**รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด**

**ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

**โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

**กิจกรรม** : การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

**กิจกรรมย่อย** : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

**ชื่อการทดลอง** : การพัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

**คณะผู้ดำเนินงาน**

**หัวหน้าการทดลอง** นางสาวศิริลักษณ์ จิตรอักษร[1/]

นางสาวศพิษา สังวิเศษ[2/]

**บทคัดย่อ**

การพัฒนาวิธีการจำแนกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการจำแนกที่ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง และทำได้อย่างรวดเร็ว ดำเนินการโดยจำแนกชนิดแบคทีเรียอย่างรวดเร็วโดยใช้หลักการใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกับระบบ Biolog MicroStation System Microlog version 4.20.05 เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบส 400-500 เบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing) ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ 3 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวก 6 ไอโซเลต และ *Bacillus circulans* ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง พบว่าการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้เทคนิค Biolog ด้วยอาหาร BUG+GN2 plate โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส 22 ชั่วโมง มีความเหมือนกับผลการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA ในระดับสกุล *Pseudomonas* จำนวน 2 ไอโซเลต (66.7 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้อาหาร BUG+GP2 plate และบ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส 20-24 ชั่วโมง พบว่าการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกมีความเหมือนกันในระดับสกุลและชนิดของ *Bacillus circulans*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus* และ *Cellulosimicrobium cellulans* จำนวน 5 ไอโซเลต ระบบ Biolog สามารถใช้ในการจำแนกบางสกุลหรือบางสกุลและชนิดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี 16S rDNA sequencing แต่ไม่ครอบคลุมทุกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และ *Corynebacterium* ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร

---

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

**คำสำคัญ:** การจำแนกชนิดแบคทีเรีย Biolog system 16S rRNA แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

## Abstract

This research was aimed to developing accuracy and rapid identification method for potassium solubilizing bacteria (PSB). The Biolog MicroStation Microlog version 4.20.05 identification system was compared to the 16S rRNA gene (16S rDNA sequencing) about 500 bps. The methods were evaluated using 10 PSB isolates. Three of them are gram negative bacteria and six are of gram positive ones plus *Bacillus circulans* as a reference strain. The results indicated that all gram negative bacteria were identified using BUG+GN2 after incubation at 30°C for 20 hrs. In addition, it was similar to the results obtained from 16S rDNA method in genus *Pseudomonas* by 2 isolates (66.7%). However, BUG+GP2 incubation for 20-24 hrs. was acceptable for the investigated gram positive strains. Of 5 isolates, 71.4% were identical to genus and species level as fell into the following: *Bacillus circulans*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus* and *Cellulosimicrobium cellulans*. The Biolog system is accuracy and rapid for identification of some genus and species of agricultural bacteria. Its accuracy is approximately 50% in comparison to 16S rDNA sequencing, but not full coverage of *all* species in *Pseudomonas* and *Corynebacterium* determined in this study.

**Key words:** Biolog system identification, 16S rRNA sequencing, potassium solubilizing bacteria

## คำนำ

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชในดินรวมถึงธาตุโพแทสเซียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ละลายธาตุอาหารพืชโดยกิจกรรมการย่อยสลาย จุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น เฟลด์สปาร์ ไมกา อิลล์ไลต์ และ ออร์โธแคลส เป็นต้น เช่น แบคทีเรียซิลิเกตซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถละลายโพแทสเซียม ซิลิกอน และอลูมินั่มที่เป็นองค์ประกอบของแร่ที่ไม่ละลายให้สามารถละลายได้และอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Aleksandrov et al, 1967; Vandeviver et al, 1994) วิธีการหนึ่งในการลดค่าใช้จ่ายปุ๋ยเคมีนั่นคือการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายอนินทรีย์โพแทสเซียมให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้มาผลิตในรูปผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ ปัจจุบัน

ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่จำหน่ายในประเทศไทยที่สามารถทดแทนหรือส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมีและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีหลายชนิด เช่น ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมคอร์ไรซ่า และปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต แต่เพื่อความปลอดภัยของผู้ผลิตและผู้บริโภคผลิตผลทางการเกษตรจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพนั้น ตลอดจนไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม จึงต้องมีข้อบังคับในการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพต้องไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคน สัตว์ และพืช

