



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดแยกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืช
และการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก

Isolation and Characterization of Phyllospheric Methylotrophic Bacteria and Test
for Indole-3-Acetic Acid Producing Ability

นามผู้วิจัย นายภูมิน นุตรทัต

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ ดวงมาลย์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติคุณ, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืช
และการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก

Isolation and Characterization of Phyllospheric Methylophilic Bacteria
and Test for Indole-3-Acetic Acid Producing Ability

โดย

นายภูมิน นุตรทัต

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2555

ภูมิน นุตรทัต 2555: การคัดแยกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืชและการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. 156 หน้า

การแยกและรวบรวมเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณผิวใบพืชจำนวน 125 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค leaf-imprinting บนอาหารแข็ง 1% methanol AMS ได้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด 274 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้อยู่ในสกุล *Methylobacterium* คิดเป็น 50.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Sphingomonas* คิดเป็น 13.87 เปอร์เซ็นต์ และ *Pseudomonas* คิดเป็น 11.68 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter*, *Anoxybacillus*, *Aurantimonas*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Luteibacter*, *Mesorhizobium*, *Mycobacterium*, *Ochroactrum*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Roseomonas* และ *Staphylococcus* จากเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 274 ไอโซเลต พบว่ามี 2 ไอโซเลต จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและเสนอชื่อเป็น *Roseomonas musaphylla* PN1 และ *Roseomonas phyllosphaerae* PN2

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 274 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก พบแบคทีเรียจำนวน 242 ไอโซเลต ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติกได้ แต่มีปริมาณกรดอินโดล-3-อะซิติกแตกต่างกันไป โดยตรวจพบได้ในช่วง 0.13-145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ *Enterobacter* sp. T13-4, *Enterobacter hormaechei* T14-2, *Klebsiella variicola* T32-1.1 และ *Klebsiella pneumoniae* T39-2 ที่สร้างสารนี้ได้สูงที่สุด คือ 103.60, 145.50, 132.90 และ 130.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ได้นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิติกได้มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างไซเดอโรฟอรัและการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งด้วย พบว่าทุกไอโซเลตสามารถละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ แต่มีเพียง 2 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างไซเดอโรฟอรัได้เล็กน้อย คือ *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pumin Nutaratat 2012: Isolation and Characterization of Phyllospheric Methylophilic Bacteria and Test for Indole-3-Acetic Acid Producing Ability. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology.
Thesis Advisor: Assistant Professor Nantana Srisuk, Ph.D. 156 pages.

Isolation and collection of phyllospheric methylophilic bacteria from 125 plant leaf samples was carried out using leaf-imprinting technique onto 1% methanol AMS agar. Two-hundreds and seventy-two bacterial isolates were obtained. Results of molecular taxonomic study by 16Sr DNA analysis revealed that the majority of bacterial population as many as 50.36% belong to the genus *Methylobacterium*, 13.87 and 11.68% of total bacteria found are in the genus *Sphingomonas* and *Pseudomonas*. The genera *Acinetobacter*, *Anoxybacillus*, *Aurantimonas*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Luteibacter*, *Mesorhizobium*, *Mycobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Roseomonas* and *Staphylococcus* were also obtained as minority. Among these, two isolates appeared to be new species. Further investigation was therefore performed and the species name was then proposed as *Roseomonas musaphylla* PN1 and *Roseomonas phyllosphaerae* PN2.

All the bacterial isolates were tested for indole-3-acetic acid (IAA) production. Almost of them possess IAA production within the range of 0.13-145.50 µg/ml but only four isolates namely *Enterobacter* sp. T13-4, *Enterobacter hormaechei* T14-2, *Klebsiella variicola* T32-1.1 and *Klebsiella pneumonia* T39-2 that showed high IAA productivity as 103.60, 145.50, 132.90 and 130.10 µg/ml, respectively. Moreover, test for siderophore production as well as phosphate solubilization on solid medium was conducted among isolates produced higher than 50 µg/ml of IAA. Results indicated that all isolates could solubilize phosphate on solid media. However, only two isolates namely *Enterobacter hormaechei* T14-2 and *Enterobacter asburiae* T79-1 showed little degree of siderophore production.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา ลีสุข อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้การสนับสนุน แนะนำ เอาใจใส่ดูแล และให้คำปรึกษาในการทำวิจัย
รวมถึงการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ ดวงมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนมาโดย
ตลอด

ขอขอบพระคุณ โครงการทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
ระดับนานาชาติประจำปีงบประมาณ 2552 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุน
สนับสนุนการศึกษาและงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ เพื่อน และพี่ทุกท่าน ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และ
เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ภูมิน นุตรทัต

ตุลาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	32
สรุป	135
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	137
ภาคผนวก	148
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	149
ภาคผนวก ข การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ของแบคทีเรีย	153
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	156

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การแยกเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียจากแหล่งตัวอย่างใบพืช	33
2 สันฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้	46
3 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว	70
4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว	74
5 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้ที่จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	92
6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	93
7 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่	95
8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่	95
9 ลักษณะเฉพาะทางสันฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 <i>Roseomonas aestuarii</i> JC17 ^T แบคทีเรียไอโซเลต PN2 และ <i>Roseomonas mucosa</i> MDA5527 ^T	101
10 การศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต PN1	108
11 การศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต PN2	114
12 การสร้าง indole-3-acetic acid ของเมทิลโลโทรฟิคมแบคทีเรียที่แยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYDM ที่เติม L-tryptophan (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM) และบ่มแบบเขย่านาน 5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส	121

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1		
1	ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นศูนย์กลางการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย	6
2	การสังเคราะห์กรดอิน โคล-3-อะซิดิก ในแบคทีเรีย	17
3	สัดส่วนของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบพืช	97
4	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 ที่เลี้ยงบนอาหาร GPA agar นาน 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส	100
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 แบคทีเรียในสกุล <i>Roseomonas</i> ทั้งหมด และสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA	110
6	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 ที่เลี้ยงบนอาหาร GPA agar นาน 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส	113
7	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 แบคทีเรียในสกุล <i>Roseomonas</i> ทั้งหมด และสกุลที่ใกล้เคียงกัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA	116
8	การสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิกโดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว PYDM บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน	132
9	การทดสอบการสร้าง siderophore บนอาหารแข็ง Chrome Azurol S (CAS)	133
10	การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's	134

การคัดแยกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืช
และการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก

Isolation and Characterization of Phyllospheric Methylo trophic Bacteria
and Test for Indole-3-Acetic Acid Producing Ability

คำนำ

เศรษฐกิจหลักหรือรายได้ส่วนใหญ่ของประเทศไทยได้มาจากการเพาะปลูก การส่งออก
ผลิตผลทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ เป็นต้น การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรจึงมีความสำคัญอย่าง
ยิ่งที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับตลาดต่างประเทศ และยังเป็น การเพิ่มรายได้ให้แก่
เกษตรกรซึ่งเป็นอาชีพหลักของคนไทย ในปัจจุบันประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าสารเคมีจาก
ต่างประเทศเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสารเคมีที่นำเข้าส่วนใหญ่เป็นสารเคมีกลุ่มป้องกันและกำจัด
วัชพืช สารเคมีกำจัดแมลง สารป้องกันและกำจัดเชื้อรา และสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่ง
การใช้สารเคมีเหล่านี้ อาจทำให้เกิดสารตกค้างในสินค้าเกษตร และก่อให้เกิดอุปสรรคต่อการ
ส่งออก ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัย ใช้ต้นทุนต่ำ และ
เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจุบันมีการใช้ในรูปแบบที่
หลากหลาย เช่น การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (BT) กำจัดแมลงศัตรูพืช การใช้จุลินทรีย์
เชื้อผสมในน้ำสกัดชีวภาพเพื่อปรับปรุงคุณภาพดิน การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Rhizobia* ซึ่งสามารถตรึง
ไนโตรเจนจากบรรยากาศ ทำให้พืชได้รับไนโตรเจนอันเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการ
เจริญเติบโตของพืช เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์อีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการศึกษา
ศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อพัฒนาด้านการเกษตร

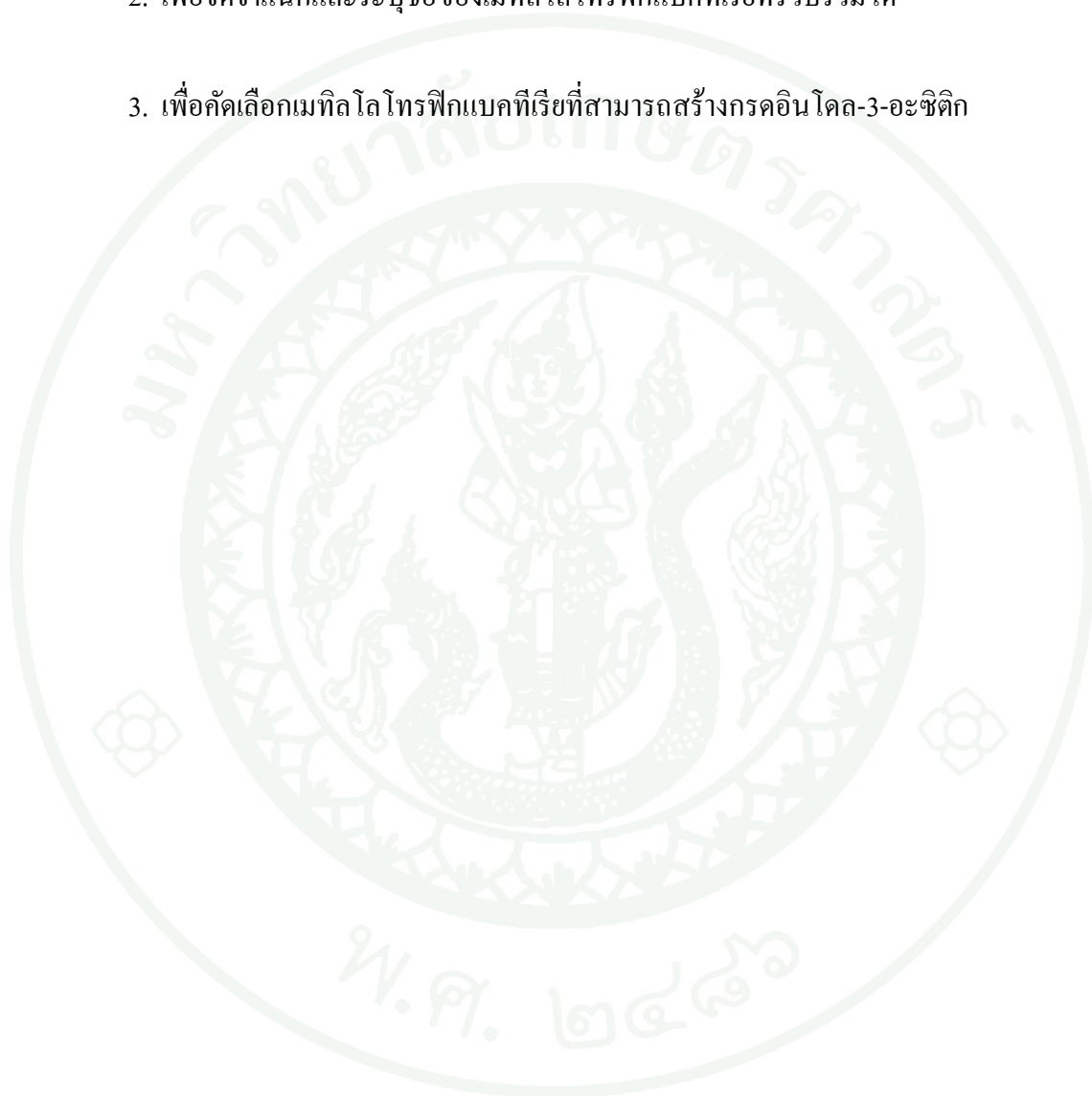
ผิวใบพืชเป็นแหล่งตัวอย่างตามธรรมชาติที่พบว่าเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ
เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย แต่พบว่ามีการพบแบคทีเรียมากที่สุด ซึ่งความแตกต่างในแง่
ของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียบนผิวใบพืชนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมหลายประการ ได้แก่
ลักษณะทางกายภาพของผิวใบพืช การเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิและความชื้น รวมถึง
สารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด ปัจจัยเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดให้พบการเจริญของแบคทีเรียจำเพาะ
ชนิดที่สามารถดำรงชีวิตและเจริญได้ภายใต้สภาวะดังกล่าวบนผิวใบพืช เมื่อพืชมีการเจริญจะเกิด
กระบวนการออกซิเดชันของมีเทน โดยเกิดการไฮโดรไลซิสของเมทิลอีเทอร์และเอสเทอร์ที่มีอยู่ใน

เพกตินและลิกนิน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักใน โครงสร้างของพืชแล้วจะปลดปล่อยเมทานอล ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ออกมาทางปากใบ จากรายงานของ MacDonald และคณะ (1993) พบว่าเมทานอลที่ผลิตออกมาจากพืชนั้นมีปริมาณมากถึง 40-46 เปอร์เซ็นต์ของสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ที่มีอยู่ในบรรยากาศ ด้วยเหตุดังกล่าวจึงอาจตรวจพบเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญอาศัยอยู่บนผิวใบพืชได้ เนื่องจากเมทานอลที่พืชสร้างจะถูกปลดปล่อย นอกจากนี้ยังอาจพบเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรียที่ใช้มีเทนเพื่อการเจริญ (methanotroph) ได้ด้วย เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มหลังนี้เมื่อใช้มีเทนแล้วจะปลดปล่อยเมทานอลออกมา ทำให้เมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียสามารถนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่อไป และยังมีรายงานว่าเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนผิวใบพืชนั้นสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดยตรวจพบการสร้างฮอร์โมนพืช ได้แก่ กรดอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic acid, IAA) ที่เมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียผลิตได้จาก tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พืชสร้างและปล่อยออกมา กรดอินโดล-3-อะซิติกจัดอยู่ในกลุ่มของออกซินที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอินโดลที่มีความสำคัญและพบมากที่สุด ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืชโดยช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืดขยายตัวของเซลล์ และการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกระบวนการเติบโต

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการรวบรวมเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียบนผิวใบพืชที่แยกในประเทศไทย รวมทั้งการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการผลิตกรดอินโดล-3-อะซิติก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและรวบรวมเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียบนผิวใบพืช การระบุชื่อของแบคทีเรียที่แยกได้ รวมทั้งการคัดเลือกเมทิล โล โทรฟิแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก และตรวจสอบลักษณะเฉพาะที่สนับสนุนการเจริญของพืช ได้แก่ การสร้างไซโตโรพอร์และการละลายฟอสเฟต ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ไปใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มผลิตผลทางการเกษตรอันก่อให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐกิจของประเทศได้ในอนาคต โดยอาจนำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติกได้ดีไปใช้ประโยชน์กับพืชได้ทั้งการนำแบคทีเรียไปผลิตกรดอินโดล-3-อะซิติก แล้วนำไปฉีดพ่นให้กับพืช หรือการใช้ตัวเซลล์โดยตรง โดยอาจเพาะเชื้อลงในดินเพื่อให้แบคทีเรียมีการเจริญบริเวณรอบราก แล้วสร้างสารที่สนับสนุนการเจริญของพืช

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและรวบรวมเมทิลโลโทรฟีกแบคทีเรียที่อยู่บนผิวใบพืช
2. เพื่อจัดจำแนกและระบุชื่อของเมทิลโลโทรฟีกแบคทีเรียที่รวบรวมได้
3. เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟีกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก



การตรวจเอกสาร

เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรีย

เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรีย คือ แบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นองค์ประกอบ โดยใช้สารประกอบนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ (Anthony, 1982) ซึ่งสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เมทานอล ฟอรัมาลดีไฮด์ เมทิลเอมีน มิเทน โบรโมมีเทน และไดโคลโรมีเทน

เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ขึ้นอยู่กับการใช้สารประกอบคาร์บอนที่เป็นขั้วสเตรต คือ กลุ่มที่เป็น obligate methylotrophic bacteria หมายถึง แบคทีเรียที่ใช้ได้เฉพาะสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอมเป็นขั้วสเตรต ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Methylophilus quaylei* ส่วน facultative methylotrophic bacteria คือ แบคทีเรียที่นอกจากจะสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอมเป็นขั้วสเตรตแล้ว ยังสามารถใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น กลูโคส หรือ ฟรุคโตส เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Methylobacterium extorquens*, *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Hansschlegelia plantiphila* รวมถึงพวก pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) เช่น *Methylobacterium mesophilicum* เป็นต้น (Trotsenko et al., 2001)

การตรวจพบเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรีย อาจพบได้ที่ใบและรากของพืช (Trotsenko et al., 2001) และอาจตรวจพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำ และดิน (Vorholt, 2002) โดยเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ตรวจพบนั้นมักมีโคโลนีสีชมพู จึงเรียกว่า pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการค้นพบเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่ม PPFM เช่น เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลือง รูปร่างไม่แน่นอนจัดอยู่ในสกุล *Xanthobacter* หรือ เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียไม่มีสี รูปร่างกลม จัดอยู่ในสกุล *Paracoccus* เป็นต้น (Doronina and Trotsenko, 2000) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพืชบางชนิดอาจไม่พบ PPFM อาศัยร่วมอยู่ด้วยกันได้ เช่น ต้นมะกอก เป็นต้น (Hirano and Upper, 2000)

การตรวจพบเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียได้ตามส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก เป็นต้น เนื่องจากพืชปล่อยเมทานอลที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของมิเทน จากการไฮโดรไลซิสเมทิลอีเทอร์และเอสเทอร์ที่มีอยู่ในเพกตินและลิกนิน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในโครงสร้างของ

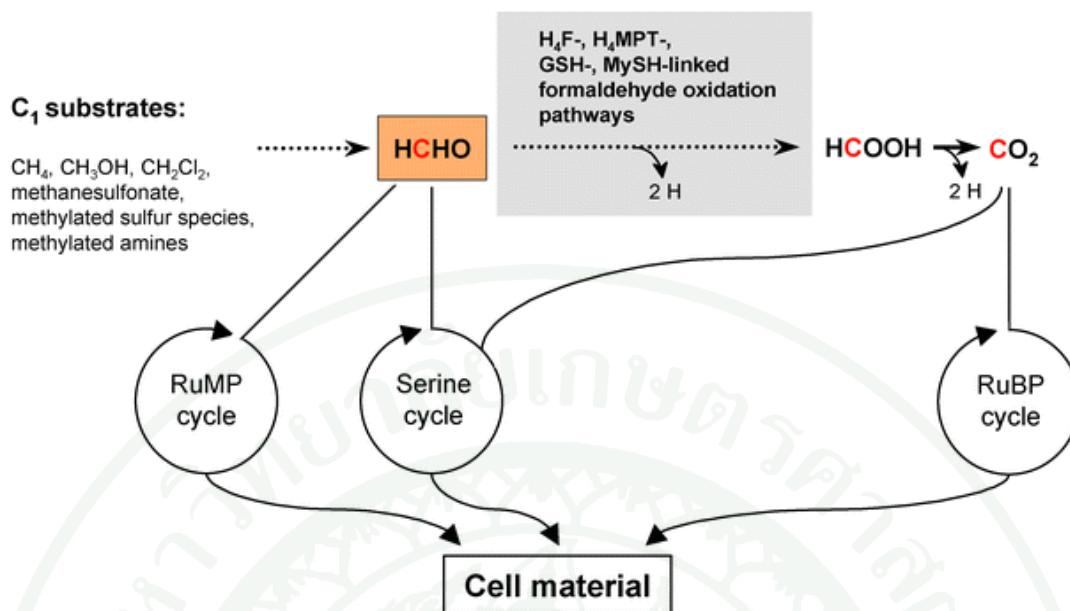
พืช แล้วเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณใบพืชจึงนำเมทานอลไปใช้เพื่อการเจริญของแบคทีเรีย มักพบว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรียที่สามารถใช้มีเทนได้ (methanotroph) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้มีเทน จะปล่อยเมทานอลออกมา ซึ่งเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียก็จะนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและเพื่อการเจริญต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียกับพืชเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism) โดยแบคทีเรียใช้เมทานอลซึ่งเป็นของเสียจากเมแทบอลิซึมของพืช และในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะผลิตสารประกอบที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช เช่น indole-3-acetic acid, cytokinin, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, vitamin เป็นต้น

แหล่งของเมทานอลส่วนใหญ่ที่ได้จากพืชเกิดจากกระบวนการ demethylation ของเพกตินที่บริเวณผนังเซลล์โดยกิจกรรมของเอนไซม์ pectin methyltransferase และอาจได้จากกระบวนการอื่นด้วย เช่น การย่อยลิกนินใน secondary cell wall หรือเป็นสารสื่อกลางที่ได้จากวิถี tetrahydrofolate โดยเอนไซม์ protein methyltransferase และนอกจากเมทานอลแล้วพืชชั้นสูงอาจสามารถผลิตสารประกอบ methylate amine อีกด้วย (Trotsenko *et al.*, 2001)

เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย

เมแทบอลิซึมของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย คือ การเปลี่ยนเมทานอลให้เป็นฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เป็นศูนย์กลางของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล (ภาพที่ 1) ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญจากการริ้วช่คาร์บอนหนึ่งอะตอม เกี่ยวข้องทั้งในเมแทบอลิซึมการสร้างพลังงานหรือคิซิมิเลชัน และการสร้างองค์ประกอบของเซลล์หรือแอสซิมิเลชันของคาร์บอน ขั้นตอนแรกของเมแทบอลิซึมของเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลได้เป็นฟอร์มัลดีไฮด์ หลังจากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มัลดีไฮด์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงส่วนนี้จะเกิดขึ้นในไซโทพลาซึมของเซลล์



ภาพที่ 1 ฟอรัมาลดีไฮด์เป็นศูนย์กลางการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรีย

ที่มา: Vorholt (2002)

ดิสซิมิเลชันของเมทานอล

ดิสซิมิเลชันของเมทานอลเป็นกระบวนการสร้างพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ โดยการออกซิไดส์เมทานอลไปเป็นฟอรัมาลดีไฮด์ด้วยเอนไซม์ methanol dehydrogenase จากนั้นฟอรัมาลดีไฮด์จะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นกรดฟอรัมิก โดยกระบวนการออกซิเดชันของฟอรัมาลดีไฮด์นั้นจะอาศัยโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์ชนิดต่างๆ ขึ้นกับชนิดของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรีย หลังจากนั้นกรดฟอรัมิกจะถูกออกซิไดส์ต่อไป ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด

แอสซิมิเลชันของเมทานอล

แอสซิมิเลชันของเมทานอลเป็นกระบวนการใช้พลังงานเพื่อสร้างองค์ประกอบของเซลล์ คือ เมื่อเมทานอลถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ methanol dehydrogenase (MDH) ได้เป็นฟอรัมาลดีไฮด์แล้ว ฟอรัมาลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์หรืออาจถูกนำไปสร้าง

องค์ประกอบของเซลล์ (Zahn *et al.*, 2001) ซึ่งการสร้างองค์ประกอบของเซลล์จะเกิดขึ้นได้โดยการตรึงฟอสฟอไรต์ไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์เข้าสู่วัฏจักรต่างๆ โดยเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ (Anthony, 1982)

1. Ribulose monophosphate cycle (RuMP)
2. Serine cycle
3. Ribulose bisphosphate cycle (RuBP)

การแยกเมทิลโอโทรฟิเคแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพืช

มีรายงานการแยกเมทิลโอโทรฟิเคแบคทีเรียที่แสดงให้เห็นว่าเมทิลโอโทรฟิเคแบคทีเรียหลายชนิด มีถิ่นอาศัยอยู่ร่วมกับพืชหลายชนิดเช่นกัน

Balachandar *et al.* (2008) แยก Pink-Pigmented Facultative Methylophiles (PPFMs) ได้ 62 ไอโซเลต จากใบฝ้าย ข้าวโพด และทานตะวัน บนอาหาร ammonium mineral salt (AMS) agar ที่เติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำ PPFMs ที่แยกได้มาศึกษาในรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย 30 ไอโซเลต มีรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนเหมือนกับ *Methylobacterium thiocyanatum* คิดเป็น 48.37 เปอร์เซ็นต์ พบ *M. aminovorans* และ *M. suomiense* ชนิดละ 10 ไอโซเลต และพบ *M. extorquens*, *M. fujisawaense* และ *M. zatmanii* ชนิดละ 4 ไอโซเลต

Schauer and Kutschera (2008) ศึกษาการแยกเมทิลโอโทรฟิเคแบคทีเรียจากส่วนต่างๆ (ดอก ใบ และราก) ของต้นทานตะวัน โดยใช้อาหาร ammonium salts solution (AMS) ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ และไซโคลเฮกซีไมด์ 50 ไมโครโมลาร์ โดยนำดอกและใบมาแช่ลงบนอาหาร AMS ส่วนรากนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนที่นำมาแช่ลงบนอาหาร AMS บ่มที่ 26 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน พบว่าแยกได้ *Methylobacterium mesophilicum* 18.2 เปอร์เซ็นต์ *M. extorquens* 15.2 เปอร์เซ็นต์ *M. radiotolerans* 3.0 เปอร์เซ็นต์ *Methylobacterium* sp. 63.6 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างดอกทานตะวัน และแยกได้ *Methylobacterium mesophilicum* 28.6 เปอร์เซ็นต์ *M. radiotolerans* 9.5 เปอร์เซ็นต์ *Methylobacterium* sp. 61.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบ *M. extorquens* จากตัวอย่างใบทานตะวันเลย ส่วนรากนั้นพบ *Methylobacterium mesophilicum* 31.8 เปอร์เซ็นต์ *M. extorquens* 36.4 เปอร์เซ็นต์ *M. radiotolerans* 4.5 เปอร์เซ็นต์ *Methylobacterium* sp. 27.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการที่ไม่พบ *M. extorquens* ที่ใบของต้นทานตะวันนั้น อาจเนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญในชั้นสเตรตอื่นได้ดีกว่าเมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาจากใบ

