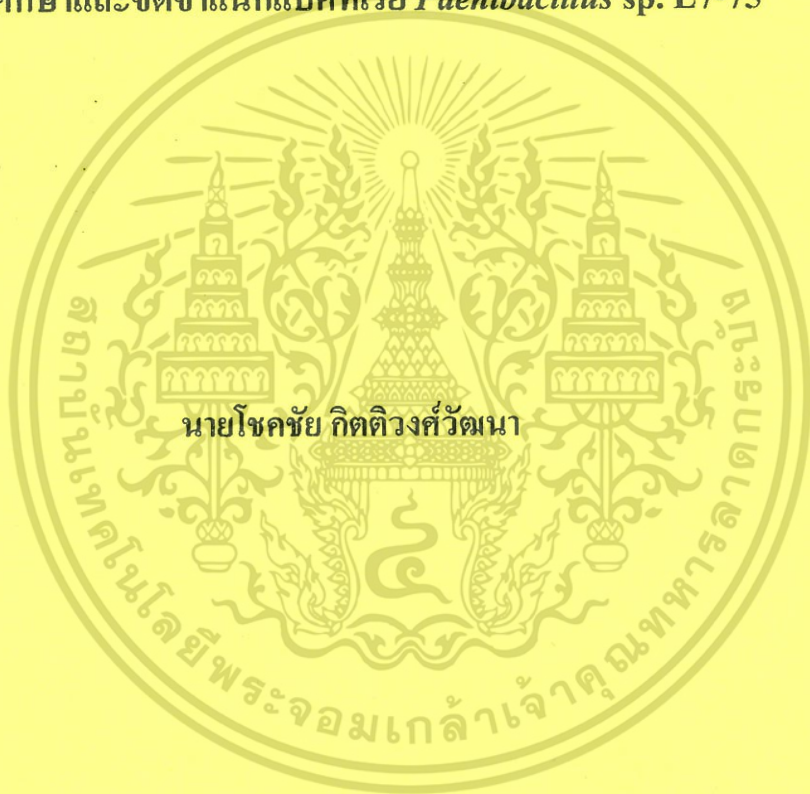




รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาและจัดจำแนกแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75



นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาและจัดจำแนกแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

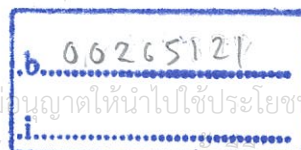
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

EResearch

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 142084

รับ.เค.ค.บ.ปี 21 ส.ค.ย. 2559



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
หากมีให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
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.....	6
3.1 การสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA.....	6
3.2 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA.....	6
3.3 การศึกษา multiple alignment.....	6
3.4 การศึกษา polar lipids.....	7
3.5 การศึกษา cellular fatty acid.....	7
3.6 การศึกษาองค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอ (G+C content).....	7
3.4 การวิเคราะห์ DNA-DNA relatedness.....	8
3.5 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์.....	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	10
4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA.....	10
4.2 การทำ Multiple alignment analysis.....	10
4.3 การวิเคราะห์ polar lipids.....	17
4.4 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของดีเอ็นเอ (G+C content).....	19
4.6 การวิเคราะห์ค่า DNA-DNA relatedness.....	19
4.7 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย <i>Paenibacillus</i> sp. L7-75.....	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	21
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	21
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	21
เอกสารอ้างอิง.....	22
ภาคผนวก.....	24
บทความวิจัยเรื่อง <i>Paenibacillus lemnae</i> sp. nov., an endophytic bacterium of duckweed (<i>Lemna aequinoctialis</i>).....	25
ประวัตินักวิจัย.....	31



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

4.1

18



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	11
4.2	12
4.3	14
4.4	16
4.5	17
4.6	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาและจัดจำแนกแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงษ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย endophytes คือแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้รับการศึกษาเบื้องต้นแล้วว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ในการวิจัยครั้งนี้แบคทีเรีย endophytes จำนวน 19 ไอโซเลตที่ถูกแยกจากเนื้อเยื่อของพืช *Landoltia punctata* และจำนวน 17 ไอโซเลตที่ถูกแยกจากพืช *Lemna aequinoctialis* ถูกนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่สามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้ และเมื่อเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียทั้ง 21 ไอโซเลตสร้างขึ้นพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ที่แยกได้จากพืช *L. punctata* มีระดับการสร้างฮอร์โมนที่สูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ โดยสร้างฮอร์โมน IAA ได้มากถึง $79.9 \pm 8.52 \mu\text{g/ml}$ และเมื่อนำดินอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ก็พบว่าต้นข้าวมีความสูงของลำต้น น้ำหนักสดของลำต้น และน้ำหนักสดของรากสูงกว่าต้นข้าวในกลุ่มควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นเท่ากับ 1.12, 1.17 และ 1.28 เท่าตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ซึ่งแยกได้จาก *L. punctata* นั้นสามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในดินอ่อนของข้าวได้

คำสำคัญ : *Landoltia punctata*, *Lemna aequinoctialis*, endophytes, ข้าว, indole-3-acetic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Study and characterization of *Paenibacillus* sp. L7-75

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

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

ABSTRACT

Endophytic bacteria colonize the internal tissues of a plant host without causing symptoms or damages. This group of bacteria is also recognized for their plant growth promotion. In the present study, the production of the plant hormone indole-3-acetic acid (IAA) of 19 and 17 isolates of endophytic bacteria isolated from *Landoltia punctata* and *Lemna aequinoctialis*, respectively, were examined. The result showed that 21 isolates were able to produce IAA. The levels of IAA production in these bacteria were also measured. The highest level of IAA ($79.9 \pm 8.52 \mu\text{g/ml}$) was observed in the culture medium of *Bacillus* sp. L1-14 that was isolated from *L. punctata*. Rice seedlings that were inoculated with *Bacillus* sp. L1-14 displayed the increase in stem length, shoot fresh weight and root fresh weight when compared to that of the control group that was inoculated with distilled water. Average stem length, shoot fresh weight and root fresh weight of the inoculated group were 1.12, 1.17 and 1.28 times higher than the control group. This result showed that the best IAA producer *Bacillus* sp. L1-14 was able to promote growth in rice seedlings.

Keywords : *Landoltia punctata*, *Lemna aequinoctialis*, endophytes, rice, indole-3-acetic acid

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยจัดอยู่ในตำแหน่งที่ตั้งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในระดับสูงของโลก ดังนั้นแล้วจึงมีสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแบคทีเรียเป็นจำนวนมากที่ยังรอการค้นพบ ศึกษา และจัดจำแนก การศึกษาเบื้องต้นและเชิงลึกที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่ยังไม่เป็นที่รู้จักจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่นการผลิตสารประกอบ secondary metabolites ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ดังนั้นแล้วเราจึงสามารถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้นับเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อประเทศและควรได้รับการศึกษาอย่างละเอียด ผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในแหวน 2 ชนิดคือ *Lemna aequinoctialis* และ *Landoltia punctata* โดยงานวิจัยดังกล่าวมุ่งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยหนึ่งในผลลัพท์ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้คือแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 ที่จัดอยู่ในสกุล *Paenibacillus* ข้อมูลในระดับโมเลกุลคือลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าแบคทีเรียไอโซเลทนี้เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ของสกุล *Paenibacillus* ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาลักษณะและรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเพื่อยืนยันข้อสมมติฐานข้างต้น โดยงานวิจัยชิ้นนี้จะครอบคลุมการศึกษาลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 ตั้งแต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี ลักษณะทางเคมี ลักษณะในระดับโมเลกุล ตลอดจนเปรียบเทียบกับแบคทีเรียในสกุลเดียวกันที่มีความใกล้เคียงกันเพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่อย่างแท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี ลักษณะทางเคมี ลักษณะในระดับ โมเลกุล ของแบคทีเรียไอโซเลท L7-75
- 1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 กับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Paenibacillus* และยืนยันการเป็นสปีชีส์ใหม่ของแบคทีเรียไอโซเลท L7-75

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้จะครอบคลุมการศึกษาแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 ในแง่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี ลักษณะทางเคมี ลักษณะในระดับ โมเลกุล รวมไปถึงการเปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะต่างๆ ข้างต้นของแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 กับแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus* ที่มีความใกล้เคียงกันเพื่อ ยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลท L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

1.4.2 การศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 กับฐานข้อมูล

1.4.3 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางพีโนไทป์และคีโมไทป์ต่างๆ ระหว่างแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกัน

1.4.4 การศึกษาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอระหว่างแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกัน

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ โดยอาศัยลักษณะทางพีโนไทป์ คีโมไทป์ และลำดับเบสของยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงลักษณะทางพีโนไทป์ คีโมไทป์ และลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ซึ่งจะช่วยในการยืนยันความเป็นสปีชีส์ใหม่ของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Paenibacillus เป็นชื่อสกุลของแบคทีเรียที่ถูกนำเสนอขึ้นมาโดย Ash *et al.* (1993) ในเบื้องต้นมีแบคทีเรียทั้งหมด 11 สปีชีส์ในสกุล *Bacillus* ที่ถูกปรับเปลี่ยนมาเป็นสมาชิกของสกุล *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993) ในปัจจุบันมีแบคทีเรียจำนวนกว่า 143 สปีชีส์ที่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Paenibacillus* (<http://www.bacterio.net>) ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียในสกุลนี้คือการมีรูปร่างเป็นแบบแท่ง โดยทั่วไปติดสี่แตรมบวกร สร้างสปอร์ได้ ดำรงชีวิตได้ทั้งแบบใช้อากาศ (aerobic) และสภาวะใช้หรือไม่ใช้อากาศ (facultative anaerobic) ชนิดของสารประกอบ isoprenoid quinone ที่พบในแบคทีเรียสกุลนี้คือ MK-7 ชนิดของ diamino acid ที่พบเป็นองค์ประกอบของ peptidoglycan คือ meso-diaminopimelic acid นอกจากนี้ชนิดของกรดไขมัน (cellular fatty acid) ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักคือ anteiso-C_{15:0} (Ash *et al.*, 1993; Shida *et al.*, 1997) ปริมาณของ G + C content ของแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus* อยู่ในช่วงระหว่าง 39-54 mol% แบคทีเรียที่จัดเป็นสมาชิกของสกุล *Paenibacillus* ถูกพบและคัดแยกจากแหล่งที่อยู่ที่มีความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก โดยแหล่งที่พบแบคทีเรียในสกุลนี้ได้แก่ ดิน, น้ำพุร้อน, รากพืช, กองขยะ และ สถานพยาบาล (Wu *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2013; Vaz-Moreira *et al.*, 2010; Glaeser *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010)

แบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อของแห่นซึ่งจัดเป็นพืชชนิดหนึ่งในสกุล *Lemnaceae* หรือที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าแห่น (duckweed) ซึ่งจัดเป็นพืชมีดอก (Angiosperm) ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) โดยแบ่งเป็น 5 สกุล (genus) ประกอบไปด้วย 38 ชนิด (species) (Wang *et al.* 2010) พืชในวงศ์นี้มีการวิวัฒนาการปรับเปลี่ยนและลดขนาดรูปร่างของส่วนต่างๆ ของพืชลงไปเป็นอย่างมาก โดยมีการสร้างโครงสร้างที่มีความซับซ้อนน้อยลง พืชต้นหนึ่งประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายใบขนาดเล็กที่เรียกว่า frond ซึ่งอาจจัดได้ว่าเป็นทั้งส่วนของลำต้นและส่วนของใบ เนื่องจากการทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์และสังเคราะห์แสงของ frond ในส่วนของรากของพืชในวงศ์นี้นั้นมีความแตกต่างไปจากพืชมีดอกอื่นๆ รากของพืชในวงศ์ *Lemnaceae* ไม่มีการสร้างขนราก ไม่มีการแตกแขนง และไม่มีการเจริญเติบโตขั้นที่สอง โดยรากทำหน้าที่ช่วยในการทรงตัวของ frond บนผิวน้ำมากกว่าการทำหน้าที่ในการลำเลียงน้ำไปยัง frond นอกจากนี้พืชในสกุล *Wolffia* ยังเป็นพืชสกุลเดียวในวงศ์ *Lemnaceae* ที่ไม่มีการสร้างรากอีกด้วย การแพร่พันธุ์ของแห่นนั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) และอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นโดยการสร้างต้นลูก daughter frond ขึ้นที่บริเวณปลายของต้นแม่ (mother frond) ต้นลูกนี้จะเกาะติดอยู่กับ frond แม่และทำการสร้าง frond ลูกต่อไปเกิดเป็นลักษณะของโคโลนีขึ้น ในส่วนของการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืชในวงศ์นี้เกิดขึ้น โดยการสร้างดอกในบางโอกาสและบางสภาพแวดล้อมเท่านั้น แหนที่เป็นแหล่งที่พบแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 จัดเป็นแหนในสกุล *Lemna* จากการศึกษาเปรียบเทียบ ลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอในตำแหน่ง *atpF-atpH* intergenic region แล้วพบว่าแหนชนิดนี้จัดอยู่ในสปีชีส์ *Lemna aequinoctialis*

ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 คือการที่แบคทีเรียชนิดนี้อยู่อาศัย ภายในเนื้อเยื่อของพืช *L. aequinoctialis* โดยที่ไม่ก่อโรคหรืออันตรายแก่ต้นพืช ลักษณะดังกล่าวของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลทนี้เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่เรียกว่า endophytic bacteria แบคทีเรีย endophytes สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วยกลไกที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น การสร้างสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Glick et al., 1999) การสร้างเอนไซม์ aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) deaminase ที่เร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่อามิโน จากสารประกอบ acc ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่พืชใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอทิลีนที่มีฤทธิ์กระตุ้นการแก่และยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Glick et al., 1998; Glick, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes ยังมีอีกกลไกหนึ่งที่สามารถส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของพืชได้คือการสร้างฮอร์โมน indole-3-acetic acid ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในแง่ของการกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์พืช การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการ inoculate เชื้อแบคทีเรียที่สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ในรากพืชสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช โดยส่งผลให้พืชมีการสร้างขนรากและรากแขนงเพิ่มมากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวโดยรวมของระบบรากพืช ทำให้พืชมีความสามารถในการดูดซับน้ำและแร่ธาตุที่สำคัญต่อพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั่นเอง ในขณะที่แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) ผลการศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันถึงความสำคัญของฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตอบสนองของข้าวต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น โดยเป็นการใช้ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรโมเตอร์ของยีน *DR5* ต่ออยู่กับยีนรายงานผล GUS โปรโมเตอร์ของยีน *DR5* นั้นจัดเป็นโปรโมเตอร์ที่มีความไวในการตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA สูง ซึ่งพืชที่ถูก inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ก็มีการแสดงออกของยีนรายงานผล GUS ในปริมาณที่สูง แสดงให้เห็นว่าพืชนั้นมีการตอบสนองในระดับโมเลกุลต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Mattos et al., 2008) กลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA นั้นถูกค้นพบและศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด โดยมีการประมาณการเอาไว้ว่าประมาณ 80% ของแบคทีเรียกลุ่มที่เรียกว่า rhizosphere bacteria ที่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืชนั้นสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ (Patten and Glick, 1996; Khalid et al., 2004) แบคทีเรียใช้กรดอะมิโน tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ากลไกการสังเคราะห์ IAA จากกรดอะมิโน tryptophan ในแบคทีเรียมียู้อยู่ด้วยกันอย่างน้อย 5 รูปแบบที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามกลไกต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันกับกลไกการสังเคราะห์ IAA ของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophyte หลายๆ ชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบ ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเอทิลีนในพืชให้กลายเป็น α -ketobutyrate และแอมโมเนีย ส่งผลให้ปริมาณของสารประกอบ ACC ในพืชมีน้อยลง จึงเป็นการส่งผลทางอ้อมในการลดปริมาณการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอทิลีนในพืชและชะลอการแก่หรือการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยฮอร์โมนอีกทางหนึ่ง (Rashid *et al.*, 2011)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptic soy broth agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วขูดเอาเชื้อแบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป พร้อมทั้งตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel electrophoresis ร่วมกับวิธี spectrophotometry

3.2 การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA โดยการใช้ไพรเมอร์ 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') และในส่วนของปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้คือ

94°C 3 นาที,	}	(40 รอบ)
94°C 30 วินาที		
58°C 30 วินาที		
72°C 90 วินาที		
72°C 5 นาที		

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปตรวจผลการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี gel electrophoresis และทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ด้วยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป และชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นี้จะถูกนำไปใช้ในการหาลำดับเบสต่อไป

3.3 การศึกษา multiple alignment

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียชื่อไอโซเลท L7-75 จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันของแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Paenibacillus* โดยการวิเคราะห์ multiple alignment ที่อยู่ในโปรแกรม Mega เวอร์ชัน 5.1 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะถูกนำมาปรับแก้ให้เหมาะสมโดยการลบเบสที่ไม่แน่นอนและบริเวณที่เป็นที่ว่างออกจากผลการวิเคราะห์ จากนั้นนำผลการเปรียบเทียบนี้ไปสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbour-joining, Maximum parsimony และ Maximum likelihood คำนวณหาระยะห่างระหว่าง cluster ด้วยวิธีการของ Kimura-2 และยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ Bootstrap value โดยทำการสุ่มวิเคราะห์ทั้งหมด 1,000 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การศึกษา Polar lipids

เซลล์แห้งของแบคทีเรียถูกนำมาสกัด polar lipid โดยการใช้ methanol ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที ตามด้วยการสกัดโดยใช้ chloroform เศษเซลล์ที่เหลืออยู่ถูกกำจัดโดยการกรอง และสารละลายที่ได้ถูกทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำการละลายสารสกัดด้วย chloroform-methanol mixture สารสกัดที่ได้ถูกนำไปตรวจสอบด้วยการใช้ HPTLC ร่วมกับการทำ two-dimensional chromatography ตัวทำละลายที่ใช้คือ chloroform:methanol:น้ำ (65:25:10) และ chloroform:acetic acid:methanol:น้ำ (80:18:12:5) จากนั้นแผ่น HPTLC ถูกพ่นด้วยน้ำยาตรวจสอบ 4 ชนิด ได้แก่ Dittmer-Lester reagent, ninhydrin, Dragendorff's reagent และ phosphomolybdic acid

3.5 การศึกษา cellular fatty acid

แบคทีเรียจะถูกเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการขูดเซลล์แบคทีเรียที่ผิวหน้าของอาหารออกมา แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นจำนวน 6 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่เครื่อง freeze-dry เพื่อทำให้เซลล์แห้ง เซลล์แห้งของแบคทีเรียถูกนำมาสกัดหา cellular fatty acid โดยการใช้ methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยก cellular fatty acid โดยการใช้ petroleum ether แล้ววิเคราะห์ชนิดด้วยเครื่อง gas liquid chromatography ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบหาชนิดของ fatty acid ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล TSBA6 ของระบบ MIDI system

3.6 การศึกษาองค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอ (G+C content)

แบคทีเรียจะถูกเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการขูดเซลล์แบคทีเรียที่ผิวหน้าของอาหารออกมา แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย TE buffer ลงไป 5 มิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ lysozyme ความเข้มข้น 20mg/ml ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Sodium dodecyl sulfate ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที รอให้เย็นแล้วเติมสารละลาย phenol:chloroform (25:24) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง कुछส่วนใส่ออกมาแล้วเติมสารละลาย chloroform ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง कुछส่วนใส่ออกมาแล้วเติมสารละลาย absolute ethanol ลงไป 8 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนตะกอนแห้งแล้วนำมาละลายด้วยสารละลาย 1% SSC buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ RNaseT1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ RNaseA ปริมาตร 1 และ 10 ไมโครลิตรตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วนำสารละลายมาเติมสารละลาย phenol:chloroform (25:24) ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง คูส่วนใสออกมาแล้วเติมสารละลาย chloroform ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง คูส่วนใสออกมาแล้วเติม isopropanol ลงไป 600 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรจากนั้นนำตะกอนไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนตะกอนแห้งแล้วนำมาละลายด้วยสารละลาย 1% SSC buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณด้วยเครื่อง spectroscopy ต่อไป ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ nuclease P1 และ alkaline phosphatase จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยนี้แล้วมาวิเคราะห์ปริมาณเบส G และ C ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการเทียบกับตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอจาก phage lambda

$$\text{ค่า G+C content} = \frac{[(Cs/Cr)+(Gs/Gr)]}{[(Cs/Cr)+(Gs/Gr)+(As/Ar)+(Ts/Tr)]}$$

โดยที่ Cs = % เบส C ตัวอย่าง

Cr = % เบส C ดีเอ็นเอมาตรฐาน

Gs = % เบส G ตัวอย่าง

Gr = % เบส G ดีเอ็นเอมาตรฐาน

As = % เบส A ตัวอย่าง

Ar = % เบส A ดีเอ็นเอมาตรฐาน

Ts = % เบส T ตัวอย่าง

Tr = % เบส T ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.7 การวิเคราะห์ DNA-DNA relatedness

ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดถูกนำมาตั้งบน microdilution plate จากนั้นทำการเติมสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ที่ต้องการศึกษาลงไปในหลุม แล้วทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของ DNA-DNA relatedness ด้วยวิธี colorimetric ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบจากปริมาณความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในสารละลายโดยการใช้เครื่อง microplate reader จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า DNA-DNA relatedness ตามสูตร

$$\text{DNA-DNA relatedness} = (As - Ab) / (Ar - Ab) \times 100$$

โดยที่ As = ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ar = ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

Ab = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่เป็น negative control

3.8 การศึกษาลักษณะฟิโนไทป์

ลักษณะต่างๆ ทางด้านฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่ใช้ในการเปรียบเทียบทำได้โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50CH และ API 20NE โดยปฏิบัติตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการแปลผลตามที่ผู้ผลิตได้ระบุเอาไว้ในชุดตรวจสอบทั้งสองชุด และทำการย้อมสีสปอร์ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ด้วยการย้อมสี safranin O ร่วมกับสี malachite green



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA

แบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากแหน (*Lemna aequinoctialis*) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้วสามารถนำมาใช้ในการศึกษาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่อไปได้ โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA โดยการใส่ไพรเมอร์ 20F และ 1541R โดยให้ผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบสซึ่งถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ 27F, 1492R, 350F (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'), 780F (5'-GATTAGATACCCTGGTAG-3'), 1100F (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 350R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3') and 780R (5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3') ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสคือลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ซึ่งมีความยาวเท่ากับ 1,509 คู่เบส (ภาพที่ 4.1) ลำดับเบสดังกล่าวนี้ถูกนำไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยมีเลข accession number คือ AB819817 และเมื่อนำลำดับเบสนี้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzTaxon แล้วพบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Paenibacillus* สปีชีส์อื่นๆ โดยมีค่าความคล้ายคลึงที่สูงที่สุดเท่ากับ 98.3%

4.2 การทำ Multiple alignment analysis

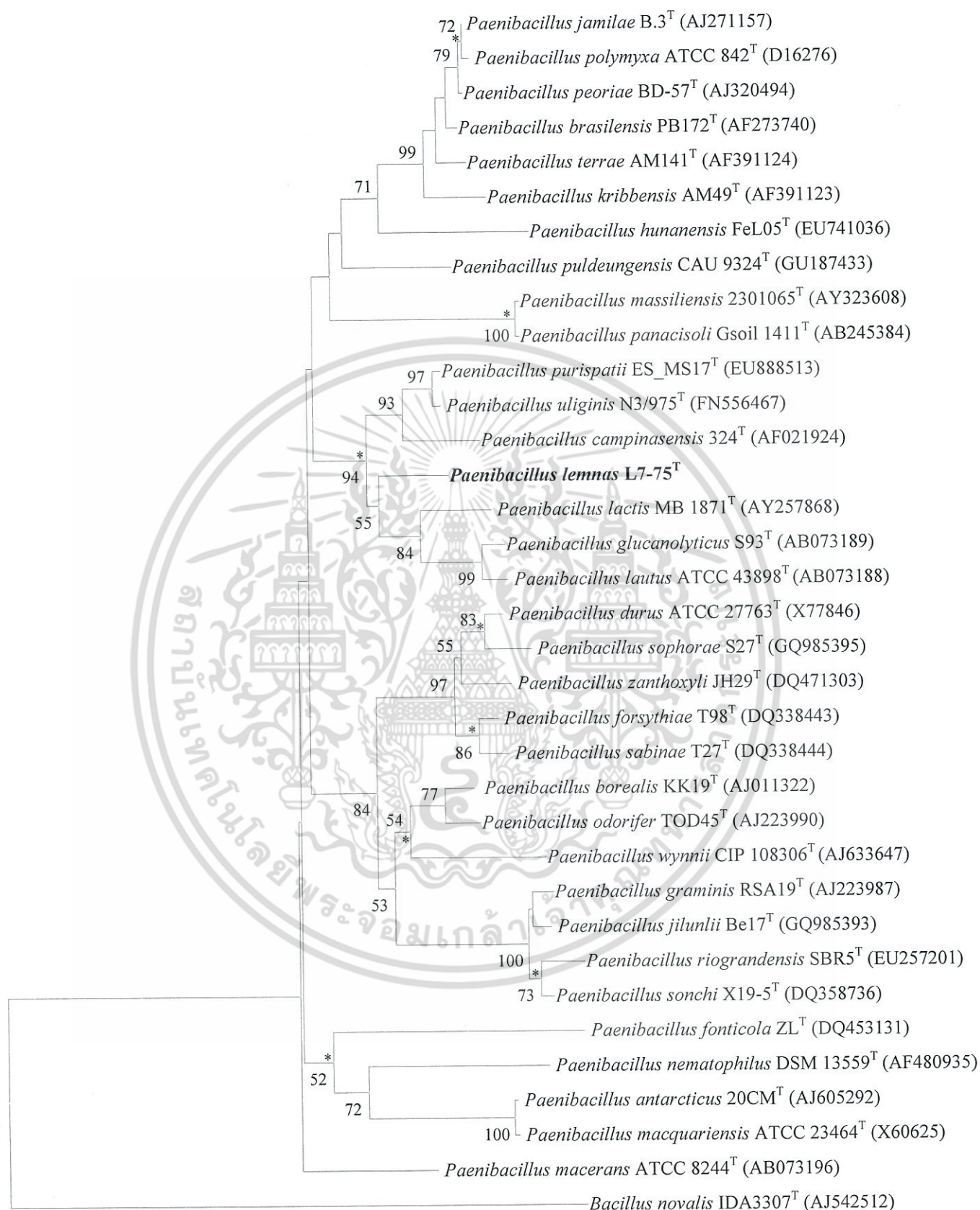
เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ไปทำการวิเคราะห์ multiple alignment analysis ในโปรแกรม Mega แล้วพบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Paenibacillus purispatii* ES_MS17^T และแบคทีเรีย *Paenibacillus uliginis* N3/975^T มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 98.5% และยังมีค่าความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียอื่นๆ อีกได้แก่ *Paenibacillus lactis* MB1871^T (ค่าความคล้ายคลึง = 98.2%), *Paenibacillus campinasensis* 324^T (97.7%), *Paenibacillus glucanolyticus* HSCC 171^T (97.7%) and *Paenibacillus lautus* ATCC 43898^T (97.4%). และเมื่อนำผลการวิเคราะห์ multiple alignment analysis ไปทำการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbour-joining แล้วพบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. uliginis* N3/975^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* MB1871^T, *P. campinasensis* 324^T, *P. glucanolyticus* HSCC 171^T และ *P. lautus* ATCC 43898^T (ภาพที่ 4.2) ผลการวิเคราะห์นี้สนับสนุนได้ว่ามีนัยสำคัญเนื่องจากมีค่า bootstrap สูงถึง 94% นอกจากนี้การสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการ maximum likelihood และ maximum parsimony ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยมีค่า boot strap เท่ากับ 76% และ 57% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3-4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTTGATGAGGAGCTTGCTCCTCTGAA
 GGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGG
 TAGCTAATACCGGATAATTGATTCCCTTACCTGAGGGGATTATGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACCTTGAG
 GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
 GAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
 TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC
 TGTTGCCAGGGAAGAAGCTCTTCTAGAGTAAGTCTAGAGAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGG
 CTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCTGGTGTTTAAACCTGGGGCTCAACTTCAGGTTCGACTGGAAACTGGG
 AAACCTTGAGTGAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGC
 CGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
 TCCCTCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTTTCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
 AGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCAGGT
 CATGCTGGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCTGGA
 GCGAATCCTAAAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCT
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAG
 AGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGTAGATGA
 TTGGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG

ภาพที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ซึ่งมีความยาวเท่ากับ 1,509 คู่เบส



