอผลงานด้วยวาจาเรื่อง “Diversity and plant-growth-promoting activities of endophytic bacteria from rice” ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 14th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology” วันที่ 6-9 พฤศจิกายน 2559 ณ เมือง Saint-Petersburg, Pushkin, Russian Federation



Biodiversity and plant-growth-promoting activities of endophytic bacteria from rice
(*Oryza sativa*)

Wilasinee Raweekul¹, Sukrita Wuttitummaporn¹, Wannudee Sodchuen¹
and Chokchai Kittiwongwattana^{1,2*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Bangkok, Thailand

²Actinobacteria research unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang Bangkok, Thailand

Abstract

Endophytic bacteria are defined as bacteria that colonize internal tissues of plants without causing diseases to the plant host. Research on endophytic bacteria has been focused on two particular topics on the diversity as well as their positive effects towards plant growth. Plant internal tissues represent a specialized environment that may affect the diversity of bacterial communities. Recently, my lab isolated and characterized 126 endophytic bacteria from rice plants that were grown in organic farms. Based on the analysis of partial sequences of the 16S rRNA gene, these bacteria were members in four different phyla and classified into 31 different genera. A distinction between the diversity of endophytic bacteria in roots and stems was observed. While *Firmicutes* was found dominant (66.7%) in the roots, *Proteobacteria* represents the majority (53.7%) in the stems. Additionally, the nearly complete sequences of the 16S rRNA gene and fatty acid profiling of isolates 1017 and 1048 suggested that they were potential candidates for novel bacterial species in genera *Pedobacter* and *Sphingomonas*, respectively. Their closest relatives were *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T (96.6% sequence similarity) and *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T (97.4%). For direct plant growth promotion, all endophytic bacteria were co-cultivated with rice seedlings for 16 days. The fresh weight of the seedlings that were inoculated with twelve bacterial isolates was at least two-fold higher than that of the water-treated control group. Various plant-growth-promoting traits were examined in these isolates. While seven isolates displayed at least one trait, the remaining isolates were tested negative for every trait. For the indirect effect on plant growth, 14 isolates displayed the antagonistic activities against either *Xanthomonas oryzae* or *Pyricularia grisea* while four isolates were able to inhibit the growth of both pathogens. However, only seven isolates were found effective in controlling the leaf blight and leaf blast diseases *in vivo*. All seven isolates produced protease whereas only one isolate was positive for chitinase. Taken together, the results obtained from this study signify the importance and potential of endophytic bacteria as biofertilizers and biocontrol agents.

*Corresponding author. E-mail address: chokchai.kt@kmitl.ac.th

เอกสารอ้างอิง

- Akeuchi, M., Sakane, T., Yanagi, M., Yamasato, K., Hamana, K. and Yokota A. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov., International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.45, pp.334-341, 1995.
- Beltrani, T., Chiavarini, S., Cicero, D.O., Grimaldi, M., Ruggeri, C., Tamburini, E. and Cremisini, C. Chemical characterization and surface properties of a new bioemulsifier produced by *Pedobacter* sp. strain MCC-Z, International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 72, pp.1090-1096, 2015.
- Du, J., Singh, H., Ngo, H.T., Won, K.H., Kim, K.Y. and Yi, T.H. *Pedobacter daejeonensis* sp. nov. and *Pedobacter trunci* sp. nov., isolated from an ancient tree trunk, and emended description of the genus *Pedobacter*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.65, pp.1241-1246, 2015.
- Neilsen, T.K., Kot, W., Sorensen, S.R. and Hansen, L.H. Draft genome sequence of MCPA-degrading *Sphingomonas* sp. strain ERG5, isolated from a groundwater aquifer in Denmark, Genome Announcements, Vol.3, doi:10.1128/genomeA.01529-14, 2015.
- Ngo, H.T., Kook, M. and Yi, T.H. *Pedobacter ureilyticus* sp. nov., isolated from tomato rhizosphere soil, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.65, pp.1008-1014, 2015.
- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K. and Saffer, J.D. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199, Journal of Bacteriology, Vol.181, pp.1585-1602, 1999.
- Sessitsch, A., Hardoimm, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D. and Reinhold-Hurek, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis, Molecular Plant Microbe Interaction, Vol.25, pp.28-36, 2012.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, Journal of Microbiological Methods, Vol.69, pp.330-339, 2007.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, Microbiology Today, Vol.33, pp.152-155, 2006.

- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis, *Microbial Ecology*, Vol.55, pp.415-424, 2008.
- Sun, Y., Liu, Y., Jiang, K., Wang, C., Wang, Z. and Huang, L. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of K-carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with K-carrageenase from *Pedobacter hainanensis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.19, pp.2398-2405, 2014.
- Větrovský, T. and Baldrian, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses, *PLoS One*, Vol.8, doi: 10.1371/journal.pone.0057923, 2013.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiology Reviews*, Vol.60, pp.407-438, 1996.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Truper, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol.37, pp.463-464, 1987.
- Yun, N.R., Shin, Y.K., Hwang, S.Y., Kuraishi, H., Sugiyama, J. and Kawahara, K. Chemotaxonomic and phylogenetic analyses of *Sphingomonas* strains isolated from ears of plants in the family Gramineae and a proposal of *Sphingomonas roseoflava* sp. nov., *Journal General and Applied Microbiology*, Vol.46, pp.9-18, 2000.
- Zhu, L., Si, M., Li, C., Xin, K., Chen, C., Shi, X., Huang, R., Zhao, L., Shen, X. and Zhang, L. *Sphingomonas gei* sp. nov., isolated from roots of *Geum aleppicum*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.65, pp.1160-1166, 2015.

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ	
1.1 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 1	42,500
1.2 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 2	7,500
1.3 ดอกเบี้ยรายรับ	67.14
รวม	50,067.14
2. ค่าใช้จ่าย	
2.1 ค่าวัสดุ	50,068.65
รวม	50,068.65

เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ingsin อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600
โทรสาร 0-329-8427
E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์	2546
วท.ม.	พันธุศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2548
Ph.D.	Plant Biology	Rutgers University, USA	2553

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมการศึกษ) ระบุสาขาวิชาการ
พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและ
เชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพืชมดเอนเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จาก
จุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์
Lemnaceae (1 กุมภาพันธ์ 2555 - 31 มกราคม 2557; กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

-การศึกษาการผลิตเฮทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* (1 ตุลาคม 2555 - 30
กันยายน 2556; ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

เอกสารที่ส่งจนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., Maliga, P. (2007) Plastid marker gene excision by the phi C31 phage sitespecific recombinase. *Plant Molecular Biology*. 64: 137-143

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาเอก

Kittiwongwattana C. and Vuttipongchaikij S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata*. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 7: 60-69. (impact factor = 0.456)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweed (*Lemna aequinoctialis*). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). Biodiversity assessment of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). *Proceedings of the 3rd International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST)*. (Accepted)

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2014). *Rhizobium lemoe* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

3.4 งานวิจัย:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ก.พ. 2555 - 31 ม.ค. 2557

-การศึกษการผลิตเอทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556