การพิสูจน์เอกลักษณ์หรือการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้วิธีการต่างๆ ได้แก่ วิธีการทั่วไปทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีแบบอัตโนมัติ และการวิเคราะห์โดยใช้สมบัติพื้นฐานทางชีวโมเลกุล เป็นต้น วิธีการทั่วไปนั้นเป็นที่รู้จักดีและใช้ในการจำแนกแบคทีเรียมาเป็นเวลานานและในปัจจุบันถือเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ (phenotypic characteristics) เช่น ลักษณะทางรูปร่าง การติดสีย้อมแบบแกรม การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้ใช้ความรู้พื้นฐานเป็นหลักสำคัญแต่มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการพิสูจน์เอกลักษณ์ วิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยใช้ความรู้พื้นฐานทางชีวโมเลกุลมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ คือ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing) จีโนมของแบคทีเรียทุกชนิดมีส่วน highly conserved region ซึ่งความผันแปรภายในบริเวณนี้มีลักษณะที่โดดเด่นและจำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิด (Dubnau et al., 1965; Woese, 1987; Woese et al., 1985) แต่วิธีการนี้เป็นมีความอ่อนไหวมากและเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงซึ่งต้องใช้ผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้เฉพาะทางเรื่องเครื่องมือและการแปลผลและการวิเคราะห์ต้องกระทำด้วยความละเอียดรอบคอบจึงจะทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ (Clarridge, 2004) ในปี 1991 ได้มีการพัฒนาระบบการพิสูจน์เอกลักษณ์หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ขึ้นมาแบบอัตโนมัติโดยใช้สมบัติทางชีวเคมีในการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด นั่นคือ Biolog system (Biolog, Hayward, CA) ซึ่งประกอบด้วย microstation computer เครื่องวัดความขุ่น โปรแกรม Microlog ถาดหลุมที่บรรจุแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด ตัวอย่างการนำ Biolog system มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ เช่น Morgan et al. (2009) ได้เปรียบเทียบวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางการแพทย์จำนวน 159 ไอโซเลตระหว่าง Biolog system กับ 16S rRNA พบว่าวิธีการ 16S rRNA gene sequencing มีเปอร์เซ็นต์ความเที่ยงตรงสูง 90.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีการ Biolog system มีความเที่ยงตรง 68.3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ปฏิบัติได้ง่าย และรวดเร็ว

## วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 3 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวก 7 ไอโซเลต และ *Bacillus circulans* เป็นแบคทีเรียอ้างอิง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ชุดวิเคราะห์ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05 ถาดหลุมบรรจุแหล่งคาร์บอน 95 ชนิดสำหรับวิเคราะห์แบคทีเรียแกรมลบ (GN2) และแบคทีเรียแกรมบวก (GP2) สารเคมีและอุปกรณ์อื่นที่จำเป็นในการวิเคราะห์

วิธีการ

**การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม**

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็งซิลิเกตแบคทีเรียที่เติมสารบรอมไธมอลบูล ที่ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกลักษณะรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็ง nutrient agar ที่ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ตามคู่มือปฏิบัติการ Biolog system แบคทีเรียแกรมลบทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) โดยหยดน้ำยา Kovac's oxidase reagent บนกระดาษกรองจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อพลาสติกเขี่ยเชื้อลงบนกระดาษกรอง อ่านผลภายใน 10 วินาที แบคทีเรียไอโซเลตใดที่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสจะสังเกตเห็นสีน้ำเงิน สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกย้อมสีเพื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์และทดสอบการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (catalase test) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อพลาสติกเขี่ยเชื้อแตะลงบนสไลด์จากนั้นหยด $H_2O_2$ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลตใดสร้างเอนไซม์แคตาเลสจะสังเกตเห็นการเกิดฟอง

