

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่
CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA AS
NOVEL BACTERIAL SPECIES



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่

CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA AS
NOVEL BACTERIAL SPECIES



โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA AS NOVEL BACTERIAL SPECIES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL
MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวน้ำฝน บุญโท	รหัสนักศึกษา	55051315
	นางสาวพรธิภา แป้นจรัส	รหัสนักศึกษา	55051337
	นางสาวพรนภัส กล้วยดี	รหัสนักศึกษา	55051338
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง(สจล.)		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา		

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์สองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 1017 และสายพันธุ์ 1048 ถูกคัดแยกได้จากรากข้าวอินทรีย์สายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ในจังหวัดสุพรรณบุรี จากการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีลักษณะเป็น strictly aerobic แกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนิมีสีชมพู สภาพภาวะเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% องค์ประกอบหลักของ fatty acid คือ iso-C_{15:0} (56.1%), summed feature 3 ที่ประกอบด้วย C_{16:1} ω6c และ/หรือ C_{16:1} ω7c (14.3%) และ iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%) Polar lipid หลักที่พบคือ phosphatidylethanolamine โดยสายพันธุ์ 1017 อยู่ในสกุล *Pedobacter* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีความคล้ายคลึงกันกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T ที่ 96.6% ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 พบว่ามีลักษณะเป็น strictly aerobic แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนิมีสีเหลือง สภาพภาวะเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-0.5% องค์ประกอบหลักของ fatty acid คือ summed feature 8 ที่ประกอบด้วย C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c (66.0%) โดยสายพันธุ์ 1048 อยู่ในสกุล *Sphingomonas* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีความคล้ายคลึงกันกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุดที่ 97.4% ซึ่งจากผลการทดลองการศึกษาข้อมูลทางพีโนไทป์ ลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 1017 และสายพันธุ์ 1048 มีแนวโน้มที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pedobacter* และสกุล *Sphingomonas* ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟต์, อนุกรมวิธาน, *Pedobacter*, *Sphingomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Characterization of Endophytic Bacteria as Novel Bacterial Species		
Students	Miss Numfon	Boontho	Student ID 55051315
	Miss Pornnipa	Panjumrus	Student ID 55051337
	Miss Pornnapat	Glouydee	Student ID 55051338
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang(KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst.Prof.Dr. Chokchai Kittiwongwattana		

Abstract

Endophytic bacterial strains designated as 1017 and 1048 were isolated from root tissues of rice collected from Supanburi. Cells of strain 1017 were strictly aerobic bacterium, Gram-stain-negative, rod shaped, non-motile, non-spore-forming and produced pink colonies. The optimum temperatures, pH and NaCl concentrations for growth of strain 1017 were 30 and 37°C at pH 7-9 and in 0-1% NaCl, respectively. The major cellular fatty acids of strain 1017 were iso-C_{15:0}, summed feature 3 consisting of C_{16:1} ω6c and/or C_{16:1} ω7c (14.3%) and iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%). The major polar lipid were phosphatidylethanolamine. The 16S rRNA gene sequences analysis showed that strain 1017 was closely related to *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T (96.6% sequence similarity). Cells of strain 1048 were strictly aerobic bacterium, Gram-stain-negative, rod shaped, non-motile, non-spore-forming and produced yellow colonies. The optimum temperatures, pH and NaCl concentrations for growth of strain 1048 were 30 and 37°C at pH 7-9 and in 0-5% NaCl, respectively. The major cellular fatty acids of strain 1048 were summed feature 8 consisting of C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c (66.0%). The 16S rRNA gene sequences analysis showed that strain 1048 was closely related to *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T (97.4% sequence similarity). On the basis of phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic analysis, it is proposed that strain 1017 and 1048 may represent novel species of the genera *Pedobacter* and genera *Sphingomonas*, respectively.

Keyword : Endophytic bacteria, Taxonomy, *Pedobacter*, *Sphingomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงการพิเศษหัวข้อเรื่องการจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลือจาก อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ให้คำปรึกษาการทำการทดลอง รวมถึงการแนะนำและช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำโครงการ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. จิตติ ท๋าไว และ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ และ กรรมการ ตามลำดับ ที่สละเวลามาตรวจสอบพิจารณาโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการเบิกสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่อบรมสั่งสอน ให้โอกาสได้มาศึกษาเล่าเรียน คอยสนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อนๆร่วมห้องที่ให้กำลังใจ ช่วยเหลือกันและกัน มาโดยตลอด

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

น้ำฝน บุญโท
พรธิภา แป้นจ้ำรัส
พรนภัส กล้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เอนโดไฟต์ (Endophyte).....	3
2.2 อนุกรมวิธาน (Taxonomy).....	4
2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	5
2.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี.....	5
2.2.3 องค์ประกอบทางเคมี.....	7
2.2.4 ลักษณะทางจีโนม.....	7
2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	7
2.4 ลักษณะทั่วไปของสกุล <i>Pedobacter</i>	8
2.5 ลักษณะทั่วไปของสกุล <i>Sphingomonas</i>	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	13
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	13
3.3 เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์.....	13
3.4 สารเคมี.....	14
3.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้วต่างๆ.....	14
3.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	15
3.6.1 การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล.....	15
3.6.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ.....	15
3.6.2.1 การศึกษาลักษณะของโคโลนี.....	15
3.6.2.2 การดิสเสแกรม.....	15
3.6.2.3 การย้อมสปอร์.....	15
3.6.2.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารต่างๆ.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.2.5 การทดสอบการทนอุณหภูมิ.....	16
3.6.2.6 การทดสอบการทนความเป็นกรด-ด่าง.....	16
3.6.2.7 การทดสอบการทนเค็ม.....	16
3.6.2.8 การทดสอบการเคลื่อนที่.....	16
3.6.2.8.1 ทดสอบการเคลื่อนที่ด้วยวิธี motility test medium.....	16
3.6.2.8.2 ทดสอบการเคลื่อนที่ด้วยวิธี Hanging drop mount.....	16
3.6.2.9 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์.....	17
3.6.2.9.1 เอนไซม์ catalase.....	17
3.6.2.9.2 เอนไซม์ caseinase.....	17
3.6.2.9.3 เอนไซม์ amylase.....	17
3.6.2.9.4 เอนไซม์ gelatinase.....	17
3.6.2.10 การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอน.....	17
3.6.2.11 การเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน.....	17
3.6.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ.....	17
3.6.3.1 การวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid).....	17
3.6.3.2 การวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของ Polar lipid.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	19
4.1 การทำ Multiple alignment analysis.....	19
4.1.1 การทำ Multiple alignment analysis ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017.....	19
4.1.2 การทำ Multiple alignment analysis ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048.....	25
4.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟิโนไทป์.....	31
4.2.1 ลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017.....	31
4.2.2 ลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas</i> sp. 1048.....	35
4.3 ผลการวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid).....	39
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid.....	39
ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017	
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid.....	41
ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas</i> sp. 1048	
4.4 ผลการวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของ Polar lipids.....	45
4.4.1 ผลการวิเคราะห์ Polar lipids ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017.....	45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	47
5.1 สรุปผลการวิจัย	47
5.2 ข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก ก.....	55
ภาคผนวก ข.....	58
ภาคผนวก ค.....	59
ภาคผนวก ง	61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ความแตกต่างลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter sp. 1017</i> และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ <i>Pedobacter</i> ที่เกี่ยวข้อง	33
4.2	ความแตกต่างลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas sp. 1048</i> และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ <i>Sphingomonas</i> ที่เกี่ยวข้อง	37
4.3	องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter sp. 1017</i> และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ <i>Pedobacter</i> ที่เกี่ยวข้อง	39
4.4	องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas sp. 1048</i> และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ <i>Sphingomonas</i> ที่เกี่ยวข้อง	42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาเอนไซม์คะตาเลส.....	6
4.1	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... neighbor-joining	20
4.2	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... maximum likelihood	22
4.3	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... maximum parsimony	24
4.4	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... neighbor-joining	26
4.5	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... maximum likelihood	28
4.6	รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี..... maximum parsimony	30
4.7	แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017 บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน	31
4.8	(ก) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017 ...	32
	(ข) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017.	32
4.9	แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas</i> sp. 1048 บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน	35
4.10	(ก) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ amylase.....	36
	ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas</i> sp. 1048	
	(ข) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase	36
	ของแบคทีเรีย <i>Sphingomonas</i> sp. 1048	
4.11	ผลการวิเคราะห์ Polar lipids ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter</i> sp. 1017 ด้วยวิธี two-dimensional TLC และทำการตรวจสอบด้วย Phosphomolybdic acid reagent (ก), Dittmer-Lester reagent (ข), Ninhydrin reagent (ค), Dragendoff's reagent (ง) และ Anisaldehyde reagent (จ)	45
ค.1	ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017	59
ค.2	ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048	60
ง.1	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Polar lipid ด้วยวิธี two-dimensional TLC..... ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter daechungensis</i> Dae 13 ^T	61
ง.2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Polar lipid ด้วยวิธี two-dimensional TLC..... ของแบคทีเรีย <i>Pedobacter luteus</i> N7d-4 ^T	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
LB	Luria-Bertani broth
16S rRNA	16S ribosomal RNA
2D-TLC	Two-dimensional thin layer chromatography
N/A	Not available
AL	Unidentified Aminolipid
APL	Unidentified Aminophospholipid
GL	Glycolipid
L	Unidentified Polar lipid
PE	Phosphatidylethanolamine
PL	Phospholipid
PGL	Phosphoglycolipid
PME	Phosphatidyl-N-methylethanolamine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เอนโดไฟติกแบคทีเรีย (endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชอาศัย และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ โดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช รวมถึงพืชยังช่วยป้องกันสภาวะที่ไม่เหมาะสมให้แก่แบคทีเรีย ในปัจจุบันการศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียโดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียหลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเอนโดไฟติกแบคทีเรียบนโลกมีมากมายหลายชนิด สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไปและแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เมื่อต้องการศึกษาและเรียนรู้เอนโดไฟติกแบคทีเรียเหล่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการจัดให้เป็นหมวดหมู่เพื่อความถูกต้องของชนิดพันธุ์ ให้สะดวกต่อการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ อีกทั้งต้องมีหลักการในการระบุชนิดว่าเป็นชนิดใด โดยใช้การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตหรือการศึกษานุกรมวิธาน (Taxonomy) ซึ่งโดยทั่วไปประกอบด้วยหลักพื้นฐาน 3 ส่วน คือ การจัดกลุ่ม (Classification) การเรียกชื่อ (nomenclature) และการพิสูจน์หรือการระบุชนิดของเชื้อ (identification) หลักพื้นฐานเหล่านี้ เป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อ เช่น รูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ องค์ประกอบภายในเซลล์ ปฏิกริยาทางชีวเคมีหรือเอนไซม์ต่างๆ ความรู้ทางอนุกรมวิธานทำให้ทราบว่ามีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนประชากรเท่าใด อีกทั้งยังทำให้ทราบคุณสมบัติต่างๆของสิ่งมีชีวิต เช่น คุณสมบัติทางชีวภาพ การสร้างเอนไซม์หรือวิตามินที่มีประโยชน์ หากขาดความรู้ทางอนุกรมวิธานจะทำให้ไม่สามารถค้นพบและสูญเสียโอกาสในการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้อย่างเต็มที่

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่แยกได้จากรากข้าวที่คาดว่าจะ เป็นสปีชีส์ใหม่ โดยใช้หลักการวิเคราะห์ตามหลักอนุกรมวิธานในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านวิทยาศาสตร์และการเกษตร รวมถึงใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนการนำเสนอเอนโดไฟติกแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 1017 และ 1048 ที่คาดว่าจะอาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ 1017, 1048 ที่แยกได้จากส่วนรากของข้าวมาทำการศึกษาอนุกรมวิธาน โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี ศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ ได้แก่ การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid), การวิเคราะห์องค์ประกอบของ Polar lipid และการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลทำการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon ทำการ Alignments คำนวนค่าความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) และสร้าง Phylogenetic tree

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ สามารถเป็นข้อมูลและทรัพยากรที่สำคัญ ที่สามารถนำมาพัฒนาต่อเพื่อเป็นประโยชน์แก่ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนโดไฟต์ (Endophyte)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ถูกค้นพบมานานกว่า 120 ปี ใน ค.ศ. 1926 (หนึ่ง, 2554) โดยเอนโดไฟติกแบคทีเรีย (Endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชหรือแยกได้จากภายในของพืช สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยไม่ทำอันตรายกับพืช (Mano and Morisaki, 2008) เอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในบริเวณที่น้ำและแร่ธาตุเคลื่อนที่ผ่านชั้นต่างๆของเซลล์ หรือจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง หรือผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ในบริเวณต่างๆของพืช ทั้งในช่องว่างระหว่างเซลล์และท่อลำเลียงน้ำ บางครั้งสามารถพบได้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของพืช เช่น ดอก ผล และ เมล็ด (Malfanova, 2013) และมีแนวโน้มพบเอนโดไฟต์ได้มากในรากมากกว่าในเนื้อเยื่อพืชที่สัมผัสกับอากาศ (Maheshwari, 2013) ปกติแล้วแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในพืชไม่เป็นสาเหตุและการเปลี่ยนแปลงใดๆที่สำคัญทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกันกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในปมรากของพืช (Malfanova, 2013) เอนโดไฟติกแบคทีเรียยังเป็นที่รู้จักกันว่าสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของพืชผลทางการเกษตรที่สำคัญ เช่น ข้าว ข้าวโพด ฝ้าย มันฝรั่ง อ้อย และพืชชนิดอื่นๆ (Shcherbakov, 2012) สามารถให้ประโยชน์กับพืชอาศัย มีความใกล้ชิดและได้รับประโยชน์จากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ซึ่งพืชอาศัยยังช่วยป้องกันสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมให้กับแบคทีเรีย (สุจิตตรา และคณะ, 2556) และเอนโดไฟติกแบคทีเรียนั้นยังช่วยส่งเสริมการเจริญและเพิ่มผลผลิตให้กับพืช สามารถทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เอนโดไฟต์ยังให้ประโยชน์ด้านอื่นๆโดยการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้สำหรับทางการแพทย์ การเกษตรหรืออุตสาหกรรม (Ryan *et al.*, 2008) ส่วนประโยชน์ของเอนโดไฟต์ต่อพืช ได้แก่ ช่วยให้พืชได้รับสารอาหารผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟตหรือการขับธาตุเหล็ก, เพิ่มความทนทานต่อความแห้งแล้ง, เพิ่มการทนความร้อน และเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม (Prasad and Dagar, 2014)

เอนโดไฟติกแบคทีเรียถูกคัดแยกจากพืชหลากหลายชนิด แบคทีเรียที่ค้นพบ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Methylobacterium* เป็นต้น (Prasad and Dagar, 2014) เอนโดไฟติกแบคทีเรียแกรมลบสามารถคัดแยก เพาะเลี้ยง และทำการศึกษได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการศึกษามากกว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียแกรมบวก เอนโดไฟติกแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดมีการสร้างเอนโดสปอร์ เช่น *Bacillus* spp. เอนโดสปอร์นี้ทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งส่วนที่ห่อหุ้มเอนโดสปอร์ (spore coat) จะเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย tyrosine และ cystine (Maheshwari, 2013)

บทบาทของเอนโดไฟต์ในพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามประเภทของกิจกรรม ได้แก่ การส่งเสริมการเจริญและการควบคุมโรค เอนโดไฟติกแบคทีเรียเชื่อว่าจะสามารถกระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วยวิธีทางตรงโดยการสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น auxin หรือ cytokinin หรือผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase วิธีทางอ้อมโดยการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (antifungal) หรือจากแบคทีเรีย

(antibacterial agent) ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคในพืช โดยเกิดการแข่งขันการเจริญกับเชื้อโรคด้วยการสร้างสาร siderophore หรือสร้างระบบภูมิคุ้มกันของพืช

ในปัจจุบันมีการศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียโดยใช้วิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียมีความหลากหลายทางสปีชีส์ (สุจิตตรา และคณะ, 2556) จากการรายงานที่ได้รับคำแนะนำเชื่อถือเกี่ยวกับการแยกเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อพืชที่ได้ทำการฆ่าเชื้อแล้ว พบแบคทีเรียมากกว่า 200 ชนิดจาก 16 ไฟลัม ได้รับรายงานว่าเป็นเอนโดไฟต์ รวมทั้งแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* และ *Verrucomicrobiae* อย่างไรก็ตามเอนโดไฟต์ที่โดดเด่นและนิยมทำการศึกษา มี 3 ไฟลัมที่สำคัญคือ *Actinobacteria*, *Proteobacteria* และ *Firmicutes* รวมทั้ง *Azoarcus*, *Acetobacter* (เปลี่ยนชื่อจาก *Gluconobacter*), *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* และ *Streptomyces* (Malfanova, 2013)

