



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดยโครมาโทกราฟีแผ่น
เคลือบบาง

Study on Amino-Lipid Pattern of Bacteria in Genus *Bacillus* by Thin Layer
Chromatography

نامผู้วิจัย นางสาวเชาวนี มีหวัง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรางค์ สุทธิราช, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิเชียร กิจปรีชาวิช, Dr.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดย
โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง

Study on Amino-Lipid Pattern of Bacteria in Genus *Bacillus* by
Thin Layer Chromatography

โดย

นางสาวเขาวนีย์ มีหวัง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2552

เขาวนั มีหว้ง 2552: การศึกรูปแบบอะมิโนลึพดของแบคทีเรยในสกุล *Bacillus* โดย
โครมาโทกราฟฟีแผ่นเคลือบบาง ปรึญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึษาวิทยานัพนธ์หลัก:
ผู้ช่วศาสตราจารย์สุรางค์ สุทธิราช, Dr.Agr. 119 หน้า

จากการศึกรูปแบบอะมิโนลึพดที่พบใน *Bacillus* sp. 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์โดยโครมาโทกราฟฟีแผ่นเคลือบบาง สามารถแบ่ง *Bacillus* sp. ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่มี และไม่มีอะมิโนลึพดที่ $R_f 0.56$ โดยทั้ง 2 กลุ่ม พบอะมิโนลึพดเหมือนกัน 7 ชนิด ได้แก่ R_f ตำแหน่ง 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 *Bacillus* sp. ที่มีอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.56$ มีทั้งหมด 12 สปีชีส์ ได้แก่ *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. circulans* และ *B. sporothermodurans* ส่วน *Bacillus* sp. ที่ไม่มีอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.56$ มีทั้งหมด 9 สปีชีส์ ได้แก่ *B. megaterium*, *B. flexus*, *B. simplex*, *B. badius*, *B. marisflavi*, *Brevibacillus choshinensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. fusiformis* และ *B. sphaericus* แม้ว่า *Brevibacillus choshinensis* และ *Paenibacillus polymyxa* จะไม่มีอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.56$ ก็ตาม แต่ทั้งสองสปีชีส์นี้แตกต่างจากกลุ่ม *B. megaterium* และกลุ่ม *B. sphaericus* เนื่องจากมีอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.60$ และ 0.65 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอะมิโนลึพดที่พบในสกุล *Bacillus* sp. แตกต่างจากที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกสกุล *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Sarcina* sp. และ *Corynebacterium* sp. เนื่องจากไม่พบอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.75$ ขณะที่เมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora* และ *Burkholderia cepacia* พบความแตกต่างชัดเจน เนื่องจากมีอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.75$ ขนาดใหญ่ชัดเจนกว่าที่พบใน *Bacillus* sp. และส่วนใหญ่พบอะมิโนลึพดในตำแหน่งสูงกว่า $R_f 0.50$ ดังนั้นจึงสามารถใช้อะมิโนลึพดเป็นเกณฑ์ในการแยกความแตกต่างของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* กับแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบสกุลอื่นได้ และพบว่าไม่มีเพียงอะมิโนลึพดที่ค่า $R_f 0.75$ เท่านั้นที่เป็นฟอสโฟลึพด และเป็น phosphatidyl ethanolamine (PE) ซึ่งพบได้ทั่วไปในแบคทีเรียแกรมลบแต่พบน้อยมากในแบคทีเรียแกรมบวก

Chowwanee Meewang 2009: Study on Amino-Lipid Pattern of Bacteria in Genus *Bacillus* by Thin Layer Chromatography. Master of Science (Microbiology),
Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor:
Assistant Professor Surang Suthirawut, Dr.Agr. 119 pages.

One hundred and forty-nine strains of 21 species of *Bacillus* sp. were divided into 2 main groups based on amino-lipid analysis using TLC technique. One group possessed amino-lipid of R_f 0.56 spot while the other group did not. Amino-lipid spots at R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 and 0.75 were commonly found in both groups. Group of possessed amino-lipid at R_f 0.56 consist of 12 species were *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. circulans* and *B. sporothermodurans*. The group of *Bacillus* sp. which not found amino-lipid of R_f 0.56 spot consist of 9 species were *B. megaterium*, *B. flexus*, *B. simplex*, *B. badius*, *B. marisflavi*, *Brevibacillus choshinensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. fusiformis* and *B. sphaericus*. Even if *Brevibacillus choshinensis* and *Paenibacillus polymyxa* are not found of R_f 0.56 spot but they were different from those group because they were appeared of R_f 0.60 and 0.65 spot. In addition, amino-lipid patterns of *Bacillus* strains used in this study were clearly distinguished from other genera of Gram positive bacteria tested, i.e. *Staphylococcus* sp., *Sarcina* sp., *Micrococcus* sp. and *Corynebacterium glutanicum* according to the disappearance of R_f 0.75 spot in those groups. In contrast, all Gram negative bacteria tested, i.e. *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora* and *Burkholdaria cepacia* possessed R_f 0.75 spot which was clearly shown as a larger spot than *Bacillus* sp.. Spot at R_f 0.75 was determined as phosphatidyl ethanolamine which is one kind of commonly phospholipids found in Gram negative bacteria but rarely found in Gram positive bacteria.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรางค์ สุธิราช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษา วางแผนการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนคำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องของ วิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช และผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. สาทิต ตระกูลน้าเลื่อมใส ประธานการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจภรณ์ ประภักดี คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลผู้ทรงคุณวุฒิ ภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จ สมบูรณ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา จันทร์ไพแสง ที่ให้ความอนุเคราะห์ *Bacillus thuringiensis* JC349 และ JC397 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา ลีสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ *Bacillus badius* TE1, *Brevibacillus chochiensis* TB2 และ *Bacillus sporothermodurans* SB4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรณา มาลาพันธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ *Bacillus circulans* JCM 2504 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาทิต ตระกูลน้าเลื่อมใส ที่ให้ความอนุเคราะห์ *Corynebacterium glutamicum* และ ศาสตราจารย์ ดร. บุญบา ขงสมิทธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ TLC chamber ที่ใช้ ประกอบการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับความกรุณา ด้าน อุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และพี่น้องสถาบันค้นคว้าผลผลิตเกษตรฯ สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณพี่ และคุณน้องๆ รวมถึงญาติทุกคนที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา รวมถึงกำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ

เชาวนี มีหวัง
กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	74
สรุป	74
ข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	84
ภาคผนวก ก รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	85
ภาคผนวก ข คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	97
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี	116
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	119

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การจำแนกแบคทีเรียสกุลต่างๆที่สร้างเอนโดสปอร์	5
2 การจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล <i>Bacillus</i> ตามรูปร่างสปอร์	6
3 การจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล <i>Bacillus</i> โดยใช้คุณสมบัติความคล้ายคลึงกันทาง phenotypic ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีนบริเวณ 16S rRNA	7
4 ชนิดของฟอสโฟลิพิดที่พบในแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ	15
5 รายชื่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	24
6 แบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้	29
7 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>Bacillus</i> sp. ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ โดยวัดจากค่า R_f	51
8 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบสกุลอื่นโดยวัดจากค่า R_f	59
9 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาบางประการของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ TB 015 เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T , <i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T และ <i>B. simplex</i> DSM 1321 ^T	66
10 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาบางประการของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3, No.4 และ N3A เปรียบเทียบกับ <i>B. sphaericus</i>	70
 ตารางผนวกที่	
ข1 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus megaterium</i> กลุ่มที่ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท	98
ข2 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus megaterium</i> กลุ่มที่ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท และสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข3 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus megaterium</i> กลุ่มที่สามารถ รีดิวส์ไนเตรท	101
ข4 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus megaterium</i> และสายพันธุ์ ใกล้เคียง	102
ข5 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus thuringiensis</i> กลุ่มที่ สามารถใช้น้ำตาลคี(+)-ไซโลส	103
ข6 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus thuringiensis</i> กลุ่มที่ สามารถย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรต	104
ข7 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus subtilis</i>	106
ข8 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	107
ข9 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus pumilus</i>	110
ข10 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus licheniformis</i>	111
ข11 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus atrophaeus</i>	112
ข12 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus</i> กลุ่ม IB	113
ข13 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus</i> กลุ่ม II	114
ข14 คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของ <i>Bacillus</i> sp. กลุ่ม III	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ Serratamic acid หรือ hydroxydecanoeyl serine	13
2	สูตรโครงสร้างของ Cerilipin	13
3	แสดงส่วนของฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย	14
4	ชนิดและโครงสร้างของฟอสโฟลิพิดที่มีหมู่อะมิโน	
	ก. แสดงโครงสร้างทางเคมีของ phosphatidyl ethanolamine	
	ข. แสดงโครงสร้างทางเคมีของ phosphatidyl serine	16
5	การวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า R_f	32
6	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T , lane 2: <i>B. megaterium</i> DSM 3228, lane 3: <i>B. megaterium</i> DMKU 78100, lane 4: <i>B. megaterium</i> KORP16, lane 5: <i>B. megaterium</i> C411 และ lane 6: <i>B. megaterium</i> T2RP13	35
7	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. simplex</i> และ <i>B. flexus</i> เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T , lane 2: <i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T และ lane 3: <i>B. simplex</i> DSM 1321 ^T	36
8	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. cereus</i> , lane 1; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.33, lane 2; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.34, lane 3; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.51.9, lane 4; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.52.1, lane 5; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.52.6 และ lane 6; <i>B. cereus</i> DMKU Bc.53.5	37
9	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> , lane 1; <i>B. thuringiensis</i> JC397, lane 2; <i>B. thuringiensis</i> JC421, lane 3; <i>B. thuringiensis</i> Fong 182, lane 4; <i>B. thuringiensis</i> Fong 183, lane 5; <i>B. thuringiensis</i> F-72 และ lane 6; <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T	38
10	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. mycoides</i> DKMU C3 เปรียบเทียบกับ <i>B. thuringiensis</i> , lane 1; <i>B. thuringiensis</i> JC397 และ lane 2; <i>B. mycoides</i> DKMU C3	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. subtilis</i> , lane 1; <i>B. subtilis</i> ATCC 6051 ^T , lane 2; <i>B. subtilis</i> ATCC 6051 ^T , lane 3; <i>B. subtilis</i> DMKU A3, lane 4; <i>B. subtilis</i> DMKU A5, lane 5; <i>B. subtilis</i> DMKU A7 (2) และ lane 6; <i>B. subtilis</i> DMKU HA3	40
12	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. atrophaeus</i> , lane 1; <i>B. atrophaeus</i> DSM 5151 ^T , lane 2; <i>B. atrophaeus</i> DMKU HA2, lane 3; <i>B. atrophaeus</i> DMKU HA7, lane 4; <i>B. atrophaeus</i> DMKU HA9, lane 5; <i>B. atrophaeus</i> DMKU HA10 และ lane 6; <i>B. atrophaeus</i> DMKU HA11	41
13	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. amyloliquefaciens</i> , lane 1; <i>B. amyloliquefaciens</i> ekos1, lane 2; <i>B. amyloliquefaciens</i> ekos2, lane 3; <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HA1, lane 4; <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HA4, lane 5; <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HA6 และ lane 6; <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HA8	42
14	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. firmus</i> และ <i>B. mojavensis</i> , lane 1; <i>B. firmus</i> K029, lane 2; <i>B. firmus</i> LDD7, lane 3; <i>B. firmus</i> LDD9 และ lane 4; <i>B. mojavensis</i> TISTR 1047 ^T	42
15	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. pumilus</i> , lane 1; <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T , lane 2; <i>B. pumilus</i> KJP1/(8) และ lane 3; <i>B. pumilus</i> DMKU A2	43
16	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. licheniformis</i> , lane 1; <i>B. licheniformis</i> TISTR 1109, lane 2; <i>B. licheniformis</i> TISTR 1110, lane 3; <i>B. licheniformis</i> P013, lane 4; <i>B. licheniformis</i> P015, lane 5; <i>B. licheniformis</i> P017 และ lane 6; <i>B. licheniformis</i> P019	43
17	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. marisflavi</i> TF-11 (lane 4) เปรียบเทียบกับ lane 1: <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T , lane 2: <i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T และ lane 3: <i>B. simplex</i> DSM1321 ^T	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B.adius</i> TE1 (lane 2) เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T (lane 1) และ <i>B. marisflavi</i> TF-11 (lane 3)	45
19	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. circulans</i> JCM 2504 (lane 1 และ 2)	46
20	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. sporothermodurans</i> SB4 (lane 1 และ 2)	47
21	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>Brevibacillus choshinensis</i> TB2 (lane 1 และ 2)	48
22	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>Paenibacillus polymyxa</i> N-10 (lane 1 และ 2)	49
23	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. sphaericus</i> และ <i>B. fusiformis</i> , lane 1; <i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 ^T , lane 2; <i>B. sphaericus</i> K022 และ lane 3; <i>B. fusiformis</i> TISTR 1049 ^T	50
24	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก; lane 1; <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> , lane 2; <i>Staphylococcus intermedius</i> , lane 3; <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> lane 4; <i>Staphylococcus simulans</i> , lane 5; <i>Micrococcus</i> sp. และ lane 6; <i>Micrococcus luteus</i>	54
25	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>Sarcina lutea</i> (lane 1) เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T (lane 2) และ <i>B. thuringiensis</i> JC397 (lane 3)	55
26	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>Corynebacterium glutamicum</i> (lane 1) เปรียบเทียบกับ <i>B. thuringiensis</i> JC397 (lane 2)	55
27	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ, lane 1; <i>E. coli</i> , lane 2; <i>Enterobacter aerogenes</i>	57
28	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบเปรียบเทียบกับ <i>B. thuringiensis</i> JC 397, lane 1 และ lane 6; <i>B. thuringiensis</i> JC 397, lane 2; <i>Erwinia carotovora</i> 486-4, lane 3; <i>E. carotovora</i> 493, lane 4; <i>Burkholdaria</i> <i>cepacia</i> 343-4 และ lane 5; <i>B. cepacia</i> 356-5	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	อะมิโนลิพิดที่สกัดจาก R_f 0.75 ที่พบใน <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T (lane 1) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟอสโฟลิพิด; phosphatidyl ethanolamine, PE (lane 2)	62
30	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ TB 015 (lane 2) เปรียบเทียบกับ <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^T (lane 1)	63
31	ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ <i>Bacillus</i> sp. TB 015 ที่อายุ 48 ชั่วโมง	65
32	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ No.1-No.4; lane 1; <i>B. thuringiensis</i> JC 397, lane 2; สายพันธุ์ No.1, lane 3; สายพันธุ์ No.2, lane 4; สายพันธุ์ No.3, lane 5; สายพันธุ์ No.4 และ lane 6; <i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 ^T	67
33	ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ <i>Bacillus</i> sp. ที่อายุ 48 ชั่วโมง; ก-ง แสดง สายพันธุ์ No.1-No.4 ตามลำดับ	68
34	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ N3A (lane 1 และ 2)	71
35	ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ N3A ที่อายุ 48 ชั่วโมง	72
ภาพผนวกที่		
ก1	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> DMKU OriBa-4-2, lane 2: <i>B. megaterium</i> DMKU OriBa12, lane3: <i>B. megaterium</i> DMKU OriBa 14-2, lane 4: <i>B. megaterium</i> DMKU OriBa 15-2 และ lane 5: <i>B. megaterium</i> DMKU6482 (2)/2	86
ก2	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> DMKU OriBa-5-2 lane 2: <i>B. megaterium</i> DMKU C1 lane 3: <i>B. megaterium</i> DMKU C5, lane 4: <i>B. megaterium</i> DMKU C6 และ lane 5: <i>B. megaterium</i> DMKU C7	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก3 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> P001 lane 2: <i>B. megaterium</i> P002 lane 3: <i>B. megaterium</i> P007 และ lane 4 : <i>B. megaterium</i> P008	87
ก4 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> BKRP5, lane 2: <i>B. megaterium</i> ExIII1, lane 3: <i>B. megaterium</i> P009, lane 4 : <i>B. megaterium</i> LDD4 และ lane 5: <i>B. megaterium</i> BKRP10	87
ก5 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> P011, lane 2: <i>B. megaterium</i> P021 และ lane 3: <i>B. megaterium</i> DMKU Oriba-5-1	88
ก6 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> P028 lane 2: <i>B. megaterium</i> P029 lane 3: <i>B. megaterium</i> K002, lane 4: <i>B. megaterium</i> K003 และ lane 5: <i>B. megaterium</i> K004	88
ก7 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> K005, lane 2: <i>B. megaterium</i> K009, lane 3: <i>B. megaterium</i> K014 และ lane 4: <i>B. megaterium</i> K018	89
ก8 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> K024 lane 2: <i>B. megaterium</i> DMKU A228 และ lane 3: <i>B. megaterium</i> DMKU C216	89
ก9 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> C46 lane 2: <i>B. megaterium</i> Korp17 และ lane 3: <i>B. megaterium</i> Korp23	90
ก10 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. megaterium</i> ; lane 1: <i>B. megaterium</i> Korp24 lane 2: <i>B. megaterium</i> T1RP13 และ lane 3: <i>B. megaterium</i> DMKU 1234 (3)/1	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ก11 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> ; lane 1: <i>B. thuringiensis</i> JC349, lane 2: <i>B. thuringiensis</i> Fong184, lane 3: <i>B. thuringiensis</i> KJP3A, lane 4: <i>B. thuringiensis</i> KJP3B, lane 5: <i>B. thuringiensis</i> P006 และ lane 6: <i>B. thuringiensis</i> P010	91
ก12 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> ; lane 1: <i>B. thuringiensis</i> P012, lane 2: <i>B. thuringiensis</i> P023, lane 3: <i>B. thuringiensis</i> P024, lane 4: <i>B. thuringiensis</i> P026, lane 5: <i>B. thuringiensis</i> P027 และ lane 6: <i>B. thuringiensis</i> P030	91
ก13 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> ; lane 1: <i>B. thuringiensis</i> P031, lane 2: <i>B. thuringiensis</i> KJP4A, lane 3: <i>B. thuringiensis</i> KJP4B และ lane 4: <i>B. thuringiensis</i> P033	92
ก14 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> ; lane 1: <i>B. thuringiensis</i> K006, lane 2: <i>B. thuringiensis</i> K011, lane 3: <i>B. thuringiensis</i> K015 และ lane 4: <i>B. thuringiensis</i> K026	92
ก15 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. thuringiensis</i> ; lane 1: <i>B. thuringiensis</i> K031 lane 2: <i>B. thuringiensis</i> K032 และ lane 3: <i>B. thuringiensis</i> K033	93
ก16 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. amyloliquefaciens</i> ; lane 1: <i>B. Amyloliquefaciens</i> DSM7 ^T , lane 2: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU A6, lane 3: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HB2/3, lane 4: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HB3/4 และ lane 5: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HB4	93
ก17 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. amyloliquefaciens</i> ; lane 1: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HB5/7, lane 2: <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKU HB7, lane 3: <i>B. amyloliquefaciens</i> P014, lane 4: <i>B. amyloliquefaciens</i> P016, lane 5: <i>B. amyloliquefaciens</i> P018 และ lane 6: <i>B. amyloliquefaciens</i> K021	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ก18	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. amyloliquefaciens</i> ; lane 1: <i>B. amyloliquefaciens</i> K027, lane 2: <i>B. amyloliquefaciens</i> P020, lane 3: <i>B. amyloliquefaciens</i> K016 และ lane 4: <i>B. amyloliquefaciens</i> K019	94
ก19	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. licheniformis</i> ; lane 1: <i>B. mojavensis</i> TISTR1047 ^T , lane 2: <i>B. licheniformis</i> K008, lane 3: <i>B. licheniformis</i> K013, lane 4: <i>B. licheniformis</i> K025 และ lane 5: <i>B. licheniformis</i> LDD2	95
ก20	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. subtilis</i> ; lane 1: <i>B. subtilis</i> ExIV6, lane 2: <i>B. subtilis</i> ExIII1, lane 3: <i>B. subtilis</i> ExIII3 และ lane 4: <i>B. subtilis</i> LDD1	95
ก21	รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน <i>B. subtilis</i> ; lane 1: <i>B. subtilis</i> LDD3a และ lane 2: <i>B. subtilis</i> LDD3b	96

**การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดย
โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง**

**Study on Amino-Lipid Pattern of Bacteria in Genus *Bacillus*
by Thin Layer Chromatography**

คำนำ

การนำเอาคุณสมบัติในทางชีวเคมี และสรีรวิทยามาใช้ในการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลา และจำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านนี้โดยเฉพาะ บางครั้งผลของการทดสอบไม่แน่นอน เนื่องจากผู้ทดสอบอาจไม่ได้ใช้วิธีที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน แม้ว่าปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาให้มีความรวดเร็วมากขึ้น (Rapid method) เช่น Biolog แต่วิธีการดังกล่าวยังมี database ที่ใช้เป็นมาตรฐานเทียบยังมีอยู่น้อย การศึกษาการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียโดยใช้องค์ประกอบทางเคมี (Chemotaxonomic identify method) เป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรีย เป็นวิธีหนึ่งซึ่งนักวิจัยทำขึ้นเพื่อนำผลมาวิเคราะห์ร่วมกับวิธีแรก เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน (Fatty acid) การวิเคราะห์โครงสร้างเปปทิโดไกลแคนจากองค์ประกอบของอะมิโนแอซิด การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (Isoprenoid quinone) ในส่วนของไซโทพลาสตมิกเมมเบรน การวิเคราะห์ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ที่พบในส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น นอกจากการวิเคราะห์ดังกล่าวยังมีการจำแนกชนิดโดยใช้วิธี FAME (Fatty acid methyl ester) ด้วยการทำปฏิกิริยากันระหว่างกรดไขมันกับเมทานอล ซึ่งเป็นวิธีที่แพร่หลายมากสามารถทำได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ทำได้เร็วและผลที่ได้จะอ่านจาก peak ที่เกิดขึ้นไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้คอมพิวเตอร์ แต่วิธีนี้จำเป็นต้องใช้เครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งราคาแพงทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับหน่วยงานที่ไม่มีเครื่องมือ ที่เป็นที่ยอมรับและแพร่หลายที่สุดในปัจจุบัน คือ การตรวจสอบลำดับเบสที่ยีน 16S rRNA ซึ่งสามารถเจาะลึกได้ทั้งในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ ขึ้นกับชนิดของกลุ่มแบคทีเรีย วิธีนี้ใช้เวลาน้อย แต่ต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม

Matsuyama *et al.* (2003) รายงานว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชมีชนิดและองค์ประกอบของอะมิโนลิพิดที่จำเพาะและแตกต่างกันแล้วแต่ละชนิดของเชื้อ และเสนอวิธีการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคพืชในระดับสกุล (หรือสปีชีส์) จากรูปแบบของอะมิโนลิพิดด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ต่อมา Boonsuebsakul *et al.* (2006) ได้รายงานว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* 11 สปีชีส์ โดยใช้วิธีการเดียวกับ Matsuyama *et al.* (2003) มีความคล้ายคลึงกัน มีเพียง *B. alvei* มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่แตกต่างจาก *Bacillus* อื่น ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในปัจจุบันที่ *B. alvei* ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่ คือ *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993) แต่ทั้งนี้จำนวนสปีชีส์ที่ศึกษาอย่างน้อยเมื่อเทียบกับสปีชีส์ทั้งหมดในแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

เนื่องจากเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง เป็นเทคนิคง่ายๆ สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ ให้มากขึ้น ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลประกอบในการจำแนกชนิดแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวให้เร็วขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นี้มีความหลากหลายสูง และแตกออกเป็นสกุลใหม่ๆ ในปัจจุบัน (Ash *et al.* (1993) และ Fritze, 2004)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และเปรียบเทียบกับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุลอื่น โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง และศึกษาชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp.

2. ศึกษาการประยุกต์ใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

การตรวจเอกสาร

1. *Bacillus* sp.

การจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ ดิน น้ำ และฝุ่นละอองในอากาศ พบได้ทั้งในน้ำจืด และน้ำเค็ม เซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod shape) ติดสีแกรมบวก เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) รอบตัว สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) มีรูปร่างหลากหลาย เช่น รูปกลม รูปไข่ รูปวงรี รูปทรงกระบอก เป็นต้น ค้นพบครั้งแรกโดย Cohn ในปี 1872 ซึ่งรายงานว่า *B. subtilis* (ก่อนหน้านี้มีชื่อว่า *Vibrio subtilis* โดย Ehrenberg ในปี 1835) มีสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดีกว่า vegetative cell Cohn จึงจัดให้อยู่ในสกุล *Bacillus* ถ้ามีการเจริญภายใต้สภาวะ aerobe หรือจัดอยู่ในสกุล *Clostridium* ถ้ามีการเจริญภายใต้สภาวะ anaerobe ต่อมามีการพิจารณาถึงคุณสมบัติทาง phenotypic characteristic ของแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ที่ค้นพบใหม่มากขึ้นจึงมีการจัดกลุ่มใหม่แบ่งออกเป็น 6 สกุล คือ *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* และ *Thermoactinomyces* ดังแสดงในตารางที่ 1 (Doi, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าทุกสปีชีส์ในสกุล *Bacillus* มีองค์ประกอบภายในเอนโดสปอร์ที่ประกอบด้วย dipicolinic acid (DPA) 5 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ทั้งนี้การสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีการคำนึงถึงอาหารที่ใช้ในสภาวะการเลี้ยงเพื่อให้มีการสร้างสปอร์ก็สามารถที่จะช่วยให้ *Bacillus* sp. มีการสร้างสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่ามีปริมาณ G+C กว้าง คือ อยู่ในช่วง 32 ถึง 69 mol% (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2550) แบคทีเรียชนิดนี้จึงมีผู้สนใจศึกษามาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียเลี้ยงง่าย สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถเจริญได้ในสภาพอาหารเป็นกรด กลาง หรือด่างได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้าง exoenzyme ที่สำคัญๆ เช่น เอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ ซึ่งมีผลทำให้อาหารเน่าเสีย เป็นต้น

ตารางที่ 1 การจำแนกแบคทีเรียสกุลต่างๆที่สร้างเอนโดสปอร์

จีนัส	G+C (mol%)	รูปร่างเซลล์	ลักษณะเฉพาะ
<i>Bacillus</i>	33-66	รูปท่อน	Catalase positive ส่วนใหญ่เป็น aerobe
<i>Sporolactobacillus</i>	38-40	รูปท่อน	Homolactic fermentation มี เป็น facultative anaerobe หรือ microaerophilic
<i>Clostridium</i>	24-54	รูปท่อนหรือ เป็นเส้นสาย (filament)	เป็น anaerobe
<i>Desulfomaculum</i>	37-50	รูปท่อนหรือ เป็นเส้นสาย	Sulfate reduction และเป็น anaerobe
<i>Sporosarcina</i>	40-42	รูปกลม อยู่เป็นกลุ่มแบบ tetrads หรือ packets	เป็น aerobe
<i>Thermoactinomycetes</i>	52-54.8	เส้นสายแตกกิ่งก้าน (Branched filaments)	เป็น aerobe

หมายเหตุ อักษรตัวหนาแสดงคุณสมบัติเด่นเฉพาะในแต่ละสกุล

ที่มา: Doi (1989)

การจำแนกชนิด *Bacillus* sp. ในยุคแรกนั้นใช้วิธีตรวจสอบลักษณะทางวิทยาประกอบกับคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา ต่อมาจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้าน chemotaxonomy ตลอดจนการตรวจสอบทาง genotypic characteristic เช่น การหาปริมาณ GC การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) ทำให้มีการจำแนกชนิด *Bacillus* sp. ออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ ที่ได้รับการยอมรับใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition (Buchanan and Gibbon, 1974) ถึง 31 สปีชีส์ ต่อมาพบสปีชีส์อื่นเพิ่มขึ้นอีก ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ตามรูปร่างสปอร์

แบคทีเรียในสกุล <i>Bacillus</i> แบ่งตามคุณสมบัติจากรูปร่างของสปอร์			
กลุ่ม 1A สปอร์มีรูป วงรี และไม่ทำให้เซลล์ โป่งออก สร้าง granule	กลุ่ม 1B สปอร์มีรูปวงรี และไม่ทำให้เซลล์โป่ง ออก ไม่สร้าง granule	กลุ่มที่ 2 สปอร์มีรูป วงรี และทำให้เซลล์ โป่งออก	กลุ่มที่ 3 สปอร์ เป็นรูปทรงกลม
<i>B. megaterium</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> *	<i>B. alcalophilus</i>	<i>B. fusiformis</i> *
<i>B. flexus</i> *	<i>B. atrophaeus</i> *	<i>B. alvei</i>	<i>B. globisporus</i>
<i>B. simplex</i> *	<i>B. badius</i>	<i>B. amylolyticus</i>	<i>B. insolitus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>B. fastidiosus</i>	<i>B. azotoformans</i>	<i>B. marinus</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. pasteurii</i>
<i>B. mycoides</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. psychrophilus</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. schlegelii</i>
	<i>B. pumilus</i>	<i>B. larvae</i>	<i>B. sphaericus</i>
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. laterosporus</i>	
	<i>B. mojavensis</i> *	<i>B. lautus</i>	
		<i>B. lentimorbus</i>	
		<i>B. macerans</i>	
		<i>B. macquariensis</i>	
		<i>B. pabuli</i>	
		<i>B. pantothenicus</i>	
		<i>B. polymyxa</i>	
		<i>B. popilliae</i>	
		<i>B. sterothermophilus</i>	
		<i>B. validus</i>	

หมายเหตุ * เป็นสปีชีส์ที่เพิ่มเติมหลังจาก ค.ศ. 1989

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gordon (1989), Fritze (2004)

ปัจจุบันการจำแนกชนิดนิยมนตรวจสอบที่ยีน 16S rRNA ซึ่งใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นโมเลกุลยุคโบราณ มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต (Ash *et al.*, 1991) เพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวาง และมีการอนุรักษ์ปานกลาง พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA กลุ่ม 6 กลุ่มของ *Bacillus* ที่จัดไว้ในตารางที่ 3 ใช้ความคล้ายคลึงของ phenotypic characteristic ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA นอกจากนี้จากรายงานของ Wisotzky *et al.* (1992) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ของ *Bacillus* ในกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูงได้ (thermophilic) คือ *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* และ *B. cycloheptaicus* มีความแตกต่างของลำดับเบสของ *Bacillus* ทั้ง 3 สปีชีส์อย่างชัดเจนจากกลุ่ม thermophilic *Bacillus* species เช่น *B. stearothermophilus* และ *B. coagulans* เป็นต้น และยังพบว่าทั้ง 3 สปีชีส์ มีลักษณะที่เฉพาะตัวที่ไม่พบใน *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ คือ มี omega-acyclic fatty acid เป็นองค์ประกอบหลักในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงได้จัด *Bacillus* ทั้ง 3 สปีชีส์ อยู่ในสกุลใหม่ คือ *Alicyclobacillus* sp.

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดยใช้คุณสมบัติความคล้ายคลึงกันทาง phenotypic ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีนบริเวณ 16S rRNA

สปีชีส์	G+C (mol%)	RNA group	คุณสมบัติเฉพาะ
กลุ่มที่ 1 กลุ่ม <i>B. polymyxa</i>			
<i>B. alvei</i>	46	3	ทุกสปีชีส์มีการเจริญแบบ
<i>B. amyloliticus</i>	53	3	facultative anaerobe และเจริญ
<i>B. apiarius</i>	-	-	ได้ดีในสภาวะ anaerobe
<i>B. azotofixans</i>	52	3	สามารถสร้างกรดได้จาก
<i>B. circulans</i>	39	1	น้ำตาลหลายชนิด สร้างสปอร์
<i>B. glucanolyticus</i>	48	-	รูปวงรี และให้เซลล์โป่ง
<i>B. larvae</i>	38	3	
<i>B. lautus</i>	51	1	
<i>B. lentimorbus</i>	38	1	
<i>B. macerans</i>	52	3	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สปีชีส์	G+C (mol%)	RNA group	คุณสมบัติเฉพาะ
<i>B. macquariensis</i>	40	3	
<i>B. pabuli</i>	49	3	
<i>B. polymyxa</i> (ปัจจุบันจัด อยู่ในสกุล <i>Paenibacillus</i>)	44	3	
<i>B. popilliae</i>	41	1	
<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	44	1	
<i>B. pulvifaciens</i>	44	3	
<i>B. thiaminolyticus</i>	53	-	
<i>B. validus</i>	54	-	
กลุ่มที่ 2 กลุ่ม <i>B. subtilis</i>			
<i>B. alcalophilus</i>	37	UG	ทุกสปีชีส์สามารถสร้างกรด
<i>B. amyloliquefaciens</i>	43	1	จากน้ำตาลหลายชนิด เช่น
<i>B. anthracis</i>	33	1	กลูโคส ส่วนใหญ่มีการเจริญ
<i>B. atropheus</i>	42	1	แบบ aerobe ไร้วัยในเตรท
<i>B. carotarum</i>	-	-	สร้างสปอร์รูปวงรีที่ไม่ทำให้
<i>B. firmus</i>	41	1	เซลล์โป่ง
<i>B. flexus</i>	38	-	
<i>B. laterosporus</i>	40	5	
<i>B. lentus</i>	36	1	
<i>B. licheniformis</i>	45	1	
<i>B. megaterium</i>	37	1	
<i>B. mycoides</i>	34	1	
<i>B. niacini</i>	38	-	
<i>B. pantothenicus</i>	37	1	
<i>B. pumilus</i>	41	1	
<i>B. simplex</i>	41	1	
<i>B. subtilis</i>	43	1	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สปีชีส์	G+C (mol%)	RNA group	คุณสมบัติเฉพาะ
<i>B. thuringiensis</i>	34	1	
กลุ่มที่ 3 กลุ่ม <i>B. brevis</i>			
<i>B. alginilyticus</i>	48	-	มีการเจริญแบบ aerobe ไม่
<i>B. aneurinolyticus</i>	42	-	สร้างกรดจากน้ำตาล ยกเว้น
(ปัจจุบันถูกจัดอยู่ในสกุล			สปีชีส์ที่อยู่ในวงเล็บ
<i>Aneurinibacillus</i>)			สร้างสปอร์รูปวงรีที่ทำให้เซลล์
<i>B. azotoformans</i>	39	1	โป่ง
<i>B. badius</i>	44	1	
<i>B. brevis</i> (ปัจจุบันถูกจัดอยู่	47	4	
ในสกุล <i>Brevibacillus</i>)			
(<i>B. chondoitimus</i>)	47	-	
<i>B. freudenreichii</i>	44	-	
<i>B. gordonae</i>	55	3	
กลุ่มที่ 4 กลุ่ม <i>B. sphaericus</i>			
<i>B. aminovorans</i>	40	-	ทุกสปีชีส์จะสร้างสปอร์ที่มี
<i>B. fusiformis</i>	36	2	รูปร่างกลมและทำให้เซลล์โป่ง
<i>B. globisporus</i>	40	2	ที่ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-
<i>B. insolitus</i>	36	2	lysine หรือ ornithine เป็น
<i>B. marinus</i>	39	-	aerobe ทุกสปีชีส์ แต่มี
<i>B. pasteurii</i>	38	2	ความสามารถในการสร้างกรด
<i>B. psychrophilus</i>	42	2	จากน้ำตาลบางชนิด
<i>B. sphaericus</i>	37	2	
กลุ่มที่ 5 กลุ่ม Thermophile			
<i>B. coagulans</i>	44	1	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สปีชีส์	G+C (mol%)	RNA group	คุณสมบัติเฉพาะ
<i>B. flavothermus</i>	61	-	เจริญอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส
<i>B. kaustophilus</i>	53	5	หรือมากกว่า ลักษณะทาง
<i>B. pallidus</i>	40	-	สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา
<i>B. schlegelii</i>	64	-	แตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่
<i>B. smithii</i>	39	1	สร้างสปอร์รูปวงรี และทำให้
<i>B. stearothermophilus</i>	52	5	เซลล์โป่ง
<i>B. thermocatenulatus</i>	69	-	
<i>B. thermocloacae</i>	42	-	
<i>B. thermodenitrificans</i>	52	-	
<i>B. thermoglucosidasius</i>	45	5	
<i>B. thermooleovorans</i>	55	-	
<i>B. thermoruber</i>	57	-	
<i>B. tusciae</i>	58	-	
กลุ่มที่ 6 กลุ่ม <i>Alicyclobacillus</i>			
<i>A. acidocaldarius</i>	60	6	เป็น thermophilic, acidophilic
<i>A. acidoterrestris</i>	52	6	และพบว่าที่เชื้อหุ้มเซลล์
<i>A. cycloheptanicus</i>	56	6	ประกอบด้วย
			ω -alicyclic fatty acids
สปีชีส์ที่ไม่ได้ระบุกลุ่มใดๆ (Unassigned species)			
<i>B. benzoovorans</i>	41	1	
<i>B. fastidiosus</i>	35	1	
<i>B. naganoensis</i>	45	-	