Kumar and Lee (2009) ศึกษาลักษณะของเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากใบสะเดา ในประเทศฟิลิปปินส์ โดยใช้อาหาร ammonium mineral salt (AMS) agar ที่เติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากตัวอย่างใบสะเดาทั้งหมด 15 ตัวอย่าง แยกเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียได้ 20 ไอโซเลต และใช้อาหาร glycerol peptone agar (GPA), ammonium mineral salt agar และ tryptic soy agar (TSA) ในการศึกษาลักษณะของเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าอาหารที่เหมาะสมคือ glycerol peptone agar (GPA) เนื่องจาก GPA เป็น enrich medium จึงทำให้เมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียเจริญได้รวดเร็ว ในขณะที่ AMS เป็น minimal medium จึงทำให้แบคทีเรียเจริญได้ช้ากว่า แต่ในอาหาร TSA พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Carvajal *et al.* (2006) ในแง่ของลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของโคโคโคนีและเซลล์ที่ศึกษา สัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรีย พบว่าเซลล์ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างท่อน และรูปร่างค็อกโคบาซิลโล โคโคโคนีกลมมนสีชมพู และชมพูอมส้ม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบแวววาวและพบว่าทุกไอโซเลตมีการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate granule และเอนไซม์คาตาเลสและส่วนใหญ่จะให้ผลบวกของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ออกซิเดส และการใช้ซิเตรต แต่ให้ผลลบของการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

Doronina *et al.* (2002) แยกเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียสายพันธุ์ F20 จากตัวอย่างดินในประเทศฟินแลนด์ และสายพันธุ์ RXM จากสิ่งปลูกในประเทศโปรตุเกส ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์ถูกนำมาวิเคราะห์ทางด้านฟิโนไทป์และจีโนไทป์ ได้แก่ คุณสมบัติของเซลล์และกระบวนการเมแทบอลิซึม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และ DNA-DNA hybridization ผลการศึกษาพบว่าเป็น PPFM ซึ่งจัดในสกุล *Methylobacterium* และเป็นแบคทีเรียชนิด (sp.) ใหม่ จึงได้ทำการเสนอชื่อเป็น *Methylobacterium suomiense* F20^T และ *Methylobacterium lusitanum* RXM^T

ในปี 2004 Akem *et al.* รายงานการค้นพบเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียชนิดใหม่ จากต้นป๊อปลาร์ (*Populus deltoids x nigra* DN34) ที่คัดแยกด้วยอาหาร Luria-Bertani (LB) ที่ผสมด้วยฟรุกโตสหรือบนอาหาร methanol mineral medium และพบว่าเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene สัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Methylobacterium thiocyanatum*, *M. extorquens*, *M. zatmanii* และ *M. rhodesianum* ตามลำดับจากมากไปน้อย และเมื่อนำมาทำ DNA-DNA hybridization พบว่าดีเอ็นเอของเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้กับเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่เปรียบเทียบกับมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 15-59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมทิล โล โทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ จึงได้เสนอชื่อชนิดใหม่เป็น *Methylobacterium populi* BJ001^T

Jourand *et al.* (2004) แยกได้เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียชนิดใหม่ *Methylobacterium nodulans* ORS2060^T จากปมรากของพืชตระกูลถั่ว 3 ชนิด ได้แก่ *Crotalaria glaucooides*, *C. perrottetii* และ *C. podocarpa* จาก 5 พื้นที่ที่แตกต่างกันของประเทศเซเนกัล โดยแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลต ซึ่งไม่สร้างรงควัตถุ เมื่อนำมาวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่ารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแบคทีเรียที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่แตกต่างจากสมาชิกอื่นๆ ในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างปมรากพืชตระกูลถั่ว (legume root-nodule-forming bacteria) และจากการศึกษา 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้ อยู่ในสกุล *Methylobacterium* ซึ่งสามารถเจริญบนสารประกอบคาร์บอน 1 อะตอม เช่น เมทานอล ฟอร์เมต และฟอร์มาลดีไฮด์ แต่ไม่สามารถเจริญและใช้เมทิลเอมีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ พบว่ามียีน *maxF* ที่สร้างเอนไซม์ methanol dehydrogenase ซึ่งเป็นการสนับสนุน methylotrophic metabolism และยังมียีน *nodA* และยีน *nifH* ซึ่งควบคุมการเกิดปมรากของพืชตระกูลถั่วและช่วยตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Methylobacterium*

Kang *et al.* (2007) ค้นพบเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Methylobacterium platani* PMB02^T ที่แยกได้จากใบของต้น *Platanus orientalis* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร TYG (ประกอบด้วย tryptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ glucose 0.1 เปอร์เซ็นต์) มีลักษณะโคโลนีกลม สีชมพู ขนาด 0.2-1.5 มิลลิเมตร หลังจากเลี้ยงไป 3 วัน เซลล์มีรูปร่างท่อน ดิสเกรมลบ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคาตาเลสให้ผลเป็นบวก และสามารถเจริญได้ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6-8 ในอาหารที่ประกอบด้วยไซเดียมคลอไรด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene จัดสายพันธุ์ PMB02^T อยู่ในสกุล *Methylobacterium* และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *M. aquaticum* 97.7 เปอร์เซ็นต์ และ *M. variabile* 97.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทำ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ PMB02^T และ *M. aquaticum* CCM 7218^T และ *M. variabile* GR3^T มีค่าความสัมพันธ์น้อยกว่า 32 เปอร์เซ็นต์

Madhaiyan *et al.* (2007) ค้นพบ PPFM ชนิดใหม่ *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อลำต้นข้าว โดยที่สายพันธุ์ CBMB20^T สามารถใช้ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) เป็นแหล่งไนโตรเจน และสามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase มีปริมาณ G+C 70.6 โมลเปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene ซึ่งให้เห็นว่าสายพันธุ์ CBMB20^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Methylobacterium fujisawaense*, *M. radiotolerans* และ *M. mesophilicum* แต่อย่างไรก็ตามค่าของการทำ DNA-DNA hybridization มีค่าความเหมือนน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

นอกจากสกุล *Methylobacterium* แล้ว ยังมีรายงานการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียสกุลอื่นๆ เช่น Doronina *et al.* (2004) ได้ทำการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ *Methylobacillus pratensis* F31^T จากต้น meadow grass (*Poa trivialis* L.) จาก city park ในเมือง Helsinki ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางด้านฟีโนไทป์และจีโนไทป์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับกลุ่มของ obligate methylotrophic non-methane utilizing bacteria และจากการวิเคราะห์ phylogenetic แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ F31^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Methylobacillus* 95-97 เปอร์เซ็นต์ และทำการวิเคราะห์กรดไขมันเพื่อเป็นการยืนยันความสัมพันธ์กับสกุล *Methylobacillus* หลังจากนั้นนำมาทำ DNA-DNA hybridization พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Methylobacillus glycogens* ATCC29475^T และ *M. flagellatus* DSM6875^T อยู่ในช่วงระหว่าง 28-34 เปอร์เซ็นต์

Ivanova *et al.* (2007) ได้เสนอสกุลและชนิดใหม่ของ facultative methylotrophic bacterium ที่แยกได้จาก lilac bud, linden bud และ blue spruce needle ที่เก็บในฤดูหนาวที่ -17 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นแบคทีเรียแอโรบิก ดิคคีแกรมลบ ท่อนสั้น ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โคลิโคนิไม่มีลี เป็นแบคทีเรียพวก neutrophilic และ mesophilic bacteria มีการใช้วิถี ribulose biphosphate และวิถี serine ในการใช้สารประกอบคาร์บอน 1 อะตอม ในการเจริญ สามารถสร้างฮอร์โมนพืช (ออกซิน และไซโตไคนิน) และวิตามินบี 12 มีกรดไขมันอิ่มตัวชนิด C_{16:0} กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด C_{18:1} 7C และ cyclopropane C_{19 cyc} เป็นองค์ประกอบหลักมี ubiquinone หลักเป็น Q-10 มีปริมาณ G+C 68.5±0.2 โมลเปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และ DNA-DNA hybridization (72-86 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ S₁^T เป็น autotrophic methanol utilizing bacteria ซึ่งจัดอยู่ Alphaproteobacteria จากการศึกษาลักษณะต่างๆ โดยรวมได้เสนอสกุลและชนิดใหม่เป็น *Hansschlegelia plantiphila* S₁^T

นอกจากเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกจากพืชแล้ว ยังมีรายงานว่าพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้จากสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น Gallego *et al.* (2005) ได้ทำการตรวจหาประชากรแบคทีเรียในน้ำคืมของเทศบาลใน Seville ประเทศสเปน ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรีย PPFM ได้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ได้แก่ GP34^T GR16^T GR3^T และ AR24^T ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับสกุล *Methylobacterium* โดยที่สายพันธุ์ GP34^T มีความคล้ายคลึงกับ type strain ของ *Methylobacterium radiotolerans* (96.6 เปอร์เซ็นต์) และ *M. fujisawaense* (96.4 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ GR16^T มีความคล้ายคลึงกับ *M. extorquens* (96.0 เปอร์เซ็นต์) และ *M. rhodesianum* (95.8 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ GR3^T มีความคล้ายคลึงกับ *M. aquaticum* (97.4 เปอร์เซ็นต์) และสายพันธุ์ AR24^T มีความคล้ายคลึงกับ *M. nodulans* (98.1

เปอร์เซ็นต์) และจากการศึกษาลักษณะเฉพาะทางด้านฟิโนไทป์และจีโนไทป์ และ DNA-DNA hybridization เป็นการยืนยันว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียชนิด (species) ใหม่ ดังนั้น Gallego *et al.* จึงได้เสนอชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่นี้เป็น *Methylobacterium hispanicum* GP34^T *Methylobacterium aquaticum* GR16^T *Methylobacterium variabile* GR3^T และ *Methylobacterium isbiliense* AR24^T ตามลำดับ

Weon *et al.* (2008) แยกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Methylobacterium iners* 5317S-33^T และ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11^T จากอากาศ โดยนำมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ กรดไขมัน และการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene พบว่าจากการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene ทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ในสกุล *Methylobacterium* ซึ่งสายพันธุ์ 5317S-33^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *M. adhaesivum* AR27^T (97.9 เปอร์เซ็นต์) ส่วนสายพันธุ์ 5413S-11^T มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *M. fujisawaense* DSM5686^T (97.3 เปอร์เซ็นต์) *M. oryzae* CBMB20^T (97.1 เปอร์เซ็นต์) และ *M. radiotolerans* JCM2831^T (97.0 เปอร์เซ็นต์) เซลล์ของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ strictly aerobic และสามารถเคลื่อนที่ได้ มีกรดไขมัน C_{18:1} ω7C เป็นองค์ประกอบหลัก มีปริมาณ G+C 68.0 โมลเปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ 5317S-33^T และ 73.2 โมลเปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ 5413S-11^T และจากข้อมูลของการทำ DNA-DNA hybridization แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ 5317S-33^T มีความเหมือนกับ *M. adhaesivum* DSM 17169^T 33 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ 5413S-11^T มีความเหมือนกับ *M. fujisawaense* DSM5686^T *M. oryzae* CBMB20^T และ *M. radiotolerans* DSM1819^T น้อยกว่า 35 เปอร์เซ็นต์

Firsova *et al.* (2009) ค้นพบ aerobic facultative methylotroph ชนิดใหม่ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารไดคลอโรมีเทน ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ DM16 ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ รูปร่างท่อน โค้ง ชอบเจริญสภาวะที่เป็นกลางและอุณหภูมิที่เป็นกลาง สามารถใช้ไดคลอโรมีเทน เมทานอล ฟอร์เมท และฟอร์มาลดีไฮด์ รวมถึงสารประกอบคาร์บอนหลายอะตอม โดยที่สายพันธุ์ DM16 ใช้วิถี ribulose biphosphate ในการใช้สารประกอบคาร์บอน 1 อะตอมเพื่อการเจริญ มีปริมาณ G+C 64.5 โมลเปอร์เซ็นต์ มี ubiquinone หลักเป็น Q-10 มีกรดไขมันชนิด C_{18:1} ω7C เป็นองค์ประกอบหลักคิดเป็น 58.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นกรดไขมันชนิด cyclo-C_{19:0} ω8C (34.8 เปอร์เซ็นต์) และกรดไขมันอิ่มตัวชนิด C_{16:0} (3.2 เปอร์เซ็นต์) และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และ DNA-DNA hybridization แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ DM16 จัดอยู่ในสกุล *Ancylobacter* และแตกต่างจากสมาชิกอื่นๆ ของสกุลนี้ จึงได้เสนอชื่อชนิดใหม่เป็น *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16^T

อนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

อนุกรมวิธาน (Taxonomy มาจากรากศัพท์ละติน คือ Taxon = ลำดับ) เป็นสาขาวิชาหนึ่งของกลุ่มชีววิทยาซึ่งเป็นการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ ซึ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่คล้ายกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยหลักการสำคัญของอนุกรมวิธานคือ

1. การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ (classification)
2. การตั้งชื่อสิ่งมีชีวิต (nomenclature)
3. การระบุหรือพิสูจน์หรือตรวจสอบชนิดสิ่งมีชีวิต (identification)

การจัดจำแนก (Classification)

การจัดจำแนกแบคทีเรียอาศัยหลักการหลายประการ เช่น รูปร่างเซลล์ โครงสร้างเซลล์ การเคลื่อนที่ ส่วนประกอบภายในของเซลล์ สรีรวิทยาของเซลล์ ปฏิกริยาทางชีวเคมี การทดสอบทางซีโรโลยี และการทดสอบลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุล เป็นต้น

สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย ใช้หนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งฉบับที่ใช้ปัจจุบันเป็นฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ปี ค.ศ. 2005 (Brenner *et al.*, 2005) เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งจัดแบคทีเรียอยู่โดเมนยูแบคทีเรียตามระบบ 3 โดเมน (three domain) และสามารถจัดแบคทีเรียอยู่ในอาณาจักรโมเนอร่า ตามระบบอาณาจักรที่ Whittaker จัดแบ่งสิ่งมีชีวิตไว้ 5 อาณาจักร ตามความต้องการสารอาหาร

การตั้งชื่อ (Nomenclature)

การตั้งชื่อแบคทีเรียอาศัยหลักการที่ถูกกำหนด โดยคณะกรรมการสากลซึ่งมีการตั้งกฎของการตั้งชื่อแบคทีเรียและไวรัสออกมาเป็นรหัส เรียกว่า The International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses ต่อมาแยกเป็น The International Code of Bacteria ในปี ค.ศ. 1974

การตั้งชื่อแบคทีเรียอาศัยระบบไบนามียัล (binomial system) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นชื่อสกุลและส่วนที่สองเป็นชื่อชนิด (sp.) โดยเขียนด้วยตัวเอนทั้ง 2 ส่วน หรือเขียนตัวตรงและขีดเส้นใต้ทั้ง 2 ส่วนแยกกัน เช่น *Methylobacterium extorquens* หรือ Methylobacterium extorquens ซึ่งชื่อสกุลสามารถเขียนตัวย่อได้โดยเขียนเฉพาะอักษรตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ตัวเอน

หรือตัวตรงและขีดเส้นใต้ และตามด้วยจุด เช่น *M. extorquens* หรือ *M. extorquens* แต่ชื่อชนิดต้องเขียนชื่อเต็มเสมอ และจะเขียนเดี่ยวๆ ไม่ได้ ต้องเขียนคู่ชื่อสกุลเสมอ

การตั้งชื่อแบคทีเรียอาจมีที่มาได้หลายอย่าง

1. การตั้งชื่อตามรูปร่างและคุณสมบัติของแบคทีเรีย
2. การตั้งชื่อตามแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย
3. การตั้งชื่อตามลักษณะของโรคติดเชื้อที่ก่อ
4. การตั้งชื่อตามผู้ค้นพบ
5. การตั้งชื่อตามสถานที่ค้นพบแบคทีเรีย เป็นต้น

ในแบคทีเรียบางชนิดมีความแตกต่างระดับชนิดได้ จึงแบ่งออกเป็น varieties หรือสายพันธุ์ต่างๆ ได้ เช่น *Streptococcus lactis* สายพันธุ์ที่มีกลิ่นเหมือนข้าวมอลต์ คือ *S. lactis* var. *maltigenus* และพวกที่ย่อยเจลาตินได้คือ *S. faecalis* var. *liquefaciens*

ชื่อแบคทีเรียอาจถูกเปลี่ยนแปลงหรือจัดอนุกรมวิธานใหม่ได้ หากมีหลักฐานหรือมีการค้นพบใหม่ซึ่งพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการจัดกลุ่มไม่ถูกต้อง และนอกจากนี้ยังมีการแยกเชื้อบางสายพันธุ์ออกเป็นชนิดใหม่ หรือแยกเชื้อบางชนิดออกเป็นสกุลใหม่ หากพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติต่างจากแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์ต้นแบบ ซึ่งชื่อของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงหรือการตั้งชื่อของแบคทีเรียที่ถูกค้นพบใหม่จะได้รับการยอมรับอย่างเป็นทางการเมื่อได้รับพิจารณาจากคณะกรรมการสากล เช่น International Committee on Systematics of Prokaryotes (กัทริชย์, 2551)

ในปัจจุบันการศึกษาในระดับโมเลกุลมีการพัฒนาก้าวหน้าอย่างรวดเร็วจึงมีบทบาทอย่างมากในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดอนุกรมวิธานอย่างต่อเนื่อง

การระบุชนิดแบคทีเรีย (Identification)

การระบุชนิดหรือพิสูจน์หรือตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย อาศัยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี โดยลักษณะที่ใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียมีอยู่ 2 ลักษณะหลักๆ คือ ลักษณะเฉพาะที่ใช้มาตั้งแต่ดั้งเดิม (classical characteristics) และลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุล (molecular characteristics) (สุรวิตย์, 2545)

1. ลักษณะเฉพาะที่ใช้มาตั้งแต่ดั้งเดิม (classical characteristics)

1.1 ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยามีประโยชน์ต่ออนุกรมวิธานของแบคทีเรียหลายๆ ด้าน เช่น ง่ายต่อการศึกษาและวิเคราะห์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ รูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของเซลล์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ (การมีหรือไม่มีแฟลกเจลลา) รูปร่างและตำแหน่งของเอนโดสปอร์ สีของโคโลนี

1.2 ลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึม

ลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมเป็นอีกลักษณะเฉพาะหนึ่งที่สำคัญที่ใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมและธรรมชาติของเอนไซม์หรือ โปรตีนของแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์หรือ โปรตีนเป็นผลผลิตของยีนจึงสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาใช้ในการเปรียบเทียบทางอ้อมที่เกี่ยวกับจีโนมของแบคทีเรีย ซึ่งลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่

- แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน
- แหล่งพลังงาน
- องค์ประกอบของผนังเซลล์
- อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ
- ความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญ
- ความต้องการและการทนทานต่อเกลือ
- ความสามารถในการย่อยสลายอาหาร
- ความสัมพันธ์กับออกซิเจน
- การทดสอบลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี เช่น การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

(catalase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test) การทดสอบ MR (methyl red test) การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) การทดสอบอินโดล (indole test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบการใช้อะซิเตต (acetate utilization test) การทดสอบการย่อยอาร์จินิน (arginine dihydrolase test) การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test) การทดสอบการย่อยแป้ง (starch

hydrolysis test) การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction test) การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase test) เป็นต้น

1.3 ลักษณะเฉพาะทางนิเวศวิทยา

แบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากก็ยังสามารถแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อพิจารณาลักษณะเฉพาะทางด้านนิเวศวิทยา เช่น จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ตามร่างกายมนุษย์จะมีความแตกต่างกันรวมทั้งแตกต่างจากพวกที่เจริญในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำเค็ม น้ำจืด และบนบก

2. ลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุล (molecular characteristics)

การศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมโดยเทคนิคระดับโมเลกุลสามารถใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียตามความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการ และสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเชื้อได้ยากหรือไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยการทดสอบอื่นที่ทำโดยทั่วไป

2.1 การวิเคราะห์อัตราส่วนของกรดนิวคลีอิกชนิดกัวนีนและไซโทซีน

โดยแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กันใกล้ชิดกันมักมีปริมาณรวมของกรดนิวคลีอิกชนิดกัวนีนและไซโทซีนในจีโนมในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน

2.2 การเปรียบเทียบโปรตีน

โปรตีนทุกโมเลกุลประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะและมีรูปร่างของโมเลกุลที่แน่นอน โปรตีนเป็นผลผลิตจากยีน ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีโปรตีนที่มีลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน วิธีการศึกษาโปรตีนระดับโมเลกุล คือ การตรวจหารูปแบบของโปรตีน (protein profile) ในเซลล์ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิก (DNA sequencing)

ในปัจจุบันวิธีการนี้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยเป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ซึ่งควบคุมการสร้างสายอาร์เอ็นเอที่เป็นส่วนประกอบของหน่วยย่อยเล็กไรโบโซม (16S ribosomal RNA) โดยแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันในสายวิวัฒนาการจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกคล้ายกัน

ในปัจจุบันเทคนิคในการทดสอบระดับโมเลกุลมีการพัฒนาก้าวหน้ามากขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียออกในระดับชนิดได้ ดังนั้นเทคนิคระดับโมเลกุลจึงมีบทบาทเพิ่มมากขึ้นในการระบุชนิดของแบคทีเรีย

สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษामีทิลโลโทรฟิแคแบคทีเรียน้อยมาก ทั้งในด้านการแยกเชื้อ ความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน ลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รวมถึงพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ทำการแยกและรวบรวมเมทิลโลโทรฟิแคแบคทีเรียจากผิวใบพืช ซึ่งคาดว่าจะสามารถรวบรวมเมทิลโลโทรฟิแคแบคทีเรียได้ในปริมาณมาก ซึ่งจะทำการจัดจำแนกเพื่อระบุชื่อด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นการรวบรวมทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสารสนับสนุนการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย

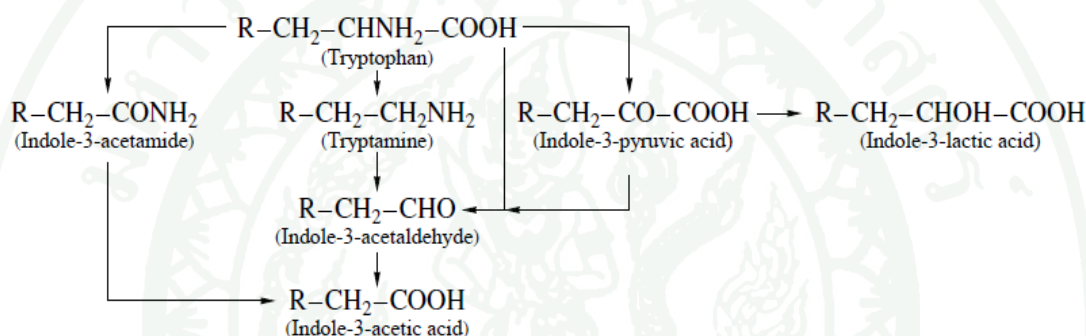
ออกซิน (Auxin)

ออกซินจัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอินโดล ที่พบได้บริเวณปลายยอดของพืช ออกซินที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่ง คือ กรดอินโดล-3-อะซิติก ซึ่งสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน tryptophan นอกจากกรดอินโดล-3-อะซิติกแล้ว พืชยังประกอบด้วยสารประกอบอินโดลชนิดอื่นๆ ที่อาจเป็นสารตัวกลางจากการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซิติก หรือผลผลิตจากการเปลี่ยนแปลงของสารตัวกลาง สารเหล่านี้ได้แก่ indole-3-pyruvic acid (IPA), indole-3-lactic acid (ILA), indole-3-acetonitrile, indole-3-acetaldehyde, tryptamine และ tryptophol ซึ่งกรดอินโดล-3-อะซิติกมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญต่อพืชหลายอย่าง เช่น กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืดขยายตัวของเซลล์ และกระตุ้นทำให้เซลล์เกิดความแตกต่าง ยังช่วยเพิ่มการ

เปลี่ยนแปลงของราก โดยช่วยเปลี่ยนพาเรนไคมาไปเป็นไซเลมและโฟลเอ็ม และยังควบคุมการร่วงของใบและการสุกของผลไม้ (Trotsenko *et al.*, 2001)

การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกในแบคทีเรีย (ภาพที่ 2) เกิดได้ 4 เส้นทาง คือ

1. การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกจาก tryptophan ผ่านทาง indole-3-acetamide
2. การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกจาก tryptophan ผ่านทาง indole-3-acetaldehyde
3. การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกจาก tryptophan ผ่านทาง indole-3-pyruvic acid
4. การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกจาก tryptophan ผ่านทาง tryptamine



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกในแบคทีเรีย

ที่มา: Trotsenko *et al.* (2001)

การสังเคราะห์สารประกอบอินโดลของเมทิลโลโทรฟีกแบคทีเรีย อาจถูกยับยั้งได้อย่างรุนแรงโดยแอมโมเนียมไอออน ทั้งนี้เนื่องจากแอมโมเนียมไอออนเกิดการแข่งขันกับหมู่อะมิโนของ tryptophan ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติก โดยใช้โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) แทนแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งช่วยเพิ่มการสังเคราะห์อินโดล 2 ถึง 15 เท่า ขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ และถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงถึง 8.2 ช่วยทำให้กิจกรรมการยับยั้งของแอมโมเนียมไอออนลดลง เพราะแอมโมเนียมไอออนถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียอิสระ (free NH_3) (Trotsenko *et al.*, 2001)

กรดอินโดล-3-อะซีติกเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญที่ช่วยในการเจริญและการพัฒนาของพืช โดยการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกสามารถพบได้ในแบคทีเรียจำนวนมากที่มีความสัมพันธ์กับพืช

โดยการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชเป็นกลไกโดยตรงที่จะไปเพิ่มการเจริญและผลผลิตของพืช (Ali *et al.*, 2009)

มีรายงานการพบสารประกอบอินโดลในอาหารเลี้ยงเชื้อเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย 37 ชนิด ที่ต่างสกุลกัน (Ivanova *et al.*, 2001) แบคทีเรียจะหลั่งสารประกอบอินโดลในอาหาร 5-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียกลุ่มที่มี serine pathway ของ C₁ metabolism (*M. mesophilicum* และ *Aminobacter aminovorans*), ribulose monophosphate pathway (*M. mays*) และ ribulose bisphosphate pathway (*Paracoccus kondratievae*) จะสังเคราะห์สารประกอบอินโดลชนิด indole-3-acetic acid, indole-3-lactic acid และ indole-3-pyruvic acid ได้ตามลำดับ (Sharma and Chakhal, 1986)

Costacurta *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. citri 233 โดยเลี้ยงในอาหาร MPI minimal medium และเติม L-tryptophan 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน พบว่าสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ 122.5 ไมโครกรัมต่อลิตร