2.2 อนุกรมวิธาน (Taxonomy)

ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการความหลากหลายของชนิดพันธุ์ (species) ดูได้จากประชากรของสิ่งมีชีวิต ความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมที่จะแสดงให้เห็นผ่านทางลักษณะภายนอกซึ่งสามารถใช้คาดเดาลำดับความห่างหรือใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการได้ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมีโอกาสที่จะมาจากบรรพบุรุษเดียวกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกไม่เหมือนกัน วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตส่วนหนึ่งเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามธรรมชาติและเกิดจากความหลากหลายของระบบนิเวศน์ สิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถวิวัฒนาการปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ แต่สิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความจำเพาะเท่านั้น ซึ่งความหลากหลายที่เกิดขึ้นนั้นมาจากการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเพื่อเอาตัวรอดและสืบทอดลูกหลานต่อไป วิวัฒนาการเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ ตามสภาพแวดล้อมจนกระทั่งอาจจะมีลักษณะที่แตกต่างจากบรรพบุรุษ และกลายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย, 2545)

อนุกรมวิธาน มาจากคำว่า “อนุกรม” หมายถึง ลำดับ และ “วิธาน” หมายถึง การจัดเรียงจัดทำ เมื่อนำมารวมกันจึงหมายถึง “การจัดเรียงอย่างมีระเบียบ” อนุกรมวิธานเป็นสาขาหนึ่งทางชีววิทยาที่มีความสำคัญมากศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนกพืชสัตว์และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กให้ออกเป็นกลุ่มอย่างมีระบบด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตบนโลกมีอยู่จำนวนมากและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงเพื่อให้สะดวกและไม่เกิดความสับสนในการศึกษาค้นคว้าจึงต้องทำการจัดกลุ่มออกจากกันให้ชัดเจน หลักพื้นฐานในการจัดจำแนกประกอบด้วย 3 ส่วน 1) การจำแนกออกเป็นหมวดหมู่ (classification) คือการจัดจำแนกออกเป็นกลุ่ม ถ้าหากสิ่งมีชีวิตมีลักษณะเหมือนหรือใกล้เคียงกันจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่ถ้าไม่มีความคล้ายคลึงกันจะถูกแยกกลุ่มออกไป ซึ่งจะจัดจำแนกตั้งแต่ลำดับชั้นระดับสูงสุดไปถึงระดับต่ำ 2) การกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ (nomenclature) มีจุดประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจตรงกัน และสามารถสื่อสารได้อย่างเป็นสากล โดยการตั้งชื่อสิ่งมีชีวิตในระดับชนิดจะตั้งชื่อตามระบบ binomial system หรือแบบทวินาม หลักการตั้งชื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิทยาศาสตร์คือ ชื่อวิทยาศาสตร์ประกอบด้วยสกุล (Genus) และชื่อต้นของชนิด (species epithet) โดยตัวอักษรแรกของสกุลจะเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนที่เหลือทั้งหมดจะเป็นพิมพ์เล็กและต้องเป็นตัวเอียง ในกรณีที่เขียนด้วยลายมือเป็นตัวตรงให้ขีดเส้นใต้ชื่อวิทยาศาสตร์ (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ไทย, 2545 ; สุรวุฑ, 2545) 3) Identification คือการตรวจสอบหาชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ ด้วยการเปรียบเทียบสิ่งที่ยังไม่รู้จักกับสิ่งที่รู้จักแล้ว (ดวงพร, 2537)

การศึกษานุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยใช้วิธี polyphasic taxonomy คือการวิเคราะห์ ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ได้แก่ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเซลล์ ลักษณะทางเคมี (chemotype) ได้แก่ การวิเคราะห์กรดไขมันและโพลาลิปิด ลักษณะจีโนไทป์ (genotype) ได้แก่ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อระบุลักษณะและสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย

2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological)

การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาเป็นการวิเคราะห์จากลักษณะภายนอกของเซลล์ เช่น ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนก เช่น รูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์ สปอร์ การเคลื่อนที่ และปฏิกิริยาการติดสีแกรม ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน ซึ่งสารพันธุกรรมจะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม (สุรวุฑ, 2545)

2.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

1) การย่อยแป้ง

แป้ง ประกอบไปด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินเป็นหลัก โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยแป้งจะต้องสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ (Fean et al., 2012) ซึ่งองค์ประกอบของแป้งทั้งสองชนิดนั้นมีองค์ประกอบที่เหมือนกัน คือ D-glucose อะไมโลสเป็นโพลีเมอร์สายตรงของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,4-glycosidic ส่วนอะไมโลเพคตินเป็นโพลีเมอร์สายตรงและแขนงของน้ำตาลกลูโคสโดยสายตรงเชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,4-glycosidic และสายแขนงเชื่อมด้วยพันธะ α -1,6-glycosidic อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลง การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสทำได้โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหาร starch agar แล้วหยดสารละลายไอโอดีนและดูการเปลี่ยนแปลงสีของไอโอดีนเมื่อสัมผัสกับอาหารบริเวณรอบๆ การเจริญของแบคทีเรีย (ดวงพร, 2537)

2) การย่อยนม

เคซีน (casein) เป็นโปรตีนหลักที่พบในนมที่สามารถแยกได้จากการตกตะกอนนม มีสัดส่วนประมาณ 80% จากปริมาณนมทั้งหมด (สุภานันท์, 2554) เคซีนสามารถย่อยได้ด้วยกระบวนการ peptonization ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เคซีนเนส ซึ่งเคซีนเป็นสารที่ทำให้นมมีสีขาว ดังนั้นเมื่อถูกเคซีนส่อยจึงทำให้น้ำนมใสขึ้นเรียกว่า whey หรืออาจพบเคซีนจับตัวกันเป็นก้อนลิมพบได้ 2 ลักษณะคือ acid curd ที่เกิดจากจุลินทรีย์เปลี่ยนแลคโตสเป็นกรดแลคติกแล้วไปรวมกับเคซีนจะเป็นลิมแข็ง ลักษณะที่สองคือ rennet curd หรือ sweet curd เกิดจากเคซีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์เรนนินจะได้เป็นก้อนนุ่มหรือตะกอนลิมเล็กๆ (จรรย์รัตน์, 2548)

3) การย่อยเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยแบคทีเรียที่ย่อยเจลาตินได้จะต้องมีเอนไซม์ gelatinase เมื่อเจลาตินถูกย่อยแล้วจะเสียสภาพจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลกลายเป็นของเหลวถึงแม้อยู่ในอุณหภูมิต่ำ คุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาใช้จัดจำแนกและดูความแตกต่างของสกุลและชนิดของแบคทีเรียได้ (ดวงพร, 2537)

4) การทดสอบคะตาเลส

การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส เป็นการทดสอบที่สามารถใช้คัดแยกแบคทีเรียได้และพบว่าแบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลสมักมีแนวโน้มที่จะตาย ถ้าหากอาหารไม่มีน้ำตาลหรือเกิดการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเซลล์คือ H_2O_2 โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่มีเอนไซม์คะตาเลสจะสามารถสลาย H_2O_2 และได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและออกซิเจน (รูปที่ 2.1) การทดสอบจะใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-5% โดยทำการเชื้อเชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงลงบนแผ่นสไลด์จากนั้นหยด H_2O_2 หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก (ดวงพร, 2537)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาเอนไซม์คะตาเลส

5) ความสามารถในการเจริญที่ NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบทำโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างกัน เพื่อศึกษาสภาวะในการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือประมาณ 10-15% (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

6) ความสามารถในการเจริญที่ pH ต่างกัน

แบคทีเรียทั่วไปในธรรมชาติส่วนใหญ่จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ pH ที่สูงหรือต่ำเกินไป ช่วง pH ที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 6.5-7.5% การทดสอบนี้จะดูคุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่างในการเจริญของแบคทีเรีย จึงสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

7) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิในการเจริญของแบคทีเรียจะมีความแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย การเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้ ซึ่งสามารถแบ่งประเภทของจุลินทรีย์โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้เป็น 3 ประเภทคือ 1) psychrophile พวกแบคทีเรียที่อาศัยได้ในอุณหภูมิต่ำ เจริญได้ตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า จนถึง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 15 องศาเซลเซียส 2) mesophile เจริญได้ที่อุณหภูมิทั่วไปคือ 25-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส 3) thermophile เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และอาจสูงถึงได้ถึง 85 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

8) การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการหมักโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน โดยน้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบจะมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไปตั้งแต่ monosaccharide จนถึง polysaccharide เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของน้ำตาลตั้งแต่น้ำตาลชนิด disaccharide ขึ้นไป ถ้าหากแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้จะต้องเป็นแบคทีเรียที่สร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยน้ำตาลให้กลายเป็นโมเลกุลเล็กก่อน ซึ่งความสามารถในการนำน้ำตาลไปใช้ของแบคทีเรียเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะแตกต่างกัน จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการแบ่งชนิดของแบคทีเรียได้ กรดที่จุลินทรีย์สามารถสร้างได้มีหลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดแอสिटิก และ กรดฟอร์มิก เป็นต้น ซึ่งอาจมีแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ (ดวงพร, 2537)

9) การเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน

ก๊าซที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียคือ ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถใช้ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้โดยแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ 1) aerobic microorganism เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เนื่องจากไม่สามารถสร้างพลังงานได้จากการหมัก 2) facultative microorganism สามารถสร้างพลังงานได้จากการหายใจและการหมัก โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้การหายใจ แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้การหมัก 3) microaerophile microorganism ต้องการออกซิเจนน้อยกว่า 0.2 atm เนื่องจากออกซิเจนจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ 4) anaerobic microorganism เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญเนื่องจากไม่มีเอนไซม์คตาเลสสลาย H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์ และในการทดสอบการเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจนสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การปิดผิวหน้าด้วยน้ำมัน การเติมสารรีดิวซิง หรือการใช้ anaerobic jar (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

2.2.3 องค์ประกอบทางเคมี

1) การวิเคราะห์ fatty acid

ไขมันเป็นชีวมวลที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ กรดไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะเป็นไขมันเชิงซ้อนสามารถจำแนกออกได้ 2 ชนิดคือ ไขมันอิ่มตัวและไขมันไม่อิ่มตัวที่เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้เป็นกรดไขมันที่มีโครงสร้างต่างกันออกไปตามแบคทีเรียแต่ละชนิด การวิเคราะห์กรดไขมันถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และระบุเชื้อแบคทีเรีย และมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้ใช้ลักษณะของกรดไขมันมาประกอบอธิบายลักษณะของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography และพบว่ามีการดไขมันมากกว่า 300 ชนิดที่พบในแบคทีเรีย ซึ่งสามารถวิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างและปริมาณของกรดไขมันได้ (MIDI, USA)

2) การวิเคราะห์ polar lipid

Phospholipid เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร โครงสร้างของฟอสโฟลิพิดประกอบด้วย เอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันและกรดฟอสโฟลิก มีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (amphipatic) คือ มีโมเลกุลทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำสามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธี Thin-layer chromatography แบบ 2 ทิศทางบนแผ่นซิลิกาเจล แล้วทำการพ่นด้วยสารทดสอบต่างๆที่จำเพาะต่อไขมันแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกแบคทีเรียได้ (นันทวัน, 2555)

2.2.4 ลักษณะทางจีโนไทป์

การศึกษาเกี่ยวกับกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตยีน โดยนิยมศึกษายีน 16S rRNA ซึ่งข้อมูลทีวิเคราะห์จะทำให้สามารถศึกษาสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ ในปัจจุบันข้อมูลด้านนี้มีความสำคัญอย่างมากในการจัดอนุกรมวิธาน (สุรวิทย์, 2545)

2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ไรโบโซม เป็นโครงสร้างภายในเซลล์ประกอบด้วย โปรตีนและอาร์เอ็นเอ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งไรโบโซมของโพรคาริโอตมี 2 หน่วยย่อยคือ 1) ไรโบโซมขนาด 50S ประกอบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปด้วย rRNA 2 ชนิด คือ 23S rRNA และ 5S rRNA 2) ไรโบโซมขนาด 30S ประกอบด้วย 16S rRNA (อภิชาติ, 2551) ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียนิยมใช้ยีน 16S rRNA เนื่องจากพบว่าเป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิดเหมือนเป็นยีนลายเซ็นของแบคทีเรียแต่ละตัว (จิราพร, 2554) และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคงตัวสูง มีลักษณะเป็นยีนอนุรักษ์ถึงแม้จะมีการวิวัฒนาการมานานยีนจะเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตที่ดูเหมือนจะมีความเกี่ยวข้องกันน้อย (นงลักษณ์และปรีชา, 2544) แต่สามารถใช้ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อดูความใกล้ชิดกันของแบคทีเรียได้ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์มาสร้าง Phylogenetic tree เพื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย (จิราพร, 2554)

2.4 ลักษณะทั่วไปของสกุล *Pedobacter*

Pedobacter เป็นชื่อสกุลที่ถูกระบุขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Steyn *et al.*, (1998) จากที่ได้มีการย้ายแบคทีเรีย *Flavobacterium heparinum* มาอยู่ในสกุล *Cytophaga* เนื่องจากพบว่าสามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยการไหลและมีค่าเบส G+C ต่ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับคุณสมบัติในสกุล *Cytophaga* มากกว่า (Christensen, 1980) โดยใช้ชื่อว่า *Cytophaga heparina* หลังจากนั้นมีการย้าย *Cytophaga heparina* มาอยู่ในสกุล *Sphingobacterium* โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การเจริญโดยใช้อากาศ โคโลนีมีสีเหลือง และการติดสีแกรมลบ ลักษณะทางเคมีที่พบ fatty acid หลักของสกุล *Sphingobacterium* ในปริมาณมาก รวมถึงผลของ DNA-rRNA hybridization ที่สนับสนุนข้อมูลทั้งหมด แต่เมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่าอุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน ($T_{m(e)}$) ในสกุล *Sphingobacterium* แล้วพบว่าค่า $T_{m(e)}$ มีค่าแตกต่างกันมากเกินที่จะทำให้อยู่ในสกุลเดียวกันได้ จึงเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนให้มีการตั้งสกุล *Pedobacter* ขึ้นเป็นสกุลใหม่ (Steyn *et al.*, 1998)

สกุล *Pedobacter* อยู่ในวงศ์ *Sphingobacteriaceae* และอันดับ *Sphingobacteriales* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็น aerobic bacteria ไม่เคลื่อนที่ (Singh *et al.*, 2015) แต่ในบางสายพันธุ์อาจเคลื่อนที่โดยการไหล เช่น *Pedobacter heparinus*, *Pedobacter saltans* เป็นต้น อุณหภูมิเฉลี่ยที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้คือ 5-30 องศาเซลเซียส แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โคโลนีมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ขนาด 2-5 มิลลิเมตร สีของโคโลนีเป็นสีเหลืองสว่าง (Steyn *et al.*, 1998) แต่ในปัจจุบันมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่มากขึ้นและพบว่าสีของโคโลนีก็มีความหลากหลายมากขึ้นด้วย เช่น สีชมพู (Urios *et al.*, 2013), สีแดง (An *et al.*, 2009) และสีส้ม (Oh *et al.*, 2013)

Isoprenoidquinone ที่สำคัญคือ manequinone MK-7 ปริมาณเบส G+C คือ 36-45 mol% เมื่อเร็วๆ นี้ปริมาณเบส G+C ได้รับการแก้ไขเพิ่มเติมโดย Kook และคณะ (2014) เป็น 36.0-47.5 mol% พบ fatty acid หลักได้แก่ iso-C_{15:0}, C_{16:0}, iso-C_{15:1} G, iso-C_{17:0}, C_{16:1} Ω6c, C_{16:1} Ω7c และ iso-C_{17:0} 3-OH สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase ได้พบ phosphatidylethanolamine เป็น polar lipid หลัก (Singh *et al.*, 2015)

สมาชิกส่วนใหญ่ในสกุล *Pedobacter* พบจากดิน (Yoon *et al.* 2007; Luo *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2012; Oh *et al.* 2013) และจะถูกพบโดยทั่วไปตามธรรมชาติซึ่งในบางสายพันธุ์อาจถูกพบได้จากสภาพแวดล้อมที่หลายหลายเช่นน้ำตก (Chung *et al.*, 2014), ธารน้ำแข็ง (Margesinet *et al.*, 2003), น้ำจากธารน้ำแข็ง, อาหารและปุ๋ยผสม (Singh *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียในสกุล *Pedobacter* มีการระบุอย่างเป็นทางการแล้วจำนวน 55 สายพันธุ์ (<http://www.bacterio.net/pedobacter.html>)