หมายเหตุ - = ไม่มีข้อมูล

ที่มา: Priest *et al.* (1988)

เมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 3 จะเห็นว่าการแบ่ง *Bacillus* ออกเป็น 6 กลุ่มโดยพิจารณาจากคุณสมบัติทาง phenotypic characteristic ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ RNA group ที่ใช้ยีนบริเวณ 16S rRNA ในการแบ่งกลุ่มพบว่าไม่สอดคล้องกัน เช่น กลุ่มของ *B. polymyxa* คุณสมบัติทาง phenotypic characteristic ที่เด่นชัด คือ สร้างสปอร์เป็นรูปวงรี และทำให้เซลล์โป่ง มีการเจริญแบบ facultative anaerobe สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลได้หลายชนิด แต่เมื่อจำแนกโดยใช้ยีนบริเวณ 16S rRNA พบว่าสมาชิกในกลุ่มจัดอยู่ต่างกลุ่มกัน เช่น *B. circulans*, *B. lentimorbus* และ *B. popilliae* จัดอยู่ในกลุ่ม 1 และ *B. alvei*, *B. amyloliticus*, *B. larvae*, *B. marcerans* และ *B. polymyxa* จัดอยู่ในกลุ่ม 3 ซึ่งปัจจุบันสมาชิกกลุ่ม 3 ได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่ตามข้อมูลของ 16S rRNA คือ สกุล *Paenibacillus* โดยพบว่าสมาชิกในสกุล *Paenibacillus* มีทั้งหมด 67 สปีชีส์ เช่น *Op. agarexedens*, *P. alvei*, *P. amylolyticus*, *P. azotofixans*, *P. barcinonensis*, *P. borealis*, *P. durum*, *P. ehimensis*, *P. favisporus*, *P. glucanolyticus*, *P. larvae*, *P. lautus*, *P. lentimorbus*, *P. macerans*, *P. terrae*, *P. macquariensis*, *P. peoriae*, *P. phyllosphaerae*, *P. polymyxa*, *P. thiaminolyticus* และ *P. timonensis* เป็นต้น (Euzéby, 2008)

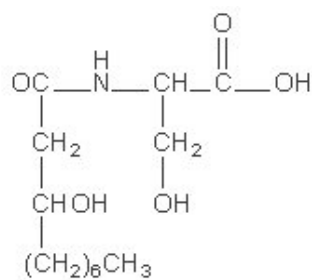
ในปัจจุบันสมาชิกในสกุล *Bacillus* ได้ถูกแบ่งออกเป็นสกุลใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้นโดยใช้วิธีทาง phenotypic characteristic ร่วมกับการศึกษาจากยีนบริเวณ 16S rRNA ได้เป็น 15 สกุล โดยแต่ละสกุลจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน เช่น (1) *Bacillus* มีการเจริญแบบ aerobe หรือ facultative anaerobe สร้างเอนโดสปอร์ เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปท่อน (2) *Amphibacillus* มีการเจริญแบบ facultative anaerobe คล้ายกับสกุล *Bacillus* ต่างกันตรงให้ผลกะตะเลส และออกซิเดสเป็นลบ (3) *Alicyclobacillus* โครงสร้างของผนังเซลล์จะประกอบด้วย cyclic fatty acid และอยู่ในกลุ่ม moderately thermophilic (4) *Paenibacillus* มีการเจริญแบบ facultative anaerobe คำพิเอนในอาหาร Voges-Proskauer (VP) น้อยกว่า 6.0 ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (5) *Aneurinibacillus* มีการเจริญแบบ aerobe และ mesophilic สามารถย่อยสลาย thiamine (6) *Brevibacillus* จัดเป็น “short” *Bacillus* ส่วนใหญ่มีการเจริญแบบ aerobe และ mesophilic (7) *Halobacillus* เป็นสกุลที่ชอบความเค็ม “salt” *Bacillus* (moderately halophilic) (8) *Virgibacillus* เซลล์มีการจัดเรียงตัวแบบ branch จัดเป็น mesophilic และทนความเค็มได้ปานกลาง (moderately halotolerant) (9) *Gracilibacillus* เซลล์เป็นรูปท่อนผอมบาง (slender shape) จัดเป็น mesophilic บางสปีชีส์ทนเกลือได้ดีมาก (10) *Salibacillus* เป็นสกุลที่ชอบเกลือ (salt *Bacillus*) moderately halophilic (11) *Anoxybacillus* เป็นสกุลที่ไม่มีการเจริญแบบ anaerobe หรือ facultative anaerobe เป็น alkaliphilic-moderately thermophilic (12) *Thermobacillus* เป็นสกุลที่ชอบอุณหภูมิสูงในการเจริญ (hot *Bacillus*) (13) *Filobacillus* เซลล์มีการ

จัดเรียงตัวแบบเป็นเส้น (thread) มีการเจริญแบบ aerobe, alkali-tolerant และเป็น halophilic (14) *Ureibacillus* ย่อยสลายยูเรีย (urea *Bacillus*) มีการเจริญแบบ aerobe และ thermophilic (15) *Geobacillus* ส่วนใหญ่พบในดินธรรมชาติ (earth *Bacillus*) มีการเจริญแบบ aerobe หรือ facultative anaerobe (Zeigler, 2001)

บางครั้งพบปัญหาว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นมีลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rRNA คล้ายกันมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยวิธีนี้ เช่น *B. anthracis*, *B. cereus* และ *B. thurengiensis* (Sacchi *et al.*, 2002) และในการศึกษาของ Fox *et al.* (1992) ได้วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ของ *Bacillus* กลุ่ม psychrophilic คือ *B. globisporus* W25T (type strain), *B. psychrophilus* W16AT และ W5 พบว่ามีความคล้ายกันถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงจำเป็นต้องนำวิธีการต่างๆ มาใช้ประกอบร่วมกันเพื่อยืนยันความเป็นสปีชีส์นั้นๆ

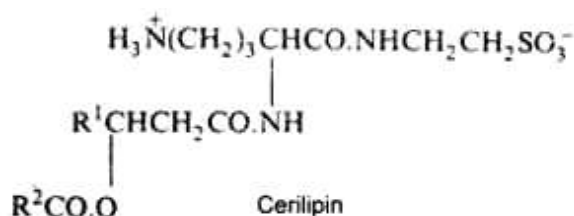
2. การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยอาศัยองค์ประกอบทางเคมี

อะมิโนลิพิด คือ สารประกอบระหว่างกรดอะมิโนหนึ่งหรือสองโมเลกุลหรือมากกว่านั้น เชื่อมอยู่กับโมเลกุลของกรดไขมันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) พันธะอีเทอร์ (ether bond) หรือพันธะเอไมด์ (amide bond) โดยจะอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membranes) หรือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membranes) ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซราไมด์ (ceramides) หรือลิพโพลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides) โดยสารเหล่านี้สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นสารที่มีขั้ว นิยมใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ และต้องการอากาศในการเจริญกันมาก ตัวอย่างอะมิโนลิพิด ได้แก่ Serratamic acid หรือ hydroxydecanoeryl serine เป็นสารประกอบอะมิโนลิพิดที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหนึ่งโมเลกุล เชื่อมอยู่กับโมเลกุลของกรดไขมันพบใน *Serratia* sp. (ภาพที่ 1) Cerilipin เป็นสารประกอบของกรดอะมิโน ornithine เชื่อมกับโมเลกุลของกรดไขมัน พบใน *Gluconobacter cerinus* (ภาพที่ 2), Surfactin เป็นสารประกอบของ cyclic อะมิโนลิพิดเชื่อมอยู่กับโมเลกุลของกรดไขมันพบใน *Bacillus* sp. บางสปีชีส์ เป็นต้น (Chevreul, 2009) ในปัจจุบันมีการใช้องค์ประกอบทางเคมีเพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียกันมากขึ้น ได้แก่ การศึกษารูปแบบของไขมัน การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน เป็นต้น (Lechevalier, 1989)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Serratamic acid หรือ hydroxydecanoeyl serine

ที่มา: Chevreur (2009)



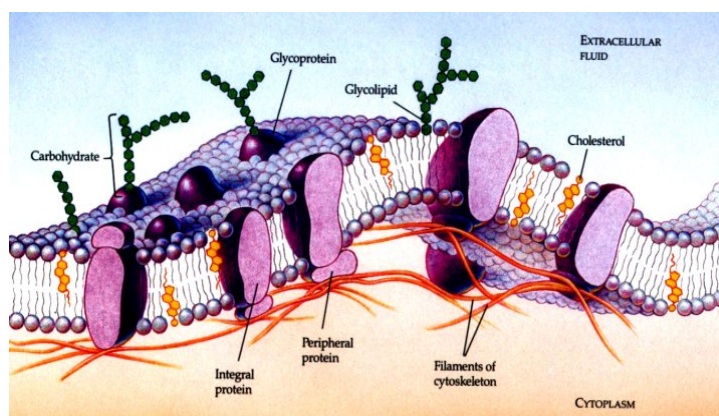
ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ Cerilipin

ที่มา: Chevreur (2009)

ลิพิด เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งต่างจากโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิกในด้านคุณสมบัติการละลาย ลิพิดส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble หรือ hydrophobic) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น ether, chloroform และ benzene เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาลิพิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย โดยลิพิดที่พบในเซลล์แบคทีเรียมีหลายรูปแบบ ได้แก่ กรดไขมัน, fatty alcohol, hydroxyl carbon หรือสารประกอบอื่นๆ เช่น อะมิโนลิพิด ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้น

ตามที่มีการระบุไว้ก่อนหน้านี้พบว่าฟอสโฟลิพิดมีองค์ประกอบของกรดไขมันอยู่มากที่สุด (Lechevalier, 1989) ซึ่งจะพบฟอสโฟลิพิดในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยทั่วไปโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นประกอบด้วยชั้นของฟอสโฟลิพิดที่มีลักษณะเป็นเยื่อ 2 ชั้น เรียก ฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ (phospholipid bilayer) ซึ่งหันส่วนที่ไม่ละลายน้ำเข้าหากัน และหันส่วนที่ละลายน้ำออก

ข้างนอก ฟอสโฟลิพิดที่พบส่วนใหญ่มีหัวเพราะสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ เป็นส่วนที่มีโครงสร้างและมีหน้าที่ที่สำคัญที่สุด และมีโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น อินทิกรัลโปรตีน (integral protein) เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในชั้นฟอสโฟลิพิด และเพอริเฟอรัลโปรตีน (peripheral protein) เป็นโปรตีนที่อยู่บนชั้นของฟอสโฟลิพิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน หรือเกาะติดกับอินทิกรัลโปรตีน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงส่วนของฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา: Gwen (2008)

ฟอสโฟลิพิดที่พบส่วนใหญ่ในแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 เช่น diphosphatidyl glycerol (DPG), phosphatidyl glycerol (PG), glycerolphospholipid เป็นฟอสโฟลิพิดที่พบมากในแบคทีเรียทุกชนิด phosphatidic acid (PA) เป็นตัวกลางในขบวนการสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิด แต่พบจำนวนน้อย ขณะที่พบ phosphatidyl ethanolamine (PE) (ภาพที่ 4ก) เป็นจำนวนมากในแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Bacillus*, *Planococcus* sp., *Micrococcus cryophilus* และ *Actinomycetes* นอกจากนี้ยังเป็นฟอสโฟลิพิดที่อาจจะเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นอนุพันธ์ N-methylated ของ PE เช่น phosphatidyl methylethanoamine (PME) และ phosphatidyl dimethylethanolamine (PDME) สำหรับ phosphatidyl choline (PC) นั้นมีโครงสร้างคล้ายกับ PME และ PDME ซึ่งอาจจะใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบออกจากแบคทีเรียแกรมบวก และ *Actinomycetes* ได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมีรายงานว่าไม่พบหรือพบน้อยในแบคทีเรียแกรมบวก และ *Actinomycetes* ขณะที่ phosphatidyl serine (PS) (ภาพที่ 4ข) จะพบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น นอกจากนี้ยังมี phosphatidyl inositol mannosides

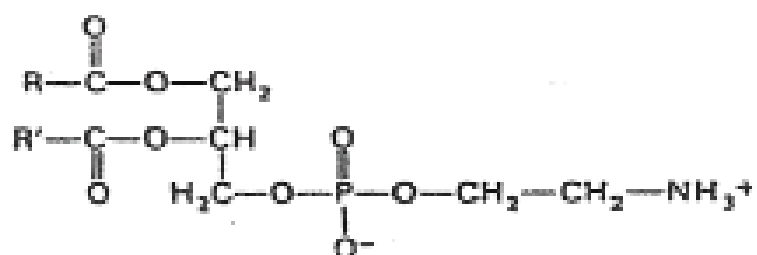
(PIM) ซึ่งฟอสโฟลิพิดชนิดนี้จะพบเฉพาะใน Actinomycetes และสายพันธุ์ใกล้เคียง มีรายงานพบใน *Propionibacterium (shermanii) freudenreichii* และในยีสต์ โดย PIM จะประกอบด้วยโมเลกุลของ mannose 1 ถึง 6 โมเลกุล โดยที่โมเลกุลที่หนึ่งจะเชื่อมกับตำแหน่งที่ 2 ของ inositol ส่วนที่เหลือจะเชื่อมอยู่กับตำแหน่งที่ 6 ของ inositol (Lechevalier, 1989)

ปัจจุบันพบชนิดของฟอสโฟลิพิดเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่ทราบปริมาณขึ้นกับอายุและสภาวะที่เชื้อเจริญ เป็นต้น ตัวอย่างฟอสโฟลิพิดที่พบใหม่ในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้แก่ glucosaminyl phosphatidyl glycerol และ aldehydogenic เป็นต้น ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ phosphatidyl ethanolamine เป็นต้น (Lechevalier, 1989)

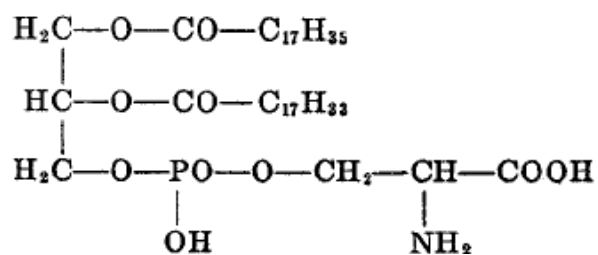
ตารางที่ 4 ชนิดของฟอสโฟลิพิดที่พบในแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ

ฟอสโฟลิพิด	เปอร์เซ็นต์		
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ	Actinomycetes
Phosphatidic acid	0.1-10	0.1-10	0.1-10
Phosphatidyl glycerol	> 50	> 50	> 50
Diphosphatidyl glycerol	> 50	> 50	> 50
Phosphatidyl ethanolamine	0.1-10	> 50	> 50
Phosphatidyl-N-methyl ethanolamine	0	0.1-10	0.1-10
Phosphatidyl-N-dimethyl ethanolamine	0	0.1-10	0.1-10
Phosphatidyl choline	0.1-10	10-50	0.1-10
Phosphatidyl serine	0	0.1-10	0
Phosphatidyl inositol	10-50	0.1-10	>50
Phosphatidyl inositol mannoside	0	0	>50

ที่มา: Lechevalier (1989)



ก.



ข.