Omer *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกโดยแบคทีเรีย PPFM ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารต่ำๆ (low nutrient medium) โดยเติมและไม่เติม L-tryptophan 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 12 วัน ที่ 20 องศาเซลเซียส พบการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ 6-13.3 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารที่เติม L-tryptophan และผลิตได้ 1.1-2.4 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารที่ไม่เติม L-tryptophan

Hornschuh *et al.* (2006) ศึกษาผลกระทบของสารออกซินที่เมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียสร้างขึ้นแล้วมีผลต่อการเจริญของมอส โดยนำ protonema ของมอสมาเพาะเลี้ยงแล้วใส่ antiauxin para-chloro phenoxy isobutyric acid (PCIB) เพื่อไปยับยั้งออกซินที่พืชสร้าง ก่อนเพาะเชื้อเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย *Methylobacterium* ซึ่งพบว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียสร้างและปล่อยออกซินออกมาช่วยให้มอสเจริญเติบโตได้ Hornschuh *et al.* (2006) ยังศึกษาการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกจาก *Methylobacterium* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Methylobacterium mesophilicum* ATCC 29983 *Methylobacterium* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากมอส (*Funaria hygrometrica*) และ *Methylobacterium* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากทานตะวัน (*Helianthus annuus*) โดยเลี้ยงใน DSM125 minimal medium ที่เติม tryptophan 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน หลังจากนั้นนำส่วนไฮมาเวิเคราะห์

หากรดอินโดล-3-อะซีติกด้วยวิธี colorimetric technique โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินโดล-3-อะซีติกสังเคราะห์ที่อยู่ในช่วง 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1.7×10^{-6} โมลาร์) ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2.9×10^{-4} โมลาร์) พบว่า *Methylobacterium mesophilicum* ATCC 29983 สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ 54 ไมโครโมลาร์ (คิดเป็น 9.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) *Methylobacterium* sp. ที่แยกจากมอสสร้างได้ 92 ไมโครโมลาร์ (คิดเป็น 16.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *Methylobacterium* sp. ที่แยกจากทานตะวันสร้างได้ 162 ไมโครโมลาร์ (คิดเป็น 28.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Mandalet *et al.* (2007) ศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกโดย *Rhizobium* sp. จากปมรากของ *Vigna mungo* (L.) Hepper เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract mineral medium ที่เติม mannitol 1 เปอร์เซ็นต์ และ CaCl_2 0.01 เปอร์เซ็นต์และเติม L-tryptophan หรือ DL-tryptophan หรือ D-tryptophan ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดล-3-อะซีติกพบการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติม L-tryptophan ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติม DL-tryptophan หรือ D-tryptophan ซึ่งอาจเนื่องจากการที่พบ D-amino acids เป็นปริมาณเล็กน้อยในจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ L-amino acids จะถูกใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน สำหรับการศึกษผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า เมื่อเติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และ KNO_3 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tsavkelova *et al.* (2007) แยกแบคทีเรียจากรากของกล้วยไม้ *Paphiopedilum appletonianum* และ *Pholidota articulate* แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่เติม DL-tryptophan 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกอยู่ในช่วง 3-58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. 21 สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้สูงสุด

Ali *et al.* (2009) แยกแบคทีเรียบริเวณรากพืช ใบบ และลำต้น ได้แบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus* และ *Staphylococcus* และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืช (กรดอินโดล-3-อะซีติก) ในอาหาร L-broth 100 มิลลิลิตร ที่เติม L-tryptophan 10 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกอยู่ในช่วง 14 ถึง 106 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* สามารถผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกได้สูงกว่าแบคทีเรียสกุล *Escherichia*, *Micrococcus* และ *Staphylococcus* นอกจากการศึกษาการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกจากแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช ใบ และลำต้น แล้ว Ali *et al.* (2009) ยังพบความแตกต่างระหว่างการตรวจวิเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกโดยวิธี colorimetric technique โดยใช้ salkowski reagent และ Gas chromatography and mass spectrometric (GC-MS) พบว่าวิธี colorimetric technique ให้ปริมาณของกรดอินโดล-3-อะซีติกสูงกว่าวิธี GC-MS เนื่องจากสารสื่อกลางต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซีติกของแบคทีเรียสามารถทำปฏิกิริยากับ salkowski reagent ทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีเข้มขึ้นในระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดล-3-อะซีติก ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS มีความไวที่สูงและการวิเคราะห์สามารถทำได้อย่างแม่นยำและถูกต้องโดยใช้ $^{13}\text{C}_6\text{IAA}$ เป็น internal standard

แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยวิธี colorimetric technique โดยใช้ salkowski reagent ก็ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดล-3-อะซีติกจากแบคทีเรียเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย รวดเร็ว และประหยัด โดยไม่ต้องมีอุปกรณ์ต่อพ่วงพิเศษ

ไซโตไคนิน (Cytokinin)

ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน โดยไซโตไคนินมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการทางกายภาพของพืชหลายอย่าง ได้แก่ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืช, remove apical domination, กระตุ้น dormant bud, เหนี่ยวนำให้เกิดการงอกของเมล็ด และช่วยชะลอความแก่ของพืช ยิ่งกว่านั้นไซโตไคนินยังช่วยเพิ่มความต้านทานของพืชจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิที่สูงมาก ความแห้งแล้ง การติดเชื้อราและไวรัส และสารพิษ ซึ่งรายงานของ Shepelyakovskaya *et al.* (1999) รายงานการค้นพบจีโนมของเมทิลโลทรอฟหลายชนิดประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์และการหลั่งไซโตไคนิน

เป็นที่แน่ชัดว่าความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเมทิลโลทรอฟกับแบคทีเรียไม่ได้จำกัดแค่เพียงในรูปแบบ commensalism เท่านั้น เนื่องจากพบว่า ฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากพืชมีความจำเป็นต่อจุลินทรีย์ทั้งพวกที่ก่อโรคและพวกที่อาศัยร่วมกับพืช และยังพบว่า aerobic methylotrophs ยังสามารถสังเคราะห์ไซโตไคนินซึ่งสำคัญต่อพืช จากการศึกษาโดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) Long *et al.* (1997) ได้แสดงให้เห็นว่ายีน adenylate isopentenyltransferase (cytokinin synthase) ใน *Methylobacterium extorquens* ซึ่งพบว่าเป็น facultative methylotroph นั้น มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ homologous กับยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์และการปล่อยไซโตไคนินอยู่ในจีโนมด้วย

ไซเดอโรฟอรั (Siderophore)

เหล็กเป็นหนึ่งในแร่ธาตุที่มีอยู่มากมายบนเปลือกโลก โดยมีเลขออกซิเดชันได้สองแบบ ในสถานะที่มีออกซิเจนมาก เหล็กมักอยู่ในรูปสารประกอบเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ซึ่งละลายน้ำได้ยาก แต่ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมี pH ต่ำมาก เหล็กมักจะอยู่ในรูปสารประกอบเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ซึ่งละลายน้ำได้ง่ายกว่ามาก ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการเหล็กในการดำรงชีวิต และแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมักต้องประสบปัญหาเรื่องความเข้มข้นของเหล็กในน้ำที่ต่ำมากและในดินก็มักเป็นเหล็กที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำไม่ได้ แบคทีเรียจึงมีการสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัซึ่งเป็นสารคีเลตที่จำเพาะต่อ Fe^{3+} เพื่อเอาชนะอุปสรรคเหล่านี้ (Chu *et al.*, 2010)

ไซเดอโรฟอรั (siderophore) มาจากภาษากรีก หมายถึง ตัวขนส่งเหล็ก คำนี้ถูกนิยามไว้ว่าเป็นสารคีเลตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความเพาะต่อเหล็ก ถูกสร้างโดยแบคทีเรียและรา แม้กระทั่งพืชที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีธาตุเหล็กต่ำ โดยไซเดอโรฟอรัทำหน้าที่ดึงเหล็กจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญมาให้แก่เซลล์ จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะมีออกซิเจนจำเป็นที่จะต้องใช้เหล็กสำหรับทำหน้าที่ต่างๆ เช่น ปฏิกริยารีดักชันของออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์ ATP ปฏิกริยารีดักชันของ ribotide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ DNA ใช้สร้าง heme เป็นต้น ระดับของเหล็กอย่างน้อยที่สุดที่จำเป็นต่อการเจริญในระดับ optimal growth คือ หนึ่งไมโครโมลาร์ เนื่องด้วยความจำกัดทางสิ่งแวดล้อมและความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้จุลินทรีย์ต้องสร้างโมเลกุลจำเพาะที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งก็คือ ไซเดอโรฟอรั ในการแข่งกับอนุโมลไฮดรอกซิล เพื่อจับอนุโมลเฟอร์ริก ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่มากแต่อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Neilands, 1995)

ฟอสเฟตที่ละลายได้ (Soluble phosphate)

ฟอสฟอรัส (P) เป็น macronutrients ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการพัฒนาของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก โดยมีอยู่ในธรรมชาติทั้งในรูปสารอินทรีย์และอนินทรีย์ (Ehrlich, 1990) ปริมาณฟอสฟอรัสในดินมีอยู่ประมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และในจำนวนนี้มีเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ และดินบางชนิดที่มีการให้ปุ๋ยฟอสเฟต อาจมีฟอสเฟตถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ที่กลายสภาพไปอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของแร่

ธาตุ (Goldstein, 1986; Sundara *et al.*, 2002) ดังนั้นการละลายได้ของฟอสเฟตจึงเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับการเจริญของพืช และการเพิ่มฟอสเฟตที่ละลายได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ ในดินที่มีการตกตะกอนของฟอสเฟต (Banik and Dey, 1982; Illmer and Schinner, 1992; Nautiyal *et al.*, 2000; Vazquez *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2005)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำกลายเป็นรูปที่ละลายได้ ได้แก่ การสร้างกรด การสร้างสารคีเลต การเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน การสร้างสาร mono- di- หรือ tricarboxylic acids เป็นต้น (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2002; Harrold and Tabatabai, 2006) การศึกษาในหลอดทดลองแสดงว่าการละลายได้ของฟอสเฟตสัมพันธ์กับการเพิ่มหรือลด pH การผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส และการผลิตกรดอินทรีย์ (Illmer and Schinner, 1995; Gupta *et al.*, 1994; Illmer *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998)

การนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์

Nath *et al.* (2008) ศึกษาการเพิ่มการผลิต polyhydroxybutyrate (PHB) โดยใช้ cheese whey ในการหมักแบบ fed-batch โดยใช้ *Methylobacterium* sp. ZP24 ซึ่งพบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 3.54 กรัมต่อลิตร ในถังหมัก 2 ลิตร และผลิต PHB ได้ถึง 3.91 กรัมต่อลิตร ในถังหมัก 30 ลิตร ซึ่ง PHB เป็นสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำไปผลิตพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ และยังสามารถนำไปสร้าง 3-hydroxybutyric acid (3-HB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางสำหรับการสังเคราะห์ chiral drug ได้อีกด้วย

Madhaiyan *et al.* (2007) พบว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียช่วยลดความเป็นพิษของแคดเมียม (Cd) และนิกเกิล (Ni) ได้ โดยพบว่า *Methylobacterium oryzae* strain CBMB20^T (pink-pigment) และ *Burkholderia* sp. strain CBMB40 (non-pigment) ที่แยกได้จากต้นข้าว มีความสามารถในการลดความเป็นพิษของแคดเมียม และนิกเกิลที่ความเข้มข้นสูงสุด 3 มิลลิโมลาร์ และยังสามารถช่วยเพิ่มความยาวของลำต้นและรากของมะเขือเทศได้ทั้งในสถานะที่ไม่มีและมีแคดเมียม และนิกเกิล ที่ความเข้มข้นของนิกเกิลไม่เกิน 5 มิลลิโมลาร์ และแคดเมียมไม่เกิน 10 มิลลิโมลาร์

Madhaiyan *et al.* (2009) ศึกษาการนำเมทิลโดโทรฟิคไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชและการทำให้เกิดปม และศึกษาเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสที่มีผลต่อการสร้างปม โดยนำเมทิลโดโทรฟิคแบคทีเรีย *Methylobacteria nodulans* CMCJ317 และ CMSA322 มาเลี้ยงกับพืช *Macroptilium atropurpureum* และ *Crotalaria juncea* จากการศึกษาพบว่าเมทิลโดโทรฟิคแบคทีเรียที่มีเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสสูงสามารถช่วยให้พืชเจริญและสร้างปมได้มากขึ้น



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างใบพืช เช่น องุ่น มะม่วง มะปราง ลำไย ลิ้นจี่ สับปะรด มะกอกน้ำ เป็นต้น
2. สารเคมี ได้แก่ ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต แอม โมเนียคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต เพอร์ริกซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต คอปเปอร์ซัลเฟตไดไฮเดรต ซิงค์ซัลเฟต บอริกแอซิด นิกเกิลคลอไรด์ โคบอลต์คลอไรด์ โซเดียม โมลิบเดต ผงวุ้น (Difco) สารยับยั้งเชื้อรา (ketoconazole) เมทานอล วิตามิน
3. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ งานเพาะเลี้ยง หลอดทดลอง ปิเปต
4. อุปกรณ์พลาสติก ได้แก่ หลอดพลาสติกสำหรับใช้กับเครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติขนาดต่างๆ
5. เครื่องมือขนาดเล็ก ได้แก่ เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติขนาดต่างๆ เครื่องผสมสาร
6. เครื่องมือขนาดใหญ่ ได้แก่ ตู้เย็นเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ ตู้อบ 180 องศาเซลเซียส หม้อนึ่งอัตโนมัติ

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจากใบพืช

1.1 เก็บตัวอย่างใบพืชจากสถานที่ต่างๆ

1.2 ใช้ forceps คีบตัวอย่างใบพืชวางบนอาหารแข็ง Ammonium Mineral Salt (AMS) ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) โดยวางใบพืชทั้งสองด้านบนผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วใช้ forceps กดเบาๆ ให้ใบพืชแนบสนิทกับผิวหน้าอาหาร (leaf-imprinting technique) จากนั้นคีบใบพืชทิ้งไป บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าจะพบการเจริญของแบคทีเรียบริเวณที่วางใบพืชไว้

1.3 ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจากผิวหน้าอาหารมา streak บนอาหารแข็ง AMS ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนี

1.4 ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง AMS ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกโคโลนีที่เป็นแบคทีเรียนำมา streak ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง AMS ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารแข็ง glycerol peptone agar (GPA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วันหรือจนกว่าจะพบโคโลนี

1.5 ทำข้อ 1.4 ซ้ำจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.6 เมื่อได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้ว จึงเก็บเชื้อบนอาหารแข็ง AMS ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารแข็ง glycerol peptone agar (GPA) ผิวหน้าเอียง ที่ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป และเก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานาน

2. การจัดจำแนกและระบุชนิดแบคทีเรียที่แยกได้

2.1 ศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้

ศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1. โดยคุณลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง GPA เช่น ลักษณะโคโลนี ขนาด สี เป็นต้น โดยเลี้ยงบ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนีและศึกษาลักษณะของเซลล์ เช่น รูปร่าง ขนาด การติดสีแกรม โดยใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และศึกษาการสร้างเอนโด

สปอร์โดยการข้อมอน โดสปอร์ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน หรือจนกระทั่งสารอาหารเริ่มขาดแคลน

2.2 การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียในบริเวณอนุรักษ์ที่มีการผันแปรได้ ความยาว 300-600 นิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่มีการอธิบายแล้วและเป็นสายพันธุ์ต้นแบบจากฐานข้อมูล EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>)

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกไปสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนของ 16S rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ที่ บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1. เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง (GPA media) ลาดเอียง ขูดเชื้อใส่หลอดไมโครพิวจ์ (Eppendorf) ที่มีน้ำปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
2. เทส่วนใสทิ้ง ก่อนเติม lysis buffer* 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดชิ้นลงเพื่อผสมสารให้เข้ากัน
3. เติม lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 ไมโครลิตร นำไปผสมบนเครื่องผสมสาร (vortexmixer) แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
4. เติม proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตรเติม RNase A ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตรและเติม SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดกลับไปมาอย่างเบาๆ แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดกลับไปมาอย่างเบาๆ

6. เติม CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์)/ NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 55 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอกลงไปมาอย่างเบาๆ
7. นำไปปั่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
8. เติม ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอกลงไปมาอย่างเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
9. ดูส่วนของ aqueous phase (ชั้นบน) มาใส่หลอดใหม่
10. เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าตัว ผสมโดยการพลิกหลอกลงไปมาอย่างเบาๆ (ควรเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นสาย) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
11. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นจัด (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
12. เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งหมาดๆ โดยการเปิดฝาหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตจากตะกอนที่เห็นเป็นสีขาวขุ่นเปลี่ยนเป็นใส
13. ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำ ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอ) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แต่ถ้าต้องการเก็บในระยะยาวให้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ * lysis buffer ประกอบด้วย

1M Tris-HCl pH 8	1	มิลลิลิตร
500 mM EDTA pH 8	0.5	มิลลิลิตร
TritonX100 (final 1.2%)	0.6	มิลลิลิตร
H ₂ O (nanopure)	50	มิลลิลิตร

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') เป็น forward primer และ

1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') เป็น reverse primer และคู่ไพรเมอร์

1F (5'-TCACGGAGAGTTTGGATCCTG-3') เป็น forward primer และ
1530R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') เป็น reverse primer

สำหรับการระบุชื่อโดยการศึกษาดิเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ในขั้นแรกใช้คู่ไพรเมอร์ 27F และ 1389R เพื่อเพิ่มปริมาณดิเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ซึ่งจะทำการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 800-1300 คู่เบส ที่ครอบคลุมบริเวณอนุกรมที่มีการผันแปรได้ และเมื่อต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวเพิ่มเป็น 1400 คู่เบส ในกรณีพบว่าผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียต้นแบบจากฐานข้อมูลต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จะใช้คู่ไพรเมอร์ 1F และ 1530R

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีดังนี้

10X PCR buffer	2	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X)
25 mM MgCl ₂	1.6	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM)
10 mM dNTP	0.4	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 mM)
10 pmol forward primer	1	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 pmol)
10 pmol reverse primer	1	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 pmol)
DNA template	1	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 80-100 ng)
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 U)
dH ₂ O	12.9	ไมโครลิตร
Total volume	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใส่ในเครื่อง PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มลดอุณหภูมิ ดังนี้

กรณีที่ใช้คู่ไพรเมอร์ 27F และ 1389R

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (เป็นขั้นตอนที่คู่ของดิเอ็นเอแยกออกเป็นดิเอ็นเอสายเดี่ยว)
3. อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที (เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กัน)

4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์)

5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

6. ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 30 รอบ

กรณีที่ใช้ไพรเมอร์ 1F และ 1530R

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

3. อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

6. ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 30 รอบ

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ที่มีอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส เมื่อใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1389R และควรมีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส เมื่อใช้ไพรเมอร์ 1F และ 1530R หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

2.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ/หรือ 1389R สำหรับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1389R และใช้ไพรเมอร์ 1F 1530R 782R (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3') และ 520F (5'-ATTGGATCCCAGCMGCCGCGGTAA-3') โดยแทน M ด้วย A หรือ C สำหรับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 1F และ 1530R

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Chromas 2.33 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากฐานข้อมูลของ EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ type strain ของแบคทีเรีย

2.2.4 การวิเคราะห์สัดส่วนของเบสกวีนีน (guanine) รวมกับเบสไซโตซีน (cytosine) ในดีเอ็นเอ หรือค่า G+C content

ทำโดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่บริษัท TechnoSuruga Laboratory (Shizuoka, Japan)

2.2.5 Genomic DNA–DNA hybridization

การทำ Genomic DNA–DNA hybridization เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่ศึกษากับดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ้างอิงว่ามีการจัดเรียงตัวและลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากน้อยเพียงใด ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำได้ตามวิธีของ Ezaki *et al.* (1989) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจด้วยสารเรืองแสง (Fluorometric hybridization)

3. การทดสอบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

เพาะเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้ลงบนอาหารแข็ง GPA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการเจริญทุกวันจนครบ 7 วัน

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติคโดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้

4.1 เตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเหลว PYDM (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 นำกล้าเชื้อจากข้อ 4.1 มาใส่อาหารเหลว PYDM 50 มิลลิลิตร ที่เติม L-tryptophan จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับให้ได้กล้าเชื้อเริ่มต้นที่ค่าความขุ่น (OD) 0.2 บ่มบนเครื่องเขย่าเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.3 หลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน นำมาวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

นำส่วนใส มาตรวจวัดกรดอิน โดล-3-อะซิติค โดยนำ supernatant มาผสมกับ Salkowski reagent (ที่มี FeCl_3 ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตร ผสมอยู่กับ H_2SO_4 ความเข้มข้น 7.9 โมลาร์) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

4.5 นำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน (linear calibration curve) ที่ได้จาก authentic indole-3-acetic acid ความเข้มข้น 1.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การสร้างไซเดอโรฟออร์ (siderophore) บนอาหารแข็ง

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สร้างกรดอิน โดล-3-อะซิติค ได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มาตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างไซเดอโรฟออร์ตามวิธีของ Schwyn and Neilands (1987)

5.1 เตรียมกล้าเชื้อบนอาหารแข็ง GPA (ภาคผนวก ก)

5.2 นำกล้าเชื้อจากข้อ 5.1 มา streak บนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.3 ตรวจสอบสีส้มที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสร้างไซเดอโรฟออร์

6. การละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สร้างกรดอิน โดล-3-อะซิติค ได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มาตรวจสอบคุณสมบัติการละลายฟอสเฟต ตามวิธีของ Zaidi *et al.* (2006)

6.1 เตรียมกล้าเชื้อบนอาหารแข็ง GPA (ภาคผนวก ก)

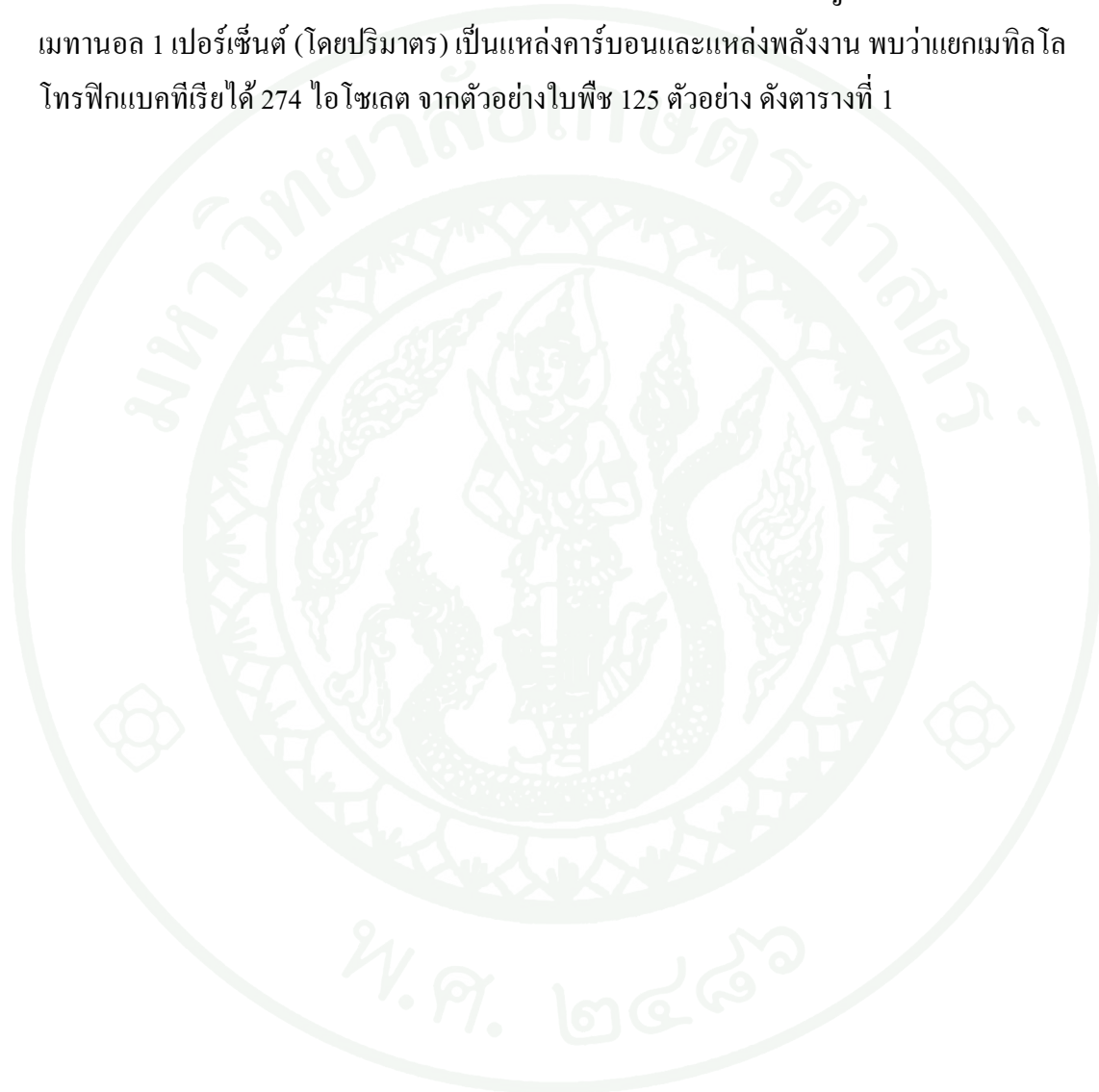
6.2 นำกล้าเชื้อจากข้อ 6.1 มา streak บนอาหาร Pikovskaya's agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.3 ตรวจสอบใสที่เกิดขึ้นเมื่อมีการละลายฟอสเฟต

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจากใบพืช

การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียโดยใช้ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้ 274 ไอโซเลต จากตัวอย่างใบพืช 125 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การแยกเมทิลโลโทรฟิแคแบคทีเรียจากแหล่งตัวอย่างใบพืช