2.5 ลักษณะทั่วไปของสกุล *Sphingomonas*

Sphingomonas เป็นชื่อสกุลของแบคทีเรียที่ได้นำเสนอครั้งแรกโดย Yabuuchi *et al.* (1990) อยู่ในวงศ์ *Sphingomonadaceae* (Huang *et al.*, 2009) ชั้น *Alphaproteobacteria* มี Type species เป็น *Sphingomonas paucimobilis* (Yabuuchi *et al.*, 1990) ต่อมา Takeuchi *et al.* (2001) พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* มีความแตกต่างกันมากจึงได้จัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้ให้อยู่ในสกุลใหม่อีก 3 สกุล ได้แก่ *Sphingobium*, *Novosphingobium* และ *Sphingopyxis* เมื่อเร็วๆ นี้ยังมีการศึกษาต่อโดย Maruyama *et al.* (2006) และนำเสนอสกุลอื่นอีกในวงศ์ *Sphingomonadaceae* คือ *Sphingosinicella* (An *et al.*, 2013) การจัดจำแนกได้ทำการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA รูปแบบของ Polyamine และคุณสมบัติของ Polar lipid (Huy *et al.*, 2014) เพื่อใช้อธิบายกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะเป็น strictly aerobic และ chemoheterotrophic มีรงควัตถุสีเหลือง ไม่สร้างสปอร์ ในปัจจุบันพบว่ามีทั้งสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้และไม่เคลื่อนที่ (Park *et al.*, 2014) ซึ่งการเคลื่อนที่โดยทั่วไปใช้ polar flagellum เส้นเดี่ยวบางชนิดใช้ peritrichous flagella เช่น *Sphingomonas trueperi* สีของโคโลนีแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ตั้งแต่สีส้ม สีเหลืองเข้ม สีเหลืองมะนาวหรือไม่มีรงควัตถุ และรงควัตถุสีเหลืองเข้มของ *Sphingomonas paucimobilis* ได้มีการรายงานว่าส่วนใหญ่เป็นรงควัตถุชนิด carotenoid และ nostoxanthin มากกว่าเป็น xanthomonadin ในบางกรณีสีของรงควัตถุยังขึ้นกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (Yabuuchi *et al.*, 2002) รูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย หรือบางสายพันธุ์มีรูปร่างรี (Park *et al.*, 2014) บางสายพันธุ์เซลล์มีการเรียงตัวคล้ายกลีบกุหลาบ และบางสายพันธุ์เซลล์มีลักษณะเป็น Bipolar staining กระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นกระบวนการหายใจแต่ไม่เกิดการหมัก (Yabuuchi *et al.*, 2002) Fatty acid หลักที่สำคัญของแบคทีเรียในสกุลนี้คือ C_{14:0} 2-OH และไม่พบ 3-hydroxy fatty acid พบ Quinone หลักที่สำคัญคือ ubiquinone Q-10 พบ Polar lipid หลักที่สำคัญคือ sphingoglycolipid พบ Polyamine หลักที่สำคัญคือ homospermidine (Huy *et al.*, 2014) สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase ได้ (Yabuuchi *et al.*, 2002) ปริมาณ DNA G+C มีค่าอยู่ในช่วง 59-68 mol% (Yabuuchi & Kosako, 2005)

สมาชิกของ *Sphingomonas* สามารถพบได้หลากหลายในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมบนพื้นดิน เช่น น้ำจืด, น้ำทะเล, ดิน, ชั้นส่วนพืช, ตะกอน, สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล, ห้องปฏิบัติการ, น้ำเสีย, เลือดมนุษย์ และยูรีน แบคทีเรีย *Sphingomonas* บางสปีชีส์สามารถเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสและเป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โลหิตเป็นพิษ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อช่องท้องอักเสบและการติดเชื้อในทารกแรกเกิดในผู้ป่วยหนัก ส่วนการก่อโรคในสัตว์นั้นยังไม่เป็นที่รู้จัก อีกทั้งสกุล *Sphingomonas* ยังเป็นที่รู้จักว่าเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการสังเคราะห์โพลีเมอร์ชีวภาพ เช่นเดียวกับการย่อยสลายและการบำบัดทางชีวภาพ (Park *et al.*, 2014) โดยในปัจจุบันมีแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* ได้มีการระบุสายพันธุ์อย่างเป็นทางการแล้วจำนวนกว่า 94 สายพันธุ์ (<http://www.bacterio.net/sphingomonas.html>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jeon *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ N7^T ที่คัดแยกได้จากดินที่ใช้ปลูกข้าว (rice paddy soil) ในประเทศเกาหลีใต้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเป็นแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ รูปร่างท่อน สภาวะการเจริญเหมาะสมที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH 6.5-7.5 Isoprenoid quinone หลักที่สำคัญคือ menaquinone-7 พบ Fatty acid หลักที่สำคัญคือ summed feature 3 (ประกอบด้วย C_{16:1} ω7c และ/หรือ iso-C_{15:0} 2-OH) และ iso-C_{16:0} ปริมาณเบส G+C เท่ากับ 37.7 mol% จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วย phyletic line ของสายพันธุ์ N7^T กับสายพันธุ์อื่นๆ ในสกุล *Pedobacter* ความคล้ายคลึงกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ N7^T กับแบคทีเรียอื่นๆ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 95.0% จากข้อมูลการวิเคราะห์ทางพีโนไทป์และข้อมูลในระดับโมเลกุลทำให้สามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ N7^T เป็นสปีชีส์ใหม่ ในสกุล *Pedobacter* โดยนำเสนอในชื่อ *Pedobacter oryzae* sp. nov. (=KACC 12821^T =DSM 19973^T)

Kwon *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์คือ 01-96^T และ 15-51^T ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากของผักกาดขาว พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly aerobic) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างท่อน โคโลนีเรียบ กลม นูน และเปลี่ยนเป็นสีชมพูหลังจาก 2 วัน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 2-37 องศาเซลเซียส pH 5.5-8.0 ที่ความเข้มข้นของ NaCl 0-15% จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 01-96^T มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter suwonensis* 15-52^T และ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T โดยมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 96.7% และ 96.7% ตามลำดับ และสายพันธุ์ 15-51^T มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter borealis* G-1^T และ *P. suwonensis* 15-52^T โดยมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 97.2% และ 97.1% ตามลำดับ อีกทั้งพบว่าค่าความคล้ายคลึงกันระหว่าง DNA ของสายพันธุ์ 15-51^T กับแบคทีเรีย *P. borealis* KACC 14287^T และ *P. suwonensis* KACC 11317^T ต่ำกว่า 50% ปริมาณเบส G+C ของสายพันธุ์ 01-96^T เท่ากับ 37.8 mol% และสายพันธุ์ 15-51^T เท่ากับ 38.6 mol% Fatty acid หลักที่สำคัญของทั้งสองสายพันธุ์คือ iso-C_{17:0} 3-OH, iso-C_{15:0} และ summed feature 3 (ประกอบด้วย C_{16:1} ω7c และ/หรือ iso-C_{15:0} 2-OH) จากผลการวิเคราะห์ DNA-DNA hybridization และลักษณะทางพีโนไทป์แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ 01-96^T และ 15-51^T อาจแตกต่างไปแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีความใกล้ชิดกันในสายวิวัฒนาการ และได้นำเสนอเป็นสองสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pedobacter* โดยนำเสนอในชื่อ *Pedobacter rhizosphaerae* sp. nov. (type strain 01-96^T =KACC 14938^T =NBRC 107690^T) และ *Pedobacter soli* sp. nov. (type strain 15-51^T =KACC 14939^T =NBRC 107691^T)

Ngo *et al.* (2015) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-T11^T ที่คัดแยกได้จากดินที่รากของต้นมะเขือเทศ ในจังหวัด Gyeonggi ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีลักษณะเป็นแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly aerobic) รูปร่างท่อน มีสีชมพูอมเหลือง เคลื่อนที่ได้ด้วยการไหล เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-T11^T มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter zeaxanthinifaciens* TDMA-5^T (ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 95.9%), *Pedobacter agri* PB92^T (94.9%), เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pedobacter rhizosphaerae 01-96^T (94.6%) และ *Pedobacter alluvionis* NWER-II11^T (94.5 %) ปริมาณเบส G+C เท่ากับ 38.4 mol% พบ Isoprenoid quinone เป็น menaquinone-7 (MK-7) เพียงชนิดเดียว รูปแบบของ Polyamine หลักที่สำคัญคือ sym-homospermidine Polar lipid หลักที่สำคัญคือ phosphatidylethanolamine, unidentified phosphoglycolipid, unidentified glycolipid, unidentified lipid, unidentified aminophospholipids และ unidentified aminolipids พบ ceramide หลักที่สำคัญคือ phosphorylethanolamine Fatty acid หลักที่สำคัญคือ iso-C_{15:0}, summed feature 3 (C_{16:1} ω7c และ/หรือ C_{16:1} ω6c) และ C_{16:0} จากข้อมูลดังกล่าวช่วยสนับสนุนความเกี่ยวข้องของแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-T11^T นี้ ว่าอยู่ในสกุล *Pedobacter* จากข้อมูลการวิเคราะห์ลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางเคมีและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ THG-T11^T ได้ถูกนำเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pedobacter* ในชื่อว่า *Pedobacter ureilyticus* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ THG-T11^T เป็น type strain (=KACC 17660^T=JCM 19461^T)

Chung et al. (2011) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ YC6722^T และ YC6723^T ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากในนาข้าว ณ เมือง Jinju ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีลักษณะเป็นแกรมลบ มีรงควัตถุสีเหลือง-ส้ม รูปร่างท่อน สภาวะการเจริญเหมาะสมที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH 7.0-8.5 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ YC6722^T มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sphingomonas jaspsi* TDMA-16^T (ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 96.6%) และสายพันธุ์ YC6723^T มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sphingomonas aquatilis* JSS7^T (96.9 %) ทั้งสองสายพันธุ์มี Quinone หลักที่สำคัญคือ ubiquinone-10 (Q-10) และพบ sym-homospermidine เป็น Polyamine หลัก ปริมาณเบส G+C ของสายพันธุ์ YC6722^T และ YC6723^T เท่ากับ 63.3 และ 61.0 mol% ตามลำดับ พบ Fatty acid หลักที่สำคัญ คือ C_{18:1} ω7c Polar lipid ที่พบในทั้งสองสายพันธุ์นี้คือ phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphatidyl dimethylethanolamine, sphingoglycolipid, และ unknown lipids อื่นๆ จากข้อมูลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ลักษณะทางชีวเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ YC6722^T และ YC6723^T ได้ถูกรายงานว่าเป็นสองสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Sphingomonas* ในชื่อ *Sphingomonas oryzae* sp. nov. (=KCTC 22476^T =DSM 21455^T) และ *Sphingomonas jinjuensis* sp. nov. (KCTC 22477^T =DSM 21457^T)

Xie and Yokota (2006) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์ คือ Y39^T, Y22 และ OSG47 ที่คัดแยกได้จากรากข้าว (*Oryza sativa*) ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกันมากด้วยลำดับความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ถึง 99% มากกว่าค่าที่ได้จากการทำ DNA-DNA hybridization ที่มีค่าเท่ากับ 70% แสดงให้เห็นว่าทั้งสามสายพันธุ์เป็นตัวแทนของสายพันธุ์เดียวกัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งให้เห็่นว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sphingomonas trueperi* (99.5%) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นชนิดแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ รูปร่างท่อนตรง เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella สามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีรงควัตถุสีเหลือง-ส้ม สภาวะการเจริญเหมาะสมที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส ลักษณะทางเคมีประกอบด้วยปริมาณเบส G+C เท่ากับ 68.0 mol% พบ ubiquinone Q-10 พบ fatty acid เพียงชนิด 2-OH hydroxyl และพบ Polyamine เพียงชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

homospermidine จากลักษณะทางเคมี ข้อมูลค่า DNA–DNA hybridization และลักษณะทาง สรีรวิทยา ทำให้ทั้งสามสายพันธุ์อาจมีความแตกต่างกันจากสายพันธุ์อื่นๆในสกุล *Sphingomonas* และได้นำเสนอแบคทีเรียสายพันธุ์ Y39^T ในชื่อ *Sphingomonas azotifigens* sp. nov. (=NBRC 15497^T=IAM 15283^T=CCTCC AB205007^T)

Son *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-DT81^T ที่คัดแยกได้จากดิน ในไรโซม ในจังหวัด Pocheon ประเทศเกาหลีใต้ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ออนุกรมวิธานในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ catalase ได้ ต้องการอากาศในการเจริญ (arobic) รูปร่างท่อน และเคลื่อนที่ด้วย polar flagellum สภาวะการเจริญเหมาะสมที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.0 ในอาหาร TSA ที่ไม่มี NaCl การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ THG-DT81^T อยู่ในวงศ์ *Sphingomonadaceae* และมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Sphingomonas pituitosa* EDIV^T (ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 98.0%), *S. leidyi* ATCC 15260^T (97.8%), *S. trueperi* LMG 2142^T (97.1%), *S. azotifigens* NBRC 15497^T (97.1%), *S. koreensis* JSS26^T (97.1%) และ *S. dokdonensis* DS-4^T (97.0%) แบคทีเรียสายพันธุ์ THG-DT81^T ประกอบด้วย Q-10 เป็น ubiquinone หลักที่สำคัญ และพบ C_{18:1} ω7c และ C_{16:0} เป็น Fatty acid หลักที่สำคัญ ปริมาณเบส G+C เท่ากับ 66.8 mol% รูปแบบ Polyamine หลักที่สำคัญ คือ sym-homospermidine Polar lipid หลักที่พบ คือ sphingoglycolipid phosphatidylethanolamine phosphatidylglycerol diphosphatidylglycerol และ phosphatidylcholine ค่าความคล้ายคลึงกันของ DNA-DNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-DT81^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงต่ำกว่า 21% ข้อมูลลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์นี้จึงช่วยอธิบายได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-DT81^T อยู่ในสกุล *Sphingomonas* จากข้อมูลทางอนุกรมวิธานแบคทีเรียสายพันธุ์ THG-DT81^T ได้ถูกรายงานว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Sphingomonas* โดยมีชื่อว่า *Sphingomonas kyeonggiense* sp. nov. มี type strain คือ THG-DT81^T (= KACC 17173^T = JCM 18825^T)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB broth)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test medium

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

3.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient gelatin broth

3.2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Strach agar

3.2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar

3.2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)

3.2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)

3.3 เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

3.3.1 เครื่องซังสาร

3.3.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.3.4 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar air flow)

3.3.5 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.3.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.7 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

3.3.8 เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

3.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.10 กล้องจุลทรรศน์

3.3.11 เครื่องวัด pH

3.3.12 ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80, -50 และ -20 องศาเซลเซียส

3.3.13 เครื่อง Gas-liquid chromatography

3.3.14 เครื่อง freeze dry

3.3.15 Anaerobic jar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.4.2 ฐัน (Agar)
- 3.4.3 Crystal violet
- 3.4.4 Safranin
- 3.4.5 Gram Iodine
- 3.4.6 Alcohol 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.4.7 Malachite green
- 3.4.8 Glycerol
- 3.4.9 Hydrogen peroxide
- 3.4.10 Hydrochloric acid
- 3.4.11 Sodium hydroxide
- 3.4.12 Methanol
- 3.4.13 Petroleum ether
- 3.4.14 Chloroform
- 3.4.15 Acetic acid
- 3.4.16 Nitrogen gas
- 3.4.17 Hydrogen gas
- 3.4.18 Dittmer&Lester reagent
- 3.4.19 Ninhydrin reagent
- 3.4.20 Anisaldehyde reagent
- 3.4.21 Dragendorff's reagent
- 3.4.22 Phosphomolibdic acid reagent

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

- 3.5.1 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.5.2 ไมโครปิเปตต์ ทิป (Micropipette tip)
- 3.5.3 กระบอกตวง
- 3.5.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 3.5.5 ลูกยาง
- 3.5.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.5.7 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.5.8 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.5.9 ปากคีบ (Forceps)
- 3.5.10 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.5.11 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- 3.5.12 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- 3.5.13 สไลด์ (Slide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.5.14 สไลด์หลุม
- 3.5.15 cover slip
- 3.5.16 ถุงพลาสติก
- 3.5.17 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ฟลาสก์ หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ปิเปต แท่งแก้ว ปีกเกอร์
- 3.5.18 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.5.19 ไม้จิ้มฟัน
- 3.5.20 ชุดน้ำยา API 50 CH
- 3.5.21 ขวด Centrifuge ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.5.22 หลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.5.23 ไมโครทิวป์ (Micro tube) ขนาด 1,500 ไมโครลิตร
- 3.3.24 อุปกรณ์ Thin-layer chromatography