ภาพที่ 4 ชนิดและโครงสร้างของฟอสโฟลิพิดที่มีหมู่อะมิโน

ก. แสดงโครงสร้างทางเคมีของ phosphatidyl ethanolamine

ข. แสดงโครงสร้างทางเคมีของ phosphatidyl serine

ที่มา: ภาควิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว (2552) และ Folch (1947)

3. การใช้โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางแบบดูดซับเพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแบคทีเรีย

โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางแบบดูดซับอาศัยหลักการให้สารตัวอย่างดูดซับบนผิวของของแข็งส่วนอยู่กับที่ด้วยแรงยึดต่าง ๆ กัน เช่น พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน แรงวานเดอวาลส์ dipole interaction หรือ hydrophobic interaction ลักษณะการดูดซับเป็นชนิดผันกลับได้ (reversible) การแยกสารเกิดจากการแทนที่สารตัวอย่างที่ดูดซับโดยตัวทำละลายส่วนเคลื่อนที่หรือตัวชะ (eluent) ทำให้สารตัวอย่างซึ่งถูกดูดซับด้วยแรงยึดต่าง ๆ กันแยกจากกันเป็นส่วน ๆ ได้

การแยกสารโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางแบบดูดซับมีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ

1. ส่วนคงที่ (Stationary phase) หรือสารดูดซับ (Adsorbent) คือของแข็งที่ใช้เคลือบบนแผ่นกระจก หรืออะลูมิเนียม สามารถดูดซับ (Adsorb) สารที่ต้องการแยกได้
2. สารตัวอย่างที่ต้องการแยก เป็นสารที่ถูกดูดซับบนผิวของสารดูดซับได้ด้วยแรงยึดต่าง ๆ กัน
3. ส่วนเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือตัวชะ (Eluent) คือ ตัวทำละลายซึ่งสามารถถูกดูดซับโดยสารดูดซับได้ และสามารถแข่งขันในการแทนที่สารที่ต้องการแยกซึ่งดูดซับอยู่บนสารดูดซับ ทำให้สารที่ต้องการแยกหลุดออกจากสารดูดซับได้

กลไกการแยกสารโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางแบบดูดซับ สารที่มีความเป็น non polar สูงสุดซึ่งมีแรงยึดกับสารดูดซับน้อยที่สุดจะถูกแทนที่และเคลื่อนตัวก่อน ตามด้วยสารซึ่งมีความเป็น Non polar ลดลงตามลำดับ (อรุณี, 2548)

โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางนี้เหมาะสมที่จะใช้กับสารระเหยยาก เนื่องจากถ้าใช้กับสารที่ระเหยง่ายนำมาจุดบนโครมาโทเพลตนั้นใช้ปริมาณของสารเพียงเล็กน้อยอาจจะระเหยหมดก่อนที่จะทำการแยกด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือบ่งชี้สารสงสัยได้อย่างรวดเร็ว

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแยกสาร คือ ส่วนคงที่ และส่วนเคลื่อนที่ โดยปัจจัยทั้งสองอย่างนี้ต้องมีความเหมาะสมทั้งชนิดและปริมาณและที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ต้องเตรียมสถานะ

การทดลองที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ บรรยากาศ และวิธีการทดลอง ทั้งสามปัจจัยนี้ต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมเพื่อให้ได้การทดลองที่ดีที่สุด

ข้อดีของวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง คือ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการแยกน้อย (เป็นไมโครลิตร) ใช้เวลาในการแยกสารน้อย แยกได้จุดที่คมชัดมาก และสามารถใช้กับสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อนได้ (Poole, 1994)

Minnikin *et al.* (1984) ได้ดัดแปลงวิธีของ Bligh and Dyer (1959) ในการสกัด isoprenoid quinones และไขมันที่มีหัวของ *B. subtilis* NCIB 3610, *Mycobacterium avium* D4, *Pseudomonas diminuta* NCTC 8545 และ *Streptomyces griseus* ISP 5236 โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ในการหา isoprenoid quinones ส่วนการวิเคราะห์ไขมันที่มีหัวใช้วิธี two-dimensional โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบ ubiquinone-10 เป็นส่วนใหญ่ใน *P. diminuta* NCTC 8545 และพบ menaquinones (MK-7, MK-9 (H_2) และ MK-9 (H_4 , H_6 และ H_8)) ใน *B. subtilis* NCIB 3610, *M. avium* D4 และ *S. griseus* ISP 5236 ส่วนไขมันที่มีหัวที่สกัดได้ในแต่ละสกุลแตกต่างกัน ซึ่งจะพบ DPG ทั้ง 4 สกุล และในปัจจุบันการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้รูปแบบของไขมันถือว่ามีประสิทธิภาพมาก

Chase *et al.* (1992) ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Xanthomonas campestris* จากต้นไม้ในวงศ์ Aroids ซึ่งเป็นไม้ล้มลุกขนาดใหญ่ที่อยู่ใน Family Araceae เช่น บอนสี เป็นต้น โดยใช้คุณสมบัติทางสรีรวิทยา คุณสมบัติการก่อโรค และวิเคราะห์ชนิดกรดไขมัน ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ซึ่งรูปแบบของกรดไขมันที่ได้มีความซับซ้อนมาก และสามารถแยกกรดไขมันได้ 20 ถึง 27 ชนิด

Kori *et al.* (1992) ศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* และ *E. caratovora* subsp. *carotovora* ด้วยการวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้วิธี gas-liquid chromatography ตรวจสอบชนิด และปริมาณของกรดไขมันที่มีเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้จากการทำ gas-liquid chromatography แสดงให้เห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน โดยพบว่า *E. caratovora* subsp. *carotovora* มีปริมาณของกรด lauric (12:0) มากกว่า *E. chrysanthemi* และมีปริมาณของกรด myristic (14:0) น้อยกว่า *E. chrysanthemi*

Bouzar *et al.* (1993) ศึกษาความแตกต่างในระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียในสกุล *Agrobacterium* 4 สปีชีส์ ได้แก่ *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* และ *A. rubi* ด้วยวิธี Biolog เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งหมด 95 ชนิด และวิเคราะห์โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ได้ ด้วยวิธี MIDI gas-liquid chromatography แสดงให้เห็นความแตกต่างของกรดไขมันที่มีในแบคทีเรีย *Agrobacterium* แต่ละสปีชีส์ที่ได้อย่างชัดเจน โดยดูจากกรด *cis-vaccinic* เป็นกรดที่พบในสกุล *Agrobacterium* โดยเฉพาะ และพบว่า *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* และ *A. vitis* มีปริมาณของกรด 3-hydroxypalmitic (16:0 3-OH) แตกต่างกัน ยกเว้น *A. rubi*

Matsuyama *et al.* (1993) ศึกษาโดยทำการเปรียบเทียบรูปแบบของอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยใช้เซลล์แบคทีเรีย 1 หลอด วางบนแผ่นซิลิกาเจลเพลต และทำให้แห้ง จากนั้นทำการ develop ใน chloroform:methanol (2:1, v/v) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นก็ทำให้แห้งแล้วทำซ้ำอีกครั้ง แต่ทำการ develop ใน chloroform:methanol:water (60:25:4, v/v/v) แล้วใช้ ninhydrin ฟ่นและนำไปอบเพื่อให้เห็นแถบอะมิโนลิพิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียได้ในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ของ *Erwinia* และ *Pseudomonas* ซึ่งวัดค่า rate of flow (R_f) สูงสุดอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 0.65 ที่น่าสนใจ คือสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้อย่างชัดเจน ต่อมา Matsuyama (1995a) ได้ทำการศึกษาการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพริกพืชมักด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยนำผลที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้แบคทีเรียปริมาณ 1 หลอด ใส่ลงในตัวทำละลาย chloroform:methanol เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น และตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของแถบที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นโครมาโทแกรมได้อย่างชัดเจน ซึ่งแยกได้เป็นแบคทีเรีย 2 สกุล คือ *Clavibacter* และ *Erwinia* นอกจากนั้นยังสามารถแยกชนิดแบคทีเรียในสกุล *Erwinia* ได้ในระดับสปีชีส์ คือ แยก *E. carotovora* subsp. *carotovora* ออกจาก *E. chrysanthemi* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และในปีเดียวกัน Matsuyama (1995b) ได้ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* rRNA-homologous Group II (*Burkholderia* spp.) พบว่าโครมาโทแกรมที่ได้จาก *P. cepacia*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. plantarii*, *P. andropogonis*, *P. salanacearum* และ *P. rubrisubalbicans* ให้ผลคล้ายคลึงกันมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ รูปแบบที่ได้

ของ *P. rubrisubalbicans* มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจาก *Pseudomonas* อื่น แต่ไม่สามารถแยก *P. andropogonis* ออกจาก *P. salanacearum*

Matsuyama *et al.* (1998) ศึกษาโครมาโทแกรมของอะมิโนลิพิดจากเซลล์แบคทีเรีย และแยกโดยวิธี HPLC เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียในสกุล *Burkholderia* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Burkholderia gladioli*, *B. glumae* และ *B. plantarii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในข้าว โดยทั้ง 3 สปีชีส์ได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า โครมาโทแกรมที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของ peak ที่ปรากฏขึ้นจาก 12 สายพันธุ์ ของ *B. gladioli* ที่ค่า R_f 6.2 ซึ่ง peak ดังกล่าวนั้นจะไม่ปรากฏใน 18 สายพันธุ์ ของ *B. glumae* และใน 5 สายพันธุ์ ของ *B. plantarii* โดยให้จุดสูงสุดของ peak อยู่ที่ R_f 3.2 และเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ให้ผลการทดลองที่ได้ไปในทางเดียวกันกับวิธี HPLC คือ แสดงให้เห็นความแตกต่างของโครมาโทแกรมที่ได้จาก *Burkholderia* 3 สปีชีส์ดังกล่าวได้ ดังนั้นวิธี HPLC จึงเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ออกจากกันได้ และ Matsuyama *et al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีการเพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยใช้เซลล์แบคทีเรียจำนวน 4 ลูกปัดเลี้ยงบนอาหาร King's B ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ลงในหลอดแก้วทดลองขนาดเล็ก (small glass vial) และเติม chloroform:methanol:0.3%NaCl 1 มิลลิลิตร (2:1:0.2, v/v) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายในชั้นล่างมาจุดลงบนแผ่นซิลิกาเจล แล้วทำการ develop ใน chloroform : methanol : 0.2%CaCl₂ (55:35:8,v/v) ตรวจสอบโครมาโทแกรมของอะมิโนลิพิดที่ได้ด้วยการฉีดพ่นด้วยสารละลาย ninhydrin โครมาโทแกรมที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ยกเว้น *P. syringae* และ *X. campestris*

Munoz *et al.* (1997) ศึกษาการแยก *M. mucogenicum* ออกจาก *M. fortuitum* โดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง และใช้สาร mycolate เป็นสารหลักในการจำแนก *Mycobacterium* สายพันธุ์อ้างอิง และที่มาจากสิ่งแวดล้อมอีก 31 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะถูกนำมาสกัดเพื่อหาสาร mycolate โดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง และทั้ง 32 สายพันธุ์นี้มี mycolate เหมือนกันหมด mycolate ประกอบด้วย mycolate 1 และ mycolate 6 การแสดงให้เห็นลักษณะของ mycolate นี้ทำให้สามารถแยก *M. mucogenicum* ออกจาก *M. fortuitum* ได้ การศึกษาครั้งนี้มีความสำคัญเพราะเชื้อ *M. mucogenicum* แยกความแตกต่าง *M. fortuitum* ได้ยากโดยวิธีทางชีวเคมี

Clarice *et al.* (1998) จัดจำแนกชนิด *Mycobacterium* โดยวิเคราะห์จากโครมาโทแกรมของ mycolic acid ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางร่วมกับวิธีทางชีวเคมี พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *M. avium* complex-MAC, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* และ *M. tuberculosis*

Dandapat *et al.* (1999) ศึกษาการจัดจำแนก และตรวจหา *M. bovis* ด้วยโครมาโทแกรมจากไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยใช้ *M. bovis* 16 สายพันธุ์ ที่แยกมาจากเนื้อเยื่อของโคที่เป็นวัณโรค และ *M. bovis* AN5 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน และยังมีสายพันธุ์อื่น เพื่อเปรียบเทียบในการตรวจหา phenolic glycolipid (PGL) และ phthiocerol dimycocerosate (PDIM) เพื่อระบุจำแนกชนิดของ *M. bovis* อย่างรวดเร็วโดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง แบบ two-dimension โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Lowenstein-Jensen (LJ) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และสกัดไขมันทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ตามวิธีการของ Bligh and Dryer (1995) พบว่าบางสายพันธุ์มีทั้ง PGL และ PDIM และบางสายพันธุ์มี PGL หรือ PDIM เพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองสามารถแยก *M. bovis* ออกจากสายพันธุ์อื่นได้

Khan and Matsuyama (1999) แยกความแตกต่างของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 4 สกุล ได้แก่ *Burkholderia* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (ชื่อเดิม *P. rubrisubalbicans*) และ *P. syringae* โดยทำการสกัดไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล ได้อย่างชัดเจน และโครมาโทแกรมที่ได้จากการทำในแบคทีเรียสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์มีความแตกต่างกันน้อยมาก เช่น ใน *Burkholderia gladioli*, *B. glumae*, *B. platarii* และ *B. vandii* ได้รูปแบบโครมาโทแกรมที่คล้ายคลึงกันมาก

Furuya *et al.* (2000) แยกแบคทีเรียจากดอกไม้มัน (Eustoma grandioflora) ที่เป็นโรคเหี่ยวในแถบประเทศอเมริกาใต้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *B. caryophylli* ซึ่งมีผลให้ดอกไม้มันเหี่ยว และใบไม้มันทั้งหมดมีสีเหลืองโดยใช้วิธี PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ร่วมกับวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบว่าเมื่อนำมาทำ cross section บริเวณลำต้นเนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) เป็นสีเหลืองออกน้ำตาล และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง เชื้อที่แยกได้ให้ผลโครมาโทแกรมเหมือนกับ *B. caryophylli* และแตกต่างจาก *B. gladioli* pv. *gladioli* และ *B. glumae* ซึ่งผลที่ได้สัมพันธ์กับคุณสมบัติทางชีววิทยา และทางการ

ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้ผลจากการทำวิธี RFLP แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้เป็นชนิดเดียวกับ *B. caryophylli* และได้ศึกษาในแบคทีเรีย *A. tumefaciens* biovar 1 ที่เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรค crown gall ในรากพืชใบยาสูบ โดยแยกเชื้อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ จากสวนใบยาสูบในบริเวณรากที่เกิดโรค crown gall และแยกสปีชีส์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกับ *A. tumefaciens* และแตกต่างกับ *A. rhizogenes* biovar 2

Lee *et al.* (2001) ตรวจวิเคราะห์หากรดอินทรีย์ในการจัดจำแนก *Bifidobacteria* ในระดับสกุลด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ของสายพันธุ์ *Bifidobacterium* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. longum*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* และ Lactic Acid Bacteria อีก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* และ *S. lactis* โดยที่ lactic acid จะแสดงจุดสีแดง 2 จุด ส่วน acetic acid จะเห็นเป็นจุดสีน้ำเงิน ซึ่งกรดอินทรีย์แต่ละตัวจะมีค่า R_f ต่างกัน ซึ่งเชื้อ *Bifidobacterium* จะเห็น lactic acid สีแดง 2 จุด และ acetic acid สีน้ำเงิน 1 จุด แต่ Lactic Acid Bacteria จะเห็นแต่ lactic acid สีแดง 2 จุดเท่านั้น ซึ่งทำให้แยกสายพันธุ์ *Bifidobacterium* ออกจาก Lactic Acid Bacteria อื่นได้ โดยการตรวจสอบกรดอินทรีย์ที่เชื้อสามารถสร้างได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถแยกเชื้อ *Bifidobacterium* ต่างสปีชีส์กันออกจากกันได้ (การทดลองดังกล่าวมุ่งเน้นไปที่ระดับสกุลเท่านั้น)

Mutsuyama *et al.* (1987) ศึกษาการใช้โคโลนีของแบคทีเรียมาทำโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางโดยตรง โดยนำโคโลนีแบคทีเรียมาวางบนแผ่นซิลิกาเจลเพลต และนำไป develop ใน chloroform:methanol (2:1,v/v) หลังจากปล่อยให้แห้งแล้วไป develop ต่อใน chloroform:methanol:5M ammonia (80:25:4) โครมาโตแกรมที่ได้บ่งชี้ถึงลักษณะขององค์ประกอบของไขมันในแบคทีเรีย ผลที่ได้สามารถแยก *Serratia marcescense* สายพันธุ์กลายออกจาก *S. marcescense* สายพันธุ์เดิมได้ ต่อมาได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ *S. marcescens* ที่กลายพันธุ์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยทำการ develop เช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวข้างต้น ผลการศึกษาที่ได้พบว่าแสดงให้เห็นไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์แบคทีเรียซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความบกพร่องทางพันธุกรรมได้