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้		รหัสเชื้อ
1	มะม่วง	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	-	-	
2	น้อยหน่า	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	1	T2-2	
3	ชมพู่มะเหมี่ยว	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	1	T3-4	
4	มะขม	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	-	-	
5	มะขาม	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	3	T5-3, T5-4, T5-9	
6	ขนุน	คู่	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	6	T6-1, T6-2, T6-3, T6-4, T6-5, T6-6	
7	กล้วย	เดี่ยว	ต. บางเขน อ. เมือง จ. นนทบุรี	1	T7-2	
8	มะละกอ	คู่	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	3	T8-4, T8-5, T8-6	
9	กล้วย	เดี่ยว	เกาะมาตราจ.ชุมพร	5	PN3, T9-2, PN4, PN1, T9-4.2	
10	มะเดื่อ	คู่	เกาะมาตราจ.ชุมพร	3	T10-3, T10-4, T10-6,	
11	มะพร้าว	เดี่ยว	เกาะมาตราจ.ชุมพร	3	T11-1, T11-2, T11-3	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
12	กล้วย	เดี่ยว	ทางหลวงชนบทกม.7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	3	T12-1, T12-2, T12-3
13	ส้มโอ	คู่	ทางหลวงชนบทกม.7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	4	T13-1, T13-2, T13-3, T13-4
14	มังคุด	คู่	ทางหลวงชนบทกม.7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	2	T14-2, T14-3
15	พุทรา	คู่	อ.ชุมพล จ.ชุมพร	3	T15-2, T15-3, T15-4
16	สับปะรด	เดี่ยว	วัดห้วยมงคลอ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	5	T16-1, T16-2, T16-3, T16-4, T16-5
17	ส้มจี๊ด	คู่	ต. บ้านเกาะ อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	1	T17-2
18	มะขามเทศ	คู่	ต. ท่าฉลอม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	4	T18-1, T18-2, T18-4, T18-5
19	ทับทิม	คู่	ต. ท่าฉลอม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	1	T19-1
20	ละมุดสีดา	คู่	ต. ท่าฉลอม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	3	T20-1, T20-2, T20-3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
21	มะดัน	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	3	T21-1, T21-2, T21-3
22	ลิ้นจี่	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	5	T22-2, T22-4, T22-5.1, T22-5.2, T22-6
23	ลิ้นจี่	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T23-1, T23-2, T23-3, T23-4
24	ลำไย	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	3	T24-1, T24-2, T24-3
25	มะละกอ	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	6	T25-1, T25-2, T25-5, T25-6, T25-7, T25-9.1
26	มะยม	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	2	T26-1, T26-2
27	กล้วย	เดี่ยว	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T27-1, T27-3, T27-4, T27-5
28	มะปราง	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T28-2, T28-4, T28-5, T28-7
29	เชอร์รี่	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	3	T29-1, T29-2, T29-4
30	ชมพู่มะเหมี่ยว	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	7	T30-1, T30-3, T30-4.1, T30-4.2, T30-5, T30-6, T30-7
31	น้อยหน่า	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T31-1.1, T31-1.2, T31-2, T31-3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของ ใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้	รหัสเชื้อ
32	ขนุน	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T32-1.1, T32-2, T32-3.2, T32-9
33	ส้มโอ	คู่	ต. ตาหลวง อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี	4	T33-3, T33-4, T33-5, T33-6
34	มันสำปะหลัง	คู่	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	3	T34-1, T34-2, T34-3
35	มันสำปะหลัง	คู่	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	2	T35-1, T35-4
36	มันสำปะหลัง	คู่	บ้านหนองสามพราน จ.กาญจนบุรี	2	T36-1, T36-2
37	มันสำปะหลัง	คู่	บ้านหนองสามพราน จ.กาญจนบุรี	3	T37-1, T37-2, T37-3
38	มันสำปะหลัง	คู่	ทางเข้าสถานีวิจัย จ.กาญจนบุรี	4	T38-1, T38-2, T38-3, T38-4
39	ขอ	คู่	สถานีวิจัย จ.กาญจนบุรี	2	T39-1, T39-2
40	มะม่วง	คู่	สถานีวิจัย จ.กาญจนบุรี	3	T40-1, T40-2S, T40-3P
41	องุ่น	คู่	สถานีวิจัย จ.กาญจนบุรี	5	T41-1, T41-2, T41-3.1, T41-3.2, T41-3.3
42	องุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	6	T42-1, T42-3, T42-5, T42-6, T42-7, T42-8

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของ ใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้	รหัสเชื้อ
43	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	4	T43-1, T43-2, T43-3, T43-4
44	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T44-1, T44-2, T44-3
45	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T45-2, T45-3, T45-5
46	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T46-1, T46-2, T46-3
47	น้อยหน่า	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T47-1, T47-2
48	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T48-1, T48-2
49	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	-	-
50	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T50-1, T50-3
51	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	-	-
52	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T52-1, T52-2
53	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T53-1, T53-2
54	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T54-1, T54-2
55	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T55-1, T55-2, T55-3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
56	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	1	PN5
57	อุนุ่น	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	2	T57-1, T57-3
58	ฝรั่ง	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	1	T58-1
59	มะม่วง	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	-	-
60	มะขามเทศ	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T60-1, T60-2, T60-3
61	มะขาม	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	1	T61-1
62	พุทรา	คู่	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	3	T62-1, T62-2, T62-3
63	มะม่วงหิมพานต์	คู่	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	3	T63-1, T63-2, T63-3
64	ละมุด	คู่	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	2	T64-2, T64-3
65	มะกอกน้ำ	คู่	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	2	PN2, PN6
66	มะม่วง	คู่	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	2	T66-1, T66-3
67	มะละกอ	คู่	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	1	T67-1
68	มะนาว	คู่	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	1	T68-1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
69	ลูกหว้า	คู่	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	2	T69-1, T69-2
70	กล้วย	เดี่ยว	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	2	T70-1, T70-2
71	มะพร้าว	เดี่ยว	ต.สระยายโสม อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	2	T71-1, T71-2
72	ส้มจี๊ด	คู่	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	-	-
73	มะยม	คู่	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	2	T73-1, T73-2
74	ข้าว	เดี่ยว	อ.บางปะอิน จ.อยุธยา	1	T74-1
75	ข้าว	เดี่ยว	อ.บางปะอิน จ.อยุธยา	2	T75-1, T75-2
76	ข้าว	เดี่ยว	อ.บางบาล จ.อยุธยา	3	T76-1, T76-2, T76-3
77	ข้าว	เดี่ยว	อ.เสนา จ.อยุธยา	2	T77-1, T77-2
78	ข้าว	เดี่ยว	อ.เสนา จ.อยุธยา	2	T78-2, T78-3
79	ข้าว	เดี่ยว	อ.เสนา จ.อยุธยา	2	T79-1, T79-2
80	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	2	T80-1, T80-2
81	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	2	T81-1, T81-2

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
82	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	1	T82-1
83	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	-	-
84	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	3	T84-1, T84-2, T84-3
85	ข้าว	เดี่ยว	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	1	T85-1
86	ข้าว	เดี่ยว	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	2	T86-1, T86-2
87	ข้าว	เดี่ยว	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	1	T87-2
88	ข้าว	เดี่ยว	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	2	T88-1, T88-2
89	ข้าว	เดี่ยว	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	1	T89-2
90	ข้าว	เดี่ยว	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	1	T90-1
91	ข้าว	เดี่ยว	อ.สามโก้ จ.อ่างทอง	2	T91-2, T91-3
92	ข้าว	เดี่ยว	อ.สามโก้ จ.อ่างทอง	1	T92-1
93	ข้าว	เดี่ยว	อ.สามโก้ จ.อ่างทอง	2	T93-1, T93-2

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
94	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโก้ จ.อ่างทอง	1	T94-2
95	ข้าว	เดี่ยวน	อ.บางบาล จ.อยุธยา	1	T95-1
96	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	3	T96-1, T96-2, T96-3
97	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	2	T97-1, T97-3
98	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	2	T98-2, T98-3
99	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	2	T99-1, T99-2
100	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	1	T100-1
101	ข้าว	เดี่ยวน	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	1	T101-1
102	มะปราง	คู่	อ.ท่าช้าง จ.เพชรบุรี	-	-
103	ข้าว	เดี่ยวน	อ.บางปลาม้า จ.สุพรรณบุรี	1	T103-2
104	ยูคาลิปตัส	คู่	อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี	2	T104-1, T104-2
105	ยูคาลิปตัส	คู่	อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	3	T105-1, T105-2, T105-3
106	ยูคาลิปตัส	คู่	อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของ ใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้		รหัสเชื้อ
107	สะเดา	คู่	อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี	-	-	
108	ฝรั่ง	คู่	อ.บางปลาม้า จ.สุพรรณบุรี	-	-	
109	จำปาตะ	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T109-1, T109-2
110	มังคุด	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	1		T110-1
111	ทุเรียนน้ำ	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T111-1, T111-2
112	ต้นสักทอง	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	1		T112-2
113	ชมพู่มะเหมี่ยว	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	1		T113-2
114	ทับทิม	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T114-1, T114-2
115	ลองกอง	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T115-1, T115-2
116	เงาะ	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T116-1, T116-2
117	ตะมุค	คู่	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	2		T117-1, T117-2
118	น้อยหน่า	คู่	อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา	1		T118-2
119	ฝรั่ง	คู่	อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา	2		T119-1, T119-2

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของพืช	ชนิดของใบเลี้ยง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสเชื้อ
120	ขนน	คู่	อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา	3	T120-1, T120-2, T120-3
121	ข้าวโพด	เดี่ยว	อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา	1	T121-1
122	ข้าวโพด	เดี่ยว	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	1	T122-1
123	ข้าวโพด	เดี่ยว	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	2	T123-1, T123-2
124	อ้อย	เดี่ยว	อ.โชคชัย จ.นครราชสีมา	2	T124-1, T124-2
125	อ้อย	เดี่ยว	อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา	2	T125-1, T125-2

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 1 พบว่าแยกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียได้จำนวน 274 ไอโซเลต จากตัวอย่างใบพืช 125 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นตัวอย่างใบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 6 ชนิด จำนวน 42 ตัวอย่าง ซึ่งแยกเชื้อได้ 80 ไอโซเลต และพืชใบเลี้ยงคู่ 36 ชนิด จำนวน 83 ตัวอย่าง แยกเชื้อได้ 194 ไอโซเลต เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ต่อจำนวนตัวอย่างจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่มีจำนวนเฉลี่ยของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งจะสังเกตว่าแยกได้เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียจำนวนค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากผิวใบพืชเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตาม แม้จะพบจุลินทรีย์ได้หลากหลายกลุ่ม แต่จะพบประชากรแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยพบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรของผิวใบ (Lindow and Brandl, 2003) ซึ่งเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียก็รวมอยู่ในกลุ่มประชากรแบคทีเรียนี้ด้วย

จากการแยกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียในครั้งนี้อาจแยก Pink-Pigmented Facultative Methylophs (PPFMs) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่บนผิวใบพืชได้ 137 ไอโซเลต จากตัวอย่างใบพืชจำนวน 125 ตัวอย่าง บนอาหาร ammonium mineral salt (AMS) agar ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) โดยใช้เทคนิค leaf-imprinting ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Balachandar *et al.* (2008) ที่แยก PPFMs ได้ 62 ไอโซเลต จากตัวอย่างใบฝ้าย ใบข้าวโพด และใบทานตะวัน ชนิดละ 20 ใบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิคการแยกเชื้อแบบเดียวกัน และรายงานของ Kumar and Lee (2009) ที่แยก PPFMs ได้จากใบสะเดาจำนวน 15 ตัวอย่าง ในประเทศฟิลิปปินส์ ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งสามารถแยก PPFMs ได้ 20 ไอโซเลต โดยการศึกษาครั้งนี้สามารถแยก PPFMs ได้จำนวนใกล้เคียงกับที่รายงาน โดย Balachandar *et al.* (2008) และ Kumar and Lee (2009)

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่แยกได้ 274 ไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง GPA พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญได้บนอาหาร GPA แสดงว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้เป็น facultative methylophic bacteria เนื่องจากสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง GPA ที่มี glycerol ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลายอะตอมเป็นองค์ประกอบ

2. การระบุชนิดของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่แยกได้

การระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ ใช้อนุกรมวิธานแบบ polyphasic ที่ประกอบด้วย การศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

2.1 การศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่แยกได้

นำเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาพื้นฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ โดยพิจารณารูปร่าง ขนาด ลักษณะของโคโลนี เมื่อเลี้ยงให้เจริญบนอาหารแข็ง GPA agar (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 2-4 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนี และพิจารณาดำแหน่งของเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ และการติดสีแกรมของเซลล์ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโคโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร GPA บ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)/ อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T2-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T3-4	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T5-3	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T5-4	ชมพูอ่อน	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T5-9	ชมพู	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T6-1	ชมพู	1 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T6-2	ขาวขุ่น	1.2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	กลม	บวก
T6-3	ชมพู	1 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T6-4	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T6-5	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T6-6	ชมพู	1 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T7-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T8-4	ชมพู	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T8-5	เหลือง	1 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T8-6	ชมพูอ่อน	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
PN3	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T9-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
PN4	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
PN1	ขาว	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T9-4.2	ขาวขุ่น	1 / 1	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T10-3	ชมพู	1.2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T10-4	ชมพู	1.5 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T10-6	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T11-1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T11-2	ส้มอ่อน	3 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ค็อกโค บาซิลไล	บวก
T11-3	ส้มเข้ม	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	บวก
T12-1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T12-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T12-3	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T13-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T13-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T13-3	เหลือง	3 / 4	กลม	นูน	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T13-4	ขาวขุ่น	4 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T14-2	ขาวขุ่น	5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T14-3	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T15-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T15-3	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T15-4	ชมพู	0.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T16-1	เหลือง	3 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T16-2	เหลือง	3 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T16-3	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T16-4	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T16-5	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T17-2	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T18-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T18-2	เหลือง	4 / 4	กลม	นูน	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T18-4	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T18-5	ชมพู	0.5 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T19-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T20-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T20-2	ชมพู	1.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T20-3	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T21-1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)/ อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T21-2	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T21-3	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T22-2	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T22-4	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T22-5.1	เหลือง	7 / 4	กลม	แบนราบ	ขุ่น	คลื่นเว้า เล็กน้อย	ท่อนยาว	ลบ
T22-5.2	ชมพูอ่อน	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T22-6	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T23-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T23-2	เหลือง	2 / 4	ไม่แน่นอน	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T23-3	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T23-4	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T24-1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T24-2	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T24-3	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-5	เหลือง	4 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-6	ชมพู	1.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-7	ชมพู	1 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T25-9.1	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T26-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T26-2	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T27-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T27-3	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T27-4	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T27-5	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T28-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T28-4	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T28-5	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T28-7	ขาวขุ่น	4 / 4	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T29-1	ชมพู	0.5 / 4	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T29-2	ชมพู	1 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T29-4	เหลือง	0.5 / 4	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T30-1	ชมพู	1 / 1	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T30-3	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวขุ่น	5 / 5	ไม่แน่นอน, เข้ม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T30-4.1	ตรงกลางขาว เหลืองรอบๆ ขาว ขุ่น	10 / 5	กลม, เข้ม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T30-4.2	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวขุ่น	5 / 5	ไม่แน่นอน, เข้ม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)/ อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T30-5	ขาวขุ่น	2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T30-6	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวขุ่น	5 / 5	ไม่แน่นอน, เยิ้ม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T30-7	เหลือง	2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T31-1.1	เหลือง	3 / 5	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	ขรุขระขุ่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T31-1.2	ชมพู	2 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T31-2	เหลือง	3 / 5	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	ขรุขระขุ่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T31-3	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T32-1.1	ตรงกลางขาวขุ่น รอบๆ ขาวใส	10 / 5	ไม่แน่นอน	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T32-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T32-3.2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T32-9	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T33-3	ชมพู	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T33-4	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T33-5	ชมพู	2 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T33-6	เหลือง	4 / 5	กลม	แบนราบ	ขรุขระย่น	คลื่นเว้า เล็กน้อย	ท่อนยาว	ลบ
T34-1	ชมพู	2 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T34-2	เหลือง	4 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T34-3	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T35-1	ชมพู	1.5 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T35-4	เหลือง	4 / 5	ไม่แน่นอน	แบนราบ	ขรุขระย่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T36-1	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T36-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T37-1	ชมพู	2 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T37-2	ชมพูถึงแดง	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T37-3	เหลือง	4 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	ขรุขระ	หยัก	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T38-1	ขาวขุ่น	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T38-2	ขาวขุ่น	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T38-3	เหลือง	3 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	ขรุขระ	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T38-4	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T39-1	เหลืองใส	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T39-2	ขาว	2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T40-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T40-2S	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T40-3P	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T41-1	ชมพู	2 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T41-2	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T41-3.1	ขาวขุ่น	8 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T41-3.2	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T41-3.3	ขาว	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T42-1	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T42-3	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T42-5	ชมพู	1 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T42-6	ขาวขุ่น	2 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T42-7	เหลืองออกดำๆ	3 / 6	กลม	นูน	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T42-8	ขาวขุ่น	2 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T43-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T43-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T43-3	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T43-4	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T44-1	ชมพู	1 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T44-2	ชมพู	1.5 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)/ อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T44-3	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T45-2	ชมพู	1 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T45-3	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T45-5	ขาวขุ่น	8 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T46-1	ชมพู	2 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T46-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T46-3	ขาวขุ่น	10 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T47-1	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T47-2	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T48-1	ชมพู	2 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T48-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T50-1	ขาวขุ่น	1.5 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T50-3	ชมพู	1.5 / 9	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T52-1	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T52-2	เหลือง	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T53-1	เหลือง	3 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T53-2	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T54-1	ชมพู	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T54-2	เหลือง	2 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T55-1	ชมพู	1 / 9	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T55-2	ขาวขุ่น	1 / 5	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	กลม	บวก
T55-3	เหลือง	2.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
PN5	ชมพูถึงแดง	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T57-1	น้ำตาล	3-4 / 5	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระเป็น รอยขุ่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T57-3	ชมพู	1.5 / 10	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T58-1	ชมพู	0.5 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T60-1	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T60-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T60-3	เหลืองใส	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T61-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T62-1	เหลือง	5 / 6	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระเป็น รอยขุ่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T62-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T62-3	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T63-1	เหลือง	5 / 6	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระเป็น รอยขุ่น	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T63-2	เหลือง	5 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T63-3	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	ขรุขระ เล็กน้อย	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T64-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T64-3	ขาว-เหลือง	1 / 3	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
PN2	ชมพูจาง	1-1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ค็อกโค บาซิลไล	ลบ
PN6	ขาว-เหลือง	0.5 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T66-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T66-3	ชมพู	1.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	บวก
T67-1	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	คล้ายซี่ลวด ของล้อรถ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T68-1	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวใส	4 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T69-1	เหลือง	3.5 / 6	กลม	นูน	ขุ่น	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T69-2	ชมพู	0.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T70-1	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T70-2	เหลืองครีม	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T71-1	เหลือง	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T71-2	ชมพู	0.5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T73-1	เหลือง	5 / 6	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระ	ริมเป็นคลื่น	ท่อนสั้น	ลบ
T73-2	ชมพู	1 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T74-1	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T75-1	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T75-2	ตรงกลางขาวชุ่น รอบๆ ขาวใส	5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T76-1	เหลือง	3 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T76-2	ขาวชุ่น	2 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T76-3	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T77-1	เหลือง	4 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T77-2	ขาวชุ่น	2 / 5	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T78-2	เหลือง	3.5 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T78-3	ตรงกลางขาวขุ่น รอบๆ ขาวใส	3 / 8	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T79-1	ขาวขุ่น	4 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T79-2	เหลือง	3 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T80-1	ชมพู	1 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T80-2	เหลือง	3 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T81-1	เหลือง	4 / 8	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T81-2	เหลือง	4 / 8	กลม	นูน	ขรุขระขุ่น	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T82-1	เหลืองครีม	2 / 8	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T84-1	ขาวขุ่น	3 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T84-2	ขาวขุ่น	0.5 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T84-3	ชมพู	1 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T85-1	เหลือง	2 / 8	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T86-1	เหลือง	4 / 8	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T86-2	ชมพู	0.5 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T87-2	เหลือง	2 / 8	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T88-1	เหลือง	4 / 8	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T88-2	เหลือง	5 / 8	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T89-2	ชมพู	1 / 7	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T90-1	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวใส	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T91-2	ชมพู	2.5 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T91-3	เหลืองครีม	3 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T92-1	เหลือง	3 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T93-1	เหลือง	4 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T93-2	ตรงกลางเหลือง รอบๆ ขาวขุ่น	7 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T94-2	เหลือง	4 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T95-1	เหลือง	3 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T96-1	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T96-2	เหลือง	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T96-3	ขาวขุ่น	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T97-1	เหลือง	2 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T97-3	ขาวขุ่น	5 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T98-2	เหลือง	1 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T98-3	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T99-1	เหลือง	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T99-2	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T100-1	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T101-1	เหลือง	3 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T103-2	เหลืองครีม	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)/ อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T104-1	ชมพู	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T104-2	เหลือง	3.5 / 6	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระ	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T105-1	เหลือง	3 / 6	ไม่แน่นอน	นูน	ขรุขระ	หยัก	ท่อนยาว	ลบ
T105-2	ขาวขุ่น	1 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	บวก
T105-3	ชมพู	1 / 6	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T109-1	ตรงกลางครีม รอบๆ ขาวใส	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T109-2	ตรงกลางครีม รอบๆ ขาวใส	2 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T110-1	ชมพู	1 / 5	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T111-1	เหลือง	4 / 5	กลม	แบนราบ	ขรุขระย่น	คลื่นเว้า เล็กน้อย	ท่อนยาว	ลบ
T111-2	เหลือง	2 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T112-2	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T113-2	เหลือง	4 / 5	กลม	แบนราบ	ขรุขระข่น	หยักเล็กน้อย	ท่อนยาว	ลบ
T114-1	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T114-2	เหลืองครีม	3 / 6	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T115-1	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T115-2	ครีมออกเหลือง	1.5 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T116-1	เหลือง	2 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T116-2	เหลือง	2 / 6	กลม	นูน	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T117-1	เหลือง	4 / 6	กลม	แบนราบ	ขรุขระ	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T117-2	ขาวขุ่น	1 / 1	กลม	นูน	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T118-2	เหลือง	2 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	บวก
T119-1	ตรงกลางเหลือง รอบๆ สีครีม	2 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T119-2	ขาวขุ่น	2 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T120-1	ครีมออกเหลือง	1.5 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเกลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (มม.) / อายุ (วัน)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	รูปร่างเซลล์	การติดสีแกรม
T120-2	ส้ม	1 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T120-3	เหลือง	1 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T121-1	เหลือง	1 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T122-1	ขาวขุ่น	2 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T123-1	เหลือง	1.5 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T123-2	ครีม	2 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ
T124-1	ครีมออกเหลือง	2 / 2	กลม	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T124-2	ขาวขุ่น	2.5 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T125-1	ส้มออกเหลือง	1 / 2	กลม	นูน	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนยาว	ลบ
T125-2	ครีมออกเหลือง	2 / 2	ไม่แน่นอน	แบนราบ	เกลี้ยงเงลา	เรียบ	ท่อนสั้น	ลบ

หมายเหตุ ไม่พบแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์

การศึกษาลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่า จาก facultative methylotrophic bacteria ทั้งหมด 274 ไอโซเลต สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามการติดสีแกรม ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 260 ไอโซเลต (คิดเป็น 94.89 เปอร์เซ็นต์ของเมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด) ซึ่งมีรูปร่างคือคอคโคบาซิลโล 1 ไอโซเลต ท่อนยาว 216 ไอโซเลต และท่อนสั้น 43 ไอโซเลต ส่วนกลุ่มที่สองเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 14 ไอโซเลต (คิดเป็น 5.11 เปอร์เซ็นต์ของเมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด) ซึ่งมีรูปร่างกลม 2 ไอโซเลต ท่อนยาว 3 ไอโซเลต ท่อนสั้น 8 ไอโซเลต และคอคโคบาซิลโล 1 ไอโซเลต นั่นคือ เมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคลิโนสีชมพู และมีเซลล์รูปท่อน นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์เลย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kumar and Lee (2009) ในแง่ของลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของโคลิโนและเซลล์ ที่พบว่าเมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้มีเซลล์รูปท่อน และคอคโคบาซิลโล ติดสีแกรมลบ โคลิโนกลมมนสีชมพู และชมพูอมส้ม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบแวววาว เมื่อเลี้ยงบนอาหาร glycerol peptone agar (GPA) เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาสังเกตเห็นได้ว่าเมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียที่มีโคลิโนมีสีหรือมีการสร้างรงควัตถุ เนื่องจากผิวใบพืชมีกรดอินทรีย์อินทรีย์ไอโอสเตตทำให้แบคทีเรียต้องปรับตัวให้อยู่รอดได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่พบบนผิวใบพืชส่วนมากจึงพบว่าสร้างรงควัตถุ ซึ่งคาดว่าเพื่อใช้ในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ในการศึกษาครั้งนี้แยกได้เมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกอย่างชัดเจน ซึ่งการที่พบแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางด้านสรีรวิทยาของเซลล์ โดยเฉพาะส่วนผนังเซลล์ โดยแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้น outer membrane อยู่ด้านนอกสุด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแกรมลบ และจะมีพื้นที่ระหว่างชั้น outer membrane กับชั้น peptidoglycan หรือที่เรียกว่า periplasm ซึ่งจะมีเอนไซม์หลายชนิดรวมถึง transport protein ที่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถรับสารอาหารได้เมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ส่วน outer membrane ยังเป็นชั้นที่ช่วยป้องกันเซลล์จากสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้อีกด้วย

การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้อนุกรมวิธานแบบ polyphasic ประกอบด้วยการศึกษาสัณฐานวิทยาของโคลิโนและเซลล์ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล และรวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี หากต้องการระบุชื่อของแบคทีเรีย การศึกษาขั้นตอนนี้ต่อไปจึงนำเมทิล โลโทรฟิกแบคทีเรียที่รวบรวมไว้ทั้งหมดไปศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดย

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล

2.2 การจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

ในปัจจุบันเทคนิคการจัดจำแนกและระบุชนิดของจุลินทรีย์ระดับโมเลกุลมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และสามารถนำมาใช้จัดจำแนกและระบุชื่อของแบคทีเรียในระดับสกุลและชนิดได้ ดังนั้นเทคนิคระดับโมเลกุลจึงมีบทบาทเพิ่มมากขึ้นในการระบุชนิดของแบคทีเรีย

ทำการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียระดับโมเลกุล โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27F และ 1389R และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ 27F และ/หรือ 1389R ซึ่งจะทำการหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 800-1300 คู่เบส และเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ 1F และ 1530R และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ 1F 520F 782R และ 1530R ซึ่งจะได้อันดับนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 1400 คู่เบส จากนั้นจึงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากฐานข้อมูล EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>) ซึ่งทำให้จัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