**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วย Biolog system**

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร BUG ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักเชื้อใส่ใน inoculating fluid ให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและใส่ thioglycolate 3 หยด และปรับให้มีความขุ่น 52-61 เปอร์เซ็นต์ตามสมบัติการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส จากนั้นหยดสารแขวนลอยของเชื้อใส่ในถาดหลุม GN2 หลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ตามลักษณะของแบคทีเรีย เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง จึงนำถาดหลุมนั้นไปวิเคราะห์ผลด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร BUG ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักเชื้อใส่ใน inoculating fluid ให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและใส่ thioglycolate 3 หยดหรือไม่ใส่ในกรณีแบคทีเรียสร้างสปอร์ และปรับให้มีความขุ่น 20-28 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นหยดสารแขวนลอยของเชื้อใส่ในถาดหลุม GP2 หลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ตามลักษณะของแบคทีเรีย เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง จึงนำถาดหลุมนั้นไปวิเคราะห์ผลด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05

**การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing)**

สกัดแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลท โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ (DNA extraction kit, Promega®) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ f5'-AAA CTY AAA KGA ATT GAC-3' และ r5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3' ส่วนผสม PCR ประกอบด้วย 10 nmole DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μM of each primer, 10xbuffer ที่มีส่วนผสมของ 1.5 mM

$MgCl_2$ และ 0.5 U Taq DNA polymerase สภาวะการทำ PCR คือ 98 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ด้วยวิธี BLAST analysis กับ NCBI GenBank database และสรุปผลการเปรียบเทียบกับการจำแนกโดย Biolog system

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2553- กันยายน 2556

สถานที่ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 3 ไอโซเลตที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ไอโซเลต K02001 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ cocci ติดสีแกรมลบและผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (ภาพที่ 1) ไอโซเลต K02004 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ cocci ติดสีแกรมลบและไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ส่วนไอโซเลท K02005 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ rod ติดสีแกรมลบและไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส แบคทีเรียแกรมบวก 6 ไอโซเลตมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติในการสร้างเอนไซม์เหมือนกัน คือ โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ rod ติดสีแกรมบวก และผลิตเอนไซม์แคตาเลส (ภาพที่ 2) ยกเว้น *Bacillus circulans* ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ bacilli ติดสีแกรมบวกและผลิตเอนไซม์แคตาเลส

### การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วย Biolog system

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบด้วย Biolog system ทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05 พบว่าสามารถอ่านผลวิเคราะห์ได้เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) สามารถจำแนกได้ 2 สกุล คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* โดยจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท K02001 เป็น *Pseudomonas citronellolist* แต่ไม่สามารถแสดงค่า probability ได้ ไอโซเลต K02004 เป็น *Pseudomonas syringae* pv. tabaciA ซึ่งมีค่า probability 81% similarity 0.587 และ distance 4.15 ส่วนไอโซเลต K02005 จำแนกเป็น *Acinetobacter calcoaceticus* ที่ไม่สามารถแสดงค่า probability ได้

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมบวกด้วย Biolog system ทั้ง 7 ไอโซเลต ด้วยระบบ Biology พบว่าสามารถอ่านผลวิเคราะห์ได้เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) และ

จำแนกได้ 5 สกุล คือ *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Clavibacter*, *Cellulosimicrobium* และ *Bacillus* โดยไอโซเลต K01026 จำแนกชนิดเป็น *Cellulomonas flavigena* ให้ค่า probability 95% ค่า similarity 0.769 distance 3.42 ไอโซเลต K02018 จำแนกเป็น *Corynebacterium nitrilophilus* แต่ไม่สามารถอ่านค่า probability ได้ ไอโซเลต K05078 จำแนกเป็น *Clavibacter agropyri* ค่า probability 98% ค่า similarity 0.625 distance 5.62 ไอโซเลต K06009 จำแนกเป็น *Corynebacterium bovis* แต่ไม่สามารถอ่านค่า probability ได้ ไอโซเลต K07002 จำแนกเป็น *Cellulosimicrobium cellulans* ค่า probability 100% ค่า similarity 0.553 distance 7.00 (ภาพที่ 3) ไอโซเลต K07009 จำแนกเป็น *Cellulosimicrobium cellulans* ค่า probability 33% ค่า similarity 0.293 distance 11.23 และ *Bacillus circulans* เชื้ออ้างอิงจำแนกเป็น *Bacillus circulans* ค่า probability 99% ค่า similarity 0.769 distance 3.42

**การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing)**

ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยไพร์เมอร์สายสั้นได้ผลผลิต PCR-16S rDNA ที่มีขนาด ประมาณ 500 bp (ภาพที่ 4) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ด้วยวิธี BLAST analysis กับ NCBI GenBank database (ตารางที่ 3) พบว่า ไอโซเลท K02001 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Pseudomonas fluorescens* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K02004 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Pseudomonas syringae* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K02005 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Burkholderia cepacia* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K01026 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulomonas flavigena* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K02018 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K05078 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K06009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K07002 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K07009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 100 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus circulans* เชื้ออ้างอิงมีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus circulans* 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วย Biolog system กับ 16S rDNA sequencing (ตารางที่ 4) พบว่า Biology system สามารถใช้ในการจำแนกสกุลของแบคทีเรียแกรมลบได้ตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing 2 ใน 3 ไอโซเลต หรือ 66.7 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 สกุล คือ *Pseudomonas* และตรงกับสกุลและชนิด 1 ไอโซเลต คือ Pseudomonas *syringae* และจำแนกสกุลแบคทีเรียแกรมบวกได้ตรงกับวิธี 16S rDNA

sequencing 5 ใน 7 ไอโซเลต หรือ 71.4 เปอร์เซ็นต์ ใน 4 สกุล *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Cellulosimicrobium* และ *Bacillus* แต่สามารถจำแนกสกุลและชนิดได้ตรงกัน 4 ไอโซเลต หรือ 57.1 เปอร์เซ็นต์ คือ *Corynebacterium nitrilophilus*, *Cellulosimicrobium cellulans* และ *Bacillus circulans* โดยภาพรวม Biolog system สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ให้ผลตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing ในระดับ สกุลและชนิด จำนวน 5 ไอโซเลต คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Morgan et al. (2009) ที่เปรียบเทียบระบบการจำแนกระหว่าง Biolog Omnilog กับ 16S rDNA sequencing ของแบคทีเรียทางการแพทย์จำนวน 159 ไอโซเลต พบว่าการจำแนกโดยใช้ 16S rDNA sequencing มีความถูกต้อง เที่ยงตรงสูงกว่าวิธี Biolog โดยวิธีแรกให้ความถูกต้อง 90.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธี Biolog มีความถูกต้อง 68.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นที่สังเกตพบว่ามีจำนวน 2 ไอโซเลตที่ใช้ Biolog จำแนกแล้วได้ผลวิเคราะห์สกุลที่แตกต่างจากวิธีของ 16S rDNA เช่น ไอโซเลท K02005 ที่ได้ผลจำแนกเป็น *Acinetobacter* ในขณะที่ใช้ 16S rDNA เป็น *Burkholderia* และไอโซเลท K05078 ได้ผลจำแนกเป็น *Clavibacter* แต่ 16S rDNA เป็น *Corynebacterium* กรณีแรกอาจเป็นเพราะการจัดกลุ่มใหม่ของ *Burkholderia* ที่แยกออกจาก *Pseudomonas* แต่โปรแกรมข้อมูลใน Biolog มีข้อมูลแบคทีเรียชนิดอื่น ในทำนองเดียวกับผลงานวิจัยของ Morgan et al. ที่พบว่า Biolog ไม่สามารถจำแนก *Paenibacillus* sp และ *Bacillus* spp. หลายชนิดได้ (Ko et al., 2006) และด้วยเหตุที่วิธี Biolog นั้นเป็นวิธีที่ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น และต้องเลี้ยงให้เจริญ ดังนั้นในกรณีที่เชื้อมีอัตราการเจริญช้าและสร้างเมือกในปริมาณมากซึ่งเป็นอุปสรรคในการเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดซึ่งจะส่งผลทำให้ผลการวิเคราะห์มีความผิดพลาดสูง