3.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.6.1 การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (Singh *et al.*, 2015)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษายีน 16S rRNA ที่ทำการศึกษาไว้แล้ว มาทำการ Alignments เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon คำนวณค่าความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) โดยใช้โปรแกรม BioEdit และสร้าง phylogenetic trees ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ neighbor-joining method, maximum-parsimony และ maximum-likelihood method โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่า bootstrap จากการวิเคราะห์ซ้ำ 1,000 ครั้ง

3.6.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ

3.6.2.1 การศึกษาลักษณะของโคโลนี

เพาะเชื้อบนอาหาร Nutrient agar (NA) เป็นเวลา 2 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บันทึกผลโดยสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง ขอบ และผิวหน้าของโคโลนี

3.6.2.2 การติดสีแกรม

หยดน้ำลงบนสไลด์เล็กน้อยและทำการเสมียร์เชื้อ รोजनแห้ง ตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์โดยนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสี crystal violet ให้ทั่วมรอยเสมียร์ รอ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ หยด gram iodine ให้ทั่วมรอยเสมียร์ รอ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำอีกครั้ง ราดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ผ่านรอยเสมียร์เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน เป็นเวลาไม่เกิน 20 วินาที ย้อมซ้ำด้วยสี safranin ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำสะอาด ชับและรोजनแห้ง ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ด้วย oil immersion objective lens (กำลังขยาย 100X) เพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์

3.6.2.3 การย้อมสปอร์

หยดน้ำลงบนสไลด์เล็กน้อยและทำการเสมียร์เชื้อ รोजนแห้ง ตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์โดยการนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสี malachite green ให้ทั่วบริเวณรอยเสมียร์ จากนั้นนำ slide ไปวางบนไอน้ำเดือดประมาณ 5 นาที โดยต้องคอยเติมสี malachite green บน

สไลด์อย่าให้แห้ง เมื่อครบเวลาให้ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ซับและรอแห้ง หยดสี safranin ทับรอยเสมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับและรอจนแห้งตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

3.6.2.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารต่างๆ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop เชียโคโลนีมาให้มีปริมาณเชื้อเท่าๆกันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว Nutrient broth (NB), Tryptic soy broth (TSB) และ Luria-Bertani broth (LB) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบและบันทึกผลด้วยการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น

3.6.2.5 การทดสอบการทนอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop เชียโคโลนีมาให้มีปริมาณเชื้อเท่าๆกัน ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี pH ตั้งแต่ 4 -14 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งอาหารได้มีการปรับค่า pH 4-6 โดยใช้ 0.1 N Hydrochloric acid และที่ pH 8-14 โดยใช้ 1 N Sodium hydroxide บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบและบันทึกผลด้วยการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น

3.6.2.6 การทดสอบการทนความเป็นกรด-ด่าง

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop เชียโคโลนีมาให้มีปริมาณเชื้อเท่าๆกัน ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี pH ตั้งแต่ 4 -14 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งอาหารได้มีการปรับค่า pH 4-6 โดยใช้ 0.1 N Hydrochloric acid และที่ pH 8-14 โดยใช้ 1 N Sodium hydroxide บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบและบันทึกผลด้วยการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น

3.6.2.7 การทดสอบการทนเค็ม

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ loop เชียโคโลนีมาให้มีปริมาณเชื้อเท่าๆกัน ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10% w/v ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบและบันทึกผลโดยการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น

3.6.2.8 การทดสอบการเคลื่อนที่

3.6.2.8.1 ทดสอบการเคลื่อนที่ด้วยวิธี motility test medium

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ needle เชียเชื้อให้มีปริมาณเท่าๆกัน และ stab 1 ครั้ง ลงใน motility test medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ความลึกอยู่ที่ 2/3 ของอาหารทั้งหมด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบและบันทึกผลโดยการสังเกตการกระจายตัวของเชื้อจากรอยที่ stab ลงในอาหาร ถ้าเชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการเคลื่อนที่

3.6.2.8.2 ทดสอบการเคลื่อนที่ด้วยวิธี Hanging drop mount

หยดน้ำลงบน cover slip ใช้ loop เชียเชื้อลงในหยดน้ำ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยวาสลินมาแตะที่ 4 มุมของ cover slip นำสไลด์หลุมมาประกบเข้ากับ cover slip แล้วพลิกให้ cover slip อยู่ด้านบน ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 40X เพื่อดูการเคลื่อนที่

3.6.2.9 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3.6.2.9.1 เอนไซม์ catalase

ใช้ไม้จิ้มฟัน sterile เชี่ยวเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด หยด 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) 1 หยดลงไปบนบริเวณที่ป้ายเชื้อบน slide สังเกตผลด้วยการดูฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที

3.6.2.9.2 เอนไซม์ caseinase (ดวงพร, 2537)

เชี่ยวเชื้อแบคทีเรียลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ถ้ามีการสร้างเอนไซม์ caseinase จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.6.2.9.3 เอนไซม์ amylase (ดวงพร, 2537)

เชี่ยวเชื้อแบคทีเรียลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าเกิดสีน้ำเงินผลการทดสอบเป็นลบ

3.6.2.9.4 เอนไซม์ gelatinase

Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดอาหาร nutrient gelatin broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยนำหลอดที่มีเชื้อและ nutrient gelatin broth ซึ่งยังไม่ได้อินโอกูเลต อีก 1 หลอด ใส่ในตู้เย็นหรือแช่ในน้ำเย็น ประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่า nutrient gelatin broth หลอดที่ไม่มีเชื้อเกิดการแข็งตัว ให้ผลบวกเมื่อ nutrient gelatin broth ยังคงเป็นของเหลวเหมือนเดิมไม่ได้เกิดการแข็งตัวเหมือนกับหลอดที่ไม่มีเชื้อ และให้ผลลบเมื่อ nutrient gelatin broth แข็งตัว เช่นเดียวกับหลอดที่ไม่มีเชื้อ

3.6.2.10 การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50CH โดยเตรียมสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ชุดเชื้อแบคทีเรียจากอาหารใส่ลงในสารละลายจนมีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 4 ชุดสารละลายเชื้อที่เตรียมได้ลงในอาหาร API 50CHB/E ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นชุดสารละลายเชื้อในอาหาร API 50CHB/E ที่เตรียมไว้ลงในชุด API 50CH ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีเมื่อครบ 48 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ 1017 และ 10 วัน สำหรับสายพันธุ์ 1048

3.6.2.11 การเจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน (ดัดแปลงจาก Park *et al.*, 2015)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมา streak ลงบนอาหาร NA และนำไปเลี้ยงใน anaerobic jar โดยใส่แผ่น Gas Pack ที่มีหน้าที่สร้าง CO_2 และดักจับ O_2 ไว้กับผนังเหล็กในตัวทำปฏิกิริยาผสม จากนั้นบ่มเป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญของโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร

3.6.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ

3.6.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นสกัดและวิเคราะห์ตามโปรโตคอลมาตรฐานของระบบการจำแนกจุลินทรีย์ของ Sherlock รุ่น 6.1 และ TSBA 6.0 (MIDI, USA) โดยใช้เซลล์ 40 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง เติม Reagent 1 (ภาคผนวก ข) ลงไปในหลอด 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 5-10 วินาที (ถ้าเซลล์ไม่แตกจึงนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เย็นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Reagent 2 (ภาคผนวก ข) ลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 5-10 นาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำเย็น เติม Reagent 3 (ภาคผนวก ข) ลงไป 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ดูดสารละลายด้านบนมาใส่หลอดทดลองใหม่ และเติม Reagent 4 (ภาคผนวก ข) ลงไป 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนในปริมาณ 2 ใน 3 ส่วน ไปใช้ในการวิเคราะห์ fatty acid ด้วยเครื่อง GC โดยใช้เฟสคงที่คือคอลัมน์ HP-ULTRA2 ยาว 25 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร ภายในหนา 0.33 ไมโครเมตร และเฟสเคลื่อนที่คือแก๊สไฮโดรเจน

3.6.3.2 การวิเคราะห์หองค์ประกอบของ Polar lipid

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง TSA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ขูดเชื้อจากจานอาหารแข็งใส่หลอดไมโครทิวบ์ ทำการล้างเซลล์ 5 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 rpm 20 นาที ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงทำการล้างเซลล์ 5 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที และทำเซลล์แห้งโดยใช้วิธี freeze dry

ทำการสกัด Polar lipid ตามวิธีของ Minnikin *et al.* (1984) โดยใช้เซลล์แห้ง 180 มิลลิกรัม เติม methanol-0.3% NaCl aq. (100:10) และ petroleum ether 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นและดูดส่วนบนทิ้ง เติม petroleum ether 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ตั้งให้แยกชั้นและดูดส่วนบนทิ้งอีกครั้ง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที และแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติม chloroform:methanol:water (90:100:30) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 10 นาที ดูด supernatant ใส่ไว้ในหลอดอื่น เติม chloroform:methanol:water (50:100:40) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที หรือปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 10 นาที ดูด supernatant ใส่รวมไว้กับที่ดูดออกครั้งแรก ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติม chloroform:methanol:water (50:100:40) อีก 2 ครั้ง เติม chloroform และ water ลงใน supernatant fraction ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง และดูดส่วนบนทิ้ง นำไปทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน และวิเคราะห์ด้วย Two-dimensional thin layer chromatography (2D-TLC) โดยใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 × 10 เซนติเมตร : (Merck) และทำการ develop 2 ทิศทาง ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform:methanol:water (65:25:4,v/v/v) และ chloroform:acetic acid :methanol:water (40:7.5:6:2,v/v/v/v) แล้วพ่นด้วย

- Dittmer & Lester reagent สำหรับตรวจสอบ phospholipids (จุดสีฟ้า)
- Ninhydrin reagent หลังพ่นแล้วทำให้แห้งที่ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับตรวจสอบ phosphatidylethanolamine (PE) และอนุพันธ์ของ phosphatidylethanolamine คือ lyso-PE, OH-PE, methyl PE
- Anisaldehyde reagent หลังพ่นแล้วทำให้แห้งที่ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับตรวจสอบ glycolipid (จุดสีเขียวอมเหลือง) และ lipid อื่นๆ (จุดสีฟ้า)
- Dragendorff' reagent สำหรับตรวจสอบ phospholipids (phosphatidylcholine)
- Phosphomolibdic acid reagent สำหรับตรวจสอบ Polar lipid ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

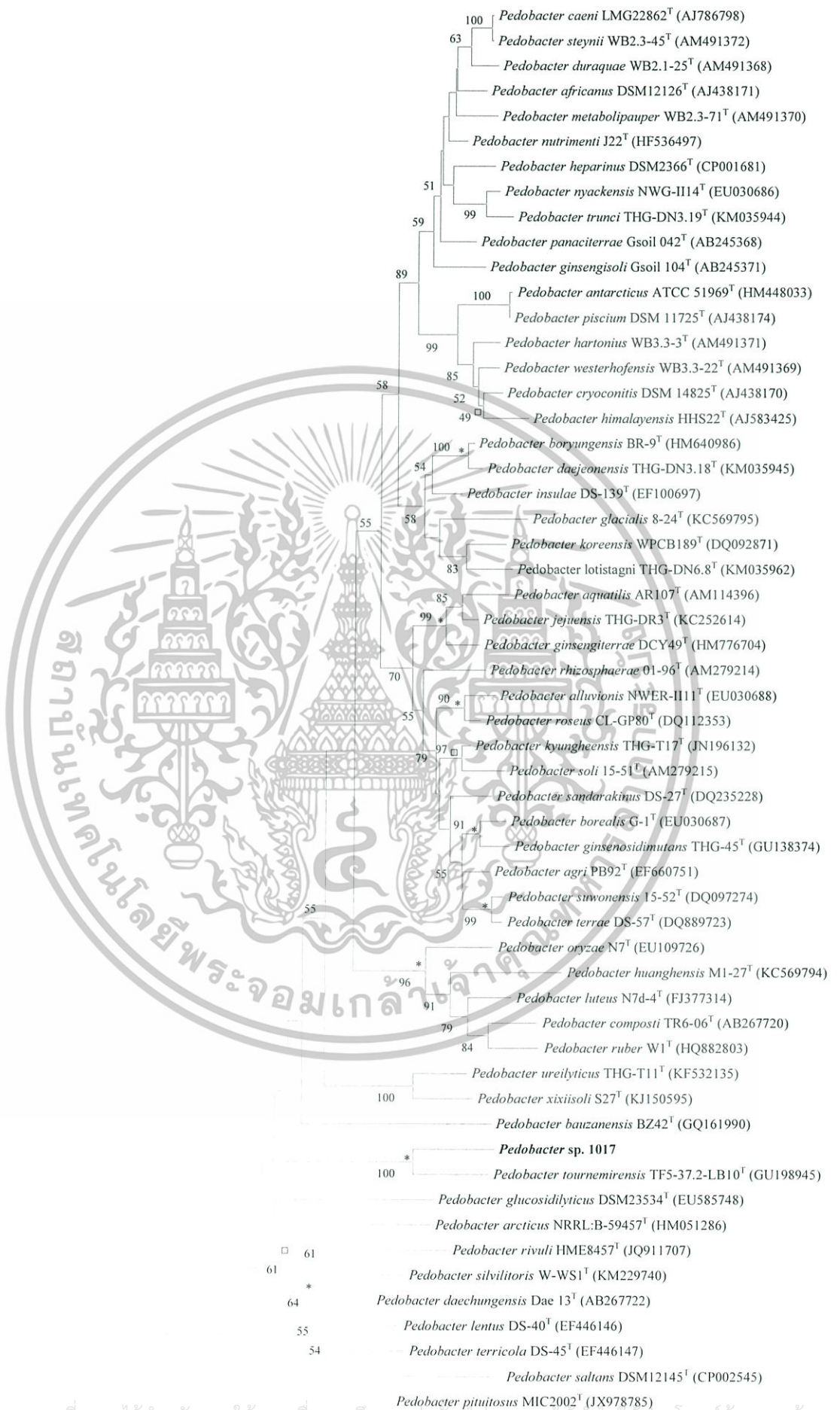
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทำ Multiple alignment analysis

4.1.1 การทำ Multiple alignment analysis ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017

นำลำดับเบสของยีน 16S rRNA (ภาคผนวก ค รูปที่ ค.1) มาทำการวิเคราะห์ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีความคล้ายคลึงกันกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) เท่ากับ 96.6% และมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียอื่นๆ อีกได้แก่ *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%) เมื่อนำผลการวิเคราะห์ multiple alignment มาสร้าง Phylogenetic tree พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T โดยผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining และ maximum parsimony มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากันคือ 100% (รูปที่ 4.1-4.2) และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 99% (รูปที่ 4.3) ซึ่งตำแหน่งของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 อยู่ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T โดยมีตำแหน่งอยู่ในกิ่งเดียวกันบน Phylogenetic tree เหมือนกันทั้งหมดจากการวิเคราะห์ทั้งสามแบบซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงอื่นๆที่มีค่าความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ในลำดับเบสลงมาเมื่อนำมาวิเคราะห์ Phylogenetic tree แล้ว พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining และ maximum parsimony ตำแหน่งของแบคทีเรียบน Phylogenetic tree คล้ายคลึงกันมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทั้งสามวิธีข้างต้น ตำแหน่งของเชื้อแบคทีเรียอาจมีความแตกต่างกัน แต่แบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันก็ยังคงอยู่ในกลุ่มเดียวกันบน Phylogenetic tree ทั้งสามแบบ และเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีค่าลำดับความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ของยีน 16S rRNA เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงต่ำกว่าค่า cut of ที่กำหนดคือ 98.5% ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ในสิ่งมีชีวิตพวก prokaryote (He *et al.*, 2015) ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pedobacter*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีเมล: 0.020 ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining โดยเครื่องหมายดอกจันที่ปรากฏบน Phylogenetic tree แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood และ maximum-parsimony เครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัส แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับ การแทนที่ 0.02 นิวคลีโอไทด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