2.2.1 แบคทีเรียสปิชีส์ที่อธิบายแล้ว

สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียสปิชีส์ที่อธิบายแล้ว คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 800-1300 คู่เบส ในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึง (similarity) 99.00-100 เปอร์เซ็นต์ กับสปิชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด ที่เป็นแบคทีเรียที่ได้มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์แล้ว ซึ่งจาก facultative methylotrophic bacteria ที่แยกได้ทั้ง 274 ไอโซเลต พบว่ามี 257 ไอโซเลต จัดเป็นแบคทีเรียสปิชีส์ที่อธิบายแล้ว ซึ่งมีจำนวนมากที่สุด (คิดเป็น 93.80 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้) จัดจำแนกได้เป็น 18 สกุล 56 สปิชีส์ โดยอยู่ในไฟลัม (Phylum) ชั้น (Class) อันดับ (Order) และวงศ์ (Family) ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปิชีส์ที่อธิบายแล้ว แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโดโทรฟิเคแบคทีเรียที่แยกได้จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว

ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	สปีชีส์ (Species)
Firmicutes (Low G+C; Gram-positive bacteria)	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Anoxybacillus</i>	<i>bogrovensis</i>
			Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i> <i>warneri</i>
Actinobacteria (high G+C; Gram-positive bacteria)	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	<i>citreum</i> <i>oceanosedimentum</i>
			Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	<i>fortuitum</i>
			Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	<i>hominis</i>
			Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>funkei</i>
			Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>	<i>terrae</i>
			Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	<i>corynebacterioides</i>
Proteobacteria (Gram negative)	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	<i>Aurantimonas</i>	<i>altamirensis</i>
			Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	<i>larrymoorei</i> <i>massiliae</i>
			Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>aerolatum</i> <i>aquaticum</i>

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	สปีชีส์ (Species)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>fujisawaense</i>
					<i>gregans</i>
					<i>komagatae</i>
					<i>oryzae</i>
					<i>platani</i>
					<i>populi</i>
					<i>radiotolerans</i>
					<i>rhodesianum</i>
					<i>suomiense</i>
					<i>tardum</i>
					<i>thiocyanatum</i>
					<i>zatmanii</i>
					<i>abaci</i>
					<i>aquatilis</i>
<i>paucimobilis</i>					
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	สปีชีส์ (Species)	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>phyllosphaerae</i>	
					<i>pseudosanguinis</i>	
					<i>sanguinis</i>	
					<i>yabuuchiae</i>	
	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Luteibacter</i>	<i>rhizovicinus</i>	
					<i>yeojuensis</i>	
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumonia</i>	
					<i>variicola</i>	
					<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>
					<i>hormaechei</i>	
					<i>oryzae</i>	
					<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>
<i>ananatis</i>						
<i>anthophila</i>						
<i>brenneri</i>						

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	สปีชีส์ (Species)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>dispersa</i>
					<i>stewartii</i>
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>bereziniae</i>
			Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>beteli</i>
					<i>geniculata</i>
					<i>hibiscicola</i>
					<i>oryzihabitans</i>
					<i>parafulva</i>
					<i>psychrotolerans</i>
					<i>stutzeri</i>

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโดโทริกแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T2-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1060	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T3-4	<i>Methylobacterium tardum</i> RB677 ^T (AB252208)	99.91	1/1059	<i>Methylobacterium tardum</i>
T5-3	<i>Methylobacterium gregans</i> 002-074 ^T (AB252200)	99.03	12/1234	<i>Methylobacterium gregans</i>
T5-4	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1070	<i>Methylobacterium populi</i>
T5-9	<i>Methylobacterium suomiense</i> NCIMB 13778 ^T (AB175645)	99.81	2/1061	<i>Methylobacterium suomiense</i>
T6-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1032	<i>Methylobacterium populi</i>
T6-2	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T (L37603)	99.91	1/1096	<i>Staphylococcus warneri</i>
T6-3	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T (AB175646)	100.00	0/1017	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>
T6-4	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.46	5/921	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T6-5	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1031	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T6-6	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1056	<i>Methylobacterium populi</i>
T7-2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.91	1/1070	<i>Methylobacterium populi</i>
T8-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1088	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T8-5	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG11256 ^T (U26262)	100.00	0/1095	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
T8-6	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 ^T (AB175642)	99.53	5/1067	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T9-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1047	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T9-4.2	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC 19867 ^T (AB021405)	99.61	4/1032	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
T10-3	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16 ^T (AJ635303)	99.11	9/1011	<i>Methylobacterium aquaticum</i>
T10-4	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16 ^T (AJ635303)	99.03	13/1345	<i>Methylobacterium aquaticum</i>
T10-6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/985	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T11-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1050	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T11-2	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> DSM 20151 ^T (AF430066)	99.62	4/1065	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>
T11-3	<i>Gordonia terrae</i> DSM 43249 ^T (X79286)	99.72	3/1074	<i>Gordonia terrae</i>
T12-1	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 ^T (AB175642)	99.03	10/1034	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>
T12-2	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 ^T (AB175642)	99.43	6/1044	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>
T12-3	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/1023	<i>Methylobacterium populi</i>
T13-1	<i>Methylobacterium zatmanii</i> DSM 5688 ^T (AB175647)	99.68	4/1229	<i>Methylobacterium zatmanii</i>
T13-2	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 ^T (AB175642)	99.50	6/1208	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>
T13-3	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.43	7/1236	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T14-2	<i>Enterobacter hormaechei</i> CIP 103441 ^T (AJ508302)	99.71	3/1028	<i>Enterobacter hormaechei</i>
T14-3	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T (AB175646)	99.90	1/1018	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T15-2	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T (AB175646)	99.61	4/1029	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>
T15-3	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.52	5/1042	<i>Methylobacterium populi</i>
T15-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.62	4/1042	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T16-1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.24	8/1057	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T16-2	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.25	8/1069	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T16-3	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 ^T (AB175642)	99.52	5/1042	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>
T16-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1047	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T16-5	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1050	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T17-2	<i>Methylobacterium tardum</i> RB677 ^T (AB252208)	100.00	0/1043	<i>Methylobacterium tardum</i>
T18-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.51	5/1024	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T18-2	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.35	8/1223	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T18-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1026	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T18-5	<i>Methylobacterium komagatae</i> 002-079 ^T (AB252201)	99.88	1/832	<i>Methylobacterium komagatae</i>
T19-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1049	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T20-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1046	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T20-2	<i>Methylobacterium gregans</i> 002-074 ^T (AB252200)	99.41	6/1016	<i>Methylobacterium gregans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T20-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1037	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T21-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1060	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T21-2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.91	1/1061	<i>Methylobacterium populi</i>
T21-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.84	2/1233	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T22-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.17	8/964	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T22-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1047	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T22-5.1	<i>Pseudomonas oryzae</i> IAM 1568 ^T (AM262973)	99.92	1/1288	<i>Pseudomonas oryzae</i>
T22-5.2	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T (AB175646)	99.64	5/1371	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>
T22-6	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1051	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T23-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/1102	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T23-2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/995	<i>Pantoea dispersa</i>
T23-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/1060	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T23-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.89	1/904	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T24-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1050	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T24-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1057	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T24-3	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.52	5/1036	<i>Methylobacterium aerolatum</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T25-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.72	3/1062	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T25-2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.79	2/943	<i>Methylobacterium populi</i>
T25-5	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.60	5/1222	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T25-7	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T (AB175646)	100.00	0/1208	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>
T25-9.1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1040	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T26-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1021	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T26-2	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.49	6/1171	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T27-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1039	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T27-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1040	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T27-4	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1040	<i>Methylobacterium populi</i>
T27-5	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1029	<i>Methylobacterium populi</i>
T28-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.71	3/1037	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T28-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.92	1/1231	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T28-5	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.52	5/1038	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T29-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1057	<i>Methylobacterium populi</i>
T29-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.43	6/1054	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T29-4	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.43	7/1230	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T30-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.71	3/1031	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T30-3	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603 ^T (DQ504305)	99.80	2/1005	<i>Pantoea dispersa</i>
T30-4.1	<i>Enterobacter oryzae</i> Ola 51 ^T (EF488759)	99.44	6/1079	<i>Enterobacter oryzae</i>
T30-4.2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	99.80	2/996	<i>Pantoea dispersa</i>
T30-6	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/1036	<i>Pantoea dispersa</i>
T30-7	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603 ^T (DQ504305)	99.60	4/989	<i>Pantoea dispersa</i>
T31-1.1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.82	2/1105	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T31-1.2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/1044	<i>Methylobacterium populi</i>
T31-2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.61	4/1037	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T31-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1019	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T32-1.1	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 ^T (AJ783916)	99.71	3/1043	<i>Klebsiella variicola</i>
T32-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1020	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T32-3.2	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.42	6/1029	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T32-9	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.41	6/1014	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T33-3	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.60	4/1005	<i>Methylobacterium aerolatum</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T33-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.80	2/1008	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T33-5	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/1040	<i>Methylobacterium populi</i>
T33-6	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.70	3/1011	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T34-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/1040	<i>Methylobacterium populi</i>
T34-2	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.60	4/991	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T34-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1029	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T35-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.80	2/1013	<i>Methylobacterium populi</i>
T35-4	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	100.00	0/995	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T36-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1018	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T36-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1026	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T37-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.22	8/1030	<i>Methylobacterium populi</i>
T37-2	<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	99.12	12/1362	<i>Methylobacterium platani</i>
T37-3	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM 1568 ^T (AM262973)	99.81	2/1041	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
T38-1	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.62	4/1058	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T38-2	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.71	3/1040	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T38-3	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM 1568 ^T (AM262973)	99.69	4/1277	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T38-4	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.53	5/1057	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T39-1	<i>Luteibacter yejuensis</i> R2A16-10 ^T (DQ181549)	99.22	8/1019	<i>Luteibacter yejuensis</i>
T39-2	<i>Klebsiella pneumonia</i> subsp. <i>ozaenae</i> ATCC 11296 ^T (Y17654)	99.43	6/1044	<i>Klebsiella pneumonia</i>
T40-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.25	8/1062	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T40-2S	<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	99.18	11/1336	<i>Methylobacterium platani</i>
T40-3P	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1026	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T41-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.80	2/995	<i>Methylobacterium populi</i>
T41-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1102	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T41-3.1	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1229	<i>Rhizobium massiliae</i>
T41-3.2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/1058	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T41-3.3	<i>Pseudomonas geniculata</i> ATCC 19374 ^T (AB021404)	99.84	2/1278	<i>Pseudomonas geniculata</i>
T42-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.72	3/1064	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T42-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1111	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T42-5	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1015	<i>Methylobacterium populi</i>
T42-7	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	100.00	0/1029	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T42-8	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.62	4/1049	<i>Rhizobium larrymoorei</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T43-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.55	5/1108	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T43-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.53	5/1068	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T43-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.81	2/1064	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T43-4	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	100.00	0/1107	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T44-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/1025	<i>Methylobacterium populi</i>
T44-2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.86	2/1387	<i>Methylobacterium populi</i>
T44-3	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.90	1/1026	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
T45-2	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/831	<i>Methylobacterium populi</i>
T45-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.45	6/1104	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T45-5	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1050	<i>Rhizobium massiliae</i>
T46-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	100.00	0/1038	<i>Methylobacterium populi</i>
T46-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.80	2/1010	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T46-3	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1054	<i>Rhizobium massiliae</i>
T47-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1043	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T47-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1040	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T48-1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.81	2/1048	<i>Methylobacterium populi</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T48-2	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.71	3/1022	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T50-1	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.61	4/1023	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T50-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.92	1/1270	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T52-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/1020	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T52-2	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.51	5/1016	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T53-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.23	8/1040	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T53-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1039	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T54-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1029	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T54-2	<i>Pantoea ananatis</i> ATCC 19321 ^T (U80209)	99.90	1/978	<i>Pantoea ananatis</i>
T55-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1039	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T55-2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970 ^T (L37600)	100.00	0/1021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
T55-3	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.32	7/1033	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T57-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.18	9/1097	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T57-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1025	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T58-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.80	2/1020	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T60-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1033	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T60-3	<i>Luteibacter rhizovicinus</i> LJ96 ^T (AJ580498)	99.17	12/1451	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>
T61-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1030	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T62-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	100.00	0/1068	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T62-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/970	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T62-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	100.00	0/1027	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T63-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.90	1/1015	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T63-2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.81	2/1024	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T63-3	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 ^T (CP001029)	99.90	1/992	<i>Methylobacterium populi</i>
T64-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.70	3/1010	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T64-3	<i>Cellulomonas hominis</i> DMMZ CE40 ^T (X82598)	99.07	13/1404	<i>Cellulomonas hominis</i>
T66-1	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.90	1/1006	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
T66-3	<i>Anoxybacillus bogrovensis</i> BT13 ^T (AM409184)	100.00	0/837	<i>Anoxybacillus bogrovensis</i>
T67-1	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> FA2 ^T (AY453855)	99.50	5/1004	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>
T68-1	<i>Pantoea anthophila</i> LMG 2558 ^T (EF688010)	99.80	2/981	<i>Pantoea anthophila</i>
T69-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.90	1/1016	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T69-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.90	1/1020	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T70-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.93	1/1392	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T70-2	<i>Curtobacterium citreum</i> DSM 20528 ^T (X77436)	99.88	1/800	<i>Curtobacterium citreum</i>
T71-1	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 ^T (AY894691)	99.00	14/1396	<i>Sphingomonas yunnanensis</i>
T71-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.91	1/1110	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T73-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.72	3/1074	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T73-2	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.62	4/1065	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
T74-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.31	7/1021	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T75-1	<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ 2129 ^T (AB060132)	99.91	1/1085	<i>Pseudomonas parafulva</i>
T75-2	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	99.91	1/1059	<i>Rhizobium massiliae</i>
T76-1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.22	8/1019	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T76-2	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.53	5/1065	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T76-3	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.82	2/1079	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T77-1	<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS7 ^T (AF131295)	100.00	0/1081	<i>Sphingomonas aquatilis</i>
T77-2	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.73	3/1097	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T78-2	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.26	8/1076	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T78-3	<i>Acinetobacter bereziniae</i> ATCC 17924 ^T (Z93443)	99.45	6/1090	<i>Acinetobacter bereziniae</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T79-1	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM 6051 ^T (AB004744)	99.26	6/808	<i>Enterobacter asburiae</i>
T79-2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 29837 ^T (U37337)	99.60	4/997	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
T80-1	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.91	1/1109	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
T80-2	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 ^T (AY894691)	99.15	12/1411	<i>Sphingomonas yunnanensis</i>
T81-1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.06	10/1067	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T81-2	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM 1568 ^T (AM262973)	99.91	1/1119	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
T82-1	<i>Pseudomonas beteli</i> ATCC 19861 ^T (AB021406)	99.17	9/1078	<i>Pseudomonas beteli</i>
T84-2	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886 ^T (AY501364)	99.79	3/1420	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
T84-3	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20 ^T (AY683045)	99.93	1/1380	<i>Methylobacterium oryzae</i>
T85-1	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T (AJ233423)	99.49	4/787	<i>Pantoea agglomerans</i>
T86-1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 29837 ^T (U37337)	99.64	4/1110	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
T86-2	<i>Methylobacterium aerolatum</i> 5413S-11 ^T (EF174498)	99.20	7/877	<i>Methylobacterium aerolatum</i>
T87-2	<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ 2129 ^T (AB060132)	99.85	2/1357	<i>Pseudomonas parafulva</i>
T88-1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.24	8/1056	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T88-2	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T (AJ233423)	99.11	13/1457	<i>Pantoea agglomerans</i>
T90-1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	99.69	3/977	<i>Pantoea dispersa</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T91-2	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.80	2/983	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T91-3	<i>Aurantimonas altamirensis</i> S21B ^T (DQ372921)	100.00	0/1366	<i>Aurantimonas altamirensis</i>
T92-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.58	4/947	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T93-1	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.09	10/1104	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T93-2	<i>Pantoea brenneri</i> LMG 5343 ^T (EU216735)	99.23	6/776	<i>Pantoea brenneri</i>
T94-2	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 ^T (AB071955)	99.30	7/1000	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>
T95-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.43	6/1043	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T96-2	<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ 2129 ^T (AB060132)	99.79	3/1454	<i>Pseudomonas parafulva</i>
T96-3	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.62	4/1057	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
T97-1	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 ^T (AY894691)	99.04	10/1042	<i>Sphingomonas yunnanensis</i>
T97-3	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1047	<i>Rhizobium massiliae</i>
T98-2	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T (AJ233423)	99.49	4/787	<i>Pantoea agglomerans</i>
T98-3	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.73	3/1095	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T99-1	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.85	2/1372	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T99-2	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.93	1/1390	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
T100-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.49	7/1367	<i>Sphingomonas sanguinis</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T101-1	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> G1-2 ^T (AM412238)	99.27	10/1374	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
T103-2	<i>Curtobacterium citreum</i> DSM 20528 ^T (X77436)	100.00	0/984	<i>Curtobacterium citreum</i>
T104-2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	100.00	0/1128	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T105-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.91	1/1126	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T105-2	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> DSM 44220 ^T (FR733720)	100.00	0/1264	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
T109-1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	99.88	1/828	<i>Pantoea dispersa</i>
T109-2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	99.10	7/777	<i>Pantoea dispersa</i>
T110-1	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 ^T (CP001001)	99.78	3/1389	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
T111-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.61	5/1280	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T111-2	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T (EF592577)	99.88	1/819	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>
T112-2	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> FA2 ^T (AY453855)	99.26	10/1342	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>
T113-2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.90	1/987	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T114-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.76	3/1239	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T114-2	<i>Curtobacterium citreum</i> DSM 20528 ^T (X77436)	99.25	11/1460	<i>Curtobacterium citreum</i>
T115-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.80	2/1010	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T115-2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/1023	<i>Pantoea dispersa</i>
T116-1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T (EF592577)	99.85	2/1297	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>
T116-2	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> FA2 ^T (AY453855)	99.29	9/1268	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>
T117-1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T (AJ575816)	99.79	3/1441	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
T117-2	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC 19867 ^T (AB021405)	99.51	7/1436	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
T118-2	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T (EF592577)	99.81	2/1061	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>
T119-1	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> LMG 2715 ^T (Z96080)	99.54	5/1081	<i>Pantoea stewartii</i>
T119-2	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1020	<i>Rhizobium massiliae</i>
T120-1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/1022	<i>Pantoea dispersa</i>
T120-2	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 ^T (AJ575817)	99.34	7/1060	<i>Sphingomonas abaci</i>
T120-3	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> FA2 ^T (AY453855)	99.44	6/1066	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>
T121-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.34	7/1057	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T122-1	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1062	<i>Rhizobium massiliae</i>
T123-1	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 ^T (D13726)	99.34	7/1058	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
T123-2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/1022	<i>Pantoea dispersa</i>
T124-1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> IAM 1568 ^T (AM262973)	99.17	9/1085	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
T124-2	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A ^T (AF531767)	100.00	0/1021	<i>Rhizobium massiliae</i>
T125-1	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 ^T (AJ575817)	99.25	8/1065	<i>Sphingomonas abaci</i>
T125-2	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603 ^T (DQ504305)	100.00	0/1022	<i>Pantoea dispersa</i>

2.2.2 แบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 800-1300 คู่เบส ในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล แล้วพบว่ามีค่าความคล้ายคลึง (similarity) อยู่ระหว่าง 97.00-98.99 เปอร์เซ็นต์ กับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์แล้ว ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ จึงจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การทำ DNA-DNA hybridization หรือ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่นนอกเหนือจากยีนของ 16S rRNA เช่น methanol dehydrogenase gene หรือ recA gene เป็นต้น (Tindall *et al.*, 2010) เพื่อให้การระบุชนิดของแบคทีเรียมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

จาก facultative methylotrophic bacteria ทั้ง 274 ไอโซเลตที่แยกได้ พบว่ามี 15 ไอโซเลต จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ (คิดเป็น 5.47 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด) อาจจัดจำแนกได้เป็น 8 สกุล ใกล้เคียงกับ 10 สปีชีส์ โดยอยู่ในไฟลัม (Phylum) ชั้น (Class) อันดับ (Order) และวงศ์ (Family) ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโดโทริกแบคทีเรียที่แยกได้ที่จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	ใกล้เคียงกับสปีชีส์ (Closest species)	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	<i>larrymoorei</i>	
			Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	<i>huakuii</i>	
			Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	<i>haematophilum</i>	
			Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>aquaticum</i>	
	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		<i>Enterobacter</i>	<i>kobei</i>
					<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>
					<i>Pantoea</i>	<i>septic</i>
			Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Luteibacter</i>	<i>yeojuensis</i>

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโดโทริกแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียที่อาจจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
PN3	<i>Methylobacterium komagatae</i> 002-079 ^T (AB252201)	98.87	16/1421	known or new species
PN4	<i>Methylobacterium komagatae</i> 002-079 ^T (AB252201)	98.87	16/1421	known or new species
T13-4	<i>Enterobacter kobei</i> CIP105566 ^T (AJ508301)	98.68	17/1287	known or new species
T25-6	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16 ^T (AJ635303)	98.81	16/1344	known or new species
T28-7	<i>Leclercia adecarboxylata</i> GTC 1267 ^T (AB273740)	98.22	23/1292	known or new species
T30-5	<i>Pantoea septic</i> LMG 5345 ^T (EU216734)	98.13	19/1017	known or new species
T42-6	<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	98.48	21/1378	known or new species
PN5	<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	97.96	29/1419	known or new species
T60-1	<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	98.30	23/1357	known or new species
PN6	<i>Mesorhizobium huakuii</i> IAM 14158 ^T (D12797)	98.10	27/1417	known or new species
T84-1	<i>Ochrobactrum haematophilum</i> CCUG 38531 ^T (AM422370)	98.92	15/1388	known or new species
T89-2	<i>Methylobacterium komagatae</i> 002-079 ^T (AB252201)	98.94	15/1422	known or new species
T96-1	<i>Luteibacter yejuensis</i> R2A16-10 ^T (DQ181549)	98.20	27/1498	known or new species
T104-1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16 ^T (AJ635303)	98.64	19/1400	known or new species
T105-3	<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	98.62	15/1084	known or new species

2.2.3 แบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1400 คู่เบส ในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลแล้ว พบว่ามีค่าความคล้ายคลึง (similarity) ต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ กับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเป็นแบคทีเรียที่มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์แล้ว (Tindall *et al.*, 2010) ซึ่งจาก facultative methylotrophic bacteria ทั้ง 274 ไอโซเลต พบว่ามี 2 ไอโซเลต ที่จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ (คิดเป็น 0.73 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทั้งหมด) ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น 1 สกุล ใกล้เคียงกับ 2 สปีชีส์ โดยอยู่ในไฟลัม (Phylum) ชั้น (Class) อันดับ (Order) และวงศ์ (Family) ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 การจัดอนุกรมวิธานของเมทิลโดโทรฟิกลแบคทีเรียที่แยกได้จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

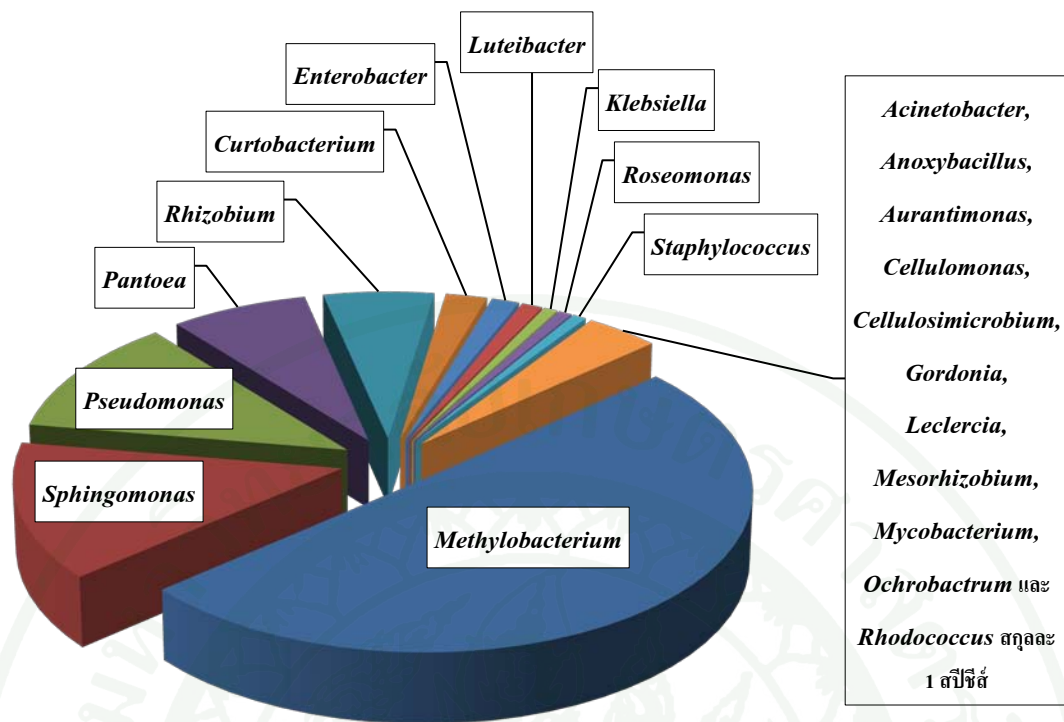
ไฟลัม (Phylum)	ชั้น (Class)	อันดับ (Order)	วงศ์ (Family)	สกุล (Genus)	ใกล้เคียงกับสปีชีส์ (Closest species)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Roseomonas</i>	<i>aestuarii</i> <i>mucosa</i>

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเมทิลโดโทรฟิกลแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon ที่จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

Isolate	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Result
PN1	<i>Roseomonas aestuarii</i> JC17 ^T (FM244739)	96.46	49/1384	new species
PN2	<i>Roseomonas mucosa</i> MDA5527 ^T (AF538712)	96.53	50/1440	new species

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ความยาวประมาณ 800-1300 คู่เบส ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Methylobacterium* คิดเป็น 50.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Sphingomonas* คิดเป็น 13.87 เปอร์เซ็นต์ และ *Pseudomonas* คิดเป็น 11.68 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล *Pantoea* (7.30 เปอร์เซ็นต์) *Rhizobium* (5.84 เปอร์เซ็นต์) *Curtobacterium* (2.19 เปอร์เซ็นต์) *Enterobacter* (1.46 เปอร์เซ็นต์) *Luteibacter* (1.10 เปอร์เซ็นต์) *Klebsiella* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Roseomonas* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Staphylococcus* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Acinetobacter* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Anoxybacillus* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Aurantimonas* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Cellulomonas* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Cellulosimicrobium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Gordonia* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Leclercia* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Mesorhizobium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Mycobacterium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Ochrobactrum* (0.36 เปอร์เซ็นต์) และ *Rhodococcus* (0.36 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 3) จะเห็นว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Methylobacterium* ที่แยกได้ และเป็นแบคทีเรีย *Methylobacterium radiotolerans* (25.91 เปอร์เซ็นต์) ที่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่ทนรังสีได้ดี โดยเฉพาะรังสีแกมมาได้ดีสูง (Ito and Iizuka, 1971) การที่ตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ค่อนข้างมาก อาจแสดงให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมในปัจจุบันมีปริมาณรังสีอยู่มาก ดังนั้นแบคทีเรียที่มีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดได้ดีจึงเป็นประชากรส่วนใหญ่ที่ตรวจพบได้