Boonsuebsakul *et al.* (2006) ศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ด้วยโครมาโทแกรมอะมิโนลิพิด ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง เปรียบเทียบกับ *Bacillus* sp. 20 สายพันธุ์ จาก 11 สปีชีส์ พบว่าส่วนใหญ่โครมาโตแกรมของ *Bacillus* sp. จะคล้ายกัน และค่อนข้างแตกต่างจากโครมาโทแกรมของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *R. solanacearum* (*P. solacearum*) จุดที่เห็นได้ชัด คือ จุดที่ R_f 0.36 จะปรากฏอย่างชัดเจน และจุดที่มีค่า R_f ใกล้เคียง 0.70 จะปรากฏให้เห็นไม่ค่อยชัดเจน อย่างไรก็ตามสารประกอบไขมันของแต่ละสายพันธุ์จะมีโครมาโทแกรมของอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.68, 0.63, 0.52, 0.36, 0.27, 0.19, 0.14 และ 0.05 ตามลำดับ โครมาโตแกรมของ *B. subtilis* จะแตกต่างจาก โครมาโทแกรมของ *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. brevis* และ *B. alvei* ขณะที่โครมาโทแกรมของ *B. alvei* จะแตกต่างจากโครมาโทแกรมของ *Bacillus* สปีชีส์อื่นดังกล่าวมาแล้ว ซึ่งข้อมูลนี้สนับสนุนข้อมูลก่อนหน้านี้ที่มีผู้ศึกษาความแตกต่างในลำดับเบสของ 16S rRNA และเปลี่ยนชื่อ *B. alvei* เป็น *Paenibacillus alvei* (Ash *et al.*, 1994)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียในการทดลองนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์ แบคทีเรียแกรมบวกสกุลอื่น 4 สกุล จำนวน 8 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบสกุลอื่น 4 สกุล จำนวน 6 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) และ *Bacillus* sp. ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้อีก 6 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 รายชื่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์	ที่มา
1.1 แบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> sp.	
1.1.1 กลุ่ม IA	
<i>B. megaterium</i>	
ATCC 14581 ^T ,	TISTR
DSM 3228 DMKU 78100	สุรางค์ สุธิราชู, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
DMKU OriBa-4-2 DMKU	วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
OriBa 12 DMKU OriBa 14-2	
DMKU OriBa 15-2 DMKU 6482	
(2)/2 DMKU OriBa-5-1	
DMKU OriBa-5-2 DMKU C1	
DMKU C5 DMKU C6 DMKU	
C7 DMKU 1234 (3)/1 ExIII1	
<u>กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย</u>	
<u>คาร์โบไฮเดรต</u> ; P001 P002 P007	Mungmanakij (2006)
P008 P009 P011 P021 P029	
K002 K003 K004 K005 K009	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	ที่มา
K014 K018 K024 P028	
<u>กลุ่มที่สามารถละลายฟอสเฟต</u>	
<u>อินทรี</u>	
DMKU A228 DMKU	นิจกาล (2550)
C216 DMKU C46 DMKU C411	
KORP 16 KORP 17 KORP 23	
KORP 24 T1RP 13 T2RP 13	
BKRP 5 BKRP 10 LDD4	สิรินันท์ (2550)
<i>B. flexus</i>	
DSM 1320 ^T	TISTR
<i>B. simplex</i>	
DSM 1321 ^T	TISTR
<i>B. cereus</i>	
DMKU Bc.33 DMKU Bc.34	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
DMKU Bc.51.9 DMKU Bc.52.1	วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
DMKU Bc.52.6 DMKU Bc.53.5	
<i>B. mycoides</i>	
DMKU C3	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
	วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. thuringiensis</i>	
JC397 JC349 JC421	จริยา จันทระไพแสง
Fong 182 Fong 183 Fong 184	กรมวิชาการเกษตร
F-72 KJP3A KJP3B KJP4A	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
KJP4B	วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
P006 P010 P012 P023	Mungmanakij (2006)
P024 P026 P027 P030 P031	
P033 K006 K011 K015 K026	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	ที่มา
K031 K032 K033	Mungmanakij (2006)
1.1.2 กลุ่ม IB	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	
DSM 7 ^T	TISTR
ekos1 ekos2 DMKU A1 DMKU A6 DMKU HA1 DMKU HA4 DMKU HA6 DMKU HA8 DMKU HB2/3 DMKU HB3/4 DMKU HB4 DMKU HB5/7 DMKU HB7	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
P014 P016 P018 K021 K027 P020 K016 K019	Mungmanakij (2006)
<i>B. atrophaeus</i>	
DSM 5151 ^T	TISTR
DMKU HA2 DMKU HA7 DMKU HA9 DMKU HA10 DMKU HA11	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. badius</i>	
TE1	นันทนา สีสุข, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. firmus</i>	
K029	Mungmanakij (2006)
LDD7 LDD9	สิรินันท์ (2550)
<i>B. licheniformis</i>	
TISTR 1109 TISTR 1110	TISTR
P013 P015 P017 P019 K008 K013 K025	Mungmanakij (2006)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	ที่มา
LDD2	สิรินันท์ (2550)
<i>B. marisflavi</i>	
TF-11	ศวพร ศุภพล, ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. mojavensis</i>	
TISTR 1047 ^T	TISTR
<i>B. pumilus</i>	
ATCC 7061 ^T	TISTR
KJP(1)/8 DMKU A2	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. subtilis</i>	
ATCC 6051 ^T	TISTR
DMKU A3 DMKU A5	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
DMKU A7(2) DMKU HA3	วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
DMKU HA8 ExIV6 Ex III1	
ExIII	
LDD1 LDD3a LDD3b	สิรินันท์ (2550)
1.1.3 กลุ่ม II	
<i>B. circulans</i>	
JCM 2504	วรรณ มาลาพันธ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>Brevibacillus choshiensis</i>	
TB2	นันทนา สีสุข, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>B. sporothermodurans</i>	
SB4	นันทนา สีสุข, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	ที่มา
<i>Paenibacillus polymyxa</i> N-10	สุรางค์ สุธิราวุธ, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
1.1.4 กลุ่ม III	
<i>B. fusiformis</i> TISTR 1049 ^T	TISTR
<i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 ^T K022	TISTR Mungmanakij (2006)
1.2 แบคทีเรียแกรมบวกอื่น	
<i>Corynebacterium glutanicum</i>	สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>Micrococcus luteus</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Micrococcus sp.</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Sarcina lutea</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Staphylococcus aureus</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Staphylococcus intermedius</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Staphylococcus simulans</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
1.3 แบคทีเรียแกรมลบอื่น	
<i>Burkholderia cepacia</i> 343-4 356-5	สุรางค์ สุธิราวุธ, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
<i>Escherichia coli</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ภาควิชาจุลชีววิทยา

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	ที่มา
<i>Erwinia carotovora</i>	
486-4 493	สุรางค์ สุทธิราช, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมายเหตุ ATCC = American Type Culture Collection

DMKU = Department Microbiology, Kasetsart University

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

JCM = Japan Collection of Microorganisms

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

^T = type strain

ตารางที่ 6 แบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้

สายพันธุ์	ที่มา
No.1, No.2, No.3 และ No.4	อาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์
N3A	ตัวอย่างน้ำหล่อเย็น
TB 015	ไส้ดั่งไก่

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (ภาคผนวก ก)

- 2.1 Nutrient agar (NA)
- 2.2 Nutrient broth (NB)
- 2.3 King B medium
- 2.4 Extraction solvent
- 2.5 Mobile solvent
- 2.6 Ninhydrin spray
- 2.7 Molybdenum blue

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1 Silica gel TLC plate ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร (Silica gel 60F₂₅₄, Merck, Germany)
- 3.2 TLC chamber
- 3.3 Incubator อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส
- 3.4 tips ขนาด 20 µl
- 3.5 เครื่องเป่าลมขนาดพอเหมาะ (220 วัตต์)
- 3.6 ขวดสีชา
- 3.7 กระดาษกรอง
- 3.8 ตู้ดูดควันพิษ
- 3.9 ตู้อบไอร้อน 100 °C (Hot air oven)
- 3.10 เครื่องคอมพิวเตอร์ และ scanner

3.11 อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เช่น กล้องจุลทรรศน์ เครื่องวัดพีเอช ปีเปต ลูกยาง ปีกเกอร์ กระบอกตวง และเครื่องชั่งสาร เป็นต้น

วิธีการ

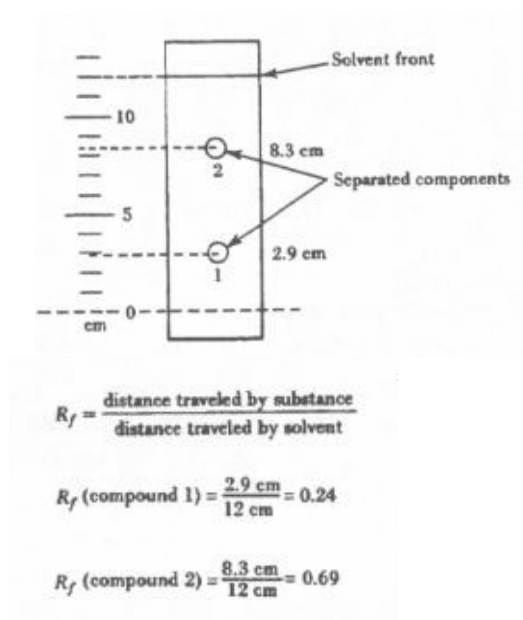
1. การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสกุลอื่นโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง และศึกษาชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp.

1.1 การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสกุลอื่นโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง (ดัดแปลงจากวิธีการของ Matsuyama *et al.*, 2003)

เลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหาร King B medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ลงในบริเวณก้นหลอดขนาด 1.4 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด เติม extraction solvent (Chloroform-methanol-0.3% NaCl, 2:1:0.2, v:v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คนด้วยเข็มเขี่ยเชื้อเพื่อให้เซลล์กระจายตัว ไม่จับกันเป็นก้อน จากนั้นปิดฝาให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที จะเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น โดยสารละลายชั้นบนเป็นส่วนของ methanol ซึ่งกากเซลล์จะอยู่ในชั้นนี้ ส่วนสารละลายชั้นล่างใสเป็นส่วนของ chloroform ซึ่งจะมีไขมันละลายอยู่ จากนั้นใช้ tip ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่อยู่ในชั้นของ chloroform ปริมาตร 15 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นซิลิกาเจลขนาด 10 x 10 เซนติเมตร (Silica gel 60F₂₅₄, Merck, Germany) ทั้งหมด 4 ครั้ง หรือ 60 ไมโครลิตร โดยต้องทำการจุด (spot) ให้มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร ระหว่างในการจุดแต่ละครั้งให้ใช้เครื่องเป่าลมเป่า โดยใช้ลมเย็น เพื่อให้สารละลายที่จุดลงไปซึมเข้าไปในแผ่นซิลิกาเจลได้เร็วขึ้น ทำให้จุดที่ได้ไม่กระจายตัวมากเกินไป และเพื่อไม่ให้ไขมันเสียสภาพ จากนั้นเอาแผ่นซิลิกาเจลที่ทำเสร็จแล้ว ใส่ลงใน TLC chamber ที่ใส่สาร mobile solvent (Chloroform-methanol-0.2%CaCl₂, 55:35:8, v:v) ปริมาตร 100 ถึง 125 มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ TLC chamber ที่ใช้) แต่ต้องให้ท่วมสูงจากด้านล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 0.5 ถึง 1 เซนติเมตร) และล้อมรอบด้วยกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย mobile solvent โดยจะใช้บีบเปิดดูแล้วฉีดที่กระดาษให้ทั่ว ทา vaseline ทั้งที่ปาก และขอบฝาของ chamber แล้วปิดฝาให้สนิท (ทำในตู้ดูดควัน) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิธีการนี้ดัดแปลงจาก Matsuyama *et al.* (2003) ในเรื่องของการบ่มเลี้ยงเชื้อจาก 48 ชั่วโมง เป็น 24 ชั่วโมง เนื่องจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างสปอร์ ในการทดลองจึงทำการสกัดไขมันในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งยังไม่มี การสร้างสปอร์ และในการทดลองยังใช้แผ่นซิลิกาเจลที่มีขนาดเล็กกว่า Matsuyama *et al.* (2003)

นำแผ่นซิลิกาเจลออกมาวางเอียงไว้ในตู้ดูดควันเพื่อปล่อยให้แห้งประมาณ 2 ถึง 3 นาที แล้วจึงฉีดพ่นด้วย 0.3% ninhydrin spray ให้ทั่วแผ่นแล้วนำไปเข้าตู้อบไอร้อน (hot air oven) ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นเป็นแถบจุดสีชมพูแดงปรากฏขึ้น ซึ่งเกิดจากโมเลกุลของ ninhydrin 2 โมเลกุลทำปฏิกิริยากับหมู่เอมิโนที่เกาะอยู่กับโมเลกุลของไขมันที่คาร์บอนตำแหน่งแอลฟา จากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจลที่ปรากฏผลการทดลอง ไปวัดระยะห่างเพื่อหาค่า R_f และบันทึกข้อมูลเก็บผล (ภาพที่ 5)

การคำนวณหาค่า R_f หาได้จาก $R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$



ภาพที่ 5 การวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่า R_f

ที่มา: Anonymous (2009).

1.2 การศึกษาชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง

ทำเช่นเดียวกับการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดโดยใช้โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง แต่เปลี่ยนจากการฉีดพ่นด้วยสารละลาย ninhydrin เป็นสารละลาย molybdenum blue เพื่อใช้ทดสอบชนิดของฟอสโฟลิพิด โดยจะเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่าง molybdate กับ phosphate เกิดเป็น

สารประกอบ phospholipid-molybdate complexes (Galanos, 1970) หลังจากพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue แล้วให้นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะปรากฏจุดสีน้ำเงินขึ้น

2. การประยุกต์ใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ไม่สมบูรณ์ และแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น โดยใช้เข็มเย็บเชื้อแยกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ไม่สมบูรณ์ และแยกเชื้อจากอาหาร WYO ซึ่งเป็น selective media เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ *Legionella* sp. จากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างๆ กัน จีกลงบนอาหาร NA แบบ cross streak บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเชื้อแยกแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมา cross streak บน NA จนกระทั่งได้เชือบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้บน NA ผิวเอียง (slant) ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนแบคทีเรียที่แยกจากไส้ดิงไก่นั้นได้ทำการแยกเชื้อไว้ก่อนแล้ว (จากโครงการพัฒนาการผลิตโปรไบโอติกส์เพื่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่เนื้อ) จากนั้นทำเช่นเดียวกับการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ดังที่กล่าวไปแล้วในข้อ 1.1 โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง จากนั้นจึงตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิดแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

การจำแนกชนิดโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant บ่มเชือนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) ศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของเชือบริสุทธิ์ โดยการตรวจลักษณะการเจริญ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วย ขนาด รูปร่าง การติดสีแกรมบวก หรือแกรม variable การมีเอนโดสปอร์ การมีเกรนูล และการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการใช้ซิเตรท และโพर्फิโรเนต การสร้างเอนไซม์เลซิทีเนส การสร้างเอนไซม์ไปย้อยสลายแป้ง เคซีน และเจลาติน การรีดิวส์ในเตรท การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต เช่น ดี(+)-กลูโคส, แอล(-)-อะราบิโนส, ดี(+)-ไซโลส, ดี(+)-แมนนิทอล และแลคโตส เป็นต้น ตามวิธีการของ Gordon (1989) ตรวจและบันทึกผลเป็นผลบวกหรือลบ

ผลและวิจารณ์

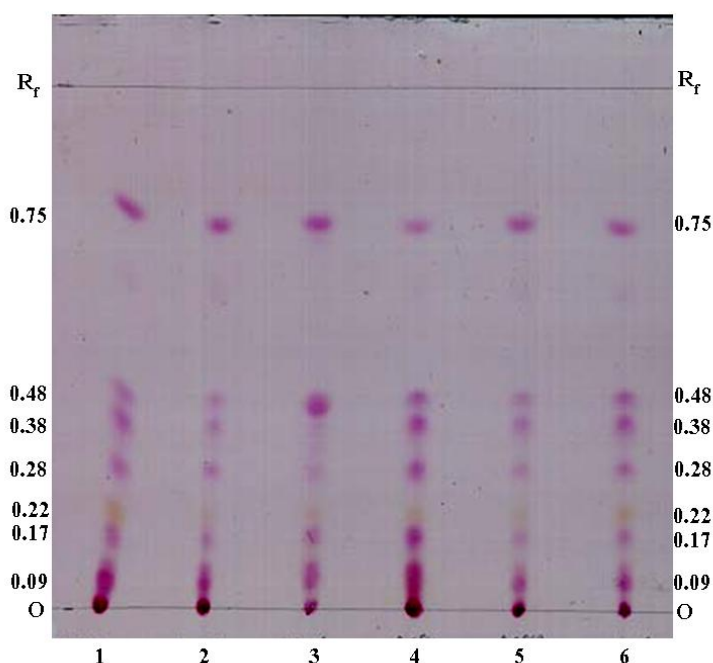
1. การศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และเปรียบเทียบกับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุลอื่น โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง และศึกษาชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp.