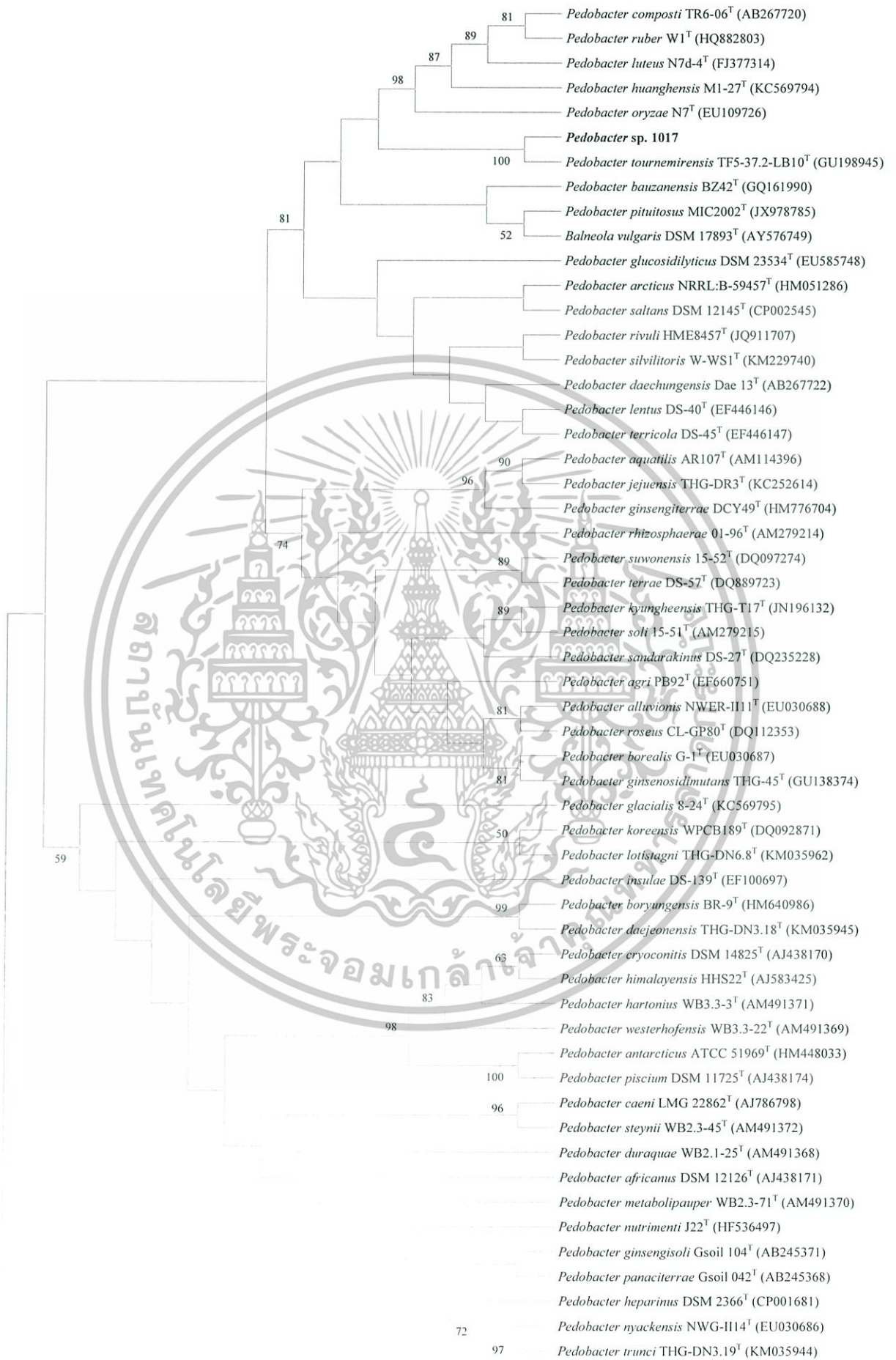


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆ ของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับ การแทนที่ 0.05 นิวคลีโอไทด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่าย การค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆ ของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น

4.1.2 การทำ Multiple alignment analysis ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048

เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA (ภาคผนวก ค รูปที่ ค.2) ไปทำการวิเคราะห์ multiple alignment analysis ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) เท่ากับ 97.4% และมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก 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%) เมื่อนำผลการวิเคราะห์ multiple alignment analysis มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 70% (รูปที่ 4.4) นอกจากนี้การสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการ maximum likelihood และ maximum parsimony มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 53% และ 39% ตามลำดับ (รูปที่ 4.5-4.6) ซึ่งตำแหน่งของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 อยู่ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T โดยมีตำแหน่งอยู่ในกิ่งเดียวกันบน Phylogenetic tree เหมือนกันทั้งหมดจากการวิเคราะห์ทั้งสามแบบซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงอื่นๆ ที่มีค่าความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ในลำดับรองลงมาเมื่อนำมาวิเคราะห์ Phylogenetic tree แล้ว พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood และ maximum parsimony ตำแหน่งของแบคทีเรียบน Phylogenetic tree คล้ายคลึงกันมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทั้งสามวิธีข้างต้น ตำแหน่งของเชื้อแบคทีเรียใน Phylogenetic tree อาจมีความแตกต่างกันแต่แบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันก็ยังคงอยู่ในกลุ่มเดียวกันบน Phylogenetic tree ทั้งสามแบบ และเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีค่าลำดับความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ของยีน 16S rRNA เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียงต่ำกว่าค่า cut of ที่กำหนดคือ 98.5% ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ในสิ่งมีชีวิตพวก prokaryote (He *et al.*, 2015) ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 นี้มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Sphingomonas*



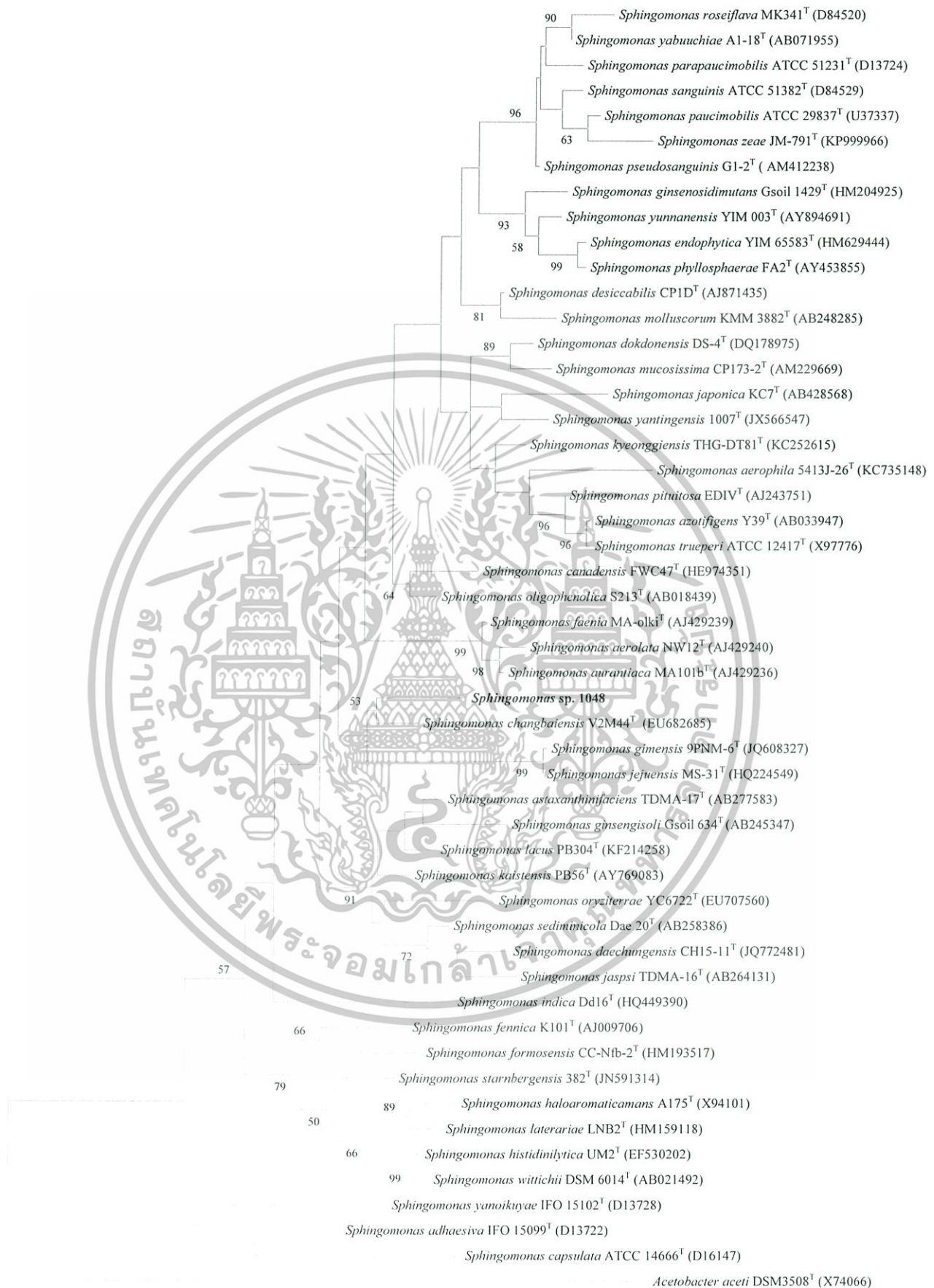
0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.4 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining โดยเครื่องหมายดอกจันที่ปรากฏบน Phylogenetic tree แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood และ maximum-parsimony เครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัส แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum-likelihood ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆ ของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับ การแทนที่ 0.02 นิวคลีโอไทด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆ ของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น แถบมาตรฐานด้านล่างมีค่าเท่ากับ การแทนที่ 0.05 นิวคลีโอไทด์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



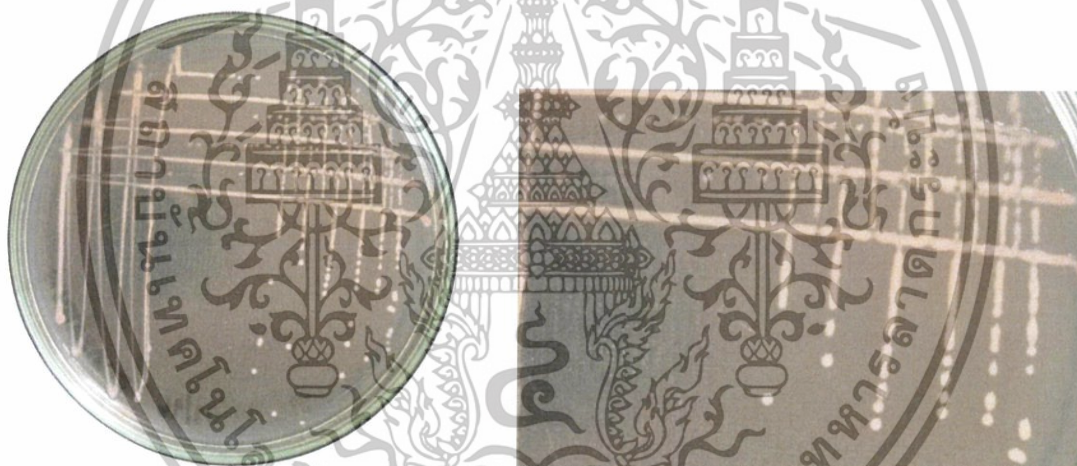
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 รูปแสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ค่าความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) แสดงไว้ตรงด้านบนของแขนงต่างๆ ของแผนภูมิ โดยแสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50 เท่านั้น

4.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์

4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017

ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 เป็นชนิด strictly aerobic แกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 ที่เจริญบนอาหาร NA มีสีชมพู โปรงแสง ผิวหนามันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน (รูปที่ 4.7) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 6-10 และที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-2% ในอาหารเหลว NB สภาวะการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% การเจริญยังสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว TSB และ LB มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase, amylase (รูปที่ 4.8) และ gelatinase



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

การใช้ชุดน้ำยา API 50CH แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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 ไม่สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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



รูปที่ 4.8 (ก) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017
(ข) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017

จากการผลการทดสอบลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์กับสายพันธุ์อ้างอิง (ตารางที่ 4.1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีลักษณะเป็นแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly aerobic) รูปร่างท่อน และส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ แต่สายพันธุ์ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T และ *Pedobacter luteus* N7d-4^T สามารถเคลื่อนที่ได้โดยการไถล ซึ่งลักษณะการติดสีแกรม ความต้องการอากาศในการเจริญ รูปร่างของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 มีความสอดคล้องกับลักษณะของสกุล *Pedobacter* (Singh et al., 2015)

ตารางที่ 4.1 ความแตกต่างลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Pedobacter* ที่เกี่ยวข้อง โดย

หมายเลข 1 คือ *Pedobacter* sp. 1017

หมายเลข 2 คือ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T (Urios *et al.*, 2013)

หมายเลข 3 คือ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T (An *et al.*, 2009)

หมายเลข 4 คือ *Pedobacter luteus* N7d-4^T (Oh *et al.*, 2013)

หมายเลข 5 คือ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T (Hwang *et al.*, 2016)

หมายเลข 6 คือ *Pedobacter ruber* W1^T (Margesin *et al.*, 2013)

หมายเลข 7 คือ *Pedobacter lentus* DS-40^T (Yoon *et al.*, 2007)

N/A คือ Not available (ไม่มีข้อมูล)

ลักษณะ	1	2	3	4	5	6	7
แหล่งที่พบ	รากข้าว	น้ำ	ทะเลสาบ	ดิน	บ่อน้ำ	ดิน	ดิน
การติดสีแกรม	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญแบบใช้ O ₂	strictly aerobic	strictly aerobic	strictly aerobic	strictly aerobic	strictly aerobic	strictly aerobic	strictly aerobic
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	รี/ท่อน
การสร้างสปอร์	-	N/A	-	N/A	N/A	N/A	-
การเคลื่อนที่	-	+	-	+	-	-	-
สีโคโลนี	ชมพู	ครีม-ชมพู	ส้มแดง	ส้ม-เหลือง	ชมพู	แดง	ส้ม-เหลือง
การสร้างเอนไซม์							
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Amylase	-	+	N/A	-	+	-	+
Caseinase	-	-	N/A	-	N/A	N/A	-
Gelatinase	-	-	N/A	-	+	-	-
อุณหภูมิในการเจริญ (°C)							
Range	20-45	12-37	15-30	15-30	5-33	1-25	4-31
Optimum	30-37	30	30	25	25-30	20-25	25
pH ในการเจริญ							
Range	6-10	6-9	5-8	6-8	6-8	N/A	6-8
Optimum	7-9	7	7	7	7	7	6.5-7.5
% (w/v) NaCl ในการเจริญ							
Range	0-2%	0-2%	0-1 g/l	0-1%	0-2%	N/A	0-4%
Optimum	0-1%	0.1%	N/A	0%	0%	0-1%	0-1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pedobacter sp. 1017 และสายพันธุ์อ้างอิงสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ทุกสายพันธุ์ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T และ *Pedobacter lentus* DS-40^T สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้ *Pedobacter* sp. 1017, *Pedobacter luteus* N7d-4^T และ *Pedobacter ruber* W1^T ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้ และ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T สามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้เพียงสายพันธุ์เดียว แหล่งที่พบแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 พบที่รากข้าว *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T, *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T และ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T พบในแหล่งน้ำ *Pedobacter luteus* N7d-4^T, *Pedobacter ruber* W1^T และ *Pedobacter lentus* DS-40^T พบในดิน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Pedobacter* sp. 1017 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส มีความคล้ายคลึงกับ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T และ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่มีความแตกต่างกับ *Pedobacter luteus* N7d-4^T, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T, *Pedobacter ruber* W1^T และ *Pedobacter lentus* DS-40^T ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH ในการเจริญ *Pedobacter* sp. 1017 เจริญได้ดีที่ pH 7-9 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์อ้างอิงทุกสายพันธุ์ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH เป็นกลาง การเจริญใน NaCl ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า *Pedobacter* sp. 1017 เจริญได้ดีในความเข้มข้น NaCl เหมือนกับ *Pedobacter ruber* W1^T และ *Pedobacter lentus* DS-40^T ซึ่งเจริญได้ดีในความเข้มข้น NaCl 0-1% และมีความคล้ายคลึงกับ *Pedobacter luteus* N7d-4^T และ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T ซึ่งเจริญได้ดีในความเข้มข้น NaCl 0% และ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T ซึ่งเจริญได้ดีในความเข้มข้น NaCl 0.1% ส่วน *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T ยังไม่สามารถสรุปได้เพราะไม่พบข้อมูล การทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียไม่สามารถทำการเปรียบเทียบได้ เนื่องจากในการทดลองนี้มีการใช้ชุดน้ำยา API 50CH เพียงชุดทดสอบเดียวสำหรับทดสอบแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และในสายพันธุ์อ้างอิง มีการใช้ชุดน้ำยาทดสอบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษาทำให้ได้ผลการทดลองแตกต่างกัน เช่น *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T และ *Pedobacter ruber* W1^T ใช้ชุดน้ำยา API 20NE, API 20E และ API ZYM ในการทดสอบ ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 กับสายพันธุ์อ้างอิงพบว่า บางลักษณะของสายพันธุ์อ้างอิงไม่พบข้อมูล เช่น ไม่พบข้อมูลการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T, *Pedobacter luteus* N7d-4^T, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T และ *Pedobacter ruber* W1^T ไม่พบข้อมูลการสร้างเอนไซม์ amylase ของสายพันธุ์ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T ไม่พบข้อมูลการสร้างเอนไซม์ caseinase ของสายพันธุ์ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T และ *Pedobacter ruber* W1^T ไม่พบข้อมูลการสร้างเอนไซม์ gelatinase ของสายพันธุ์ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์ได้ทุกลักษณะ ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์ของ *Pedobacter* sp. 1017 กับสายพันธุ์อ้างอิงที่พบข้อมูล พบว่า *Pedobacter* sp. 1017 มีความแตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิงทุกสายพันธุ์