จากผลการวิจัยนี้ สามารถแยกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียได้หลายชนิดและจำนวนมาก ซึ่งอาจเนื่องจากการใช้เทคนิค leaf imprinting โดยนำไปพืชที่ไม่ได้ผ่านการล้างมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที จึงทำให้ตรวจพบการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียประจำถิ่นและพลัดถิ่นที่มากับลมหรือฝน ซึ่งพบพาเอาฝุ่นละอองหรือเศษดินจากแหล่งชุมชนหรือสภาพแวดล้อมอื่น มาสะสมอยู่บนผิวใบพืช ซึ่งสังเกตได้ว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Anoxybacillus bogrovensis* (มีรายงานว่าแยกได้จาก น้ำพุร้อน (Atanassova *et al.*, 2008)) และแบคทีเรีย *Cellulosimicrobium funkei* (มีรายงานว่าแยกได้จากเลือดผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ดิน และลำไส้ไส้เดือน (Brown *et al.*, 2006, Na *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2009)) ได้จากผิวใบพืช ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้ยังไม่เคยมีรายงานว่าแยกได้จากพืช



ภาพที่ 3 สัดส่วนของเมทิลโดโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบพืช

สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* มีรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียสกุลนี้ได้จากแหล่งตัวอย่างที่หลากหลาย ได้แก่ ดิน อากาศ น้ำดื่ม ระบบน้ำหล่อเย็น (water-cooling system) ตะกอนทะเลสาบน้ำจืด เลือดผู้ป่วย (Jiang *et al.*, 2006, Gallego *et al.*, 2006, Yoon *et al.*, 2007, Yoo *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2009) แต่ในการศึกษารั้งนี้แยกได้แบคทีเรียสกุล *Roseomonas* จากใบพืช ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Loreti *et al.* (2009) ที่แยก *Roseomonas* ได้จากกิ่งของต้น Hazelnut ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสกุล *Roseomonas* มีความสัมพันธ์กับพืชได้ (plant associated *Roseomonas*)

เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษารั้งนี้ตรวจไม่พบ *M. extorquens* ได้เลยจากใบพืชชนิดต่างๆ ที่นำมาแยกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Schauer and Kutschera (2008) ที่ทำการแยกเมทิลโดโทรฟิกแบคทีเรียจากส่วนต่างๆ (ดอก ใบ และราก) ของต้นทานตะวัน บนอาหาร ammonium salts solution (AMS) ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ พบแบคทีเรียชนิดนี้ในส่วนของดอกและรากของทานตะวัน ในขณะที่ส่วนใบของทานตะวันพบ *Methylobacterium mesophilicum* 28.6 เปอร์เซ็นต์ *M. radiotolerans* 9.5 เปอร์เซ็นต์ และ *Methylobacterium* sp. 61.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบ

M. extorquens ที่ใบของต้นทานตะวัน อาจเนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญในชั้นสเตรตอื่น ได้ดีกว่าเมทานอลที่ปลดปล่อยออกมาจากใบพืช

จากการศึกษาข้างต้นที่พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้อยู่ในสกุล *Methylobacterium* โดยคิดเป็น 50.36 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโอโทรฟิคแบคทีเรียทั้งหมด จึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* เป็นกลุ่มประชากรหลักของเมทิลโอโทรฟิคแบคทีเรียที่อาศัยบนผิวใบพืช เช่นเดียวกับที่รายงาน โดย Hirano and Upper (1991)

จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่รวบรวมได้ กับฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่อยู่ในฐานข้อมูลต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จึงคาดว่าไอโซเลตเหล่านี้อาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่มีความยาว 1400 คู่เบส และศึกษาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี ได้แก่ การใช้สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ เพื่อการเจริญ ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ เพื่อการระบุชนิดของแบคทีเรียอย่างถูกต้องต่อไป จึงได้นำไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็แบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ที่อยู่ในสกุล *Roseomonas* มาศึกษาลักษณะเฉพาะต่างๆ เพิ่มเติมและเสนอตั้งชื่อต่อไป

การอธิบายแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

การอธิบายแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ทำโดยศึกษาลักษณะเฉพาะต่างๆ ของแบคทีเรีย ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (classical taxonomy) เช่น ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยา เป็นต้น อนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) เช่น วิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เป็นต้น และศึกษาลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุล (molecular characteristics) เช่น การวิเคราะห์ปริมาณเบส guanine และ cytosine ที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกการเปรียบเทียบความเหมือนของ DNA ของแบคทีเรียที่ศึกษากับแบคทีเรียอ้างอิงที่มีการอธิบายและตีพิมพ์แล้ว โดยการทำให้ DNA-DNA hybridization เป็นต้น รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแล้วตั้งชื่อเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ดังนี้

Roseomonas เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง plump coccoid rods มักปรากฏอยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบ cocci และอาจพบเป็นรูปร่างท่อนในบางครั้ง แบคทีเรียสกุลนี้

สามารถเจริญได้ในอาหาร 5% sheep blood agar, hert infusion agar ที่มี rabbit blood 5 เปอร์เซ็นต์, chocolate agar, BCYE agar, trypticase soy agar และ 91 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียสกุลนี้ สามารถเจริญได้ในอาหาร MacConkey agar แต่ไม่สามารถหมัก (nonfermentative) และไม่เจริญบนอาหารที่มีเกลือ 6 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านั้น แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 องศาเซลเซียส และพบได้บ่อยว่าเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียสด้วย ลักษณะเด่นของแบคทีเรียสกุลนี้ คือ มีโคโลนีสีชมพูอ่อน เป็นมัน นูน ขอบเรียบ และมีลักษณะเป็นเมือกเมื่อเลี้ยงบนอาหาร BCYE agar หลังจากบ่มเป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน ที่ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสกุลนี้ให้ผลคาตาเลสและยูรีเอสเป็นบวก สปีชีส์ที่เป็นสมาชิกในสกุล *Roseomonas* ให้ผลลบในปฏิกิริยา beta-hemolysis, indole production, ONPG, hydrogen sulfide production, gelatin liquefaction, phenylalanine deaminase, acetamide assimilation, ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี cetrinide, L-lysine และ L-ornithine decarboxylases และ L-arginine dihydrolase และไม่สามารถออกซิไดซ์ dulcitol, lactose, maltose, methanol, raffinose, L-rhamnose หรือ sucrose ส่วนการทดสอบออกซิเดสให้ผลได้หลากหลาย สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลบวกเล็กน้อยในการทดสอบที่ Veterans Affairs Medical Center (VAMC) และประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์ให้ผลออกซิเดสเป็นลบเมื่อทดสอบที่ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) สำหรับการทดสอบ citrate utilization, esculin hydrolysis, nitrate reduction และการออกซิเดชัน L-arabinose, fructose, D-galactose, glycerol, D-mannose, D-mannitol, salicin และ xylose ให้ผลที่ผันแปร ปริมาณ GC-content ของ DNA คือ 65-71 โมลเปอร์เซ็นต์ (Rihs *et al.*, 1993)

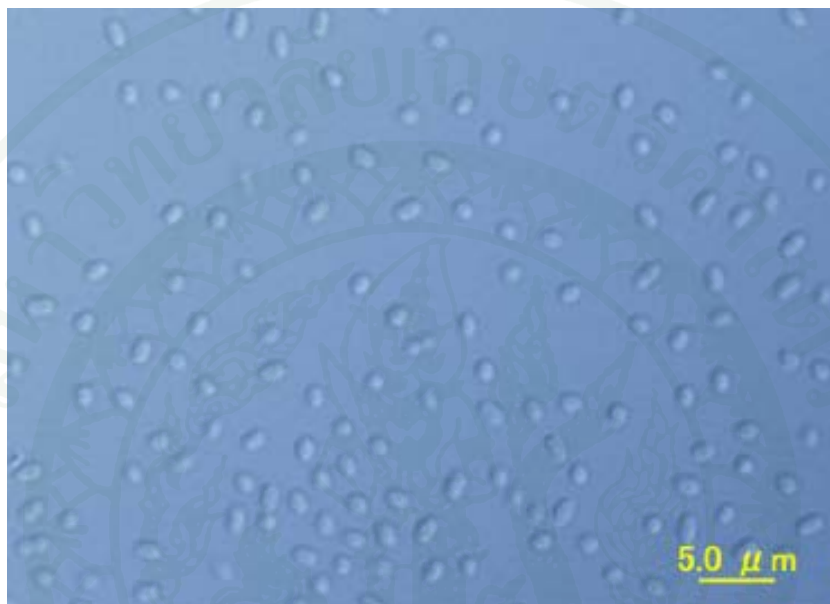
1. แบคทีเรียไอโซเลต PN1

แบคทีเรียไอโซเลต PN1 เป็นแบคทีเรียที่แยกจากผิวใบตองซึ่งเก็บจากเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร (10°04'N 99°35'E) เมื่อ พ.ศ. 2552

1.1 การศึกษาอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมของแบคทีเรียไอโซเลต PN1

ทำโดยศึกษาลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ Biolog GN2 Microplates (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), API ZYM และ API 20NE (Biomerieux, Inc., Durham, NC, USA) (ตารางที่ 9)

การเจริญบนอาหาร GPA agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างคือกโคบาซิลไลถึงท่อนสั้น ขนาด 1.3-1.5 x 1.5-2.3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4) ติดสีแกรมลบ และเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่าโคโลนีสีขาว รูปร่างกลมแบนราบขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเกลี้ยงเงา และเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน นำมาข้อมเอนโดสปอร์ พบว่าไม่สร้างเอนโดสปอร์



ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 ที่เลี้ยงบนอาหาร GPA agar นาน 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 9 ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียไฮโซเลต PN1
Roseomonas aestuarii JC17^T แบคทีเรียไฮโซเลต PN2 และ *Roseomonas mucosa*
 MDA5527^T

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i> JC17 ^T	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i> MDA5527 ^T
Cell	short rod to coccobacilli	coccobacilli	coccobacilli	cocoid to bacillary
Gram	negative	negative	negative	negative
Motility	-	- ^a	-	+ ^b
Color of colonies	white	Orange ^a	pink	pink
Temperature optimum (°C)	30	30 ^a	30	35 ^b
pH optimum (range)	7(6-8)	7 (6-8)	7(6-8)	ND
NaCl tolerance (%)	≤3	≤1; 1 ^a	≤1	≤ 7.0
Catalase	+	+; + ^a	-	+
Oxidase	+	+	+	+
MR-test	-	-	-	-
VP-test	-	-	-	-
API 20NE				
Reduction of nitrates	-	+; - ^a	-	-
Indole production	-	-; + ^a	-	-
Glucose acidification	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-	-
Urea utilization	+	+; - ^a	-	+
Esculin hydrolysis	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-; - ^a	-	-
β-Galactosidase activity	-	-	-	-
Assimilation of :				
N-Acetyl-Glucosamine	-	+	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i> JC17 ^T	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i> MDA5527 ^T
Potassium Gluconate	-	+	-	-
Capric Acid	-	-	-	-
Adipic Acid	-	+	-	+/-
Malic Acid	-	+	+/-	+/-
Trisodium Citrate	-	- ^a	-	-
Phenylacetic Acid	-	-	-	-
Biolog GN2 Microplates				
i-Erythritol	-	-	+	-
D-Melibiose	+	-	-	-
Acetic Acid	+	+	+	+
p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-	+	+	+
Bromosuccinic Acid	+	+	+	+
L-Histidine	+	+	+	-
Urocanic Acid	+	-	-	-
α - Cyclodextrin	-	+	-	-
D-Fructose	-	- ^a	-	-
β -Methyl-D-Glucoside	+	-	+	-
Cis-Aconitic Acid	+	+	+	+
Itaconic Acid	-	+	+	-
Succinamic Acid	+	+	+	+
Hydroxy-L-Proline	+	+	+	+
Inosine	+	-	+	+
Dextrin	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i> JC17 ^T	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i> MDA5527 ^T
D-Psicose	-	-	-	-
Citric Acid	+	+; - ^a	+	+
α -Keto Butyric Acid	-	-	-	-
Glucuronamide	-	-	-	-
L-Leucine	-	-	+	-
Uridine	+	-	+	-
Glycogen	+	-	-	-
D-Galactose	-	-; - ^a	-	-
D-Raffinose	+	+	-	-
Formic Acid	-	+	-	+
α -Keto Glutaric Acid	+	-	-	+
L-Alaninamide	+	+	+	-
L-Ornithine	-	-	-	-
Thymidine	-	-	+	-
Tween 40	-	-	+	-
Gentiobiose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-
D-Galactonic Acid Lactone	+	+	-	-
α -Keto Valeric Acid	-	-	-	-
D-Alanine	-	+	+	-
L-Phenylalanine	-	+	+	-
Phenylethylamine	+	-	+	+
Tween 80	-	-	-	-
α -D-Glucose	+	+	-	-
D-Sorbitol	-	+	+	-
D-Galacturonic Acid	-	-	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i>	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i>
		JC17 ^T		MDA5527 ^T
D,L-Lactic Acid	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	-
L-Proline	-	+	+	-
Putrescine	-	+	+	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-
m-Inositol	-	-	+	-
Sucrose	-	+	-	-
D-Gluconic Acid	+	+	-	-
Malonic Acid	-	-	-	+
L-Alanylglycine	+	+	+	-
L-Pyroglutamic Acid	-	+	+	-
2-Aminoethanol	-	+	-	-
N-Acetyl-D- Glucosamine	-	+	-	-
α -D-Lactose	+	+	+	-
D-Trehalose	+	+	+	-
D-Glucosaminic Acid	+	-	-	-
Propionic Acid	+	+	+	+
L-Asparagine	+	+	-	-
D-Serine	+	+	+	-
2,3-Butanediol	-	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-
D-Glucuronic Acid	-	-	-	-
Quinic Acid	+	+	+	-
L-Aspartic Acid	+	+	+	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i>	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i>
		JC17 ^T		MDA5527 ^T
L-Serine	-	-	+	-
Glycerol	-	-; ^a	+	-
L-Arabinose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Xylitol	-	-	+	-
α -Hydroxybutyric Acid	+	+	-	-
D-Saccharic Acid	+	-	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	-
L-Threonine	-	+	+	-
D,L- α -Glycerol Phosphate	+	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	-
Pyruvic Acid Methyl Ester	-	-	-	-
β -Hydroxybutyric Acid	+	+	+	+
Sebacic Acid	-	-	+	+
Glycyl-L-Aspartic Acid	+	+	+	+
D,L-Carnitine	+	+	+	-
α -D-Glucose-1-Phosphate	-	+	+	-
D-Cellobiose	+	-	-	-
D-Mannose	+	-	-	-
Succinic Acid Mono-Methyl-				
Ester	+	+	+	+
γ -Hydroxybutyric Acid	+	+	-	+
Succinic Acid	+	+	+	+
Glycyl-L-Glutamic Acid	+	+	+	+
γ -Amino Butyric Acid	-	+	+	-
D-Glucose-6-Phosphate	+	+	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i> JC17 ^T	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i> MDA5527 ^T
Enzyme activity (API ZYM) and other				
Alkaline Phosphatase	-	+	+	+
Esterase (C 4)	+	+	+	+/-
Esterase lipase (C 8)	-	-	+/-	-
Lipase (C 14)	-	-	-	-
Leucine Arylamidase	+	+	-	+
Valine Arylamidase	-	-	-	-
Cystine Arylamidase	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	+	-
Acid Phosphatase	+	-	-	+
Naphthol-AS-BI- Phosphohydrolase	+	+	+	+
α -Galactosidase	-	-	-	-
β -Galactosidase	-	-	-	-
β -Glucuronidase	-	-	-	-
α -Glucosidase	-	-	-	+/-
β -Glucosidase	-	-	-	-
N-Acetyl- β -Glucosaminidase	-	-	-	-
α -Mannosidase	-	-	-	-
α -Fucosidase	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-
Caseinase	-	-	-	-
Amylase	-	-; ^a	-	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Characteristics	Isolate PN1	<i>R. aestuarii</i> JC17 ^T	Isolate PN2	<i>R. mucosa</i> MDA5527 ^T
Acid production				
Manitol	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Xylose	+	-	-	-
Susceptibility to antibiotic				
Ampicillin 10 µg	R	R ^a	R	ND
Chloramphenicol 30 µg	S	ND	S	ND
Kanamycin 30 µg	S	ND	S	ND
Penicillin 10 U	R	R ^a	R	ND
Streptomycin 10 µg	S	R ^a	S	ND
Tetracycline 10 µg	S	ND	S	ND
Tetracycline 30 µg	S	S ^a	S	ND

หมายเหตุ + หมายถึง positive or present; - หมายถึง negative or absent; +/- หมายถึง variable;
R หมายถึง Resistant; S หมายถึง Susceptible; ND หมายถึง not determined.

ที่มา: ^a Ramana *et al.* (2010); ^b Han *et al.* (2003)

1.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต PN1

ทำโดยศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท TechnoSuruga Laboratory (Shizuoka, Japan) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต PN1

Fatty acid	เปอร์เซ็นต์
C _{14:0}	1.23
C _{16:1} ω5C	1.11
C _{16:0}	13.92
C _{17:1} ω7C	0.47
C _{16:0} 3-OH	1.79
C _{18:1} ω9C	0.83
C _{18:1} ω7C	58.78
C _{18:0}	2.69
11 methyl C _{18:1} ω7C	1.49
C _{19:0} cyclo ω8C	8.70
C _{18:1} 2-OH	3.89
C _{18:0} 3-OH	0.87
C _{20:2} ω6,9C	0.67
Summed Feature 2**	0.66
Summed Feature 3**	1.14
Summed Feature 5**	1.74

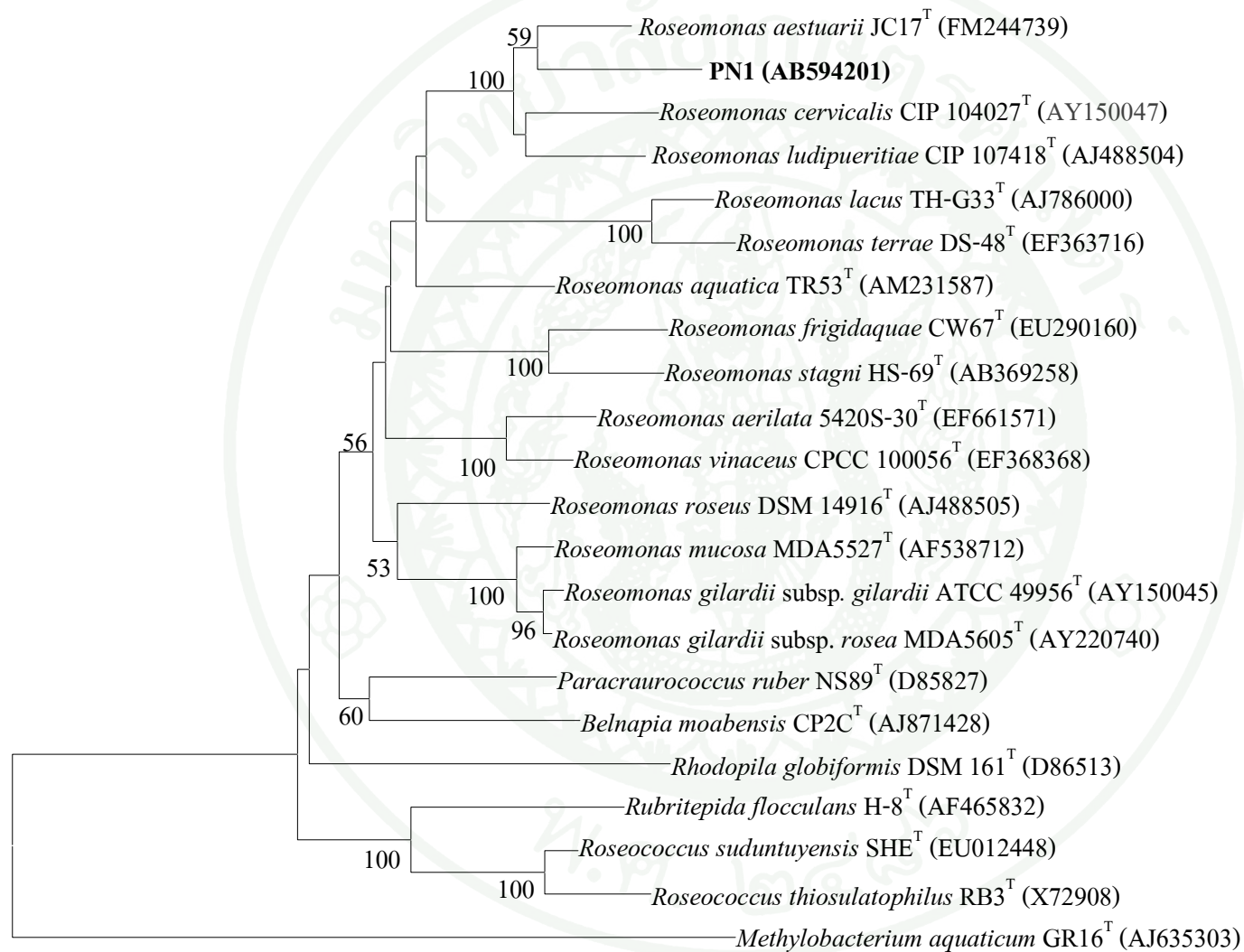
หมายเหตุ **Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated. Summed feature 2 contained C_{16:1} ISO I and/or C_{14:0} 3-OH; summed feature 3 contained C_{16:1} ω7C and/or iso-C_{15:0} 2-OH; summed feature 5 contained C_{18:2} ω6,9C and/or C_{18:0} ANTE.

จากการศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ของ *Roseomonas* sp. PN1 พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ คือ C_{18:1} ω7C (58.78 เปอร์เซ็นต์)

1.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุล (molecular characteristics) ของ *Roseomonas* sp. PN1 มีดังนี้

1.3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Roseomonas aestuarii* JC17^T 96.46 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ *Roseomonas cervicalis* CIP104027^T เท่ากับ 95.35 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ *Roseomonas ludipueritiae* CIP107418^T เท่ากับ 95.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ได้ คือ เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA ของ *Roseomonas* sp. PN1 แบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* ทั้งหมด และสกุลที่ใกล้เคียงกันพบว่า *Roseomonas* sp. PN1 อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *R. aestuarii* JC17^T *R. cervicalis* CIP104027^T และ *R. ludipueritiae* CIP107418^T (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 แบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* ทั้งหมด และสกุลที่ใกล้เคียงกัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ หมายถึง มีการแทนที่ 2 นิวคลีโอไทด์ ต่อ 100 นิวคลีโอไทด์



0.02

1.3.2 การวิเคราะห์สัดส่วนของเบสกวีนีน (guanine) รวมกับเบสไซโตซีน (cytosine) ในดีเอ็นเอ หรือค่า G+C content

จากการวิเคราะห์พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PN1 มีสัดส่วนของเบสกวีนีนรวมกับเบสไซโตซีนในดีเอ็นเอ 69.7 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่เป็น high G+C content และมีค่าสอดคล้องกับค่า G+C content ของแบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* (65-71 โมลเปอร์เซ็นต์) (Rihs *et al.*, 1993)

1.3.3 Genomic DNA–DNA hybridization

จากการทำ Genomic DNA–DNA hybridization พบว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลต PN1 มีความสัมพันธ์กับ DNA ของ *Roseomonas aestuarii* JC17^T น้อยมาก คือ มีการจัดเรียงตัวและลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเพียง 22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Wayne *et al.* (1987) ระบุว่าถ้าดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่ศึกษาสัมพันธ์กับดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ้างอิงที่มีการตีพิมพ์แล้วน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่นำมาเปรียบเทียมนั้น เป็นคนละชนิดกัน จึงกล่าวได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลต PN1 เป็นแบคทีเรียสกุล *Roseomonas* ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลต PN1 จึงน่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Roseomonas*

จากผลการศึกษาแบคทีเรียไอโซเลต PN1 ทั้งหมดที่รวบรวมได้ จะเสนอตั้งชื่อแบคทีเรียไอโซเลต PN1 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่และสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) โดยให้ชื่อเป็น *Roseomonas musae* PN1 ต่อไป

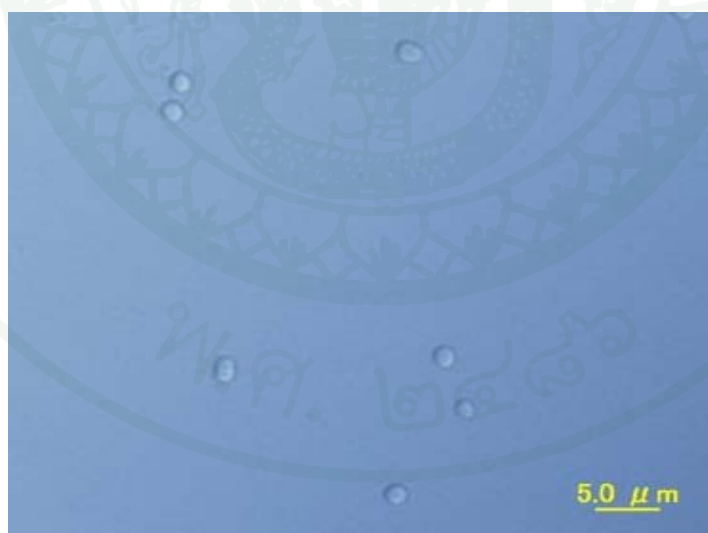
2. แบคทีเรียไอโซเลต PN2

แบคทีเรียไอโซเลต PN2 เป็นแบคทีเรียที่แยกจากผิวใบมะกอกน้ำซึ่งเก็บจาก ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี เมื่อ พ.ศ.2552

2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมของแบคทีเรียไอโซเลต PN2

ทำโดยศึกษาลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ Biolog GN2 Microplates (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), API ZYM และ API 20NE (Biomérieux, Inc., Durham, NC, USA) ได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 9

การเจริญบนอาหาร GPA agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างคือกโคบาซิลไล ขนาด 1.4-1.9 x 2.0-2.3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 6) ติดสีแกรมลบ และเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบโคโลนีสีชมพูถึงชมพูอ่อน รูปร่างกลมมน ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเกลี้ยงเงา และเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน นำมาย้อมเอนโดสปอร์ พบว่าไม่สร้างเอนโดสปอร์



ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 ที่เลี้ยงบนอาหาร GPA agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต PN2

ทำโดยศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท TechnoSuruga Laboratory (Shizuoka, Japan) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต PN2

Fatty acid	เปอร์เซ็นต์
C _{14:0}	0.34
C _{16:0}	18.96
C _{17:1} ω6C	1.19
C _{17:0}	0.74
C _{16:0} 2-OH	1.25
C _{16:0} 3-OH	1.65
C _{18:1} ω9C	0.99
C _{18:1} ω7C	33.53
C _{18:0}	4.27
11 methyl C _{18:1} ω7C	1.23
C _{19:0} cyclo ω8C	26.33
C _{18:1} 2-OH	4.45
C _{20:2} ω6,9C	1.05
Summed Feature 2**	0.57
Summed Feature 3**	1.72
Summed Feature 5**	1.75

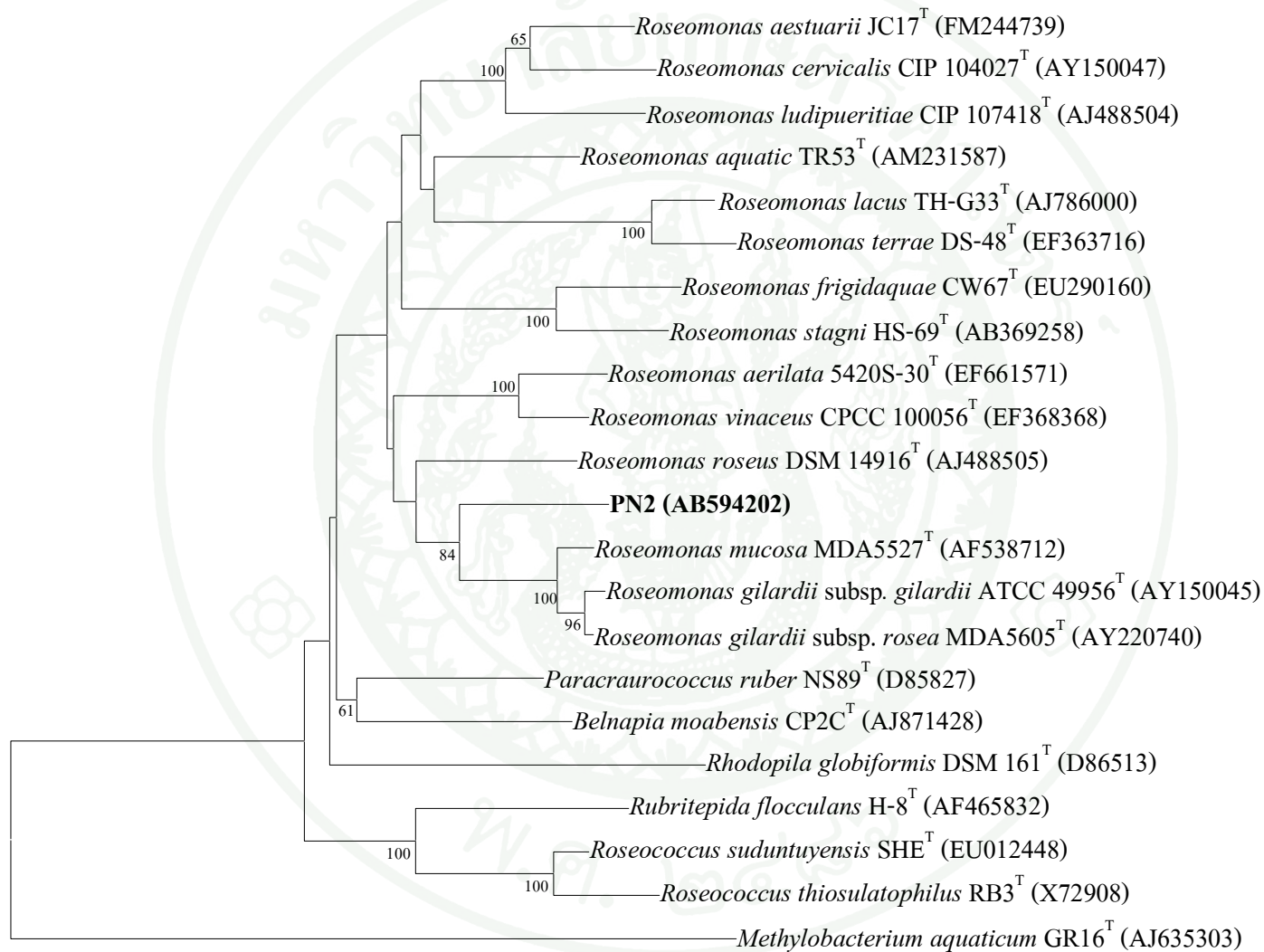
หมายเหตุ **Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated. Summed feature 2 contained C_{16:1} ISO I and/or C_{14:0} 3-OH; summed feature 3 contained C_{16:1} ω7C and/or iso-C_{15:0} 2-OH; summed feature 5 contained C_{18:2} ω6,9C and/or C_{18:0} ANTE.

จากการศึกษาศึกษากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ของ แบคทีเรียไอโซเลต PN2 พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ คือ $C_{18:1}\omega 7C$ (33.53 เปอร์เซ็นต์)

2.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะเฉพาะระดับโมเลกุล (molecular characteristics) ของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 ได้ทำการศึกษาดังนี้

2.3.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ แบคทีเรียไอโซเลต PN2 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Roseomonas mucosa* MDA5527^T เท่ากับ 96.53 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ *Roseomonas gilardii* subsp. *gilardii* ATCC49956^T เท่ากับ 96.25 เปอร์เซ็นต์ และใกล้เคียงกับ *Roseomonas gilardii* subsp. *rosea* ATCCBAA-691^T เท่ากับ 96.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ คือ มีค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 แบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* ทั้งหมดและสกุลที่ใกล้เคียงกัน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PN2 อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *R. mucosa* MDA5527^T *R. gilardii* subsp. *rosea* ATCCBAA-691^T และ *R. gilardii* subsp. *gilardii* ATCC49956^T (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของแบคทีเรียไอโซเลต PN2 แบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* ทั้งหมดและสกุลที่ใกล้เคียงกัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ หมายถึง มีการแทนที่ 2 นิวคลีโอไทด์ ต่อ 100 นิวคลีโอไทด์



0.02

2.3.2 การวิเคราะห์สัดส่วนของเบสกวานีน (guanine) ร่วมกับเบสไซโตซีน (cytosine) ในดีเอ็นเอ หรือค่า G+C content

จากการวิเคราะห์พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PN2 มีสัดส่วนของเบสกวานีนร่วมกับเบสไซโตซีนในดีเอ็นเอ 70.4 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่เป็น high G+C content และมีค่าสอดคล้องกับค่า G+C content ของแบคทีเรียในสกุล *Roseomonas* (65-71 โมลเปอร์เซ็นต์) (Rihs *et al.*, 1993)

จากผลการศึกษาแบคทีเรียไอโซเลต PN2 ทั้งหมดที่รวบรวมได้ จะเสนอตั้งชื่อแบคทีเรียไอโซเลต PN2 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่และสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) โดยให้ชื่อเป็น *Roseomonas phyllosphaerae* PN2 ต่อไป แต่ก็ควรต้องทำการยืนยันด้วย Genomic DNA–DNA hybridization ต่อไปด้วย

3. การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทรร้อน

การเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ อาจแบ่งแบคทีเรียออกได้ดังนี้แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) และแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant bacteria) และหากพิจารณาเฉพาะเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียแล้ว ก็อาจพบว่ามีลักษณะการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป ดังนั้นจึงจะพิจารณาเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลางว่า ควรจะเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง GPA ที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส สำหรับเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง ควรจะเจริญบนอาหารแข็ง GPA ได้ดี 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง จะหมายถึงแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง GPA ได้ดีที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ก็สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียสด้วย การค้นหาเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทรร้อนมีความสำคัญ เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิสูง ก็จะยังสามารถเจริญและมีกิจกรรมของเซลล์ในการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญได้ดี ถ้าสายพันธุ์นั้นสามารถสร้างสารดังกล่าวได้ที่อุณหภูมิปานกลาง

เมื่อนำ facultative methylotrophic bacteria ที่แยกได้ทั้ง 274 ไอโซเลต มาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง GPA แล้วบ่มที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทรร้อนพบว่า

facultative methylotrophic bacteria ที่แยกได้ทั้ง 274 ไอโซเลต เป็นเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ชอบ อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic methylotrophic bacteria) ทั้งหมด

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกโดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จาก ผักใบพืช ซึ่งจากรายงานทางวิชาการหลายๆ ฉบับ รายงานว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียสามารถผลิต สารประเภทออกซิน (auxin) บางชนิดออกมา โดยชนิดที่พบเป็นหลัก คือ กรดอินโดล-3-อะซีติก (indole-3-acetic acid, IAA) ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืช โดยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืด ขยายตัวของเซลล์ และกระตุ้นทำให้เซลล์เกิดความแตกต่าง ยังช่วยเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของรากโดย ช่วยเปลี่ยนพาราไคมาไปเป็นไซเลมและโฟลเอ็ม และยังควบคุมการร่วงของใบและการสุกของ ผลไม้ (Trotsenko *et al.*, 2001) และเนื่องจากเศรษฐกิจหลักหรือรายได้ส่วนใหญ่ของประเทศไทย ส่วนหนึ่งได้มาจากการเพาะปลูก ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและปลดปล่อยสารเมแทบอลิต์ประเภทที่เป็นฮอร์โมนพืช ที่มีผลต่อการเจริญและความสมบูรณ์ของพืช จึงเป็นสิ่งที่ น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

สำหรับการตรวจสอบการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก โดยแบคทีเรีย อาจทำได้หลายวิธี แต่ ในการศึกษานี้ใช้วิธี colorimetric technique ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสีที่เกิดจาก การที่กรดอินโดล-3-อะซีติกทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ Salkowski reagent Kaper และ Veldstra (1958) รายงานว่า indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide สามารถทำปฏิกิริยากับ Salkowski reagent ได้ แต่โดยทั่วไปแล้วจะพบ indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide ใน ระดับความเข้มข้นที่ต่ำและเปลี่ยนไปเป็นกรดอินโดล-3-อะซีติกอย่างรวดเร็ว เมื่อศึกษาการทำ ปฏิกิริยาระหว่างอาหาร PYDM ที่มีองค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ peptone yeast extract dextrose และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ กับ Salkowski reagent ไม่พบการเกิดสีหรือตะกอนที่อาจบงกนผลการวิเคราะห์ แต่อย่างใด จึงอาจกล่าวได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้เป็นตัวแทนของสารประกอบอินโดลที่วัดได้ จากวิธี colorimetric technique เป็นค่าที่เชื่อถือได้ เนื่องจากเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบ เองซ้อนที่เกิดจากสารประกอบอินโดลทำปฏิกิริยากับ Salkowski reagent เท่านั้นแต่จากรายงานของ Glickmann และ Dessaux (1995) ระบุว่านอกจากกรดอินโดล-3-อะซีติกแล้ว Salkowski reagent ยัง สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ indole-3-pyruvic acid และ indole-3-acetamide แต่อย่างไรก็ตามการ

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอิน โคล-3-อะซิดิกด้วย Salkowski reagent ก็ยังมีความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากกรดอิน โคล-3-อะซิดิก เป็นสารประกอบอิน โคลหลักที่จุลินทรีย์สร้างออกมา

เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก โดย facultative methylotrophic bacteria ที่แยกได้ 274 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 242 ไอโซเลต ที่สร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้ ซึ่งคิดเป็น 88.32 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโอโทโรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด โดยพบว่าแบคทีเรียสร้างกรดชนิดนี้ได้ในปริมาณแตกต่างกันไปในช่วง 0.13-145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12) และมีเมทิลโอโทโรฟิกแบคทีเรียจำนวน 32 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้เลย ซึ่งคิดเป็น 16.68 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโอโทโรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด จากแบคทีเรียที่สร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้นั้น พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างกรดชนิดนี้ได้สูงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ คือ *Enterobacter* sp. T13-4 สร้างได้ 103.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Enterobacter hormaechei* T14-2 สร้างได้ 145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Klebsiella variicola* T32-1.1 สร้างได้ 132.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Klebsiella pneumonia* T39-2 สร้างได้ 130.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 12 การสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียที่แยกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYDM (ภาคผนวก ก) ที่เติม L-tryptophan (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM) และบ่มแบบเขย่านาน 5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	กรดอินโดล-3-อะซีติก ($\mu\text{g/ml}$)
T2-2	2.77
T3-4	2.87
T5-3	8.80
T5-4	-
T5-9	9.66
T6-1	-
T6-2	10.91
T6-3	28.19
T6-4	10.43
T6-5	14.66
T6-6	14.39
T7-2	13.19
T8-4	4.08
T8-5	10.17
T8-6	16.95
T9-1	0.70
T9-2	0.22
T9-3	8.91
T9-4.1	14.80
T9-4.2	9.58
T10-3	19.48
T10-4	16.94
T10-6	17.56
T11-1	13.73
T11-2	1.46

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค ($\mu\text{g/ml}$)
T11-3	11.46
T12-1	1.86
T12-2	3.96
T12-3	25.50
T13-1	-
T13-2	5.57
T13-3	35.02
T13-4	103.60
T14-2	145.50
T14-3	-
T15-2	8.73
T15-3	-
T15-4	17.31
T16-1	18.36
T16-2	18.01
T16-3	13.04
T16-4	14.96
T16-5	-
T17-2	-
T18-1	13.14
T18-2	16.48
T18-4	14.92
T18-5	8.82
T19-1	12.97
T20-1	13.37
T20-2	20.11
T20-3	12.55

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค (µg/ml)
T21-1	13.11
T21-2	6.66
T21-3	10.83
T22-2	-
T22-4	13.20
T22-5.1	28.62
T22-5.2	-
T22-6	15.44
T23-1	14.64
T23-2	23.92
T23-3	10.79
T23-4	26.54
T24-1	10.51
T24-2	11.26
T24-3	13.19
T25-1	13.70
T25-2	11.33
T25-5	26.31
T25-6	13.08
T25-7	41.24
T25-9.1	-
T26-1	16.00
T26-2	15.91
T27-1	12.83
T27-3	14.42
T27-4	4.87
T27-5	-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค (μg/ml)
T28-2	15.31
T28-4	16.60
T28-5	10.14
T28-7	29.11
T29-1	9.95
T29-2	32.83
T29-4	15.98
T30-1	0.13
T30-3	13.73
T30-4.1	11.59
T30-4.2	34.48
T30-5	27.84
T30-6	32.17
T30-7	30.55
T31-1.1	18.93
T31-1.2	9.95
T31-2	21.82
T31-3	9.75
T32-1.1	132.90
T32-2	12.86
T32-3.2	14.37
T32-9	22.51
T33-3	-
T33-4	16.39
T33-5	-
T33-6	24.95
T34-1	15.29

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค (µg/ml)
T34-2	25.54
T34-3	13.26
T35-1	10.05
T35-4	16.69
T36-1	14.74
T36-2	10.46
T37-1	12.00
T37-2	-
T37-3	15.08
T38-1	30.69
T38-2	31.5
T38-3	15.69
T38-4	-
T39-1	12.88
T39-2	130.10
T40-1	-
T40-2S	-
T40-3P	11.73
T41-1	11.70
T41-2	16.38
T41-3.1	25.07
T41-3.2	44.72
T41-3.3	-
T42-1	17.26
T42-3	18.49
T42-5	10.19
T42-6	19.71

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค (μg/ml)
T42-7	8.89
T42-8	13.80
T43-1	15.83
T43-2	10.31
T43-3	12.27
T43-4	9.75
T44-1	15.34
T44-2	-
T44-3	19.32
T45-2	-
T45-3	15.49
T45-5	26.60
T46-1	8.76
T46-2	10.26
T46-3	27.07
T47-1	23.82
T47-2	17.13
T48-1	19.90
T48-2	25.86
T50-1	28.98
T50-3	12.31
T52-1	10.02
T52-2	19.02
T53-1	16.31
T53-2	24.92
T54-1	11.60
T54-2	22.56

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค ($\mu\text{g/ml}$)
T55-1	16.65
T55-2	39.54
T55-3	16.90
T56-2	11.39
T57-1	23.90
T57-3	21.48
T58-1	16.90
T60-1	5.96
T60-2	-
T60-3	-
T61-1	-
T62-1	11.75
T62-2	5.89
T62-3	-
T63-1	14.86
T63-2	14.26
T63-3	12.49
T64-2	7.51
T64-3	12.07
T65-3	12.39
T65-4	20.88
T66-1	10.82
T66-3	11.47
T67-1	3.45
T68-1	28.16
T69-1	12.71
T69-2	17.68

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค ($\mu\text{g/ml}$)
T70-1	9.74
T70-2	13.14
T71-1	5.58
T71-2	-
T73-1	12.87
T73-2	15.12
T74-1	20.32
T75-1	23.82
T75-2	25.76
T76-1	18.03
T76-2	26.58
T76-3	16.76
T77-1	-
T77-2	23.73
T78-2	18.78
T78-3	41.93
T79-1	71.10
T79-2	19.32
T80-1	-
T80-2	1.59
T81-1	19.73
T81-2	15.65
T82-1	-
T84-1	12.58
T84-2	23.59
T84-3	17.67
T85-1	29.86

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค ($\mu\text{g/ml}$)
T86-1	18.86
T86-2	2.06
T87-2	12.52
T88-1	17.66
T88-2	18.44
T89-2	1.36
T90-1	12.30
T91-2	20.56
T91-3	12.69
T92-1	19.16
T93-1	19.68
T93-2	34.57
T94-2	21.53
T95-1	20.85
T96-1	0.65
T96-2	29.09
T96-3	13.00
T97-1	-
T97-3	27.96
T98-2	23.68
T98-3	25.59
T99-1	22.70
T99-2	14.77
T100-1	13.86
T101-1	15.55
T103-2	16.39
T104-1	28.48

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิติค ($\mu\text{g/ml}$)
T104-2	13.00
T105-1	11.57
T105-2	8.35
T105-3	0.55
T109-1	23.10
T109-2	32.23
T110-1	13.64
T111-1	16.73
T111-2	12.23
T112-2	5.48
T113-2	13.57
T114-1	18.36
T114-2	13.70
T115-1	10.55
T115-2	-
T116-1	13.04
T116-2	0.92
T117-1	9.91
T117-2	-
T118-2	15.39
T119-1	25.77
T119-2	2.66
T120-1	32.48
T120-2	26.48
T120-3	-
T121-1	19.68
T122-1	28.88

ตารางที่ 12 (ต่อ)

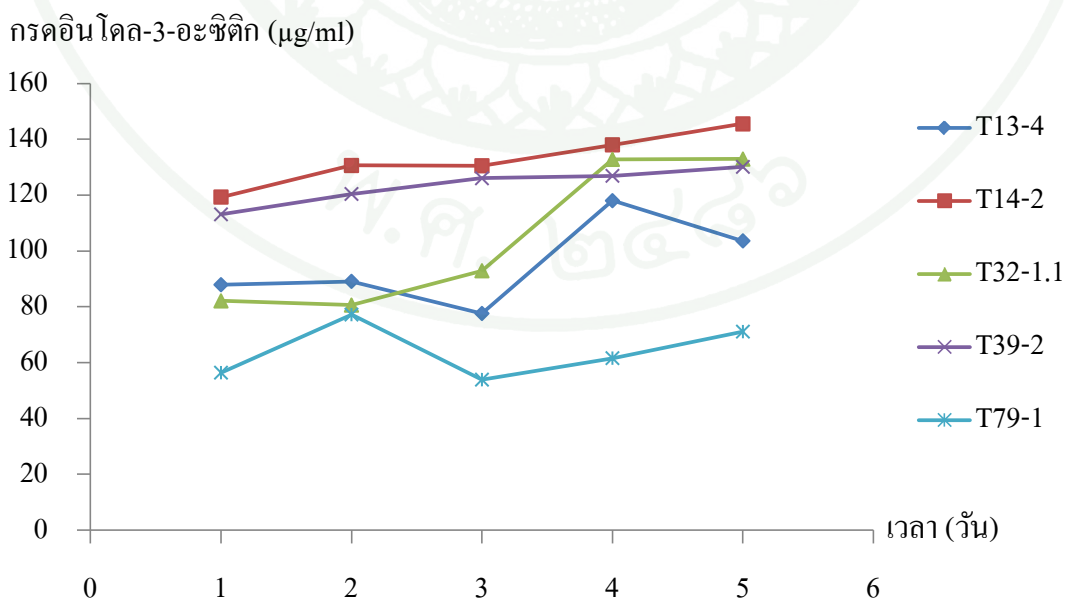
รหัสเชื้อ	กรดอิน โคล-3-อะซิดิก (µg/ml)
T123-1	18.02
T123-2	30.16
T124-1	17.16
T124-2	28.07
T125-1	4.18
T125-2	27.32

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจไม่พบกรดอิน โคล-3-อะซิดิก

จากผลการศึกษาที่พบว่า *Enterobacter* sp. T13-4 สร้างได้ 103.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Enterobacter hormaechei* T14-2 สร้างได้ 145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Klebsiella variicola* T32-1.1 สร้างได้ 132.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Klebsiella pneumonia* T39-2 สร้างได้ 130.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก โดยแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตนี้กับแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีรายงานมาแล้ว พบว่าแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. T13-4 *Enterobacter hormaechei* T14-2 *Klebsiella variicola* T32-1.1 และ *Klebsiella pneumonia* T39-2 ผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้สูงกว่า เช่น ในการศึกษาของ Costacurta *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิกโดย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 233 ที่สร้างได้ 122.5 ไมโครกรัมต่อลิตร หรือ 0.1225 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงใน MPI minimal medium ซึ่งอาจเนื่องจากใน MPI minimal medium มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นองค์ประกอบ ทำให้ความสามารถผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิกซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Omer *et al.* (2004) ที่ศึกษาการผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิก โดย pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารต่ำๆ (low nutrient medium) ร่วมกับการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ซึ่งแอมโมเนียมไอออนเกิดการแข่งขันกับหมู่อะมิโนของ tryptophan ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอิน โคล-3-อะซิดิกทำให้สามารถผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิกได้เพียง 6-13.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงแม้จะเลี้ยงนาน 12 วัน ในขณะที่ Hornschuh *et al.* (2006) ศึกษาการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิกจาก *Methylobacterium* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Methylobacterium mesophilicum* ATCC29983 *Methylobacterium* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากมอส (*Funaria hygrometrica*) และ *Methylobacterium* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากทานตะวัน (*Helianthus annuus*) โดยเลี้ยงใน DSM125 minimal medium ที่เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจน จาก

(NH₄)₂SO₄ เป็น KNO₃ ก็ยังพบปริมาณการผลิตกรดอิน โดล-3-อะซิดิกที่ต่ำกว่า คือ ผลิตได้ 54 ไมโครโมลาร์ (คิดเป็น 9.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ถึง 162 ไมโครโมลาร์ (คิดเป็น 28.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

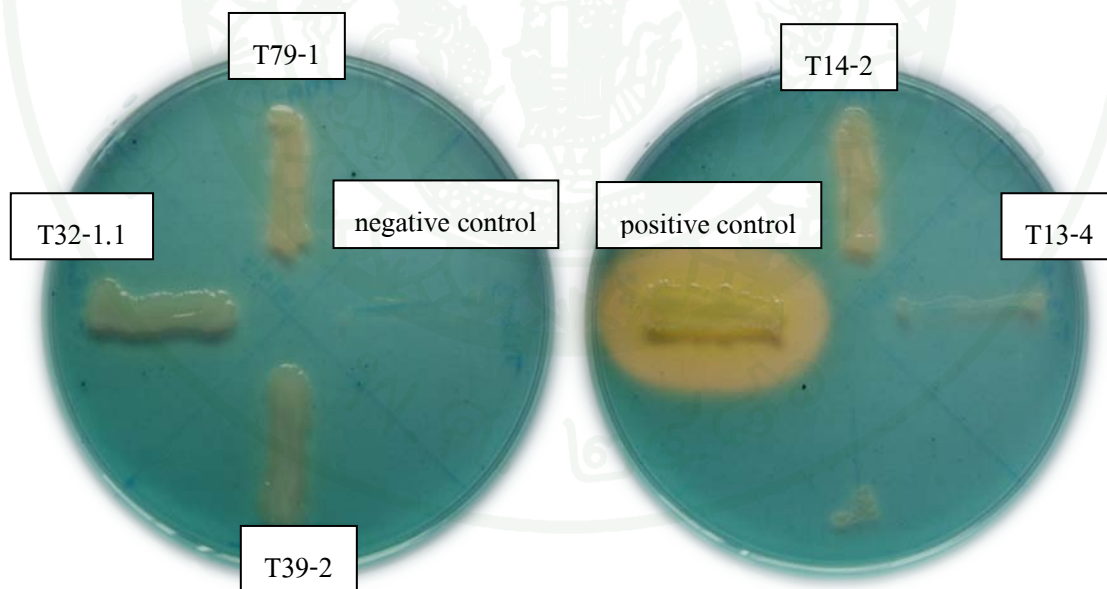
จากการทดสอบการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกพบว่ามีเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่สร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ *Enterobacter* sp. T13-4, *Enterobacter hormaechei* T14-2, *Klebsiella variicola* T32-1.1, *Klebsiella pneumonia* T39-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 มาศึกษาอิทธิพลของเวลาในการหมักต่อการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกโดยการเก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน แล้วนำมาตรวจวัดการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกของทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกได้สูงสุดที่เวลาแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียสกุลเดียวกันก็ตามจากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 8 พบว่า ไอโซเลต T14-2 T32-1.1 และ T39-2 มีแนวโน้มการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง 5 วัน ในขณะที่ไอโซเลต T13-4 สร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงนาน 4 วัน และไอโซเลต T79-1 สร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกสูงสุดเมื่อหมักนาน 2 วัน แสดงให้เห็นว่าการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกในเวลาที่แตกต่างกัน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสกุล แต่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ดังนั้นการประยุกต์ใช้เมทิลโลแบคทีเรียเพื่อสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกอาจต้องมีการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างกรดอิน โดล-3-อะซิดิกของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก่อนนำไปใช้งาน