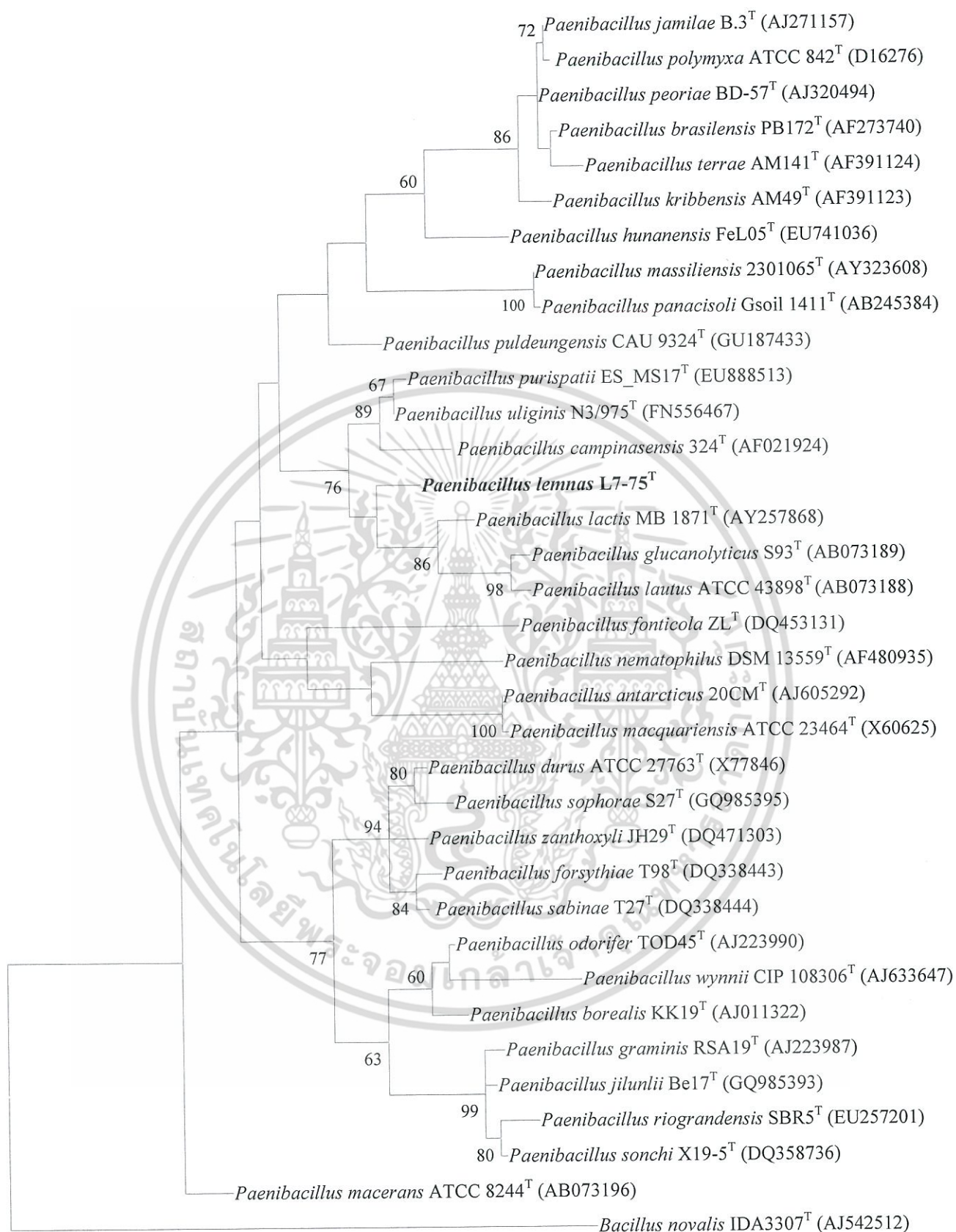


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี neighbour-joining แสดงค่า bootstrap ที่สูงกว่า 50% เท่านั้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



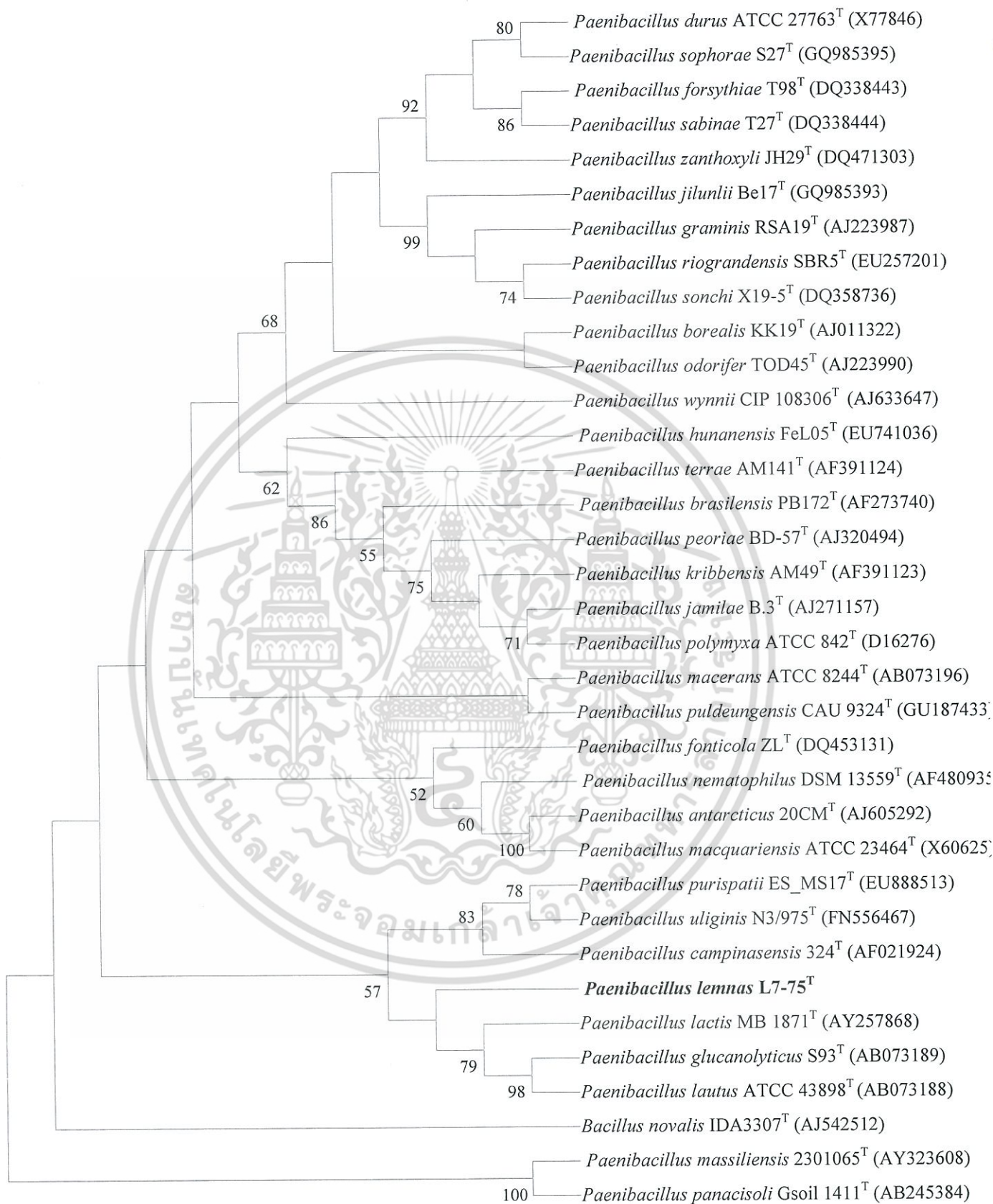
0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี maximum likelihood แสดงค่า bootstrap ที่สูงกว่า 50% เท่านั้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

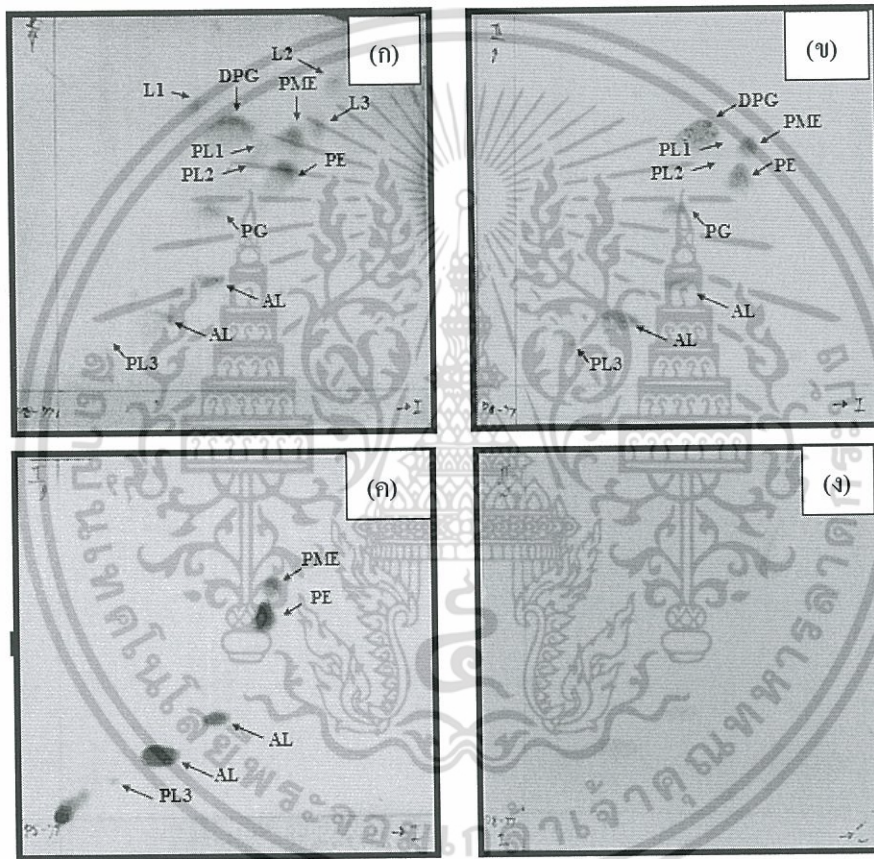


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี maximum parsimony

4.3 การวิเคราะห์ polar lipids

การวิเคราะห์ polar lipids ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนี้มีองค์ประกอบของ polar lipids เป็น diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ phosphatidyl-N-methylethanolamine (PME) (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ polar lipids ด้วยวิธี two-dimensional TLC และทำการตรวจสอบด้วย phosphomolybdic acid (ก), Dittmer-Lester reagent (ข), ninhydrin (ค) และ Dragendorff's reagent (ง). DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidyl-N-methylethanolamine; PL, unidentified phospholipid; L, unidentified lipid; AL, unidentified aminolipid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid

จากการวิเคราะห์ชนิดของ cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 พบว่าชนิดของ fatty acid ที่สำคัญของแบคทีเรียนี้ได้แก่ anteiso-C_{15:0} (36.0%), C_{16:00} (14.2%) and anteiso-C_{17:0} (10.0%) และยังมี fatty acid ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของ fatty acid ที่พบในแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันกับแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 กับแบคทีเรียอื่นๆ เช่น iso-C_{17:1} I and/or anteiso-C_{17:1} fatty acids (summed feature 4) พบ *Paenibacillus* sp. L7-75, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* และ *P. lautus* ATCC 43898^T ในขณะที่ C_{17:0} cyclo พบเฉพาะใน *Paenibacillus* sp. L7-75, *P. campinasensis* 324^T และ *P. lautus* ATCC 43898^T ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ชนิดของ fatty acid ที่พบในแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่นำมาเปรียบเทียบกับ 1, *Paenibacillus* sp. L7-75; 2, *P. uliginis* DSM 21861^T; 3, *P. purispatii* ES_MS17^T; 4, *P. lactis* DSM 15596^T; 5, *P. campinasensis* DSM 21989^T; 6, *P. glucanolyticus* DSM 5162^T; 7, *P. lautus* DSM 3035^T.

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7
C _{10:0}	–	0.1	0.1	–	–	–	–
C _{12:0}	0.3	0.4	0.5	0.4	0.2	0.5	0.2
C _{14:0}	1.3	1.6	1.6	2.6	2.1	1.1	1.0
C _{16:0}	14.2	13.7	23.9	21.4	14.2	19.3	14.2
C _{17:0}	0.3	0.1	0.2	–	0.1	0.2	0.1
C _{18:0}	3.0	0.4	0.8	0.5	1.0	0.4	0.6
C _{17:0} cyclo	0.1	–	–	–	0.1	–	0.1
C _{19:0} cyclo ω8c	–	–	–	–	0.1	–	–
anteiso-C _{11:0}	–	–	–	0.3	–	–	–
anteiso-C _{13:0}	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
anteiso-C _{14:0}	0.1	0.1	0.1	0.1	–	0.1	–
anteiso-C _{15:0}	36.0	47.2	39.0	33.1	46.1	43.0	44.4
anteiso-C _{16:0}	0.1	–	0.1	–	–	–	0.1
anteiso-C _{17:0}	10.0	8.4	9.1	7.7	6.0	10.4	15.5
C _{16:0} N alcohol	0.1	–	0.1	0.1	–	–	0.1
iso-C _{13:0}	0.1	0.1	–	0.1	0.1	0.1	0.1
iso-C _{14:0}	1.1	2.0	1.4	2.9	1.6	1.2	1.1
iso-C _{15:0}	8.3	7.1	5.5	7.7	14.5	5.3	4.3
iso-C _{16:0}	7.3	10.6	7.5	11.5	7.0	10.4	10.1
iso-C _{17:0}	8.9	4.0	5.1	5.3	5.0	5.8	5.4
iso-C _{18:0}	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2
iso-C _{19:0}	–	0.2	0.2	–	–	–	–
iso-C _{17:0} 3-OH	0.1	–	–	–	0.1	–	–
C _{13:0} 2-OH	–	–	–	–	0.1	–	–
C _{15:0} 2-OH	–	–	0.1	–	–	0.1	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7
C _{17:0} 2-OH	–	0.1	–	–	–	–	–
C _{16:1} ω5c	0.2	0.3	0.4	0.2	0.1	0.3	0.2
C _{16:1} ω11c	4.0	1.1	1.7	3.4	–	0.5	1.0
C _{18:1} ω5c	–	0.1	–	–	0.1	–	–
C _{18:1} ω9c	1.7	1.0	1.0	0.4	0.3	0.5	0.1
C _{20:1} ω7c	–	0.1	0.1	–	–	–	–
C _{16:1} ω 7c alcohol	0.5	0.1	0.1	0.5	–	0.1	0.2
C _{17:1} anteiso A	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	–	0.1
C _{17:1} anteiso ω9c	–	–	–	–	–	0.1	–
iso-C _{17:1} ω5c	–	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	–
iso-C _{17:1} ω10c	0.7	0.1	0.2	0.4	–	0.1	0.4
Summed feature 1	–	–	–	–	0.1	–	–
Summed feature 3	0.2	0.2	0.2	–	0.2	0.1	0.1
Summed feature 4	0.4	–	0.1	0.2	–	–	0.4
Summed feature 5	–	–	0.3	–	0.1	0.2	0.1
Summed feature 6	–	–	–	0.2	–	–	–
Summed feature 8	0.3	0.2	0.3	0.1	0.6	0.1	0.1

4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของดีเอ็นเอ (G+C content)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนี้มีดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส Adenine (A) 27.337 % เบส Thymine (T) 24.769% เบส Cytosine (C) 22.852% และเบส Guanine (G) 25.042% ในขณะที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีค่าเบสต่างๆ คือ เบส Adenine (A) 26.738 % เบส Thymine (T) 24.507% เบส Cytosine (C) 23.663% และเบส Guanine (G) 25.091% และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า G+C content ก็จะได้เป็นปริมาณ G+C content ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เท่ากับ 49.1mol% (*T_m*)

4.6 การวิเคราะห์ค่า DNA-DNA relatedness

การวิเคราะห์ค่า DNA-DNA relatedness โดยทำการตรึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75, *P. uliginis* DSM 21861^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* DSM 15596^T, *P. campinasensis* DSM 21989^T, *P. glucanolyticus* DSM 5162^T และ *P. lautus* DSM 3035^T ในหลุมของ microplate และใช้ดีเอ็นเอของ *Paenibacillus* sp. L7-75 ที่ติดฉลากเป็นโพรบแล้วพบว่าค่า DNA-DNA relatedness ระหว่างแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 กับแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันมีค่าดังนี้ *P. uliginis* DSM 21861^T (20.3±0.4%), *P. purispatii* ES_MS17^T (10.2±0.2%), *P. lactis* DSM 15596^T (47.8±0.7%), *P. campinasensis* DSM 21989^T (4.4±0.6%), *P. glucanolyticus* DSM 5162^T (42.5±0.1%) และ *P. lautus* DSM 3035^T (41.4±0.8%) ซึ่งค่าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณได้นี้อยู่ในช่วงระหว่าง 4.4-47.8% ซึ่งจัดได้ว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำและแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบกับ

4.7 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

การใช้ชุดน้ำยา API 50CH และ API 20NE แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้, ไม่สามารถสร้างสารประกอบ indole, ไม่สามารถหมักกลูโคสได้, ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Arginin Arginine dihydrolase, urease and beta-galactosidase activities are absent, มีกิจกรรมของเอนไซม์ beta glucosidase และ gelatinase activities, สามารถใช้สาร D-glucose, D-mannose และ D-maltose เป็นแหล่งคาร์บอนได้, ไม่สามารถใช้ L-arabinose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate และ phenylacetate เป็นแหล่งคาร์บอนได้, สร้างกรดได้โดยการใช้สาร glycerol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, methyl- β -D-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, inositol, methyl- α -D-xylopyranoside, methyl- α -D-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, sucrose, D-trehalose, starch, glycogen, gentiobiose, D-turanose, L-fucose และ potassium 2-ketogluconate และไม่สามารถสร้างกรดได้จากสาร erythritol, L-xylose, D-adonitol, L-sorbose, dulcitol, D-mannitol, D-sorbitol, N-acetylglucosamine, inulin, D-melezitose, D-raffinose, xylitol, D-xylose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate และ potassium 2-ketogluconate นอกจากนี้แบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 สามารถสร้างสปอร์ได้ด้วย โดยตัวเซลล์ติดสีแดงของ safranin O ในขณะที่สปอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ติดสีเขียวของ malachite green (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 สปอร์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในجنัส *Paenibacillus* โดยมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. uliginis* DSM 21861^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* DSM 15596^T, *P. campinasensis* DSM 21989^T, *P. glucanolyticus* DSM 5162^T and *P. lautus* DSM 3035^T โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับเบสยีน 16S rRNA ดังนี้ ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. purispatii* ES_MS17^T และแบคทีเรีย *P. uliginis* N3/975^T เท่ากับ 98.5% ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Paenibacillus lactis* MB1871^T เท่ากับ 98.2% ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. campinasensis* 324^T เท่ากับ 97.7% ความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. glucanolyticus* HSCC 171^T เท่ากับ 97.7% และความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. lautus* ATCC 43898^T เท่ากับ 97.4% นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดนี้รวมกันเป็นแขนงเดียวกันบน phylogenetic tree เมื่อทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ด้วยวิธี neighbour-joining, maximum likelihood และ maximum-parsimony ด้วย อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียอีก 6 ชนิดที่นำมาทำการศึกษา โดยสังเกตได้จากการที่ค่า DNA-DNA relatedness ระหว่างแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 กับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ มีค่าค่อนข้างต่ำคืออยู่ในช่วงระหว่าง 4.4 – 47.8 %