1.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียสกุลอื่น

การศึกษารังนี้มีแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์ โดยแบ่งตามเกณฑ์ที่ Gordon (1989) ได้อธิบายไว้ตามรูปร่างลักษณะของสปอร์ได้กลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่ม IA 83 สายพันธุ์ 6 สปีชีส์ กลุ่ม IB 59 สายพันธุ์ 9 สปีชีส์ กลุ่ม II 4 สายพันธุ์ 4 สปีชีส์ และกลุ่ม III 3 สายพันธุ์ 2 สปีชีส์ ซึ่งผลจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดจาก *Bacillus* sp. ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ อ่านผลจากจำนวนจุดที่ปรากฏในแต่ละค่า R_f โดยไม่คำนึงถึงความเข้มจางของจุดที่ปรากฏ เนื่องจากการศึกษารังนี้ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 ลูก ซึ่งอาจทำให้ได้ปริมาณเซลล์ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงอ่านผลในเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) เหตุผลที่ไม่อ่านผลในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) นั้น เนื่องจากองค์ประกอบของไขมันจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน เจริญและเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกัน แม้จะทดลองในห้องทดลองเดียวกันก็ตาม พบว่าอาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น พิเศษของอาหารเลี้ยงเชื้อ องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ เป็นต้น ดังนั้นควรพิจารณาจากชนิดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย และค่า R_f ที่แสดงนี้เป็นค่าที่วัดได้จากการเฉลี่ยในการทดลอง เนื่องจากการที่จะทำให้ค่า R_f เท่ากันทุกครั้งนั้นอาจทำได้ยาก เนื่องจากค่า R_f ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ธรรมชาติของแอดซอร์เบนท์ (เช่น ขนาดอนุภาคของพื้นที่ผิว) ธรรมชาติของเฟสเคลื่อนที่ (เช่น ความบริสุทธิ์ของตัวทำละลาย ความถูกต้องของการผสม ปริมาณความชื้น และการระเหย) อุณหภูมิขณะทำการทดลอง ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ เป็นต้น ซึ่งแก้ไขได้โดยการทำเทียบกับตัวแทนมาตรฐานทุกครั้ง (Lechevalier, 1989) ผลที่ได้แสดงดังนี้

1.1.1 *Bacillus* sp. กลุ่ม IA ประกอบด้วย *B. megaterium* 46 สายพันธุ์ *B. flexus* 1 สายพันธุ์ *B. simplex* 1 สายพันธุ์ *B. cereus* 6 สายพันธุ์ *B. thuringiensis* 28 สายพันธุ์ และ *B. mycoides* 1 สายพันธุ์ โดยรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. กลุ่มนี้แสดงดังต่อไปนี้

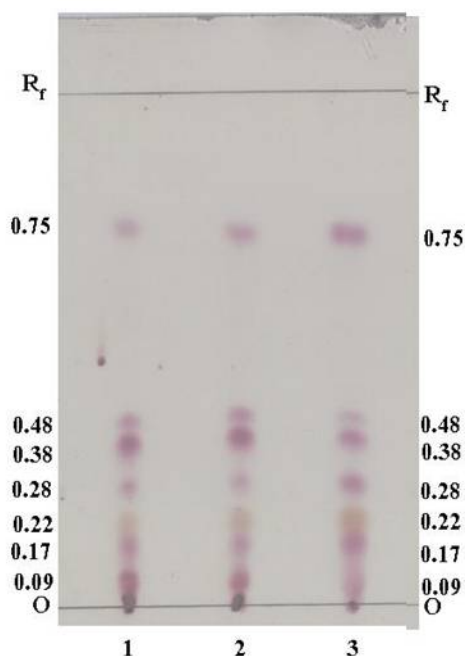
1.1.1.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*



ภาพที่ 6 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* ATCC 14581^T, lane 2: *B. megaterium* DSM 3228, lane 3: *B. megaterium* DMKU 78100, lane 4: *B. megaterium* KORP16, lane 5: *B. megaterium* C411 และ lane 6: *B. megaterium* T2RP13

จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่าอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ที่เป็น type strain และ *B. megaterium* จากแหล่งต่างๆ มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ อีก 40 สายพันธุ์ก็ให้ผลสอดคล้องกัน (ดังแสดงภาพไว้ในภาพผนวกที่ ก1-ก10) *B. megaterium* ทั้ง 46 สายพันธุ์นี้ ครอบคลุมทั้งสายพันธุ์ที่เป็น type strain (ATCC 14581^T), DSM 3228 ซึ่งมีที่มาจากประเทศรัสเซียตลอดจน *B. megaterium* ที่แยกจากดินในประเทศต่างๆ หลายแหล่ง ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้มีความแตกต่างทางชีวเคมี และสรีรวิทยา ในเรื่องของการรีดิวส์ในเตรท ความสามารถในการเจริญที่พีเอช 4.5 ความสามารถในการย่อยสลาย คาร์โบฟูแรน ความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ (ตารางภาคผนวกที่ ข1-ข4) แสดงให้เห็นเอกลักษณ์ของ *B. megaterium* แม้ว่าจะมีความแตกต่างกันก็พบรูปแบบอะมิโนลิพิดแบบเดียวกัน คุณสมบัตินี้จึงอาจใช้เป็น phenotypic characteristic อีกข้อหนึ่งที่จะช่วยเสริมการจำแนกของแบคทีเรียสปีชีส์นี้ให้ชัดเจนขึ้น

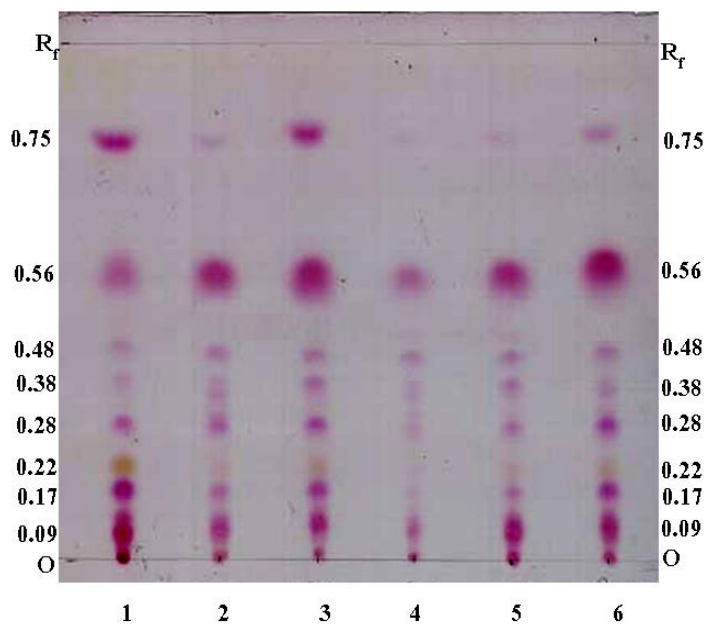
1.1.1.2 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. flexus* และ *B. simplex*



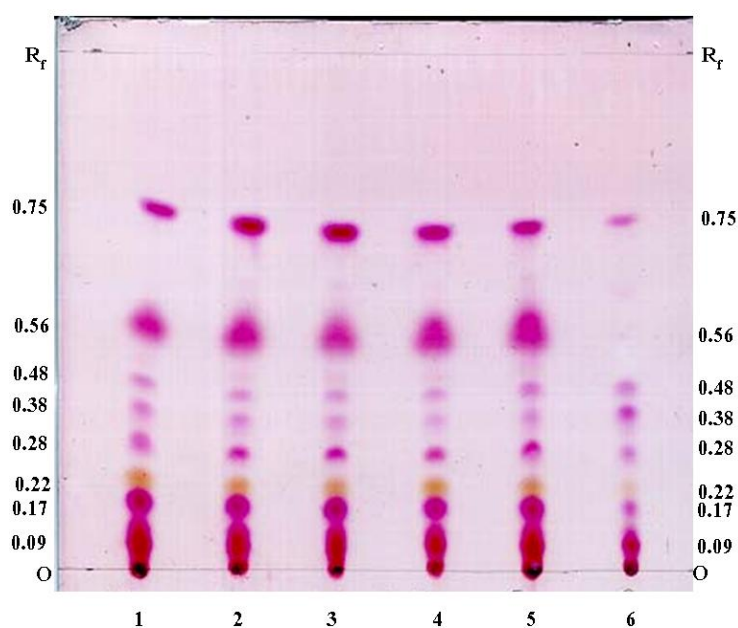
ภาพที่ 7 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. simplex* และ *B. flexus* เปรียบเทียบกับ *B. megaterium* ;
 lane 1: *B. megaterium* ATCC 14581^T, lane 2: *B. flexus* DSM 1320^T และ lane 3:
B. simplex DSM 1321^T

จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่านอกจาก *B. megaterium* แล้ว *B. flexus* DSM 1320^T (lane 2) *B. simplex* DSM 1321^T (lane 3) ก็พบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ R_f เดียวกัน คือ 0.09 0.17 0.22 0.28 0.38 0.48 และ 0.75 ตามลำดับ ซึ่งการที่ *B. flexus* DSM 1320^T และ *B. simplex* DSM 1321^T พบรูปแบบอะมิโนลิพิดเหมือนกับที่พบใน *B. megaterium* ยิ่งแสดงให้เห็นความใกล้เคียงของแบคทีเรียทั้ง 3 สปีชีส์นี้อย่างเด่นชัด สนับสนุนข้อมูลที่ *B. flexus*, *B. simplex* เคยจัดอยู่ใน *B. megaterium* มาก่อน (Sneath, 1986 และ Priest *et al.* 1988)

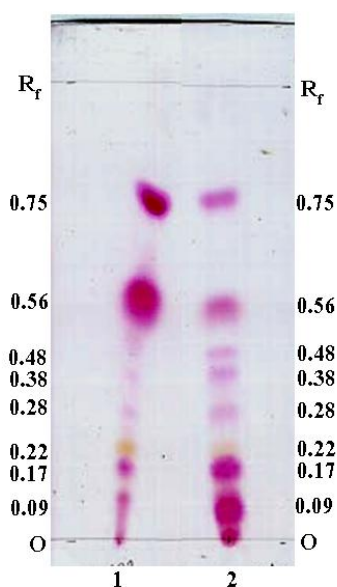
1.1.1.3 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. cereus*, *B. mycoides* และ *B. thuringiensis*



ภาพที่ 8 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. cereus*, lane 1; *B. cereus* DMKU Bc.33, lane 2; *B. cereus* DMKU Bc.34, lane 3; *B. cereus* DMKU Bc.51.9, lane 4; *B. cereus* DMKU Bc.52.1, lane 5; *B. cereus* DMKU Bc.52.6 และ lane 6; *B. cereus* DMKU Bc.53.5



ภาพที่ 9 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis* เปรียบเทียบกับ *B. megaterium*, lane 1; *B. thuringiensis* JC397, lane 2; *B. thuringiensis* JC421, lane 3; *B. thuringiensis* Fong 182, lane 4; *B. thuringiensis* Fong 183, lane 5; *B. thuringiensis* F-72 และ lane 6; *B. megaterium* ATCC 14581^T

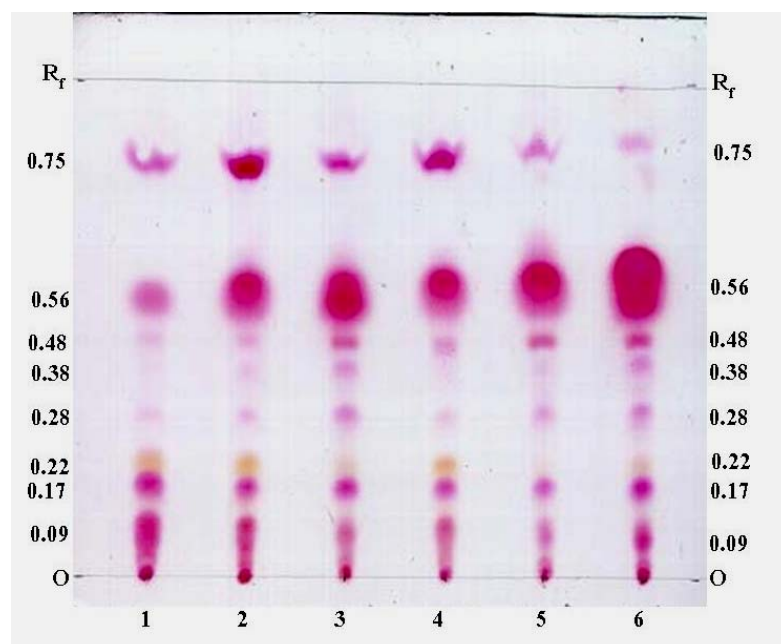


ภาพที่ 10 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. mycoides* DKMU C3 เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis*, lane 1; *B. thuringiensis* JC397 และ lane 2; *B. mycoides* DMKU C3

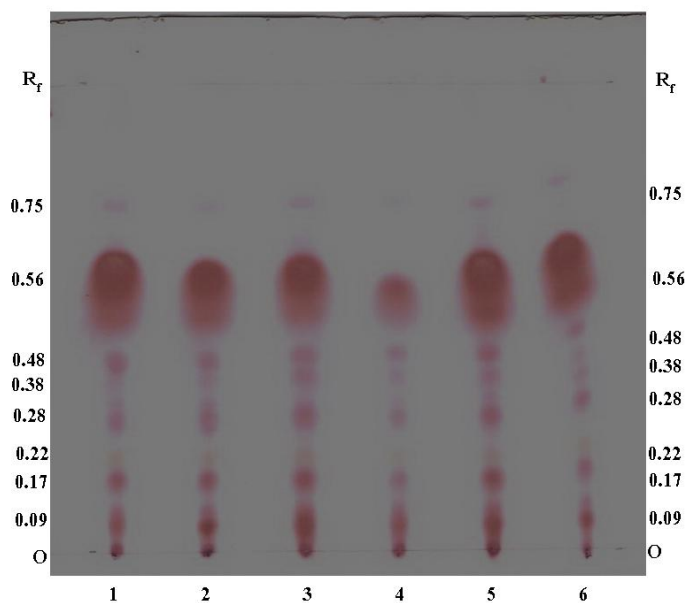
จากภาพที่ 8 ถึง 10 จะเห็นว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. cereus*, *B. mycoides* และ *B. thuringiensis* (ภาพบางส่วนจัดไว้ในภาพผนวกที่ ก11-ก15) มีความคล้ายคลึงกันหมด เนื่องจากมีอะมิโนลิพิดที่จุด R_f เท่ากับ 0.09 0.17 0.22 0.28 0.38 0.48 0.56 และ 0.75 ซึ่งจุด R_f เท่ากับ 0.56 มีขนาดใหญ่ และชัดเจนกว่าจุดอื่น ซึ่งมีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่แตกต่างไปจากกลุ่ม *B. megaterium* ที่ไม่พบจุด R_f 0.56 ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ใกล้ชิดของแบคทีเรียในกลุ่ม *B. cereus* นี้เพราะทั้ง *B. cereus*, *B. mycoides* และ *B. thuringiensis* เป็นสปีชีส์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกันมาก หากเปรียบเทียบโดยวิธีดั้งเดิม หรือแม้กระทั่งลำดับเบสของ 16S rRNA ก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระหว่าง 3 สปีชีส์นี้ได้ (Sacchi *et al.*, 2002)

1.1.2 *Bacillus* sp. กลุ่ม IB ประกอบด้วย *B. subtilis* 12 สายพันธุ์ *B. mojavensis* 1 สายพันธุ์ *B. atrophaeus* 6 สายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* 22 สายพันธุ์ *B. pumilus* 3 สายพันธุ์ *B. licheniformis* 10 สายพันธุ์ *B. firmus* 3 สายพันธุ์ *B. marisflavi* 1 สายพันธุ์ และ *B. badius* 1 สายพันธุ์ โดยรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. กลุ่มนี้แสดงดังต่อไปนี้

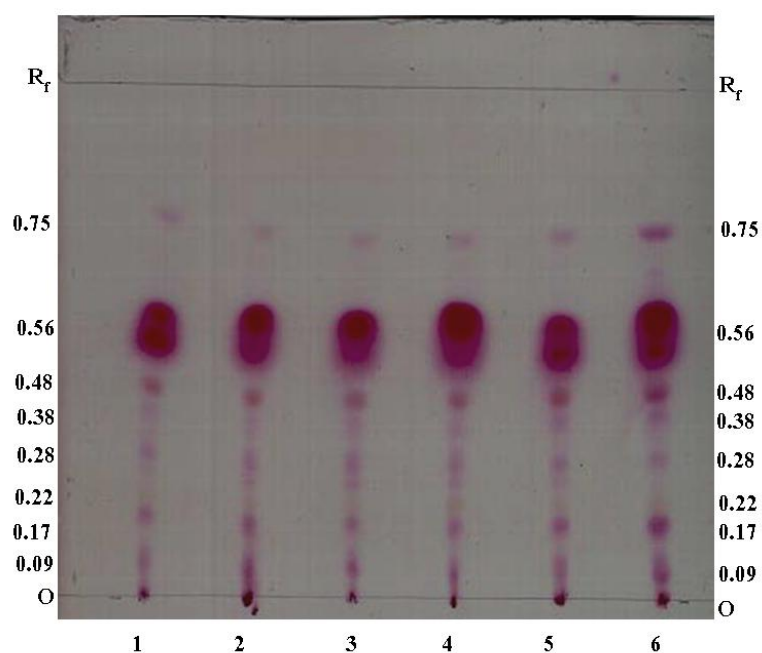
1.1.2.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*,
B. amyloliquefaciens, *B. pumilus*, *B. licheniformis* และ *B. firmus*



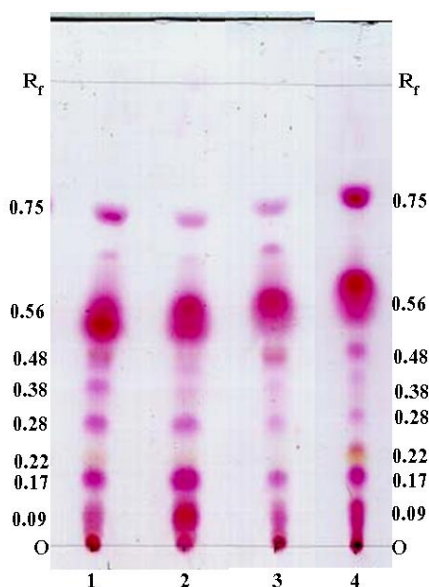
ภาพที่ 11 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. subtilis*, lane 1; *B. subtilis* ATCC 6051^T, lane 2;
B. subtilis ATCC 6051^T, lane 3; *B. subtilis* DMKU A3, lane 4; *B. subtilis* DMKU A5,
lane 5; *B. subtilis* DMKU A7 (2) และ lane 6; *B. subtilis* DMKU HA3



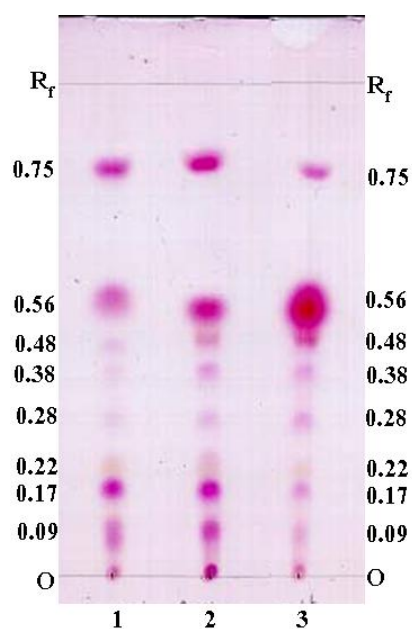
ภาพที่ 12 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. atrophaeus*, lane 1; *B. atrophaeus* DSM 5151^T, lane 2; *B. atrophaeus* DMKU HA2, lane 3; *B. atrophaeus* DMKU HA7, lane 4; *B. atrophaeus* DMKU HA9, lane 5; *B. atrophaeus* DMKU HA10 และ lane 6; *B. atrophaeus* DMKU HA11