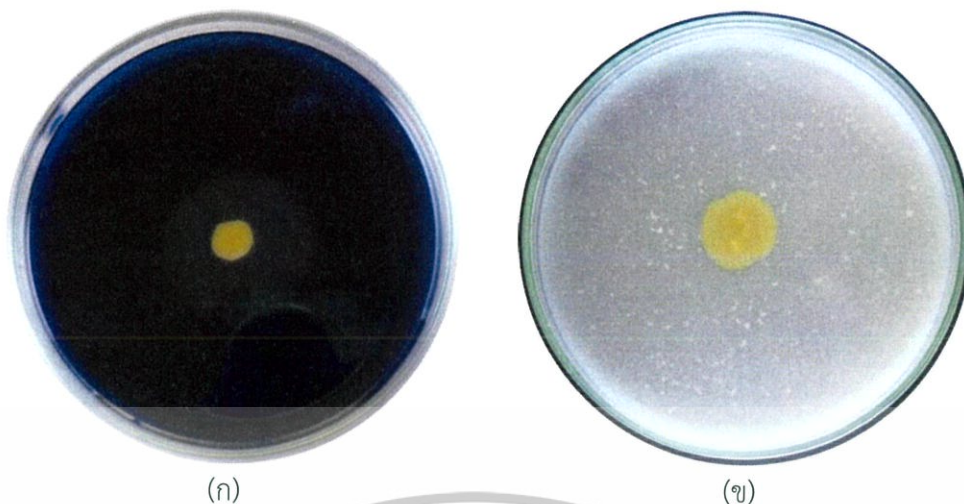
4.2.2 ลักษณะทางพีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048

ลักษณะทางพีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 เซลล์เป็นชนิด strictly aerobic แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ที่เจริญบนอาหาร NA มีสีเหลือง ทึบแสง ผิวหน้ำมันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน (รูปที่ 4.9) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 5-10 และที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% ในอาหารเหลว NB สภาวะการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-0.5% การเจริญยังสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว TSB และ LB อีกด้วย ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase, caseinase, amylase (รูปที่ 4.10) และ gelatinase



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 บนอาหาร NA ระยะเวลา 3 วัน

การใช้ชุดน้ำยา API 50CH แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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-trehatose, D-melezitose, amidon (starch), D-fucose, potassium 5-ketogluconate ไม่สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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



รูปที่ 4.10 (ก) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048
 (ข) รูปแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048

จากการผลการทดสอบลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์กับสายพันธุ์อ้างอิง (ตารางที่ 4.2) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีลักษณะเป็นแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ รูปร่างท่อน สามารถเคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และมีรงควัตถุสีเหลือง ซึ่งลักษณะการติดสีแกรม ความต้องการอากาศในการเจริญ รูปร่าง และรงควัตถุของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 มีความสอดคล้องตามลักษณะของสกุล *Sphingomonas* (Park et al., 2014)

ตารางที่ 4.2 ความแตกต่างลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Sphingomonas* ที่เกี่ยวข้อง โดย

หมายเลข 1 คือ *Sphingomonas* sp. 1048

หมายเลข 2 คือ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T (Zhang *et al.*, 2010)

หมายเลข 3 คือ *Sphingomonas canadensis* FWC47^T (Abraham *et al.*, 2013)

หมายเลข 4 คือ *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T (Romanenko *et al.*, 2007)

หมายเลข 5 คือ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T (Kim *et al.*, 2014)

หมายเลข 6 คือ *Sphingomonas azotifigens* Y39^T (Xie & Yokota, 2006)

หมายเลข 7 คือ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T (Kämpfer *et al.*, 1997)

N/A คือ Not available (ไม่มีข้อมูล)

ลักษณะ	1	2	3	4	5	6	7
แหล่งที่พบ	รากข้าว	ดิน	ตะกอน บ่อ บำบัด	เปลือก หอย	อากาศ	รากข้าว	ดิน
การติดสีแกรม	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญแบบใช้ O ₂	strictly aerobic	strictly aerobic	aerobic	aerobic	aerobic	aerobic	N/A
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน
การสร้างสปอร์	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	-
การเคลื่อนที่	-	+	-	-	+	+	+
สีโคโลนี	เหลือง	เหลือง	N/A	เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
การสร้างเอนไซม์							
Catalase	-	+	+	+	-	+	+
Amylase	-	-	N/A	+	-	N/A	N/A
Caseinase	-	-	N/A	+	-	N/A	N/A
Gelatinase	-	+	-	+	-	+	+
อุณหภูมิในการเจริญ (°C)							
Range	20-45	20-33	N/A	7-37	4-37	N/A	N/A
Optimum	30-37	29-31	28-30	25-28	28-30	25-37	N/A
pH ในการเจริญ							
Range	5-10	5-8	N/A	N/A	6-9	N/A	N/A
Optimum	7-9	6-7	6-8	N/A	7	N/A	N/A
% (w/v) NaCl ในการเจริญ							
Range	0-1%	0-1%	0-3%	0-4%	0-1%	0-2.5%	0-10%
Optimum	0-0.5%	0.05%	0-2%	N/A	0%	N/A	N/A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *Sphingomonas* สายพันธุ์ที่นำมาอ้างอิงเปรียบเทียบกับลักษณะทางฟีโนไทป์ สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้เกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น *Sphingomonas* sp. 1048 และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ ส่วนเอนไซม์ gelatinase พบว่า *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T, *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T, *Sphingomonas azotifigens* Y39^T และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T สามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้ และ *Sphingomonas* sp. 1048, *Sphingomonas canadensis* FWC47^T และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้ โดย *Sphingomonas* sp. 1048 สามารถพบได้ที่รากข้าวเหมือนกับ *Sphingomonas azotifigens* Y39^T ส่วน *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T สามารถพบได้ในดิน *Sphingomonas canadensis* FWC47^T พบได้ในตะกอนบ่อบำบัด *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T พบได้ที่เปลือกหอย และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T พบได้ในอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas* สายพันธุ์อ้างอิงและ *Sphingomonas* sp. 1048 อยู่ในช่วงของแบคทีเรียประเภท mesophile คือสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิทั่วไปที่ 25-40 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญใน NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า *Sphingomonas* sp. 1048, *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T เจริญได้ในช่วงความเข้มข้น NaCl 0-1% ส่วน *Sphingomonas canadensis* FWC47^T เจริญได้ในช่วงความเข้มข้น NaCl 0-3%, *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T เจริญได้ในช่วงความเข้มข้น NaCl 0-4%, *Sphingomonas azotifigens* Y39^T เจริญได้ในช่วงความเข้มข้น NaCl 0-2.5% และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T สามารถเจริญได้ในช่วงความเข้มข้น NaCl 0-10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Sphingomonas* สายพันธุ์อ้างอิงอื่นๆ การทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียไม่สามารถทำการเปรียบเทียบได้ เนื่องจากในการทดลองนี้มีการใช้ชุดน้ำยา API 50CH เพียงชุดทดสอบเดียว สำหรับทดสอบแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และมีการใช้ชุดน้ำยาทดสอบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา ทำให้ได้ผลการทดลองแตกต่างกัน เช่น ใช้ชุดน้ำยา API 50CH สำหรับทดสอบแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T ใช้ชุดน้ำยา API 20NE สำหรับทดสอบแบคทีเรีย *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T ใช้ชุดน้ำยา API ZYM สำหรับทดสอบแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T และ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T เป็นต้น และในบางการศึกษาไม่มีการระบุว่าใช้ชุดน้ำยาใดในการทดสอบอีกด้วย จากการเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 กับสายพันธุ์อ้างอิงพบว่า บางลักษณะของสายพันธุ์อ้างอิงไม่พบข้อมูล เช่น การสร้างเอนไซม์ amylase, caseinase, ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ และช่วง pH ในการเจริญของแบคทีเรีย *Sphingomonas canadensis* FWC47^T, *Sphingomonas azotifigens* Y39^T และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T เป็นต้น ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์กับสายพันธุ์อ้างอิงได้ทุกลักษณะ ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์ของ *Sphingomonas* sp. 1048 กับสายพันธุ์อ้างอิงที่พบข้อมูล พบว่า *Sphingomonas* sp. 1048 มีความแตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิงทุกสายพันธุ์

4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017

จากการวิเคราะห์ชนิดของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 พบว่าชนิดของ fatty acid ที่สำคัญของแบคทีเรียนี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 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%) ชนิดของ fatty acid ที่เป็นส่วนน้อยของสปีชีส์ประกอบด้วย summed feature 9 (5.0%), iso-C_{15:0} 3-OH (3.0%) และ C_{16:0} (2.2%) อย่างไรก็ตามคุณภาพและปริมาณของ Cellular fatty acid มีความแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆของจีนัส *Pedobacter* ที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Pedobacter* ที่เกี่ยวข้อง

หมายเลข 1 คือ *Pedobacter* sp. 1017

หมายเลข 2 คือ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T (Urios *et al.*, 2013)

หมายเลข 3 คือ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T (An *et al.*, 2009)

หมายเลข 4 คือ *Pedobacter luteus* N7d-4^T (Oh *et al.*, 2013)

หมายเลข 5 คือ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T (Hwang *et al.*, 2016)

หมายเลข 6 คือ *Pedobacter ruber* W1^T (Margesin *et al.*, 2013)

หมายเลข 7 คือ *Pedobacter lentus* DS-40^T (Yoon *et al.*, 2007)

โดย tr คือ ร่องรอย (น้อยกว่า 1% หรือ ตรวจไม่พบ)

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7
Saturated							
C _{12:0}	0.4	-	-	-	-	-	-
C _{14:0}	0.3	-	-	-	tr	-	-
C _{15:0}	-	-	-	-	tr	8.1	1.8
C _{16:0}	2.2	1.3	6.9	6.9	tr	1.4	0.8
C _{17:0}	0.1	-	-	-	-	-	-
C _{18:0}	0.7	-	-	-	-	-	-
Unsaturated							
C _{15:1} ω6c	0.6	-	1.6	1.6	1.6	5.1	2.4
C _{17:1} ω8c	0.2	-	2.0	1.1	-	2.5	0.5
C _{18:1} ω9c	0.4	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Pedobacter* ที่เกี่ยวข้อง

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7
Branched							
iso-C _{11:0}	0.1	-	-	-	-	-	-
iso-C _{13:0}	0.2	-	-	-	-	-	0.7
iso-C _{15:0}	56.1	45.6	10.5	11.5	37.0	9.1	44.7
iso-C _{16:0}	0.1	-	-	2.7	-	3.1	0.5
iso-C _{17:0}	0.8	-	-	-	-	-	-
iso-C _{15:1} F	0.2	1.5	-	-	-	-	-
anteiso-C _{14:0}	0.1	-	-	-	-	-	-
anteiso-C _{15:0}	0.4	-	5.1	16.5	1.9	10.0	2.9
anteiso-C _{16:0}	0.1	-	-	-	-	-	-
anteiso-C _{17:0}	0.1	-	-	-	-	-	-
Hydroxylated							
C _{15:0} 2OH	0.2	-	2.2	1.3	tr	0.6	0.4
C _{16:0} 2OH	0.2	-	-	-	-	-	-
C _{16:0} 3OH	0.3	tr	tr	-	1.0	1.1	-
iso-C _{15:0} 3OH	3.0	2.8	2.4	1.7	2.7	0.7	4.1
iso-C _{16:0} 3OH	0.2	-	5.1	4.0	tr	6.4	0.9
iso-C _{17:0} 3OH	12.0	10.5	12.8	9.6	11.3	6.4	19.7
Summed Feature*							
Summed Feature 1	0.5	2.7	-	-	-	-	0.6
Summed Feature 2	0.1	-	-	-	-	-	-
Summed Feature 3	14.3	18.9	24.0	16.9	-	17.6	8.0
Summed Feature 4	0.7	2.0	-	-	-	-	1.0
Summed Feature 5	0.1	-	-	-	-	-	-
Summed Feature 8	0.5	-	-	-	-	-	-
Summed Feature 9	5.0	-	-	-	-	-	-

* summed feature คือ กลุ่มของกรดไขมันสองหรือสามกลุ่มที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วย GC โดยใช้ระบบ MIDI ซึ่ง 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 ที่มีความยาวของสายโซ่เท่ากับ 10.928, 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,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

summed feature 8 ประกอบด้วย $C_{18:1} \omega 7c$ และ/หรือ $C_{18:1} \omega 6c$, summed feature 9 ประกอบด้วย $C_{16:0}$ 10-methyl

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 โดยเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า *Pedobacter* sp. 1017, *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T และ *Pedobacter lentus* N7d-4^T มี fatty acid ชนิด iso- $C_{15:0}$ ในปริมาณมากที่สุด คือ 56.1%, 45.6%, 37.0% และ 44.7% ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T, *Pedobacter luteus* N7d-4^T และ *Pedobacter ruber* W1^T พบ fatty acid ชนิด summed feature 3 ปริมาณมากที่สุด คือ 24.0%, 16.9% และ 17.6% ตามลำดับ พบ $C_{12:0}$ (0.4%), iso- $C_{11:0}$ (0.1%), iso- $C_{17:0}$ (0.8%), anteiso- $C_{14:0}$ (0.1%), anteiso- $C_{16:0}$ (0.1%), anteiso- $C_{17:0}$ (0.1%), $C_{16:0}2OH$ (0.2%) และ summed feature 2 (0.1%) ในเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 เพียงสายพันธุ์เดียว พบ iso- $C_{15:1} F$ (0.2%) และ summed feature 1 (0.5%) ในเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และ *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T พบ $C_{15:0}$ ในสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 6 สายพันธุ์แต่ไม่พบในสายพันธุ์ *Pedobacter* sp. 1017 และไม่พบ $C_{15:0} 2OH$ และ iso- $C_{16:0} 3OH$ ในสายพันธุ์อ้างอิง *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T เพียงสายพันธุ์เดียว ความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณ fatty acid ที่พบนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ โดยในสายพันธุ์ที่นำมาอ้างอิงนี้มีการใช้อาหารทั้ง TSA สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T, *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T และ *Pedobacter roseus* CL-GP80^T, NA สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter lentus* DS-40^T หรือ R2A สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter luteus* N7d-4^T และ *Pedobacter ruber* W1^T หรืออาจเป็นไปได้ว่าไม่ได้มีการรายงานองค์ประกอบ fatty acid บางชนิดในรายงานอื่นๆที่ได้มีการตีพิมพ์เนื่องจากพบในปริมาณที่น้อยมาก

ลักษณะทางเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 สรุปได้ว่าสามารถพบ fatty acid ชนิด iso- $C_{15:0}$, summed feature 3 และ iso- $C_{17:0} 3OH$ เป็น fatty acid หลัก ซึ่งสอดคล้องตามคุณลักษณะที่ได้อธิบายไว้สำหรับสายพันธุ์ที่อยู่ในจีนัส *Pedobacter* (Singh et al., 2015)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048

จากการวิเคราะห์ชนิดของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 พบว่าชนิดของ fatty acid ที่สำคัญของแบคทีเรียนี้ส่วนใหญ่เป็นชนิด summed feature 8 ที่ประกอบด้วย $C_{18:1} \omega 7c$ และ/หรือ $C_{18:1} \omega 6c$ (66.0%) และ $C_{16:0}$ (10.1%) ชนิดของ fatty acid ที่มีปริมาณปานกลางของสปีชีส์ประกอบด้วย $C_{14:0} 2-OH$ (6.5 %) และชนิดของ fatty acid ที่เป็นส่วนน้อยของสปีชีส์ประกอบด้วย $C_{17:1} \omega 6c$ (3.9%), $C_{18:1} \omega 5c$ (3.7%) และ $C_{18:0}$ (2.1%) อย่างไรก็ตามคุณภาพและปริมาณของ Cellular fatty acid มีความแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆของจีนัส *Sphingomonas* ที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Sphingomonas* ที่เกี่ยวข้อง

หมายเลข 1 คือ *Sphingomonas* sp. 1048

หมายเลข 2 คือ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T (Zhang *et al.*, 2010)

หมายเลข 3 คือ *Sphingomonas canadensis* FWC47^T (Abraham *et al.*, 2013)

หมายเลข 4 คือ *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T (Romanenko *et al.*, 2007)

หมายเลข 5 คือ *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T (Kim *et al.*, 2014)

หมายเลข 6 คือ *Sphingomonas azotifigens* Y39^T (Xie & Yokota, 2006)