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี Biolog system สามารถใช้กับจุลินทรีย์ทางการเกษตรบางชนิดได้ เช่น จำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม ซึ่งให้ผลตรงกับการจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA sequencing และเป็นวิธีที่ไม่ซ้ำซ้อน ทำได้ง่าย และรวดเร็ว โดยแบคทีเรียแกรมลบต้องใช้ถาดหลุม GN2 และบ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกต้องใช้ถาดหลุม GP2 บ่มปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ตรวจสอบและมีความถูกต้องตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing ได้แก่ *Pseudomonas syringae* (แบคทีเรียโรคพืช) *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Cellulosimicrobium cellulans* และ *Bacillus circulans* ซึ่งมีความถูกต้อง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าการจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA sequencing อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้ออาหาร BUG agar ตามวิธีของ Biolog ควรวิจัยพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง ตรงกับการใช้ BUG agar

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อยอดวิธีการจำแนกแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการบ่มปฏิกิริยา

## เอกสารอ้างอิง


Aleksandrov, V. G., R. N. Blagodry, and I. P. Ilev. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. ***Mikrobiolohichnyi Zhurnal*** (*Kiev*) 29:111-114.

Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. ***Clinical Microbiology Review*** 17: 840-862.

Dubnau, D., I. Smith, P. Morell and J. Marmur. 1965. Gene conservation in Bacillus species. ***Proceeding Natural Academic Science*** U. S. A. 54:491-498.

Ko, K. S., W. Oh, M. Y. Lee, H. Lee, K. R. Peck, N. Y. Lee and J. H. Song. 2008. *Paenibacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. ***International Journal Systematic Evolution Microbiology*** 56:2541-2544.

Morgan, M. C., B. Marilyn, G. Chris, V. S. Katharine and R. G. Shermalyn. 2009. Comparison of the Biolog Omnilog identification system and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. ***Journal of Microbiological Methods*** 79:336-343.

Vandevivere, P., S. A. Welch, W. j. Ullman and D. L. Kirchman.1994. Enhanced dissolution of

silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. ***Microbial Ecology*** 27:241-251.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. ***Microbiology Molecular Biology Review*** 51:221-271.

Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke and G. E. Fox. 1985. A phylogenetic definition of major eubacterial taxa. ***Systematic Applied Microbiology*** 6:143-151.

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

| ไอโซเลท | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา | การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | การสร้างเอนไซม์แคตาเลส |
|---|---|---|---|
| K02001 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง cocci ติดสีแกรมลบ | สร้างเอนไซม์ | ไม่ทดสอบ |
| K02004 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง cocci ติดสีแกรมลบ | ไม่สร้างเอนไซม์ | ไม่ทดสอบ |
| K02005 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมลบ | ไม่สร้างเอนไซม์ | ไม่ทดสอบ |
| K01026 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| K02018 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| K05078 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| K06009 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| K07002 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| K07009 | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |
| *Bacilllus circulans* | โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ | ไม่ทดสอบ | สร้างเอนไซม์ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | รูปร่าง bacilli ติดสีแกรมบวก | | |

ตารางที่ 2 สภาวะการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วย Biolog system

| ไอโซเลท | สภาวะการบ่มปฏิกิริยา | ผลการจำแนกโดย Biolog system |
|---|---|---|
| K02001 | 30°ซ, 22 ชม. | *Pseudomonas citronellolist* |
| K02004 | 30°ซ, 22 ชม. | *Pseudomonas syringae* pv. tabaciaA |
| K02005 | 30°ซ, 22 ชม. | *Acinetobacter calcoaceticus* |
| K01026 | 30°ซ, 20 ชม. | *Cellulomonas flavigena* |
| K02018 | 30°ซ, 24 ชม. | *Corynebacterium nitrilophilus* |
| K05078 | 30°ซ, 22 ชม. | *Clavibacter agropyri* |
| K06009 | 30°ซ, 24 ชม. | *Corynebacterium bovis* |
| K07002 | 30°ซ, 20 ชม. | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| K07009 | 30°ซ, 20 ชม. | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| *Bacillus circulans* | 30°ซ, 20 ชม. | *Bacillus circulans* |