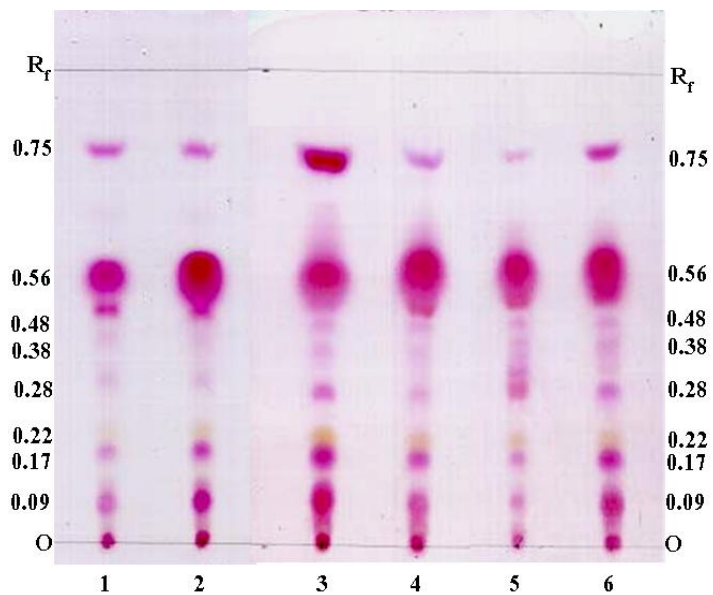
ภาพที่ 13 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. amyloliquefaciens*, lane 1; *B. amyloliquefaciens* ekos1, lane 2; *B. amyloliquefaciens* ekos2, lane 3; *B. amyloliquefaciens* DMKU HA1, lane 4; *B. amyloliquefaciens* DMKU HA4, lane 5; *B. amyloliquefaciens* DMKU HA6 และ lane 6; *B. amyloliquefaciens* DMKU HA8



ภาพที่ 14 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. firmus* และ *B. mojavensis*, lane 1; *B. firmus* K029, lane 2; *B. firmus* LDD7, lane 3; *B. firmus* LDD9 และ lane 4; *B. mojavensis* TISTR 1047^T



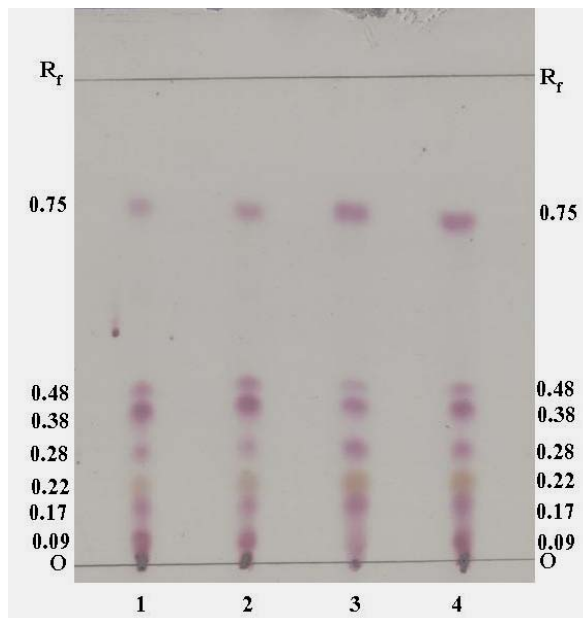
ภาพที่ 15 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. pumilus*, lane 1; *B. pumilus* ATCC 7061^T, lane 2; *B. pumilus* KJP1/(8) และ lane 3; *B. pumilus* DMKU A2



ภาพที่ 16 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. licheniformis*, lane 1; *B. licheniformis* TISTR 1109, lane 2; *B. licheniformis* TISTR 1110, lane 3; *B. licheniformis* P013, lane 4; *B. licheniformis* P015, lane 5; *B. licheniformis* P017 และ lane 6; *B. licheniformis* P019

รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. mojavensis* และ *B. licheniformis* ซึ่งแสดงไว้ในภาพที่ 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 (ภาพบางส่วนแสดงไว้ในภาพผนวกที่ ก16-ก21) แสดงให้เห็นว่าสปีชีส์ที่กล่าวมาทั้งหมดมีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เดียวกับที่พบใน *B. cereus* และสายพันธุ์ใกล้เคียง ดังได้อธิบายไว้ในข้อ 1.1.1.3 โดยทุกสปีชีส์มีจุด R_f 0.56 ที่มีขนาดใหญ่และชัดเจนกว่าจุดอื่นดังเช่นที่พบในกลุ่ม *B. cereus* นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าขนาดของจุด R_f 0.56 จะมีขนาดใหญ่ไม่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่น องค์ประกอบของอาหาร พีเอชของอาหาร หรือการสุ่มโหลตัวอย่างสารที่ค่า R_f เท่ากับ 0.56 น้อยเกินไป แต่จุดดังกล่าวก็ยังเป็นจุดที่เห็นได้ชัดที่สุด ผลที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลที่ *B. mojavensis*, *B. atrophaeus* และ *B. amyloliquefaciens* เคยจัดอยู่ใน *B. subtilis* มาก่อนดังข้อมูลของ Nakamura (1987) และ Robert *et al.* (1994)

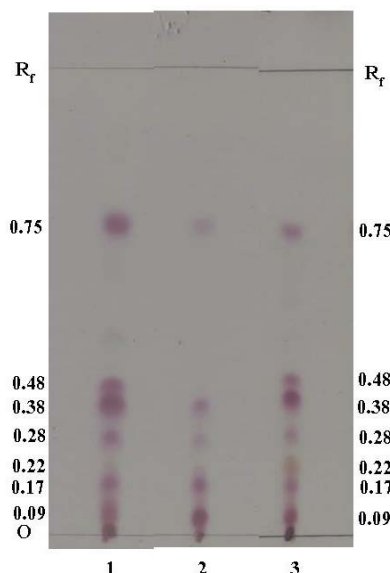
1.1.2.2 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. marisflavi* และ *B.adius*



ภาพที่ 17 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. marisflavi* TF-11 (lane 4) เปรียบเทียบกับ lane 1:

B. megaterium ATCC 14581^T, lane 2: *B. flexus* DSM 1320^T และ lane 3: *B. simplex* DSM1321^T

มีเพียง 2 สปีชีส์เท่านั้นใน *Bacillus* sp. กลุ่ม IB ที่พบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เดียวกับที่พบใน *B. megaterium* คือ *B. marisflavi* TF-11 และ *B. badius* TE1 จากภาพที่ 17 แสดงอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. marisflavi* สายพันธุ์ TF11 การที่ *B. marisflavi* TF-11 มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่เหมือนกับกลุ่มของ *B. megaterium* อาจเป็นเพราะว่าลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาเบื้องต้นของสปีชีส์นี้แทบไม่แตกต่างกับ *B. megaterium* ข้อแตกต่างที่ชัดเจน คือ แบคทีเรียชนิดนี้มีขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า $1\ \mu\text{m}$ สามารถสร้างรงควัตถุสีชมพูอ่อนในอาหาร nutrient agar และสามารถเจริญได้ในอาหาร nutrient broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *B. megaterium* โดยทั่วไปเจริญได้ใน nutrient broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์บ้างแล้วแต่สายพันธุ์



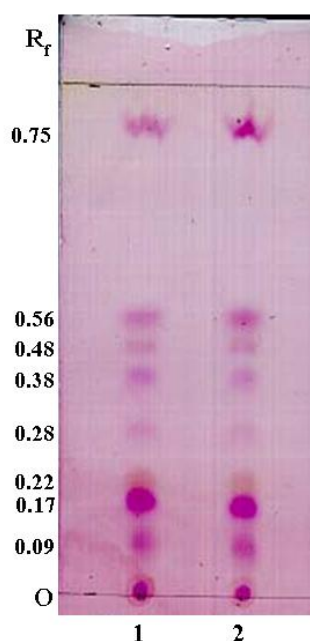
ภาพที่ 18 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. badius* TE1 (lane 2) เปรียบเทียบกับ *B. megaterium* ATCC 14581^T (lane 1) และ *B. marisflavi* TF-11 (lane 3)

ส่วน *B. badius* TE1 มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่คล้ายกับกลุ่ม *B. megaterium* เช่นกันแต่ *B. badius* TE1 ค่า R_f 0.48 จะเห็นจางๆ ดังภาพที่ 18 แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาผลของรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้กับคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *B. badius* TE1 พบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มของ *B. megaterium* ทั้งในเรื่องของขนาดเซลล์มีขนาดเล็กกว่า $0.6\ \mu\text{m}$ ค่าพีเอชที่วัดได้ในอาหาร VP มีค่า 7.12 ซึ่งมากกว่าช่วงพีเอชของ *B. megaterium* และไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล ดี(+)-กลูโคส, แอล(-)-อะราบิโนส, ดี(+)-ไซโลส, ดี(+)-แมนนิทอล และแลคโตสได้เลย เป็นต้น ดังนั้นการที่รูปแบบอะมิโนลิพิดของ *B. badius* TE1 แตกต่างจากสมาชิกอื่นๆ ใน

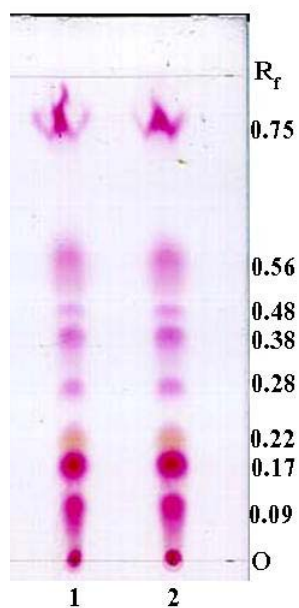
Bacillus กลุ่ม IB จึงเป็นข้อมูลเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิด อย่างไรก็ตามรูปแบบอะมิโนลิพิดชี้ให้เห็นถึงความใกล้ชิดกันของ *B. badius* และ *B. megaterium* ในอีกหนึ่งมุมมอง

1.1.3 *Bacillus* sp. กลุ่ม II ประกอบด้วย *B. circulans*, *B. sporothermodurans*, *Brevibacillus choshiensis* และ *Paenibacillus polymyxa* สปีชีส์ละ 1 สายพันธุ์ แต่ละสปีชีส์แสดงรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบดังต่อไปนี้

1.1.3.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. circulans* และ *B. sporothermodurans*



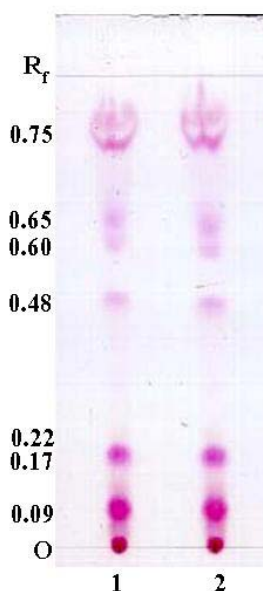
ภาพที่ 19 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. circulans* JCM 2504 (lane 1 และ 2)



ภาพที่ 20 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. sporothermodurans* SB4 (lane 1 และ 2)

จากภาพที่ 19 และ 20 จะเห็นว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. circulans* JCM 2504 และ *B. sporothermodurans* SB4 นั้นจะพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f ต่างๆ เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่ม *B. cereus* และกลุ่ม *B. subtilis* คือ พบจุด R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48, 0.56 และ 0.75 ตามลำดับ

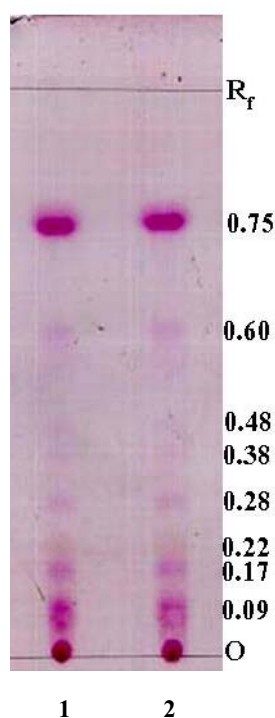
1.1.3.2 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Brevibacillus choshinensis*



ภาพที่ 21 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Brevibacillus choshinensis* TB2 (lane 1 และ 2)

จากภาพที่ 21 จะเห็นว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Brevibacillus choshinensis* TB2 (เดิมชื่อ *Bacillus choshinensis*) แตกต่างจากรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. อื่นๆ ที่กล่าวมา เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.48, 0.60, 0.65 และ 0.75 ตามลำดับ ซึ่งจุด 0.60 และ 0.65 เป็นอะมิโนลิพิดที่ยังไม่พบใน *Bacillus* sp. ใดๆ จึงเป็นเหตุผลให้แยกความแตกต่างกับสปีชีส์อื่นได้ ผลที่ได้จึงสอดคล้องกับการที่แบคทีเรียสปีชีส์นี้ เคยเป็นสมาชิกในสกุล *Bacillus* และแยกออกมาเป็นสกุลใหม่ในปี ค.ศ.1994 ตามรายงานของ Ash *et al.* (1994) เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเพียง 1 สปีชีส์ 1 สายพันธุ์ จาก *Brevibacillus* sp. จึงควรจัดหาแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน หรือต่างสปีชีส์หลายๆ สายพันธุ์ของ *Brevibacillus* sp. มาทดสอบร่วมด้วย จึงจะสามารถบอกแนวโน้มได้ว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดของ *Brevibacillus* sp. แตกต่างจาก *Bacillus* sp. ตามที่กล่าวไปข้างต้น

1.1.3.3 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Paenibacillus polymyxa*

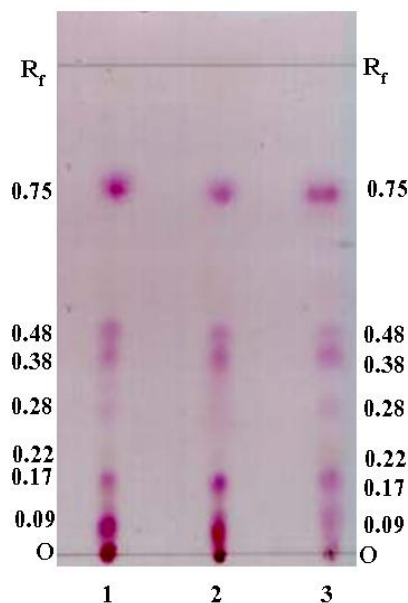


ภาพที่ 22 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Paenibacillus polymyxa* N-10 (lane 1 และ 2)

จากภาพที่ 22 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Paenibacillus polymyxa* N-10 (เดิมชื่อ *Bacillus polymyxa*) พบว่ามีรูปแบบอะมิโนลิพิดคล้ายกับกลุ่มของ *B. megaterium* คือ R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 แต่มีแตกต่างจากกลุ่ม *B. megaterium* เพราะ *Paenibacillus polymyxa* N-10 พบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.60 เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ไม่เหมือนกับ *Bacillus* sp. สปีชีส์ใด ดังกล่าวไปแล้วข้างต้น ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการที่ *B. polymyxa* ถูกจัดใหม่ให้อยู่ในสกุล *Paenibacillus* เป็น *Paenibacillus polymyxa* โดยลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1,393 ถึง 1,437 (Shida *et al.*, 1997) และสอดคล้องกับรายงานของ Boonsuebsakul *et al.* (2006) ที่พบว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดของ *Paenibacillus alvei* มีความแตกต่างจาก *Bacillus* sp. สปีชีส์อื่นๆ จึงเป็นเหตุผลที่ยืนยันความแตกต่างของ *Bacillus* sp. กับ *Paenibacillus alvei* ที่ Ash *et al.* (1994) ได้จัด *Bacillus alvei* อยู่ในสกุล *Paenibacillus*

1.1.4 *Bacillus* sp. กลุ่ม III ประกอบด้วย *B. fusiformis* 1 สายพันธุ์ และ *B. sphaericus* 2 สายพันธุ์ โดยรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. กลุ่มนี้ แสดงดังต่อไปนี้

1.1.4.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. sphaericus* และ *B. fusiformis*



ภาพที่ 23 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. sphaericus* และ *B. fusiformis*, lane 1; *B. sphaericus* ATCC 14577^T, lane 2; *B. sphaericus* K022 และ lane 3; *B. fusiformis* TISTR 1049^T

รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. sphaericus* ATCC 14577^T, *B. sphaericus* K022 และ *B. fusiformis* TISTR 1049^T คล้ายกับที่พบในกลุ่ม *B. megaterium* คือมีจุด R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 ตามลำดับ ดังภาพที่ 23 ซึ่งจุดที่ R_f เท่ากับ 0.28 และ 0.22 เห็นจางๆ อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบโดยวิธีการวิเคราะห์แบบอื่นที่ให้ผลชัดเจนกว่านี้ เมื่อพิจารณาข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของ *B. sphaericus* และ *B. fusiformis* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สปีชีส์นี้ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจาก *B. fusiformis* เป็นสปีชีส์ที่แยกออกจาก *B. sphaericus* ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ *B. fusiformis* สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และเจริญได้ในอาหาร nutrient broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Priest, 1988) การที่พบว่ามีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่คล้ายกันมากจึงช่วยยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย 2 สปีชีส์นี้ได้เป็นอย่างดี

สรุปผลจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยอ่านผลจากจำนวนจุดที่ปรากฏในแต่ละค่า R_f แสดงข้อมูลดังตารางที่ 7 ได้ดังนี้