ผลการวิเคราะห์ polar lipid แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 สร้าง polar lipid ที่สำคัญคือ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ phosphatidyl-N-methylethanolamine (PME) ส่วน fatty acid ที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างขึ้นในปริมาณมากได้แก่ anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} and anteiso-C_{17:0} โดยมีปริมาณเท่ากับ 36.0%, 14.2% และ 10.0% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ค่า G+C content แสดงว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 มีค่า G+C content เท่ากับ 49.1 mol% (T_m)

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้นำมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่และยังเป็นการค้นพบแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus* ในแห่นเป็นครั้งแรก แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้สูงที่ยังมีแบคทีเรียชนิดใหม่อื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในแห่นอีก ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแห่นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและควรได้รับการศึกษามากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Barka E.S., Nowak, J., and Clement, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 72, 7246-7252.
- Ash, C., Priest, F. G. and Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 253–260.
- Glaeser, S. P., Falsen, E., Busse, H. J. & Kämpfer, P. (2013). *Paenibacillus vulneris* sp. nov., isolated from a necrotic wound. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 777–782.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *J Theo Biol* 190, 63-68.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. & Penrose, D.M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press.
- Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251, 1-7.
- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2004). Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non rhizosphere soils. *Aus J Soil Res* 42, 921-926.
- Kim, K. K., Lee, K. C., Yu, H., Ryoo, S., Park, Y. & Lee, J. S. (2010). *Paenibacillus sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2371–2376.
- Kong, B. H., Liu, Q. F., Liu, M., Liu, Y., Liu, L., Li, C. L., Yu, R. & Li, Y. H. (2013). *Paenibacillus typhae* sp. nov., isolated from roots of *Typha angustifolia* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1037–1044.
- Mattos, K.A., Padua, V.L., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J.O. & Mendonca-Previato, L. (2008). Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An Acad Bras Cienc* 80, 477-493.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42, 207-220.
- Rashid, S., Charles, T.C. & Glick, B.R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*. 61, 217-224.

- Saha, P., Krishnamurthi, S., Bhattacharya, A., Sharma, R. & Chakrabarti, T. (2010). *Fontibacillus aquaticus* gen. nov., sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 422–428.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 47, 289–298.
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.
- Tang, Q. Y., Yang, N., Wang, J., Xie, Y. Q., Ren, B., Zhou, Y. G., Gu, M. Y., Mao, J., Li, W. J. & other authors (2011). *Paenibacillus algorifonticola* sp. nov., isolated from a cold spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2167–2172.
- Vaz-Moreira, I., Figueira, V., Lopes, A. R., Pukall, R., Spröer, C., Schumann, P., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2010). *Paenibacillus residui* sp. nov., isolated from urban waste compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2415–2419.
- Wang W, Wu Y, Yan Y, Ermakova M, Kerstetter R & Messing J. (2010). DNA barcoding of the lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol* 10, 205.
- Wang, L., Baek, S-H., Cui, Y., Lee, H-G. and Lee, S-T. 2012. *Paenibacillus sediminis* sp. nov. a xylanolytic bacterium isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Micro*. 62, 1284-1288.
- Wu, X., Fang, H., Qian, C., Wen, Y., Shen, X., Li, O. & Gao, H. (2011). *Paenibacillus tianmuensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1133–1137.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paenibacillus lemnae sp. nov., an endophytic bacterium of duckweed (*Lemna aequinoctialis*)

Chokchai Kittiwongwattana^{1,2} and Chitti Thawai^{1,2}Correspondence
Chitti Thawai
ktchitti@kmitl.ac.th¹Department of Biology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand²Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

A Gram-stain-variable, rod-shaped and endospore-forming bacterium, designated strain L7-75^T, was isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). Cells were motile with a monopolar flagellum. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence indicated that strain L7-75^T belonged to the genus *Paenibacillus*, and the closest phylogenetically related species were *Paenibacillus uliginis* N3/975^T (98.5% 16S rRNA gene sequence similarity), *Paenibacillus purispatii* ES_M17^T (98.5%), *Paenibacillus lactis* MB 1871^T (98.2%), *Paenibacillus campinasensis* 324^T (97.7%), *Paenibacillus glucanolyticus* S93^T (97.7%) and *Paenibacillus lautus* ATCC 43898^T (97.4%). Growth of strain L7-75^T was observed at pH 7–10 and at 20–40 °C, and NaCl concentrations up to 5% (w/v) were tolerated. Major cellular fatty acids included anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} and anteiso-C_{17:0} that were present at 36.0%, 14.2% and 10.0% of the total cellular fatty acid profile, respectively. The major polar lipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidyl-*N*-methylethanolamine. MK-7 was the predominant menaquinone. The diamino acid found in the cell-wall peptidoglycan was *meso*-diaminopimelic acid. The DNA G + C content was 49.1 mol% (*T_m*). DNA–DNA relatedness values between strain L7-75^T and its closest relatives ranged from 4.4 to 47.8%. These results indicate that strain L7-75^T represents a novel species of the genus *Paenibacillus*, for which the name *Paenibacillus lemnae* sp. nov. is proposed. The type strain is L7-75^T (=BCC 67838^T=NBRC 109972^T).

The genus *Paenibacillus* was first proposed by Ash *et al.* (1993). An emended description of the genus was subsequently provided by Shida *et al.* (1997). Members of the genus are rod-shaped and aerobic or facultatively anaerobic bacteria that form ellipsoidal endospores. Several species were characterized as Gram-stain-positive bacteria while others were observed as Gram-stain-negative or Gram-variable bacteria. Anteiso-C_{15:0} is the major cellular fatty acid, and MK-7 is the major menaquinone. The DNA G + C content is in the range of 39 to 54 mol% (Wang *et al.*, 2012). Numerous species of the genus *Paenibacillus* have been isolated from diverse sources, including cold spring, soil, urban waste compost, clinical samples, the phyllosphere and the rhizosphere of various plant species (Tang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2010;

Glaeser *et al.*, 2013; Valverde *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011). In the present study, we carried out a polyphasic investigation to characterize an endophytic bacterium, designated strain L7-75^T, which was isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). The results obtained from phylogenetic, phenotypic and chemotaxonomic analyses indicated that strain L7-75^T represents a novel species of the genus *Paenibacillus*.

L. aequinoctialis plants were collected from a natural pond in Pathumthani province, Thailand. Approximately 1 g whole plants was rinsed with water to remove dirt on the outside and surface-sterilized with 10% sodium hypochlorite solution supplemented with a few drops of Tween 20. Plants were washed five times with sterilized distilled water and ground in sterilized distilled water with a mortar and a pestle. Plant suspensions were plated on starch-casein-nitrate agar (1⁻¹: 0.3 g casein, 10 g starch, 2 g KNO₃, 2 g NaCl, 2 g K₂HPO₄, 0.05 g MgSO₄·7H₂O, 0.02 g CaCO₃, 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 15 g agar; pH 7.0) and incubated at 30 °C for 7 days. Several endophytic bacteria were obtained and purified by repeatedly cross-streaking on tryptic soy agar (TSA; LabM). One hundred microlitres

Abbreviations: DPG, diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PME, phosphatidyl-*N*-methylethanolamine.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the partial 16S rRNA gene sequence of strain L7-75^T is AB819817.

Five supplementary figures and a supplementary table are available with the online Supplementary Material.

of the water used for the final rinse was plated on starch-casein-nitrate agar and used as a control.

Genomic DNA of endophytic bacteria were prepared according to the method previously described (Araújo *et al.*, 2002) and used for amplification of the almost complete 16S rRNA gene fragment. The universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991) were used in the PCR, and the temperature profile was as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 90 s; and final extension at 72 °C for 5 min. The sequence of the PCR product was obtained using the 27F, 1492R, 350F (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'), 780F (5'-GATTAGATACCCTGGTAG-3'), 1100F (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 350R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3') and 780R (5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3') primers (Lane, 1991). The pairwise alignment analysis of the nearly complete 16S rRNA gene sequences of endophytic bacteria was performed using the EzTaxon server (Kim *et al.*, 2012). Among these endophytic bacteria, a bacterial isolate designated strain L7-75^T was identified as a member of the genus *Paenibacillus*.

Multiple alignment analysis of the nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain L7-75^T and members of the genus *Paenibacillus* was performed using the CLUSTAL W program, version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). Gaps and ambiguous nucleotides were manually corrected. Phylogenetic analysis was conducted using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) in the program MEGA version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Evolutionary distances were determined using Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980). Phylogenetic analyses using the maximum-parsimony (Fitch, 1971) and maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) methods were also carried out using the same software. Bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1000 resamplings was used to determine the confidence levels of clusters.

Morphological characteristics of strain L7-75^T were determined after growth on TSA at 30 °C for 48 h. Cell motility in hanging-drop wet mounts was determined under a bright-field microscope. Additional cell morphology was observed under a transmission electron microscope (JEM-1230; JEOL). Phenotypic characteristics were determined using the API 20NE and API 50CH galleries according to the manufacturer's instructions (bioMérieux). Growth at different pH and temperatures and NaCl tolerance were examined and compared with reference strains. The pH range (pH 4–10) for growth and NaCl tolerance (0.5–6%) were determined in tryptic soy broth (TSB; LabM) medium at 30 °C. The citrate-phosphate and carbonate-bicarbonate buffer systems were used for pH 4–7 and pH 8–10, respectively (Gomori, 1955; Lim *et al.*, 2006). Growth at various temperatures (20–42 °C) was examined on TSA medium. Endospores were stained using malachite green staining (Smibert & Krieg, 1994). Catalase and cytochrome oxidase activities were determined according to the methods previously described (Graham & Parker,

1964; Skerman, 1967). Hydrolysis of starch and Tween 80 was determined according to previously described methods (Smibert & Krieg, 1994). DNase activity was tested on DNase test agar base medium (HiMedia) according to the manufacturer's protocol.