ภาพที่ 8 การสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกโดยเมทิลโลโทโรฟิคแบคทีเรีย ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PYDM บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ผลการทดลองในภาพที่ 8 แสดงการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกโดยเมทิลโลโทโรฟิคแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ *Enterobacter* sp. T13-4, *Enterobacter hormaechei* T14-2, *Klebsiella variicola* T32-1.1, *Klebsiella pneumonia* T39-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 โดยนำมาตรวจสอบการสร้างไฮเดรโอโรฟอร์และการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่มีส่วนสนับสนุนการเจริญของพืชได้ต่อไป

5. การทดสอบการสร้างไฮเดรโอโรฟอร์บนอาหารแข็ง

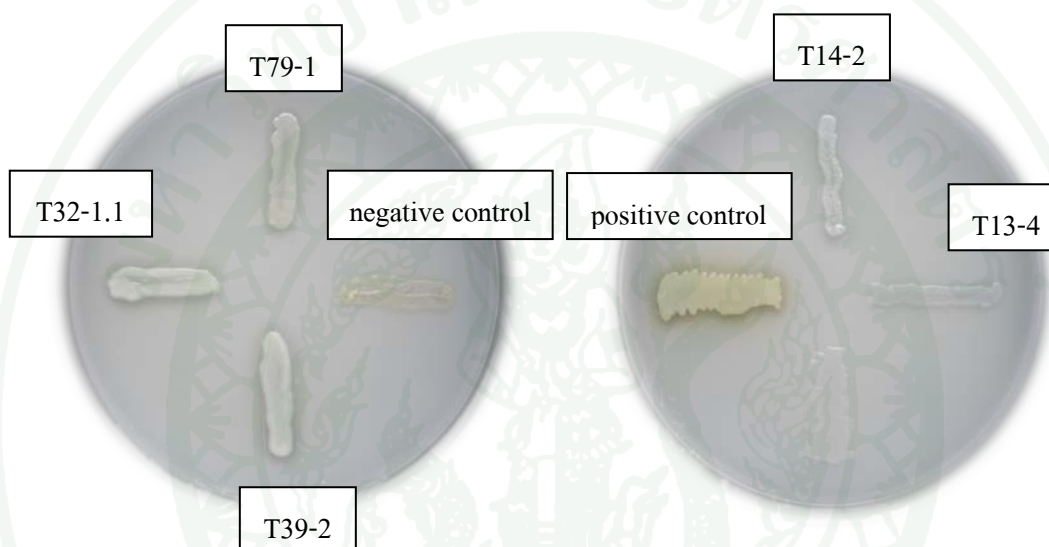
การทดสอบการสร้างไฮเดรโอโรฟอร์บนอาหารแข็งของเมทิลโลโทโรฟิคแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างไฮเดรโอโรฟอร์ได้เล็กน้อย คือ *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 ซึ่งจะเห็นผลได้ชัดเจนชัดเจนเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 9 การทดสอบการสร้างไฮเดรโอโรฟอร์ บนอาหารแข็ง Chrome Azurol S (CAS) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน ที่ 28-30 องศาเซลเซียส

6. การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก ได้สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าทุกไอโซเลตสามารถละลายฟอสเฟตได้เพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 10 การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน ที่ 28-30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช (กรดอินโดล-3-อะซิดิก) การสร้างไซโตไคน์ และการละลายฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรีย *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ และยังสามารถสร้างไซโตไคน์และละลายฟอสเฟตได้ด้วย ในขณะที่ไอโซเลต *Enterobacter* sp. T13-4, *Klebsiella variicola* T32-1.1 และ *Klebsiella pneumoniae* T39-2 สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ และละลายฟอสเฟตได้ด้วย แต่ไม่สามารถสร้างไซโตไคน์ได้ ซึ่งทั้งกรดอินโดล-3-อะซิดิก ไซโตไคน์ และฟอสเฟตที่ละลายได้ เป็นสารสนับสนุนการเจริญของพืช ดังนั้นแบคทีเรีย *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 จึงคาดว่ามีศักยภาพในการสนับสนุนการเจริญของพืช หรือเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) ได้เหมาะสมมากกว่าไอโซเลตอื่นที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

สรุป

การศึกษานี้ นับเป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยที่ได้คัดแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืช และทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติก รวมทั้งการตรวจสอบลักษณะเฉพาะที่สนับสนุนการเจริญของพืช ได้แก่ การสร้างไซเดอโรฟออร์และการละลายฟอสเฟต ซึ่งพบว่าแยก facultative methylotrophic bacteria ได้ 274 ไอโซเลต จากตัวอย่างใบพืช 125 ตัวอย่าง บนอาหาร AMS ที่เติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) โดยแบ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 6 ชนิด จำนวน 42 ตัวอย่าง แยกได้ 80 ไอโซเลต และใบเลี้ยงคู่ 36 ชนิด จำนวน 83 ตัวอย่าง แยกได้ 194 ไอโซเลต โดยเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ต่อจำนวนตัวอย่างจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่มีจำนวนเฉลี่ยของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้จำนวนมากจากผิวใบพืช แสดงให้เห็นว่าผิวใบพืชน่าจะเป็นแหล่งที่อยู่ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเมทานอลที่ถูกปล่อยออกมาทางปากใบจะเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้แก่เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบนผิวใบพืช นอกจากนี้ลักษณะทางกายภาพของใบพืช การเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิและความชื้น รวมถึงสารอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงต่อเนื่องและมีอยู่อย่างจำกัด ยังส่งผลต่อการตรวจพบแบคทีเรียได้หลากหลายชนิดบนใบพืชด้วย

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากผิวใบพืชอยู่ในสกุล *Methylobacterium* คิดเป็น 50.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Sphingomonas* คิดเป็น 13.87 เปอร์เซ็นต์ และ *Pseudomonas* คิดเป็น 11.68 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล *Pantoea* (7.30 เปอร์เซ็นต์) *Rhizobium* (5.84 เปอร์เซ็นต์) *Curtobacterium* (2.19 เปอร์เซ็นต์) *Enterobacter* (1.46 เปอร์เซ็นต์) *Luteibacter* (1.10 เปอร์เซ็นต์) *Klebsiella* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Roseomonas* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Staphylococcus* (0.73 เปอร์เซ็นต์) *Acinetobacter* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Anoxybacillus* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Aurantimonas* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Cellulomonas* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Cellulosimicrobium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Gordonia* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Leclercia* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Mesorhizobium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Mycobacterium* (0.36 เปอร์เซ็นต์) *Ochrobactrum* (0.36 เปอร์เซ็นต์) และ *Rhodococcus* (0.36 เปอร์เซ็นต์) จะสังเกตเห็นได้ว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้ที่อยู่ในสกุล *Methylobacterium* และส่วนใหญ่เป็น *M. radiotolerans* (25.91 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อทดสอบการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก พบเมทิลโลโทรฟิแกแบคทีเรียจำนวน 242 ไอโซเลต จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด สามารถสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้ คิดเป็น 88.32 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิแกแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด และพบว่าสร้างได้ปริมาณ แตกต่างกันในช่วง 0.13-145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิแกแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่สร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้สูงอย่างชัดเจน คือ *Enterobacter* sp. T13-4 สร้างได้ 103.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Enterobacter hormaechei* T14-2 สร้างได้ 145.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Klebsiella variicola* T32-1.1 สร้างได้ 132.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Klebsiella pneumonia* T39-2 สร้างได้ 130.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่สร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอรั และการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งเพิ่มเติม พบว่าทุกไอโซเลตสามารถละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ แต่มีเพียง 2 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างไซเดอโรฟอรัได้เล็กน้อย คือ *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1

จากผลการแยกเมทิลโลโทรฟิแกแบคทีเรียบนผิวใบพืช และการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก อาจนำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ได้ดี ไปใช้ประโยชน์กับพืชได้ทั้งการนำแบคทีเรียไปผลิตกรดอิน โคล-3-อะซิดิก แล้วนำกรดอิน โคล-3-อะซิดิกที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ไปฉีดพ่นให้กับพืช และการใช้ตัวเซลล์โดยตรง โดยอาจเพาะเชื้อลงในดินเพื่อให้แบคทีเรียมีการเจริญบริเวณรอบราก แล้วสร้างสารที่สนับสนุนการเจริญของพืช ซึ่งพบว่าเมทิลโลโทรฟิแกแบคทีเรีย *Enterobacter hormaechei* T14-2 และ *Enterobacter asburiae* T79-1 ที่นอกจากสามารถสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิกแล้ว ยังสามารถสร้างไซเดอโรฟอรั และช่วยละลายฟอสเฟตได้ด้วย จึงน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้ในกรณีดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังอาจฉีดพ่นตัวเซลล์แบคทีเรียที่ใบพืชเพื่อให้แบคทีเรียเจริญอยู่บนใบพืช แล้วสร้างกรดอิน โคล-3-อะซิดิก ให้แก่พืชได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ภัทรชัย กิรติสิน. 2551. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ศุรวินท์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. วิทยาแบคทีเรีย. สถาบันราชภัฏสุรินทร์, สุรินทร์.

Aken, B.V., C.M. Peres, S.L. Doty, J.M. Yoon and J.L. Schnoor. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids x nigra* DN34). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1191-1196.

Ali, B., A.N. Sabri, K. Ljung and S. Hasnain. 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Lett. Appl. Microbiol.** 48: 542-547.

Anthony, C. 1982. **The biochemistry of methylotrophs.** Academic Press, London.

Atanassova, M., A. Derekova, R. Mandeva, C. Sjöholm and M. Kambourova. 2008. *Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 2359-2362.

Balachandar, D., P. Raja and SP. Sundaram. 2008. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plant. **Braz. J. Microbiol.** 39: 68-73.

Banik, S. and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. **Plant Soil.** 69: 353-364.

- Brenner, D.J., N.R. Krieg and J.T. Staley. 2005. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Springer Science+Business Media, Inc., USA.
- Brown, J.M., A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, M.I. Daneshvar, L.J. Romero and M.M. McNeilt. 2006. Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 801-804.
- Carvajal, T.M., M.A.M. Dolleton, D.S. Estrella, O.A. Gagui, E.C. Peralta, M.C.D. Valera and A.C. Lee. 2006. Phenotypic characterization of pink pigmented facultative methylotrophic bacteria from various sources. Proceedings of the Osaka University-De La Salle University Academic Research Workshops. 7: 5-7.
- Chen, C.R., L.M. Condon, M.R. Davis and R.R. Cherlock. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). **Soil Biol. Biochem.** 34: 487-499.
- Chu, B.C., A. Garcia-Herrero, T.H. Johanson, K.D. Krewulak, C.K. Lau, R.S. Peacock, Z. Slavinskaya and H.J. Vogel. 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **Biometals.** 23: 601-611
- Chung, H., M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biol. Biochem.** 37: 1970-1974.
- Chwynan, B. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.** 160: 47-56.
- Corpe, W.A. 1985. A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. **J. Microbiol. Meth.** 3: 215-221.

- Costacurta, A., P. Mazzafera and Y.B. Rosato. 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomona saxonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiol. Lett.** 159: 215-220.
- Doronina, N.V. and Yu.A. Trotsenko. 2000. A new thermotolerant alkaliphilic plant-associated methylotroph of the genus *Paracoccus*. **Microbiology.** 69: 593-598.
- Doronina, N.V., Yu.A. Trotsenko, B.B. Kuznetsov, T.P. Tourova and M.S. Salkinoja-Salonen. 2002. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 773-776.
- _____, _____, T.V. Kolganova, T.P. Tourova and M.S. Salkinoja-Salonen. 2004. *Methylobacillus pratensis* sp. nov., a novel non-pigmented, aerobic, obligately methylotrophic bacterium isolated from meadow grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1453-1457.
- Ehmann, A. 1977. The van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **J. Chromatogr.** 132: 267-276.
- Ehrlich, H.L. 1990. **Geomicrobiology.** Marcel Dekker, New York.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39: 224-229.

- Firsova, J., N. Doronina, E. Lang, C. Sproer, S. vuilleumier and Y. Trotsenko. 2009. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.—a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. **Syst. Appl. Microbiol.** 32: 227-232.
- Gallego, V., M.T. Garcia and A. Ventosa. 2005. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 281-287.
- Gallego, V., M.T. Garcia and A. Ventosa. 2005. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1429-1433.
- _____, _____ and _____. 2005. *Methylobacterium isbiliense* sp. nov., isolated from the drinking water system of Sevilla, Spain. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 2333-2337.
- _____, _____, _____ and C. Sanchez-Porro. 2006. *Roseomonas aquatica* sp. nov., isolated from drinking water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2291–2295.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 793-796.
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. **Am. J. Altern. Agricult.** 1: 57-65.
- Gupta, R., R. Singal, A. Shankar, R.C. Kuhad and R.K. Saxena. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40: 255-260.

- Gyaneshwar, P., G.N. Kumar, L.J. Parekh and P.S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**. 245: 83-93.
- Han, X.Y., A.S. Pham, J.J. Tarrand, K.V. Rolston, L.O. Hessel and P.N. Levett. 2003. Bacteriologic characterization of 36 strains of *Roseomonas* species and proposal of *Roseomonas mucosa* sp. nov. and *Roseomonas gilardii* subsp. *rosea* subsp. nov. **Am. J. Clin. Pathol.** 120: 256-264.
- Harrold, S.A. and M.A. Tabatabai. 2006. Release of inorganic phosphorus from soils by low-molecular-weight organic acids. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** 37: 1233-1245.
- Hirano, S.S. and C.D. Upper. 1991. Bacteria community dynamics. pp. 271-294. In J.H. Andrews and S.S. Hirano, eds. **Microbial Ecology of Leaves**. Springer, New York.
- _____ and _____. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 624-653.
- Hornschuh, M., R. Grotha and U. Kutschera. 2006. Moss-associated methylobacteria as phytosymbionts: an experimental study. **Naturwissenschaften**. 93: 480-486.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol. Biochem.** 24: 389-395.
- _____ and _____. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. **Soil Biol. Biochem.** 27: 257-263.
- _____, A. Barbato and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biol. Biochem.** 27: 265-270.

- Ito, H., and H. Iizuka. 1971. Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. *XII*. Studies on the microorganisms of cereal grain. **Agric. Biol. Chem.** 35: 1566-1571.
- Ivanova, E.G., N.V. Doronina and Yu.A. Trotsenko. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. **Microbiology.** 70: 392-397.
- Ivanova, E., N. Doronina and Yu. Trotsenko. 2007. *Hansschlegelia plantiphila* gen. nov. sp. nov., a new aerobic restricted facultative methylotrophic bacterium associated with plants. **Syst. Appl. Microbiol.** 30: 444-452.
- Jiang, C.Y., X. Dai, B.J. Wang, Y.G. Zhou and S.J. Liu. 2006. *Roseomonas lacus* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 25–28.
- Jourand, P., E. Giraud, G. Bena, A. Sy, A. Willems, M. Gillis, B. Dreyfus and P. de Lajudie. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 2269-2273.
- Kang, Y.S., J. Kim, H.D. Shin, Y.-D. Nam, J.W. Bae, C.O. Jeon and W. Park. 2007. *Methylobacterium platani* sp. nov., isolated from a leaf of the tree *Platanus orientalis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2849-2853.
- Kaper, J.M. and H. Veldstra. 1985. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. **Biochim. Biophys. Acta.** 30: 401-406.
- Kim, D.Y., M.K. Han, J.S. Lee, H.W. Oh, D.S. Park, D.H. Shin, K.S. Bae, K.H. Son and H.Y. Park. 2009. Isolation and characterization of a cellulase-free endo- β -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. **Process Biochem.** 44: 1055-1059.

- Kim, K.Y., D. Jordan and G.A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biol. Fertil. Soils.** 26: 79-87.
- Kim, M.S., K.S. Baik, S.C. Park, M.S. Rhee, H.M. Oh and C.N. Seong. 2009. *Roseomonas frigidaquae* sp. nov., isolated from a water-cooling system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59: 1630-1634.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111-120.
- Kumar, R. and A.C. Lee. 2009. Isolation and characterization of pink-pigmented facultative methylotrophic (PPFM) bacteria from leaves of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Philippine Journal of Systematic Biology.** 3: 8-16.
- Lindow, S.E. and M.T. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1875-1883.
- Loreti, S., A. Gallelli, D. De Simone and A. Bosco. 2009. Detection of *Pseudomonas avellanae* and the bacterial microflora of hazelnut affected by 'Moria' in central Italy. **J. Plant. Pathol.** 91: 365-373.
- MacDonald, R.C. and R. Fall. 1993. Detection of substantial emissions of methanol from plant to the atmosphere. **Atmos. Environ.** 27: 1709-1713.
- Madhaiyan, M., B.Y. Kim, S. Poonguzhali, S.W. Kwon, M.H. Song, J.H. Ryu, S.J. Go, B.S. Koo and T.M. Sa. 2007. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from rice. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 326-331.

- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali and T. Sa. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**. 69: 220-228.
- _____, _____, M. Senthilkumar, SP. Sundaram and T. Sa. 2009. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. **Microbiol. Res.** 164: 114-120.
- Mandal, S.M., K.C. Mondal S. Dey and B.R. Pati. 2007. Optimization of cultural and nutritional conditions for indole 3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolation from root nodules of *Vignamungo* (L.) Hepper. **Res. J. Microbiol.** 2: 239-246.
- Na, J.R., Y.J. Kim, S.H. Kim, H.B. Kim, J.S. Shim, S.Y. Kim and D.C. Yang. 2009. Conversion of ginsenoside Rb₁ by ginseng soil bacterium *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235 according to various culture broths. **Kor. J. Microbiol. Biotechnol.** 37: 55-61.
- Nath, A., M. Dixit, A. Bandiya, S. Chavda and A.J. Desai. 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technol.** 99: 5749-5755.
- Nautiyal, C.S., S. Bhadauria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal and D. Verma. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiol. Lett.** 182: 291-296.
- Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J. Biol. Chem.** 45: 26723-26726.
- Omer, Z.S., R. Tombolini, A. Broberg and B. Gerhardson. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regul.** 43: 93-96.

- Ramana, V.V., Ch. Sasikala, S. Takaichi and Ch.V. Ramana. 2010. *Roseomonas aestuarii* sp. nov., a bacteriochlorophyll-a containing alphaproteobacterium isolated from an estuarine habitat of India. **Syst. Appl. Microbiol.** 33: 198-203.
- Rihs, J.D., D.J. Brenner, R.E. Weaver, A.G. Steigerwalt, D.G. Hollis and V.L. Yu. 1993. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. **J. Clin. Microbiol.** 31: 3275-3283.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Schauer, S. and U. Kutschera. 2008. Methylophilic bacteria on the surfaces of field-grown sunflower plants: a biogeographic perspective. **Theory Biosci.** 127: 23-29.
- Schwyn, B. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Chem.** 160: 47-56.
- Shepelyakovskaya, A.O., N.V. Doronina, A.G. Laman, F.A. Brovko and Yu.A. Trotsenko. 1999. New data about the ability of aerobic methylophilic bacteria to synthesize cytokinins. **Dokl. Akad. Nauk.** 368: 555-557.
- Sundara, B, V. Natarajan and K. Hari. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Res.** 77: 43-49
- Tindall, B.J., R. Rossello-Mora, H.J. Busse, W. Ludwig and P. Kampfer. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 249-266.
- Trotsenko, Yu.A., E.G. Ivanova and N.V. Doronina. 2001. Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology.** 70: 623-632.

- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, S.G. Botina and A.I. Netrusov. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiol. Res.** 162: 69-76.
- Vazquez, P., G. Holguin, M.E. Puente, A. Lopez-Cortes and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biol. Fertil Soils.** 30: 460-468.
- Vorholt, J.A. 2002. Cofactor-dependent pathway of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. **Arch. Microbiol.** 178: 239-249.
- Wayne, L. G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr and H. G. Truper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37: 463-464.
- Weon, H.Y., B.Y. Kim, J.H. Joa, J.A. Son, M.H. Song, S.W. Kwon, S.J. Go and S.H. Yoon. 2008. *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 93-96.
- Yoo, S.H., H.Y. Weon, H.J. Noh, S.B. Hong, C.M. Lee, B.Y. Kim, S.W. Kwon and S.J. Go. 2008. *Roseomonas aerilata* sp. nov., isolated from an air sample. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 1482-1485.
- Yoon, J.H., S.J. Kang, H.W. Oh and T.K. Oh. 2007. *Roseomonas terrae* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2485-2488.
- Zahn, J.A., D.J. Bergmann, J.M. Boyd, R.C. Kunz and A.A. DiSpirito. 2001. Membrane-associated quinoprotein formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* bath. **J. Bacteriol.** 183: 6832-6840.

Zaidi, S., S. Usmani, B.R. Singh and J. Musarrat. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. **Chemosphere**. 64: 991-997.

Zhao, X.R., Q.M. Lin and B.G. Li. 2002. The solubilization of four insoluble phosphates by some microorganisms. **Acta. Microbiol. Sin.** 42: 236-241.

Zhang, Y.Q., L.Y. Yu, D. W., H.Y. Liu, C.H. Sun, W. Jiang, Y.Q. Zhang and W.J. Li. 2008. *Roseomonas vinacea* sp. nov., a gram-negative coccobacillus isolated from a soil sample. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 2070–2074.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หรือหากต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็งทำได้โดยเติมวุ้น 1.5-2 เปอร์เซ็นต์

1. อาหารแข็ง Ammonium Mineral Salts (AMS) (ดัดแปลงจาก Corpe, 1985)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
NH_4Cl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.7	กรัม
KH_2PO_4	0.54	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.003	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001	กรัม
H_3BO_3	0.03	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02	กรัม
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006	กรัม
เมทานอล	10	มิลลิลิตร
vitamin solution *	2	มิลลิลิตร
วุ้น (Difco)	2	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เติม vitamin solution, เมทานอล และสารยับยั้งเชื้อรา (ketoconazole) (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ * ในน้ำ 100 มิลลิลิตร มี biotin 2 มิลลิกรัม, thiamine-HCl 5 มิลลิกรัม, Calcium pantothenate 5 มิลลิกรัม, p-aminobenzoic acid 5 มิลลิกรัม, nicotinic acid 5 มิลลิกรัม,

pyridoxine HCl 10 มิลลิกรัม, riboflavin 5 มิลลิกรัม, folic acid 2 มิลลิกรัม โดยเมื่อเตรียมเสร็จแล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. glycerol peptone agar (GPA)

Glycerol	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. PYDM broth

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

4. Chrome Azurol S (CAS) agar (ดัดแปลงจาก Schwyn and Neilands, 1987)

4.1 CAS indicator solution

Chrome Azurol S	60.5	มิลลิกรัม
Fe(III) solution*	10	มิลลิลิตร
Hexadecyltrimethylammonium bromide	72.9	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

หมายเหตุ * Fe(III) solution ประกอบด้วย FeCl₃ 27 มิลลิกรัม + conc. HCl 83.3 ไมโครลิตร

4.2 Basal agar medium

3-(N-morpholino) propane sulfonic acid	3	กรัม
--	---	------

NaCl	0.05	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.03	กรัม
NH ₄ Cl	0.01	กรัม
L-asparagine	0.05	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	1.5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 6 นอร์แมล แล้วปรับให้ได้ปริมาตร
สุดท้ายเป็น 90 มิลลิลิตร

โดยเมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำ CAS indicator solution 10 มิลลิลิตร เติมลงใน
Basal agar medium

5. Pikovskaya's agar (Zaidi *et al.*, 2006)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
MnSO ₄	0.002	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร



การทดสอบลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ของแบคทีเรีย

1. ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี

เมื่อทำการแยกเชื้อด้วยวิธีเทเพลทแบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญเป็นโคโลนีมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีรูปลักษณ์ของโคโลนีเหมือนกันและแตกต่างจากแบคทีเรียต่างชนิด ลักษณะนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการจำแนกชนิดแบคทีเรียรูปลักษณ์ของโคโลนีที่ต้องบันทึกเพื่อใช้ในการจำแนก คือ

รูปร่างของโคโลนี (Form)

Punctiform	โคโลนีขนาดเล็กมาก ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
Circular	โคโลนีรูปร่างกลม
Irregular	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
Filamentous	โคโลนีเจริญออกไปในลักษณะคล้ายเส้นใยของรา
Rhizoid	โคโลนีเจริญเป็นเส้นหยากกว่าพวก filamentous แผลอกคล้ายรากต้นไม้

ระดับความนูนของโคโลนี (Elevation)

Effuse	โคโลนีแผ่บางๆ
Flat	โคโลนีเจริญกว่า effuse แต่ก็ยังแบนราบบนผิวหน้าของอาหาร
Raised	โคโลนีค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวอาหาร แต่ส่วนบนจะเรียบ
Convex	โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร
Pulvinate	โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร มากจนเกือบจะเป็นรูปครึ่งวงกลม
Umbonate	โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร ตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง

ขอบของโคโลนี (Margin)

Entire	ของโคโลนีเรียบ
Undulate	ขอบโคโลนีเป็นริ้ว
Lobate	ขอบโคโลนีเป็นร่องลึก
Erose	ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป
Filamentous	ขอบเป็นเส้นยื่นออกไปโดยรอบ
Curled	ขอบเป็นวงริ้วเส้นขนานรอบโคโลนี

2. การย้อมสีแบบแกรม

วิธีปฏิบัติ

- 2.1 ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
- 2.2 เตรียมรอยสเมียร์ละติจิงเซลล์ด้วยความร้อน
- 2.3 หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
- 2.4 เทสีที่เหลือที่ค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ และทิ้งไว้ 1 นาที
- 2.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบา
- 2.6 ชับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยสี safranin O ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
- 2.7 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง
- 2.8 นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การย้อมสีเอนโดสปอร์

วิธีปฏิบัติ

- 3.1 นำสไลด์ที่เตรียมเชื้อแล้วนำไปวางไว้บนไอน้ำเดือด
- 3.2 หยดสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์มาลาไคท์กรีน (malachite green) ในน้ำกลั่น ประมาณ 10 นาที (ระวังอย่าให้สีมาลาไคท์กรีนแห้งต้องเติมสีตลอดเวลา)
- 3.3 ล้างด้วยน้ำประปา 10 วินาที ชับน้ำให้แห้ง
- 3.4 ย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน (safranin-O) 30 วินาที ล้างด้วยน้ำประปาเบาๆ ชับให้แห้ง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เอนโดสปอร์ติดสีเขียว ตัวเซลล์ติดสีแดง

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายภูมิน นุตรทัต
เกิดวันที่	21 ตุลาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดยะลา
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษา โรงเรียน ภ.ป.ร. ราชวิทยาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ใน วารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552 จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการฝึกงานและประสบการณ์การทำงาน	เข้ารับการฝึกงานที่บริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซน โปรด์ักส์ จำกัด (มหาชน)