หมายเลข 7 คือ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T (Kämpfer *et al.*, 1997)

โดย tr คือ ร่องรอย (น้อยกว่า 1% หรือ ตรวจไม่พบ)

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7
Saturated							
C _{12:0}	0.4	-	-	-	-	-	-
C _{14:0}	0.6	-	-	-	-	2.6	-
C _{15:0}	-	2.3	4.9	1.7	-	-	-
C _{16:0}	10.1	5.3	4.2	24.0	9.7	24.5	9.8
C _{17:0}	0.5	3.8	4.4	-	-	-	1.6
C _{18:0}	2.1	tr	-	9.2	-	3.8	-
Unsaturated							
C _{15:1}	-	-	-	1.6	-	-	-
C _{16:1}	-	-	-	2.1	-	-	-
C _{17:1}	-	-	-	2.5	-	-	-
C _{19:1}	-	-	-	3.9	-	-	-
C _{16:1} ω5c	0.7	1.4	-	-	2.3	-	-
C _{17:1} ω6c	3.9	38.9	39.5	-	1	1.4	13.6
C _{17:1} ω8c	0.5	5.2	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω5c	3.7	1.2	-	-	-	1.2	4.0
C _{18:1} ω7c	-	-	-	17.7	-	44.7	-
C _{18:1} ω9	-	-	-	16.5	-	-	-
C _{18:2} ω6	-	-	-	8.1	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) องค์ประกอบของ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Sphingomonas* ที่เกี่ยวข้อง

Fatty acids	1	2	3	4	5	6	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	-	-	-	-	-	-
cyclo-C _{19:0} ω8c	-	-	-	-	-	3.3	-
Hydroxylated							
C _{14:0} 2OH	6.5	1.3	2.9	12.8	11.5	13.3	6.7
C _{15:0} 2OH	0.7	4.4	21.5	-	-	0.9	-
C _{16:0} 2OH	0.4	1.8	4.1	-	-	-	-
C _{18:1} 2OH	-	-	-	-	0.7	-	-
Summed Feature*							
Summed Feature 3	0.5	1	-	-	16.2	1.2	-
Summed Feature 7	-	31.5	13.9	-	-	-	64.2
Summed Feature 8	66.9	-	-	-	55.5	-	-
C _{18:0} 10-methyl	0.2	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω7c 11-methyl	-	2.0	-	-	2.5	10.9	-

* summed feature คือ กลุ่มของกรดไขมันสองหรือสามกลุ่มที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วย GC โดยใช้ระบบ MIDI ซึ่ง summed feature 3 ประกอบด้วย C_{16:1} ω7c และ/หรือ C_{16:1} ω6c, summed feature 7 ประกอบด้วย C_{18:1} ω7c, C_{18:1} ω9t และ/หรือ C_{18:1} ω12t และ summed feature 8 ประกอบด้วย C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c (c คือ cis isomers และ t คือ trans isomers)

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Cellular fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 โดยเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงทั้ง 6 สายพันธุ์ พบ fatty acid ชนิด C_{16:0}, C_{14:0} 2OH เป็นองค์ประกอบที่สามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 และสายพันธุ์ที่นำมาอ้างอิงทั้ง 6 สายพันธุ์ ซึ่ง fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ต่างจากสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง โดยสามารถพบ C_{12:0} (0.4%), 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} (0.4%), anteiso-C_{17:1} A (0.6%), C_{18:0} 10-methyl (0.2%) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ไม่พบในสายพันธุ์อื่นๆที่นำมาอ้างอิง อีกทั้งพบ fatty acid ชนิด C_{15:1} (1.6%), เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C_{16:1} (2.1%), C_{17:1} (2.5%), C_{19:1} (3.9%), C_{18:1} ω9 (16.5%) และ C_{18:2} ω6 (8.1%) เพียงแคในแบคทีเรีย *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T และพบ fatty acid ชนิด cyclo-C_{19:0} ω8c (3.3%) เพียงแคในแบคทีเรีย *Sphingomonas azotifigens* Y39^T พบ fatty acid ชนิด C_{18:1} ω7c 11-methyl ในสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ คือ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T, *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T และ *Sphingomonas azotifigens* Y39^T และพบ summed feature 7 ในสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์เช่นกัน คือ *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T, *Sphingomonas canadensis* FWC47^T และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T ความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณ fatty acid ที่พบนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ โดยในสายพันธุ์ที่นำมาอ้างอิงนี้มีการใช้อาหารทั้ง TSA สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T และ *Sphingomonas azotifigens* Y39^T, D-TSB agar สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T, R2A สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T หรือ PYEM broth สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Sphingomonas canadensis* FWC47^T ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้นหรืออาจเป็นไปได้ว่าไม่ได้มีการรายงานองค์ประกอบ fatty acid บางชนิดในรายงานอื่นๆที่ได้มีการตีพิมพ์เนื่องจากพบในปริมาณที่น้อยมาก อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่สอดคล้องกับแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 โดยองค์ประกอบ fatty acid ของแบคทีเรีย *Sphingomonas aerophila* sp. 5413J-26^T ยังพบ summed Feature 8 (55.8%), C_{16:0} (9.7%) และ C_{14:0} 2OH (11.5%) และแบคทีเรีย *Sphingomonas naasensis* sp. nov. KIS18-15^T (Kim *et al.*, 2014) พบ summed Feature 8 (65.8%), C_{16:0} (13.6%) และ C_{14:0} 2OH (8.4%) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เป็นคุณสมบัติของสกุล *Sphingomonas* และเป็นองค์ประกอบของ fatty acid ที่พบเหมือนกันกับแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ที่ได้ทำการศึกษา

ลักษณะทางเคมีของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 สรุปได้ว่าสามารถพบ summed feature 8 (C_{18:1} ω7c และ/หรือ C_{18:1} ω6c), C_{16:0} และ C_{14:0} 2OH เป็น fatty acid หลัก และไม่พบ 3-hydroxy fatty acid ในการวิเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องตามคุณลักษณะที่ได้อธิบายไว้สำหรับสายพันธุ์ที่อยู่ในจีนัส *Sphingomonas* (Romanenko *et al.*, 2007)

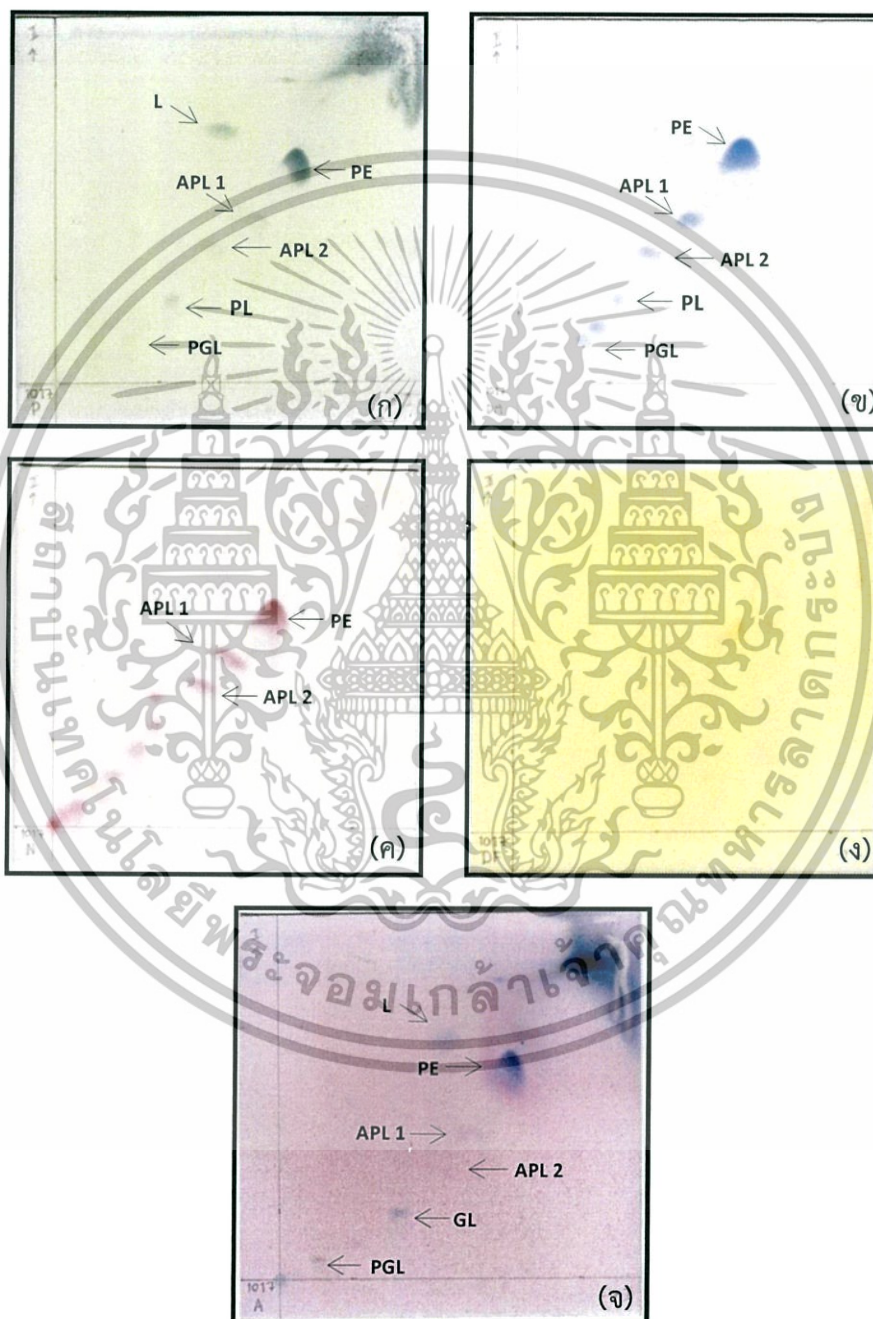
อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่สอดคล้องกับแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ที่ได้มีการศึกษาไว้โดย Xie and Yokota (2006) ณ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งสามารถทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ในสกุล *Sphingomonas* โดยทำการศึกษานุกรมวิธานและนำเสนอในชื่อ *Sphingomonas azotifigens* sp. nov. (=NBRC 15497^T=IAM 15283^T=CCTCC AB205007^T) ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวเป็นแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* และสามารถคัดแยกได้จากรากข้าวเช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ในโครงการพิเศษนี้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ Polar lipid

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ Polar lipids ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017

การวิเคราะห์ Polar lipid ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนี้มีองค์ประกอบของ Polar lipid เป็น Phosphatidylethanolamine (PE), Phospholipid (PL), Unidentified Aminophospholipid (APL1-2), Phosphoglycolipid (PGL), Glycolipid (GL), Unidentified Polar lipid (L) (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ Polar lipids ด้วยวิธี two-dimensional TLC และทำการตรวจสอบด้วย Phosphomolybdcic acid reagent (ก), Dittmer-Lester reagent (ข), Ninhydrin reagent (ค), Dragendoff's reagent (ง) และ Anisaldehyde reagent (จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ Polar lipid ด้วยวิธี 2D-TLC ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 พบ Phosphatidylethanolamine (PE) เป็น Polar lipid หลัก ซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะของสกุล *Pedobacter* (Singh *et al.*, 2015) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลองค์ประกอบของ Polar lipids กับสายพันธุ์อ้างอิงที่นำมาศึกษาพบข้อมูลของสายพันธุ์อ้างอิงเพียงสองสายพันธุ์คือ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T และ *Pedobacter luteus* N7d-4^T (ภาคผนวก ง) โดยใน *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T พบ Phosphatidylethanolamine (PE) เป็น Polar lipids หลัก และ *Pedobacter luteus* N7d-4^T พบ Phosphatidyl-N-methylethanolamine (PME) และ phosphatidylethanolamine (PE) เป็น Polar lipids หลัก นอกจากนี้ยังพบ Unidentified Aminophospholipid (APL) ในแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 สองชนิดคือ APL1 และ APL2 ในแบคทีเรีย *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T พบสี่ชนิดคือ APL1-4 แต่ไม่พบ APL ใน *Pedobacter luteus* N7d-4^T ส่วน Unidentified Polar lipid (L) ของแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 พบเพียงชนิดเดียว ซึ่งใน *Pedobacter luteus* N7d-4^T พบ L1-4 แต่ไม่พบใน *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T พบ Unidentified Aminolipid (AL) ใน *Pedobacter luteus* N7d-4^T เพียงสายพันธุ์เดียว และ *Pedobacter* sp. 1017 ยังพบ Phospholipid (PL), Phosphoglycolipid (PGL) และ Glycolipid (GL) เพียงสายพันธุ์เดียว

ดังนั้น *Pedobacter* sp. 1017 จึงมีความแตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งความแตกต่างกันของชนิด Polar lipids ที่พบนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ โดย *Pedobacter* sp. 1017 เลี้ยงในอาหาร TSA, *Pedobacter luteus* N7d-4^T เลี้ยงในอาหาร R2A และ *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T เลี้ยงในอาหาร NB

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากข้าวและมีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่คือ แบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 และแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 ได้ผลดังนี้

แบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นชนิด strictly aerobic โคโลนีสีชมพู โปรงแสง ผิวหน้ามันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 6-10 และสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-2% สภาพการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% และสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว NA, TSA, TSB และ LB มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase, amylase และ gelatinase สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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, D-melibiose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, inulin, D-raffinose, amidon (starch), glycogen, gentiobiose, D-turanose, L-fucose ไม่สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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 มี iso-C_{15:0} (56.1%), summed feature 3 ที่ประกอบด้วย C_{16:1} ω 6c และ/หรือ C_{16:1} ω 7c (14.3%) และ iso-C_{17:0} 3-OH (12.0%) เป็น fatty acid หลัก มี Polar lipid หลักคือ phosphatidylethanolamine (PE) และจากการทำ Multiple alignment analysis โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และนำมาเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) กับฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. 1017^T มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T มากที่สุดเท่ากับ 96.6%, *Pedobacter daechungensis* Dae13^T เท่ากับ 93.1%, *Pedobacter luteus* N7d-4^T เท่ากับ 93%, *Pedobacter roseus* CL-GP80^T เท่ากับ 92.8%, *Pedobacter ruber* W1^T เท่ากับ 92.7% และ *Pedobacter lentus* DS-40^T เท่ากับ 92.6% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Pedobacter tournemirensis* TF5-37.2-LB10^T โดยผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining และ maximum parsimony มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากันคือ 100% (รูปที่ 4.1-4.2) และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 99% (รูปที่ 4.3)

แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 1048 เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นชนิด strictly aerobic โคลีนีสีเหลือง ทึบแสง ผิวหน้ามันวาว ขอบเรียบ และโค้งนูน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH 5-10 และสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-1% สภาพการเจริญที่เหมาะสมที่สุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ที่ pH 7-9 และมีความเข้มข้นของ NaCl 0-0.5% การเจริญยังสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว NA, TSA, TSB และ LB ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase, casinase, amylase และ gelatinase สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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 ไม่สามารถสร้างกรดได้จากสาร 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 มี summed feature 8 ที่ประกอบด้วย C_{18:1} ω 7c และ/หรือ C_{18:1} ω 6c (66.0%) และ C_{16:0} (10.1%) เป็น fatty acid หลัก และจากการทำ Multiple alignment analysis โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และนำมาเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) กับฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าสายพันธุ์ *Sphingomonas* sp. 1048 มีความคล้ายคลึงกันกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T มากที่สุดเท่ากับ 97.4%, *Sphingomonas canadensis* FWC47^T เท่ากับ 97.2%, *Sphingomonas molluscorum* KMM 3882^T เท่ากับ 97.0%, *Sphingomonas aerophila* 5413J-26^T เท่ากับ 96.7%, *Sphingomonas azotifigens* Y39^T เท่ากับ 96.7% และ *Sphingomonas trueperi* ATCC 12417^T เท่ากับ 96.7% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ 1048 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Sphingomonas changbaiensis* V2M44^T โดยผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor-joining มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 70% (รูปที่ 4.4) และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood และ maximum parsimony มีระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) เท่ากับ 53% และ 39% ตามลำดับ (รูปที่ 4.5-4.6)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรซื้อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาในแต่ละสกุล มาทำการศึกษาในสถานะเดียวกัน เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ

5.2.2 ควรทำการศึกษาด้านอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ตรวจสอบลักษณะของเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน, วิเคราะห์ DNA-DNA hybridization และตรวจสอบปริมาณเบส G+C เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลให้มีความน่าเชื่อถือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- จิราพร ใจตรง, เมทนี มูลศรี และสถาพร เนินหอม. 2554. “การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสปีท ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินในประเทศไทย.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จूरियร์ตัน ลีสมิท. 2548. *ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นันทวัน เทียนหอม. 2555. “ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสปีทหายากจากป่าพรุเขตตอนในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย. 2545. *ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.
- สุจิตตรา ปะนันโต, ภาคภูมิ ตันเดชสาธิต, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, รังสฤษฎี กาวีดี และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. “เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว.” *แก่นเกษตร*. 41(4) : 467-468.
- สุภานันท์ จันทรประอบ. 2554. “การปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพจากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งด้วยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน.” *ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*.
- สุรวีทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. *วิทยาแบคทีเรีย*. สุรินทร์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสุรินทร์.
- หนึ่ง เตียงอำรุง. 2554. *แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abraham, W.R. Estrela, A.B. Rohde, M. Smit, J. and Vancanneyt M. 2013. “Prosthecate sphingomonads: proposal of *Sphingomonas canadensis* sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 3214-3219.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- An, D.S. Kim, S.G. Ten, L.N. and Cho, C.H. 2009. “*Pedobacter daechungensis* sp. nov., from freshwater lake sediment in South Korea.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 : 69-72.
- An, D.S. Liu, Q.M. Lee, H.G. Jung, M.S. Kim S.C. Lee, S.T. and Im, W.T. 2013. “*Sphingomonas ginsengisoli* sp. nov. and *Sphingomonas sedimnicola* sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 496-501.
- Christensen, P. 1980. “Description and Taxonomic Status of *Cytophaga heparina* (Payza and Korn) comb. nov. (Basionym: *Flavobacterium heparinum* Payza and Korn 1956).” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30(2) : 473-475.
- Chung, E.J. Jo, E.J. Yoon, H.S. Song, G.C. Jeon, C.O. and Chung Y.R. 2011. “*Sphingomonas oryzae* sp. nov. and *Sphingomonas jinjuensis* sp. nov. isolated from rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.).” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 : 2389-2394.
- Du, J. Singh, H. Ngo, H.T.T., Won, K.H. Kim, K.Y. and Yi, T.H. 2015. “*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*. 65 : 1241-1246.
- Fean, D.S. Rachel, M. van der Kaaij & Slavko, K. Dirk-Jan, W. Doede, J. B. Marc, J. E. C. van der Maarel & Lubbert, D. 2011. “Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium aurum* strain B8.A.” *Appl Microbiol Biotechnol*. 93 : 645-654.
- He, S.T. Zhi, X.Y. Jiang, H. Yang, L.L. Wu, J.Y. Zhang, Y.G. Hozzein, W.N. and Li, W.J. 2015. “Biogeography of *Nocardiopsis* strains from hypersaline environments of Yunnan and Xinjiang Provinces, western China.” *Scientific Reports*. 5(13323) : 1-10.
- Hwang, C.Y. Choi, D.H. and Cho, B.C. 2006. “*Pedobacter roseus* sp. nov., isolated from a hypertrophic pond, and emended description of the genus *Pedobacter*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 : 1831-1836.
- Huang, H.D. Wang, W. Ma, T. Li, G.Q. Liang, F.L. and Liu, R.L. 2009. “*Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 : 719-723.
- Huy, H. Jin, L. Lee, K.C. Kim, S.G. Lee, J.S. Ahn, C.Y. and Oh, H.M. 2014. “*Sphingomonas daechungensis* sp. nov., isolated from sediment of a eutrophic reservoir.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 1412-1418.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jeon, Y.J. Kim, J.M. Park, J.H. Lee, S.H. Seong, C.N. Lee, S.S. and Jeon, C.O. 2009. "Pedobacter oryzae sp. nov., isolated from rice paddy soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 : 2491-2495.
- Kämpfer, P. Danner, E.B.M. Meyer, S. Moore, E.R.B. and Busse, H.J. 1997. "Classification of "Pseudomonas azotocolligans" Anderson 1955, 132, in the Genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47(2) : 577-583.
- Kim, S.J. Moon, J.Y. Lim, J.M. Ahn, J.H. Weon, H.Y. Ahn, T.Y. and Kwon, S.W. 2014. "Sphingomonas aerophila sp. nov. and Sphingomonas naasensis sp. nov., isolated from air and soil, respectively." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 926-932.
- Kwon, S.W. Son, J.A. Kim, S.J. Kim, Y.S. Park, I.C. Bok, J.I. and Weon, H.Y. 2011. "Pedobacter rhizosphaerae sp. nov. and Pedobacter soli sp. nov., isolated from rhizosphere soil of Chinese cabbage (*Brassica campestris*)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 : 2874-2879.
- Maheshwari, D.K., editor. 2013. *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Berlin : Springer.
- Malfanova, N.V. 2013. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. [Online]. Available : <http://hdl.handle.net/1887/20732>.
- Mano, H. and Morisaki, H. 2008. "Endophytic Bacteria in the rice plant." *Microbes and Environments*. 23(2) : 109-117.
- Margesin, R. and Shivaji, S. 2005. "Genus II. *Pedobacter* Steyn, Segers, Vancanneyt, Sandra, Kersters and Joubert 1998, 171^{VP}" In: Krieg, N.R. Staley, J.T. Brown, D.R. Hedlund, B.P. Paster, B.J. Ward, N.L. Ludwig, W. Whitman, W.B. Parte, A.C., editor. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol.4. New York : Springer.
- Margesin, R. and Zhang, D.C. 2013. "Pedobacter ruber sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 339-344.
- Minnikin, D.E. O'Donnell, A.G. Goodfellow, M. Alderson, G. Athalye, M. Schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. "An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids." *Journal of Microbiological Methods*. 2 : 233-241.
- Ngo, H.T.T. Kook, M.C. and Yi, T.H. 2015. "Pedobacter ureilyticus sp. nov., isolated from tomato rhizosphere soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65 : 1008-1014.

- Oh, H.W. Kim, B.C. Park, D.S. Jeong, W.J. Kim, H. Lee, K.H. and Kim, S.U. 2013. "Pedobacter luteus sp. nov., isolated from soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 1304-1310.
- Park, H.K. Han, J.H. Kim, T.S. Joung, Y.C. Cho, S.H. Kwon, S.W. and Kim, S.B. 2015. "*Sphingomonas aerea* sp. nov. from indoor air of a pharmaceutical environment." *Antonie van Leeuwenhoek*. 107 : 47-53.
- Prasad, M.P. and Dagar S. 2014. "Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes." *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 8(3) : 937-947.
- Romanenko, L.A. Uchino, M. Frolova, G.M. Tanaka, N. Kalinovskaya, N.I. Latyshev, N. and Mikhailov V.V. 2007. "*Sphingomonas molluscorum* sp. nov., a novel marine isolate with antimicrobial activity." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 : 358-363.
- Ryan, R.P. Germaine, K. Franks, A. Ryan, D.J. and Dowling, D.N. 2008. "Bacterial endophytes: recent developments and applications." *FEMS Microbiol Lett*. 278 : 1-9.
- Shcherbakov, A.V. Bragina, A. Kuzmina, E.Y. Berg, C. Muntyan, A.N. Makarova, N.M. Malfanova, N. Cardinale, M. Berg, G. Chebotar, V.K. and Tikhonovich, I.A. 2012. "Endophytic bacteria of *Sphagnum* mosses as promising objects of agricultural microbiology." *Microbiology*. 82(3) : 306-315.
- Singh, H. Du, J. Ngo, H.T.T. Kim, K.Y. and Yi, T.H. 2015. "*Pedobacter lotistagni* sp. nov. isolated from lotus pond water." *Antonie van Leeuwenhoek*. 107(4) : 951-959.
- Son, H.M. Kook, M.C. Tran, H.T.H. Kim, K.Y. Park, S.Y. Kim, J.H. and Yi, T.H. 2014. "*Sphingomonas kyeonggiense* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field." *Antonie van Leeuwenhoek*. 105 : 791-797.
- Steyn, P.L. Segers, P. Vancanneyt, M. Sandra, P. Kersters, K. and Joubert, J.J. 1998. "Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48 : 165-177.
- Urios, L. Intertaglia, L. and Magot, M. 2013. "*Pedobacter tournemirensis* sp. nov., isolated from a fault water sample of a deep Toarcian argillite layer." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 : 303-308.

- Xie, C.H. and Yokata, A. 2006. “*Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 : 889-893.
- Yabuuchi, E. Yano, I. Oyaizu, H. Hashimoto, Y. Ezaki, T. and Yamamoto, H. 1990. “Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*.” *Microbiol Immunol*. 34 : 99-119.
- Yabuuchi, E. Kosako, Y. Fujiwara, N. Naka, T. Matsunaga, I. Ogura, H. and Kobayashi, K. 2002. “Emendation of the genus *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990 and junior objective synonymy of the species of three genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, in conjunction with *Blastomonas ursincola*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 : 1485-1496.
- Yabuuchi, E. Kosako, Y. 2005. “Genus I. *Sphingomonas* Yabuuchi, Yano, Oyaizu, Hashimoto, Ezaki and Yamamoto 1990b, 312^{VP} (Effective publication: Yabuuchi, Yano, Oyaizu, Hashimoto, Ezaki and Yamamoto 1990a, 116) emend. Takeuchi, Hamana and Hiraishi 2001, 1414; emend. Yabuuchi, Kosako, Fujiwara, Naka, Matsunaga, Ogura and Kobayashi 2002, 1489.” In: Brenner, D.J. Krieg, N.R. Staley, J.T. and Garrity, G.M., editor. 2005. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Vol.2. part C. New York : Springer.
- Yoon, J.H. Kang, S.J. Park, S. and Oh, T.K. 2007. “*Pedobacter lentus* sp. nov. and *Pedobacter terricola* sp. nov., isolated from soil.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 : 2089-2095.
- Zhang, J.Y. Liu, X.Y. and Liu, S.J. 2010. “*Sphingomonas changbaiensis* sp. nov., isolated from forest soil.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60 : 790-795.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth (LB broth) (เกอร์ตัน, 2545)

Tryptone	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
NaCl	5.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	7.0	

2. Motility test medium (Acumedia, 2011)

Enzymatic digest of gelatin	10.0	g
Beef extract	3.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	4.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	7.3±0.2	

3. Nutrient agar (ดวงพร, 2537)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

4. Nutrient broth (ดวงพร, 2537)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

5. Nutrient gelatin broth (ดวงพร, 2537)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Gelatin	120.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	6.8±0.2	

6. Tryptic Soy Agar (ปฐมรัตน์, 2549)

Pancreatic digest of casein	15.0	g
Enzymatic digest of soybean meal	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	7.3±0.2	

7. Tryptic Soy Broth (ปฐมรัตน์, 2549)

Pancreatic digest of casein	15.0	g
Enzymatic digest of soybean meal	5.0	g
NaCl	5.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	7.3±0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Skim milk agar (HiMedia)

Skim milk powder	28.0	g
Casein enzymic hydrolysate	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
pH	7.0±0.2	

9. Starch agar (ดาวพร, 2537)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Potato starch	10.0	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ภาคผนวก ข

สารเคมี

Reagent สำหรับการวิเคราะห์ Cellular fatty acid

Reagent 1 – Saponification reagent (NaOH ในเมทานอล)

Sodium hydroxide	15 g
Methanol (HPLC grade)	50 ml
Milli-Q water	50 ml

ละลายผลึก NaOH ใน Milli-Q water และเติมเมทานอล

Reagent 2 – Methylation reagent (Hydrochloric acid ในเมทานอล)

6 N Hydrochloric acid	65 ml
Methanol (HPLC grade)	55 ml

pH ต้องต่ำกว่า 1.5

Reagent 3 – Extraction solvent (hexane/MTEB)

n-Haxane (HPLC grade หรือ n-Haxane 1000)	50 ml
Methyl-tert-Butyl Ether (HPLC grade)	50 ml

Reagent 4 – Base wash (dilute NaOH)

Sodium hydroxyde	1.2 g
Milli-Q water	100 ml

Reagent 5 – Saturated sodium chloride (เพื่อหยุดปฏิกิริยา emulsion)

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ทำการศึกษา

AACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGATTGAGGACTTCGGTCCTCATGACA
 GTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTGCCTTACTCAGGGGGATAGCCCGGAGAAAT
 CCGGATTAACACCGCATAACATCATGATATGGCATCATATTATGATCAAATATTCATAGGAGTAA
 GATGAGCATGCGTGACATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGTCTAGG
 GGATCTGAGAGGATGACCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACG
 GCCCTACGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACCGGAATAAACCTCTTTTCGTGAAAGAGGCTGAATG
 TACGGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAG
 CGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTGTAAAGTCAGGGGTGAAAGAC
 GGTAGCTCAACTATCGCAGTGCCTTTGATACTGATGGGCTTGAATAAACCTGAGGTAGGCGGAA
 TGTGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCACAGAACACCAATTGCCAAGGCAGCTTACT
 AAAGTTTAATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGT
 CCACGCCCTAAACGATGAACACTCGATGTTGGCGATATACGGTCAGCGTCTAAGCGAAAGCGTT
 AAGTGTTCCACCTGGGGAGTACGCCCGCAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGAGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAAGT
 TACTGAAGTATCCAGAGATGGATACGTCCTTCGGGACAGGAACTAGGTGCTGCATGGCTGTGCG
 TCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGAATAGTTGC
 CAGCATGTAAAGGTGGGGACTCTATTCAGACTGCCTGTGCAAACAGAGAGGAAGGCGGGGACG
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGATACAGAGG
 GCAGCTACACAGTAATGTGATGCCAATCTCAAAAAGTCATTACAGTTCGGATTGAGGTCTGCA
 ACTCGACCTCATGAAGTTGGATTTCGCTAGTAATCGCGTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTACCTGAAGTATGTAACC
 GCAAGGAGCGTCTAGGGTAAAACCGGTAACCTGGGGCTAATCTA

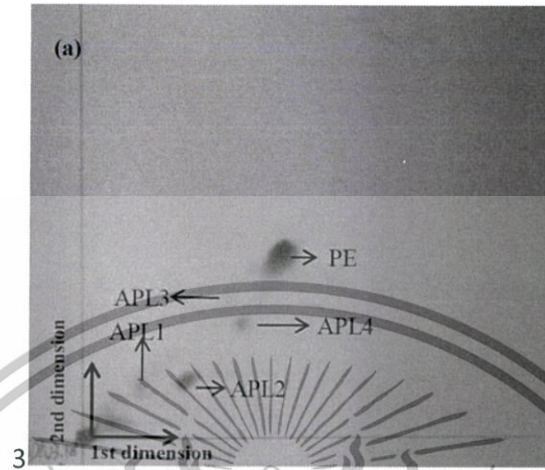
รูปที่ ค.1 ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1017

ACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGCGGCACGGG
 TGCCTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCGGAATAACTCAGAGAAATTTGAGCTAATACCG
 GATGATGTGCGAAGACCAAAGATTTATCGCCCGAGGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG
 GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA
 AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGG
 GATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGT
 CAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCGGG
 AGAGGAGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGC
 GAAGGCGGCTCACTGGACCGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTGCCCTGGCATTGTTGGG
 TGCGCGAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACC
 TTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTGGCAGAGATGCCTTTCTTCCCTTCGGGGACCTACA
 CACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCTACCAITTTAGTTGGGCACTCTAAGGAAAACCGCCGGTGATAAG
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGC
 TACAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAATCCCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCA
 GTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
 TGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAGTTGGTTT
 CACCCGAAGGCAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCAGCTGACCACGGTGGGATCAGCGAC

รูปที่ ค.2 ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ 1048

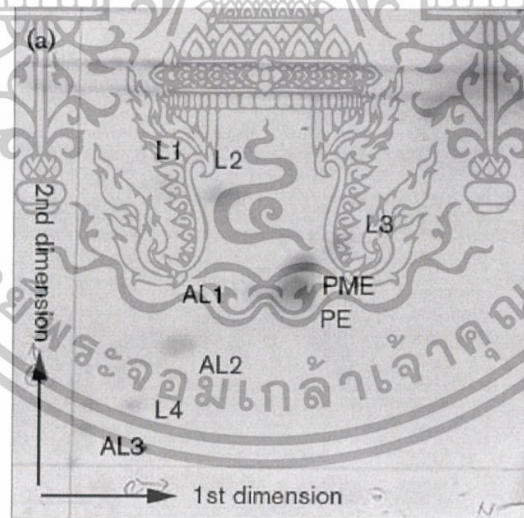
ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Polar lipid ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง



รูปที่ ง.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Polar lipid ด้วยวิธี two-dimensional TLC ของแบคทีเรีย *Pedobacter daechungensis* Dae 13^T (Du et al., 2015)

โดย PE คือ Phosphatidylethanolamine
APL คือ Unidentified Aminophospholipid



รูปที่ ง.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ Polar lipid ด้วยวิธี two-dimensional TLC ของแบคทีเรีย *Pedobacter luteus* N7d-4^T (Oh et al., 2013)

โดย PE คือ Phosphatidylethanolamine
PME คือ Phosphatidyl-N-methylethanolamine
AL คือ Unidentified Aminolipid
L คือ Unidentified Polar lipid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้