For cellular fatty acid profile analysis, cells of strain L7-75^T and the reference strains were grown on TSA plates at 30 °C for 48 h. The analysis was carried out using GLC according to the instructions of the Microbial Identification System (MIDI), Sherlock version 6.0 (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996; Sasser, 1990). Cellular fatty acids were identified using the TSBA6 database of the MIDI system (Sasser, 1990). For polar lipid analysis, cells of strain L7-75^T grown in TSB medium at 30 °C for 48 h were collected and lyophilized. Polar lipids were extracted and examined according to the methods described by Minnikin *et al.* (1984). Isoprenoid quinones were extracted according to the method described by Collins *et al.* (1977) and analysed using HPLC equipped with a Cosmosil 5C₁₈ column (4.6 × 150 mm; Nacalai Tesque). The elution solvent consisted of methanol and 2-propanol (2:1, v/v). Preparation and hydrolysis of cell-wall peptidoglycan was carried out according to the method described by Kawamoto *et al.* (1981), and the isomer of diaminopimelic acid was examined using one-dimensional thin-layer chromatography (Staneck & Roberts, 1974).

Genomic DNA of strain L7-75^T and the reference strains was prepared according to the method described by Moore & Dowhan (1995) and used for the G+C content analysis and DNA–DNA hybridization. The DNA G+C content was determined using the HPLC method (Mesbah *et al.*, 1989). Lambda DNA (Invitrogen) was used as the standard. DNA–DNA hybridization was performed in microdilution-well plates according to the method described by Ezaki *et al.* (1989). The DNA–DNA relatedness was determined using the colorimetric method (Verlander, 1992).

Strain L7-75^T was obtained from ground tissues of *L. aequinoctialis*. Pairwise alignment analysis of the nearly complete 16S rRNA gene sequence (1509 bp) using the EzTaxon server (Kim *et al.*, 2012) suggested that strain L7-75^T was a member of the genus *Paenibacillus*. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences of strain L7-75^T and other species of the genus *Paenibacillus* was also performed. The closest relatives of strain L7-75^T were *Paenibacillus uliginis* N3/975^T (98.5% 16S rRNA gene sequence similarity), *Paenibacillus purispatii* ES_MS17^T (98.5%), *Paenibacillus lactis* MB 1871^T (98.2%), *Paenibacillus campinasensis* 324^T (97.7%), *Paenibacillus glucanolyticus* S93^T (97.7%) and *Paenibacillus lautus* ATCC 43898^T (97.4%). The low levels of sequence similarity indicated that strain L7-75^T may represent a novel species of the genus *Paenibacillus* (Stackebrandt & Ebers, 2006). The phylogenetic tree that was reconstructed using the neighbour-joining method showed that strain L7-75^T clustered together with *P. uliginis* N3/975^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* MB1871^T, *P. campinasensis* 324^T, *P. glucanolyticus* S93^T

and *P. lautus* ATCC 43898^T (Fig. 1). This was significantly supported by the high bootstrap value of 94%. The phylogenetic trees that were reconstructed using the maximum-likelihood and maximum-parsimony methods

consistently supported the phylogenetic relationship between strain L7-75^T and its closest relatives with bootstrap values of 76 and 57%, respectively (Figs S1 and S2, available in the online Supplementary Material).

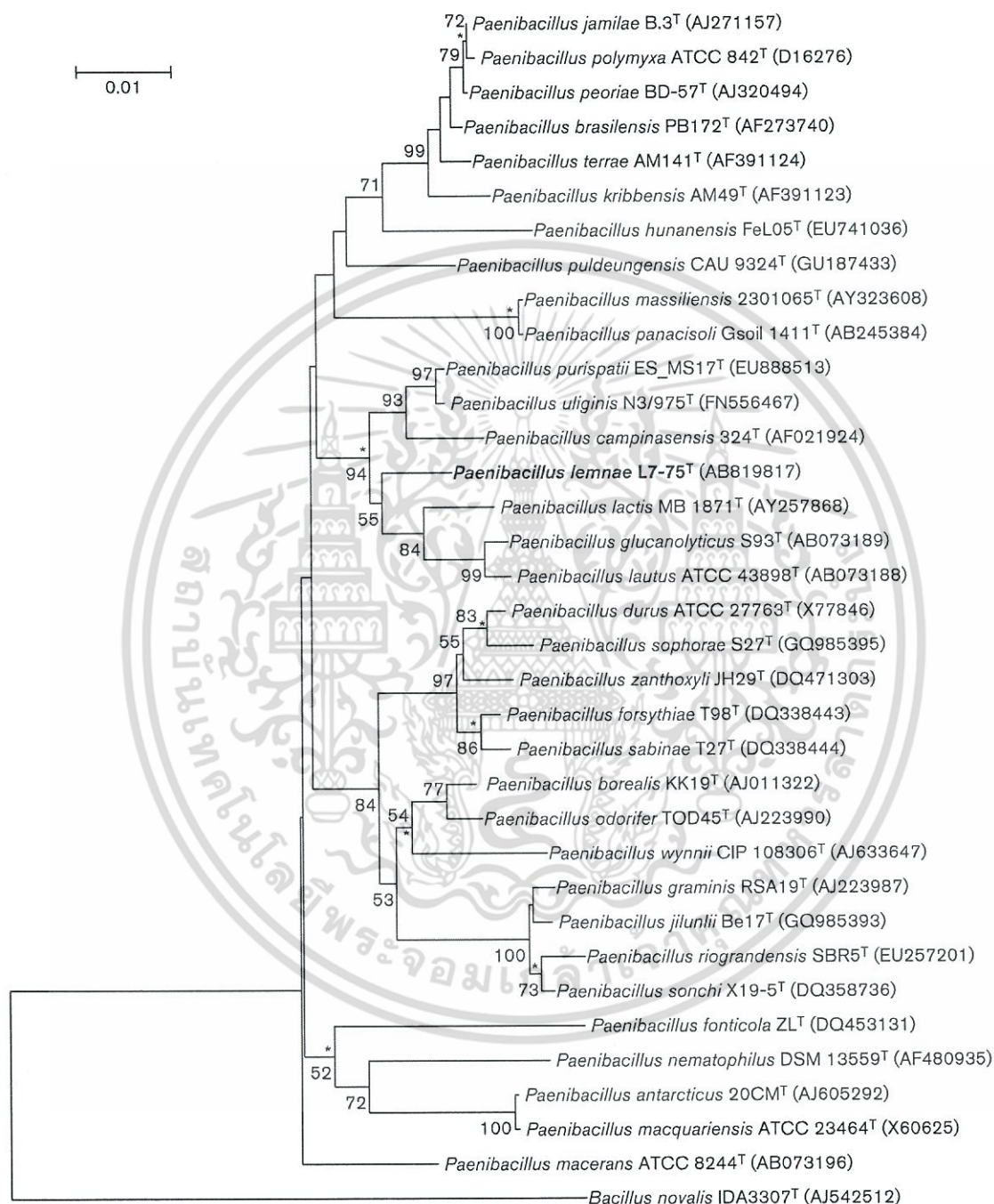


Fig. 1. Phylogenetic tree reconstructed with the neighbour-joining method based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain L7-75^T and related species of the genus *Paenibacillus*. *Bacillus novalis* IDA3307^T was used as an outgroup. Asterisks indicate branches of the tree that were also found using maximum-parsimony and maximum-likelihood methods. Bootstrap values are indicated at tree nodes as the percentage of 1000 replicates; only values >50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Cells of strain L7-75^T were Gram-stain-variable, motile and rod-shaped. Ellipsoidal endospores were observed (Fig. S3). Colonies of strain L7-75^T were circular and cream when grown on TSA medium at 30 °C for 48 h. A monopolar flagellum was observed under the transmission electron microscope (Fig. S4). Two other members of the genus *Paenibacillus* have also been described as Gram-stain-variable with a single flagellum; these are *Paenibacillus prosopidis* PW21^T and *Paenibacillus darwinianus* Br^T (Valverde *et al.*, 2010; Dsouza *et al.*, 2014). Several distinct phenotypic characteristics were observed between strains L7-75^T and the reference strains *P. uliginis* DSM 21861^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* DSM 15596^T, *P. campinasensis* DSM 21989^T, *P. glucanolyticus* DSM 5162^T and *P. lautus* DSM 3035^T (Table 1). For example, only strain L7-75^T, *P. uliginis* DSM 21861^T and *P. lactis* DSM 15596^T did not assimilate L-arabinose. Strain L7-75^T was unable to produce acid from raffinose as opposed to all of the reference strains. In contrast, only strain L7-75^T and *P. uliginis* DSM 21861^T produced acid from inositol. Additionally, only strain

L7-75^T and *P. campinasensis* DSM 15596^T were unable to grow in TSB at pH 6.0.