ตารางที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี partial 16S rRNA sequencing (16S rDNA)

| ไอโซเลท | Length (bases) | Identities (%) | Definition |
|---|---|---|---|
| K02001 | 497 | 100 | *Pseudomonas fluorescens* |
| K02004 | 489 | 100 | *Pseudomonas syringae* |
| K02005 | 494 | 99 | *Burkholderia cepacia* |
| K01026 | 497 | 100 | *Cellulomonas flavigena* |

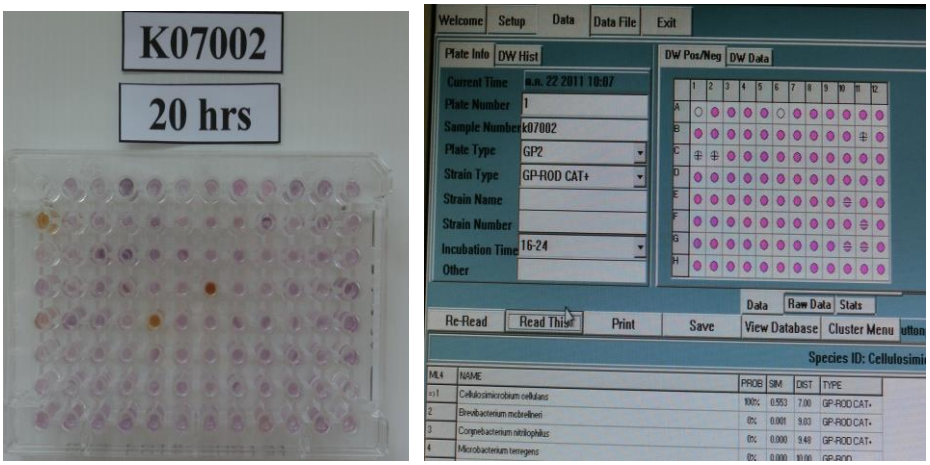
| | | | |
|---|---|---|---|
| K02018 | 495 | 100 | *Corynebacterium nitrilophilus* |
| K05078 | 499 | 99 | *Corynebacterium nitrilophilus* |
| K06009 | 489 | 99 | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| K07002 | 472 | 100 | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| K07009 | 485 | 100 | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| *Bacillus circulans* | 493 | 100 | *Bacillus circulans* |

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วย Biolog system กับวิธี 16S rDNA sequencing

| ไอโซเลท | Biolog system | 16S rDNA sequencing |
|---|---|---|
| K02001 | *Pseudomonas citronellolist* | *Pseudomonas fluorescens* |
| K02004 | *Pseudomonas syringae* pv. tabaciA | *Pseudomonas syringae* |
| K02005 | *Acinetobacter calcoaceticus* | *Burkholderia cepacia* |
| K01026 | *Cellulomonas inchonesis* | *Cellulomonas flavigena* |
| K02018 | *Corynebacterium nitrilophilus* | *Corynebacterium nitrilophilus* |
| K05078 | *Clavibacter agropyri* | *Corynebacterium nitrilophilus* |
| K06009 | *Corynebacterium bovis* | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| K07002 | *Cellulosimicrobium cellulans* | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| K07009 | *Cellulosimicrobium cellulans* | *Cellulosimicrobium cellulans* |
| *Bacillus circulans* | *Bacillus circulans* | *Bacillus circulans* |

ภาพที่ 1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย K02001

ภาพที่ 2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรีย K07002

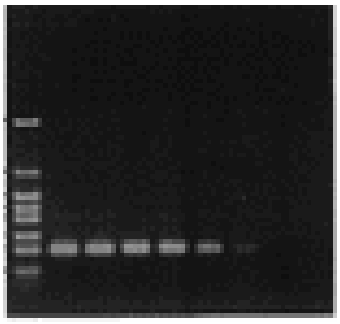



**(ก)** **(ข)**

ภาพที่ 3 (ก) ปฏิกิริยารีดักชั่น C-source ในถาดหลุม GP2

(ข) ผลการจำแนกแบบอัตโนมัติโดย Biolog MicroStation System

Microlog 4.20.05



ภาพที่ 4 ภาพถ่าย PCR product ชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 6 ไอโซเลท รหัส K01026 K02018 K05078 K06009 K07002 และ K07009