The results of the cellular fatty acid analysis of strain L7-75^T and the reference strains are provided in Table S1. The predominant fatty acids (>10 %) of strain L7-75^T were anteiso-C_{15:0} (36.0 %), C_{16:0} (14.2 %) and anteiso-C_{17:0} (10.0 %). The presence of anteiso-C_{15:0} as the major fatty acid was consistent with the previous report on the chemotaxonomic study of members in the genus *Paenibacillus* (Shida *et al.*, 1997). The differences between the fatty acid profiles of strain L7-75^T and the reference strains were found among minor constituents. For example, iso-C_{17:1} and/or anteiso-C_{17:1} fatty acids (summed feature 4) were found in strain L7-75^T, *P. purispatii* ES_MS17^T, *P. lactis* and *P. lautus* ATCC 43898^T. In contrast, C_{17:0} cyclo fatty acid was found only in strain L7-75^T, *P. campinasensis* 324^T and *P. lautus* ATCC 43898^T. The major polar lipids of strain L7-75^T were diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidyl-N-methylethanolamine (PME) (Fig. S5). DPG,

Table 1. Differential phenotypic characteristics of strain L7-75^T and reference strains

Strains: 1, strain L7-75^T; 2, *P. uliginis* DSM 21861^T; 3, *P. purispatii* ES_MS17^T; 4, *P. lactis* DSM 15596^T; 5, *P. campinasensis* DSM 21989^T; 6, *P. glucanolyticus* DSM 5162^T; 7, *P. lautus* DSM 3035^T. All data were obtained from this study. v, Variable; +, positive; -, negative; w, weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Gram-staining	v	v	v	v	v	+	+
Assimilation of:							
L-Arabinose	-	-	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	-	+	+	+
D-Mannitol	-	-	-	-	+	+	+
Acid production from:							
D-Adonitol	-	+	-	-	-	-	-
D-Arabinose	+	+	-	+	+	w	+
L-Arabinose	+	-	+	+	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	-	+	-	-
L-Fucose	w	-	-	+	-	w	-
Glycerol	w	+	+	-	-	-	+
Inositol	+	w	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	+	+	+	+
Methyl α-D-xylopyranoside	+	-	-	+	w	-	-
N-Acetylglucosamine	-	+	+	+	-	+	+
Potassium 2-ketogluconate	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose	-	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	w	-	-	-	w	+	-
Xylitol	-	+	-	-	w	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	+	-	-
Growth at/with:							
pH 6	-	+	+	+	-	+	+
5% (w/v) NaCl	+	-	+	w	-	+	+
pH for growth							
Range	7-10	6-10	5-10	6-10	7-10	6-10	6-10
Optimum	7	7	7	7	10	6	7
Temperature for growth (°C)							
Range	20-40	20-37	20-37	30-42	20-42	20-37	30-42
Optimum	30	30	32	30	40	30	30

PG and PE were found as predominant polar lipids in the type species *Paenibacillus polymyxa* and other species of the genus *Paenibacillus* (Kämpfer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). PME was found as one of the major polar lipids in '*Paenibacillus beijingensis*' and '*Paenibacillus humi*' (Wang *et al.*, 2013; Kim & Lee, 2014). The major menaquinone observed in strain L7-75^T was MK-7 and the cell-wall peptidoglycan contained *meso*-diaminopimelic acid, both features that are commonly found in members of the genus *Paenibacillus* (Shida *et al.*, 1997). Taken together, these results supported the affiliation of strain L7-75^T to the genus *Paenibacillus*.

The DNA base composition analysis showed that the G + C content of strain L7-75^T was 49.1 mol% (T_m). This was consistent with the DNA G + C content of the genus *Paenibacillus* that ranges from 39 to 54 mol% (T_m) (Wang *et al.*, 2012). DNA–DNA hybridization between strain L7-75^T and its closest relatives was also carried out. DNA–DNA relatedness values between strain L7-75^T and *P. uliginis* DSM 21861^T (20.3 ± 0.4%), *P. purispatii* ES_MS17^T (10.2 ± 0.2%), *P. lactis* DSM 15596^T (47.8 ± 0.7%), *P. campinasensis* DSM 21989^T (4.4 ± 0.6%), *P. glucanolyticus* DSM 5162^T (42.5 ± 0.1%) and *P. lautus* DSM 3035^T (41.4 ± 0.8%) were below 70%, the value which is accepted as the cut-off point for assigning bacterial strains to the same species (Wayne *et al.*, 1987). This result indicated that strain L7-75^T was clearly distinct from the reference strains and represents a novel species of the genus *Paenibacillus*, for which the name *Paenibacillus lemnae* sp. nov. is proposed.

Description of *Paenibacillus lemnae* sp. nov.

Paenibacillus lemnae (lem'nae N.L. gen. n. *lemnae* of *Lemna* – the duckweed)

Cells are Gram-stain-variable, motile, rods (0.4–0.6 × 1.4–1.5 μm) with a monopolar flagellum. Ellipsoidal spores are produced. Colonies are circular, cream and approximately 2 mm in diameter when grown on TSA medium at 30 °C for 48 h. Growth occurs at 20–40 °C (optimum 30 °C) and pH 7–10 (optimum pH 7.0). Tolerates NaCl concentrations ranging from 0.5 to 5% (w/v); the optimum NaCl concentration for growth is 0.5% (w/v). Tests for catalase and cytochrome oxidase activities are positive. Starch is hydrolysed, but Tween 80 and DNA are not. In the API 20NE strip, nitrate is not reduced to nitrite, indole is not produced and glucose is not fermented. Arginine dihydrolase, urease and β-galactosidase activities are absent. β-Glucosidase and gelatinase activities are present. The following carbon sources are assimilated: D-glucose, D-mannose and maltose. The following carbon sources are not assimilated: L-arabinose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate and phenylacetate. In the API 50CH strip, acid is produced from glycerol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, methyl β-D-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, inositol, methyl α-D-xylopyranoside,

methyl α-D-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, aesculin ferric citrate, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, starch, glycogen, gentiobiose, turanose, L-fucose and potassium 2-ketogluconate. Acid is not produced from erythritol, L-xylose, D-adonitol, L-sorbose, dulcitol, D-mannitol, D-sorbitol, N-acetylglucosamine, inulin, melezitose, raffinose, xylitol, D-xylose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol and potassium gluconate. The major cellular fatty acids (>10%) are anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} and anteiso-C_{17:0}. The major polar lipids are DPG, PG, PE and PME. MK-7 is the major menaquinone. The cell-wall peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid.

The type strain is L7-75^T (=BCC 67838^T=NBRC 109972^T), which was isolated from the whole plant of *Lemna aquinotalis*. The DNA G + C content of the type strain is 49.1 mol% (T_m).

References

- Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr, Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol* 68, 4906–4914.
- Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 253–260.
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 100, 221–230.
- Dsouza, M., Taylor, M. W., Ryan, J., MacKenzie, A., Lagutin, K., Anderson, R. F., Turner, S. J. & Aislabie, J. (2014). *Paenibacillus darwinianus* sp. nov., isolated from gamma-irradiated Antarctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1406–1411.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid–deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224–229.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20, 406–416.
- Glaeser, S. P., Falsen, E., Busse, H. J. & Kämpfer, P. (2013). *Paenibacillus vulneris* sp. nov., isolated from a necrotic wound. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 777–782.
- Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol* 1, 138–146.
- Graham, P. H. & Parker, C. A. (1964). Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* 20, 383–396.
- Jin, H. J., Zhou, Y. G., Liu, H. C. & Chen, S. F. (2011). *Paenibacillus jilunlii* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1350–1355.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 42, 989–1005.

- Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Falsen, E., Busse, H. J. & Tindall, B. J. (2006). *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of '*Paenibacillus hongkongensis*' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 781–786.
- Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1981). Cell wall composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *J Bacteriol* 146, 527–534.
- Kim, H. S. & Lee, S. S. (2014). *Paenibacillus humi* sp. nov., isolated from peat-soil. *J Gen Appl Microbiol* 60, 23–27.
- Kim, B. C., Lee, K. H., Kim, M. N., Kim, E. M., Min, S. R., Kim, H. S. & Shin, K. S. (2009). *Paenibacillus pini* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the rhizosphere of pine tree. *J Microbiol* 47, 699–704.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H. & other authors (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 716–721.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley & Sons.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Park, D. J., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2006). *Paenibacillus xinjiangensis* sp. nov., isolated from Xinjiang province in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2579–2582.
- Liu, Y., Liu, L., Qiu, F., Schumann, P., Shi, Y., Zou, Y., Zhang, X. & Song, W. (2010). *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., isolated from rice seeds. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1266–1270.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159–167.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 2, 233–241.
- Moore, D. D. & Dowhan, D. (1995). Preparation and analysis of DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2–11. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. New York: Wiley.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Sasser, M. (1990). *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acid*, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlandolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 47, 289–298.
- Skerman, V. B. D. (1967). *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 2nd edn. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33, 152–155.
- Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* 28, 226–231.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731–2739.
- Tang, Q. Y., Yang, N., Wang, J., Xie, Y. Q., Ren, B., Zhou, Y. G., Gu, M. Y., Mao, J., Li, W. J. & other authors (2011). *Paenibacillus algarifonticola* sp. nov., isolated from a cold spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2167–2172.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680.
- Valverde, A., Peix, A., Rivas, R., Velázquez, E., Salazar, S., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C. & Igual, J. M. (2008). *Paenibacillus castaneae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Castanea sativa* Miller. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2560–2564.
- Valverde, A., Fterich, A., Mahdhi, M., Ramírez-Bahena, M. H., Caviedes, M. A., Mars, M., Velázquez, E. & Rodríguez-Llorente, I. D. (2010). *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2182–2186.
- Vaz-Moreira, I., Figueira, V., Lopes, A. R., Pukall, R., Spröer, C., Schumann, P., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2010). *Paenibacillus residui* sp. nov., isolated from urban waste compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2415–2419.
- Verlander, C. P. (1992). Detection of horseradish peroxidase by colorimetry. In *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 185–201. Edited by L. J. Kricka. New York: Academic Press.
- Wang, L., Baek, S. H., Cui, Y., Lee, H. G. & Lee, S. T. (2012). *Paenibacillus sediminis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1284–1288.
- Wang, L. Y., Li, J., Li, Q. X. & Chen, S. F. (2013). *Paenibacillus beijingensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from wheat rhizosphere soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 675–683.
- 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. & other authors (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463–464.
- Wu, X., Fang, H., Qian, C., Wen, Y., Shen, X., Li, O. & Gao, H. (2011). *Paenibacillus tianmuensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1133–1137.
- Wu, Y.-F., Wu, Q.-L. & Liu, S.-J. (2013). *Paenibacillus taihuensis* sp. nov., isolated from an eutrophic lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3652–3658.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพืชมดัดเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

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 lemae* 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

-การศึกษาการผลิตเอทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้