ตารางที่ 7 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ โดยวัดจากค่า R_f

<i>Bacillus</i> sp. ที่ใช้ทดสอบ	ค่า R_f										
	0.09	0.17	0.22	0.28	0.38	0.48	0.50	0.56	0.60	0.65	0.75
กลุ่ม IA											
<i>B. megaterium</i> (46 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. simplex</i> DSM 1321 ^T	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. cereus</i> (6 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. mycoides</i> DMKU C3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. thuringiensis</i> (28 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
กลุ่ม IB											
<i>B. amyloliquefaciens</i> (22 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. atrophaeus</i> (6 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B.adius</i> TE1	+	+	+	+	+	+	- ^w	-	-	-	+
<i>B. firmus</i> (3 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. licheniformis</i> (10 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. marisflavi</i> TF-11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. mojavensis</i> TISTR 1047 ^T	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. pumilus</i> (3 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. subtilis</i> (12 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

ตารางที่ 7 (ต่อ)

<i>Bacillus</i> sp. ที่ใช้ทดสอบ	ค่า R_f										
	0.09	0.17	0.22	0.28	0.38	0.48	0.50	0.56	0.60	0.65	0.75
กลุ่ม II											
<i>B. circulans</i> JCM 2504	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Brevibacillus choshimensis</i> TB2	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>B. sporothermodurans</i> SB4	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i> N-10	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
กลุ่ม III											
<i>B. fusiformis</i> TISTR 1049 ^T	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. sphaericus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
(2 สายพันธุ์)											

หมายเหตุ + = ปรากฏจุดของอะมิโนลิพิดบนแผ่นซิลิกาเจล

+^w = ปรากฏจุดของอะมิโนลิพิดจางๆบนแผ่นซิลิกาเจล

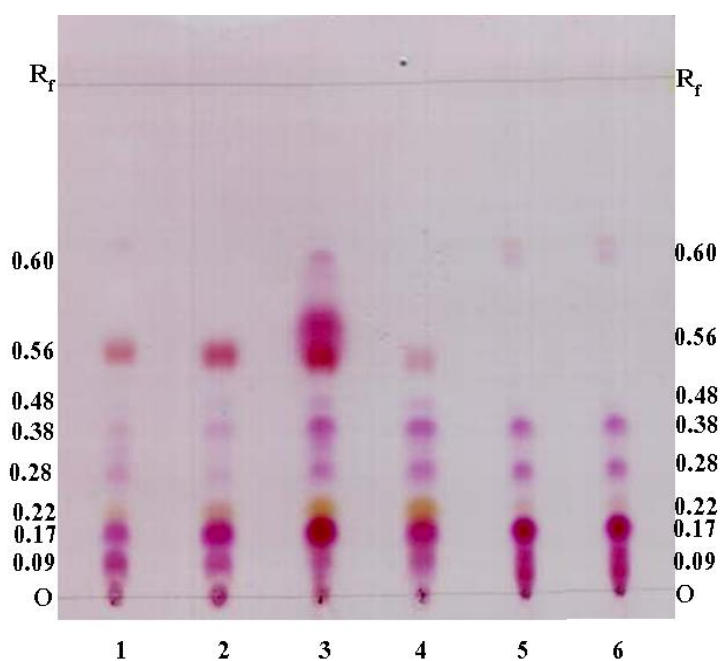
- = ไม่ปรากฏจุดใดๆ บนแผ่นซิลิกาเจล

จากผลการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. ทั้งหมด 149 สายพันธุ์พบว่าทั้งหมดมีอะมิโนลิพิดที่เหมือนกัน 7 จุด ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 ส่วนจุดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.56 นั้นมีทั้งกลุ่มที่มีและไม่มี ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบได้ 2 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.56 และกลุ่มที่ไม่มี R_f 0.56 ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยกลุ่มที่มีค่า R_f 0.56 มีทั้งหมด 12 สปีชีส์ ได้แก่ *B. cereus* 6 สายพันธุ์, *B. mycoides* 1 สายพันธุ์, *B. thuringiensis* 28 สายพันธุ์, *B. subtilis* 12 สายพันธุ์, *B. mojavensis* 1 สายพันธุ์, *B. atrophaeus* 6 สายพันธุ์, *B. amyloliquefaciens* 22 สายพันธุ์, *B. pumilus* 3 สายพันธุ์, *B. licheniformis* 10 สายพันธุ์, *B. firmus* 3 สายพันธุ์, *B. circulans* 1 สายพันธุ์ และ *B. sporothermodurans* 1 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของทั้ง 12 สปีชีส์นี้ พบว่าทุกสปีชีส์ที่กล่าวมา มีการสปอร์เป็นรูปวงรีทั้งหมด ไม่ว่าจะอยู่ต่างกลุ่มกันตามการแบ่งกลุ่มของ Gordon (1989) คือ แม้ว่า *B. cereus*, *B. thuringiensis* และ *B. mycoides* จะอยู่กลุ่ม IA ขณะที่ *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* และ *B. firmus* อยู่กลุ่ม IB แม้กระทั่ง *B. circulans* JCM 2504 และ *B. sporothermodurans* SB4 ที่อยู่ใน

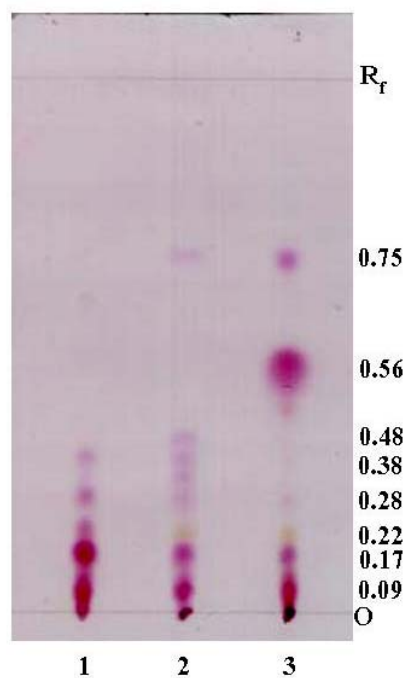
กลุ่ม II ที่สปอร์ทำให้เซลล์โป่ง แต่ทุกสปีชีส์สร้างสปอร์เป็นรูปวงรีเหมือนกัน ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ *Bacillus* sp. 12 สปีชีส์นี้ที่พบรูปแบบอะมิโนลิพิดเหมือนกัน

ส่วน *Bacillus* sp. ที่พบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ไม่มีจุด $R_f 0.56$ มีทั้งหมด 9 สปีชีส์ ได้แก่ *B. megaterium* 46 สายพันธุ์, *B. flexus* 1 สายพันธุ์, *B. simplex* 1 สายพันธุ์, *B. badius* 1 สายพันธุ์, *B. marisflavi* 1 สายพันธุ์, *Brevibacillus choshinensis* 1 สายพันธุ์, *Paenibacillus polymyxa* N-10, *B. fusiformis* และ *B. sphaericus* และเมื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของทั้ง 9 สปีชีส์นี้ พบว่า สปีชีส์ส่วนใหญ่มีการสปอร์เป็นรูปกลม เช่น *B. megaterium* ซึ่งแม้ว่าจะจัดอยู่ใน *Bacillus* sp. กลุ่ม IA ตามการแบ่งกลุ่มของ Gordon (1989) ที่มีการสร้างสปอร์รูปวงรี และไม่ทำให้เซลล์โป่งก็ตาม แต่ในบางครั้งก็พบสปอร์รูปกลมใน *B. megaterium* ได้เช่นกันโดยเฉพาะในระยะที่เป็นสปอร์อิสระจะเห็นได้ชัดเจน ส่วน *B. flexus* และ *B. simplex* เป็นสปีชีส์ที่แยกออกมาจาก *B. megaterium* จึงเป็นสายพันธุ์ใกล้ชิด *B. megaterium* อยู่ก่อนแล้ว (Sneath, 1986 และ Priest *et al.* 1988) ส่วน *B. fusiformis* และ *B. sphaericus* นั้นจัดอยู่ใน *Bacillus* sp. กลุ่ม III ที่มีสปอร์กลมและทำให้เซลล์โป่งอยู่แล้ว จึงอาจเป็นไปได้ว่าสัณฐานวิทยาของสปอร์อาจมีส่วนสัมพันธ์กับชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบ ส่วน *B. badius* และ *B. marisflavi* แม้ว่า Gordon (1989) เคยจัดให้อยู่ใน *Bacillus* sp. กลุ่ม IB สร้างสปอร์วงรี และไม่ทำให้เซลล์โป่ง แต่พบว่า *B. marisflavi* TF-11 มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบเหมือนกับกลุ่ม *B. megaterium* ขณะที่ *B. badius* TE1 มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบคล้ายกับกลุ่ม *B. megaterium* แตกต่างที่อะมิโนลิพิดที่ค่า $R_f 0.48$ จะจางกว่าที่พบในกลุ่ม *B. megaterium* แสดงให้เห็นว่า *B. marisflavi* ใกล้ชิดกับ *B. megaterium* มากกว่า *B. badius* แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้มาจาก *Bacillus* sp. ทั้งสองสปีชีส์นี้ตัวอย่างละ 1 สายพันธุ์เท่านั้น จึงควรหาตัวแทนของทั้งสองสปีชีส์นี้มาศึกษาเพิ่มเติม เพื่อช่วยในการยืนยันข้อมูลให้ชัดเจนมากขึ้น ส่วน *Brevibacillus choshinensis* และ *Paenibacillus polymyxa* ถึงแม้ว่าจะพบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ไม่มีจุด $R_f 0.56$ แต่ทั้งสองสปีชีส์นี้ก็มีความแตกต่างไปจากกลุ่ม *B. megaterium* และกลุ่ม *B. sphaericus* คือ พบว่า *Brevibacillus choshinensis* TB2 มีจุด $R_f 0.60$ และ 0.65 เพิ่มมาเช่นเดียวกับ *Paenibacillus polymyxa* N-10 ที่มีจุด $R_f 0.60$ ดังกล่าวไปแล้วข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในปัจจุบันที่จัดให้ทั้ง 2 สปีชีส์อยู่สกุลใหม่ ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบจึงเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนข้อมูลดังกล่าว

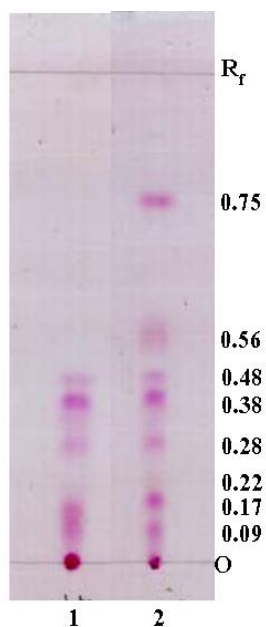
1.1.5 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก



ภาพที่ 24 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก; lane 1; *Staphylococcus epidermidis*, lane 2; *Staphylococcus intermedius*, lane 3; *Staphylococcus aureus*, lane 4; *Staphylococcus simulans*, lane 5; *Micrococcus* sp. และ lane 6; *Micrococcus luteus*



ภาพที่ 25 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Sarcina lutea* (lane 1) เปรียบเทียบกับ *B. megaterium* ATCC 14581^T (lane 2) และ *B. thuringiensis* JC397 (lane 3)



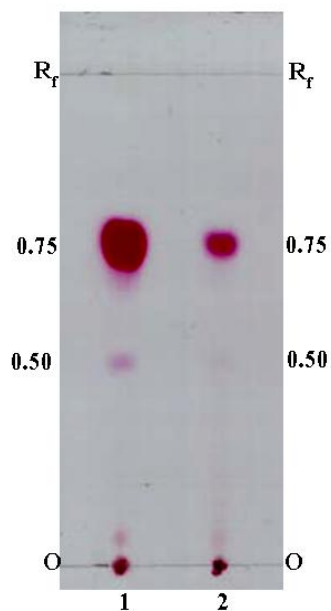
ภาพที่ 26 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Corynebacterium glutamicum* (lane 1) เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* JC397 (lane 2)

จากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียแกรมบวกสกุลอื่น คือ *Staphylococcus epidermidis*, *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. simulans*, *Micrococcus* sp., *M. luteus*, *Sarcina lutea* และ *Corynebacterium glutamicum* พบว่าแบคทีเรียแต่ละสกุลมีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่แตกต่างกัน และต่างจากรูปแบบของ *Bacillus* sp. ที่กล่าวมาในข้างต้น โดยแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมในสกุล *Staphylococcus* มีความคล้ายคลึงกัน โดยพบจุด R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.56 (ภาพที่ 24) ใน lane 1 ถึง 4 เฉพาะ *S. aureus* ใน lane 3 ที่พบจุด R_f เท่ากับ 0.60 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จุด R_f เท่ากับ 0.56 ที่พบใน *S. aureus* นั้นมีขนาดใหญ่เข้มชัดเด่นชัดเช่นเดียวกับที่พบใน *Bacillus*

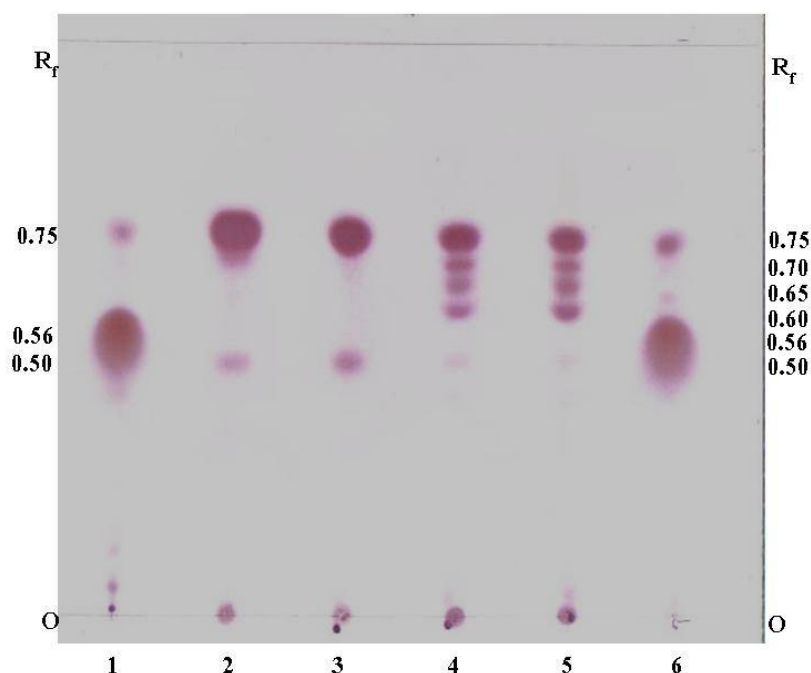
ส่วนรูปแบบอะมิโนลิพิดของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมในสกุล *Micrococcus* พบว่า *Micrococcus* sp. และ *M. luteus* (ภาพที่ 24 lane 5 และ 6 ตามลำดับ) มีรูปแบบอะมิโนลิพิดเหมือนกัน คือ ปรากฏที่ R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38 และ 0.60 ตามลำดับ แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมในสกุล *Sarcina lutea* (ภาพที่ 25) คล้ายกับสกุล *Micrococcus* แต่ไม่พบจุด R_f เท่ากับ 0.60 (ภาพที่ 24 lane 5 และ 6)

รูปแบบอะมิโนลิพิดของ *Corynebacterium glutamicum* (ภาพที่ 26) แสดงให้เห็นความแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่กล่าวมาทั้งหมด เพราะพบจุด R_f เท่ากับ 0.09, 0.28, 0.38 และ 0.48 เท่านั้น จะเห็นว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียแกรมบวกในสกุลต่างๆมีจุดที่น่าสนใจ คือ จุด R_f ที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้ ล้วนพบใน *Bacillus* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุด R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.56 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม น่าจะเป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับ *Bacillus* sp. ในระดับหนึ่งแม้ว่าไม่พบจุด R_f 0.75 ในสกุลใดเลยก็ตาม

1.1.6 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ



ภาพที่ 27 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ, lane 1; *E. coli*, lane 2; *Enterobacter aerogenes*



ภาพที่ 28 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบเปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis*

JC 397, lane 1 และ lane 6; *B. thuringiensis* JC 397, lane 2; *Erwinia carotovora* 486-4, lane 3; *E. carotovora* 493, lane 4; *Burkholdaria cepacia* 343-4 และ lane 5; *B. cepacia* 356-5

จากการศึกษาารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ 4 สกุล คือ *E. coli*, *Erwinia carotovora* 486-4, *E. carotovora* 493, *Enterobacter aerogenes*, *Burkholdaria cepacia* 343-4 (ชื่อเดิม *Pseudomonas cepacia*) และ *Burkholdaria cepacia* 356-5 พบความแตกต่างในแบคทีเรียแกรมลบด้วยกันและแตกต่างจากรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. ดังภาพที่ 27 และ 28

จะเห็นว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *E. coli* (ภาพที่ 27 lane 1), *E. carotovora* 486-4, *E. carotovora* 493 (ภาพที่ 28 lane 2 และ 3 ตามลำดับ) และ *E. aerogenes* (ภาพที่ 27 lane 2) มีความคล้ายคลึงกันมาก เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ R_f เท่ากับ 0.50 และ 0.75 เพียง 2 จุด เท่านั้น ขณะที่ *Burkholdaria cepacia* 343-4 และ *Burkholdaria cepacia* 356-5 (ภาพที่ 28 lane 4 และ 5) พบว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดของทั้งสองสายพันธุ์เหมือนกันทุกประการ และแตกต่างจาก 3 สกุลแรกอย่างชัดเจน เพราะพบอะมิโนลิพิดที่ R_f เท่ากับ 0.60, 0.65, 0.70 และ 0.75 ข้อมูลเหล่านี้

ชี้ให้เห็นว่าทุกสกุลของแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบมีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่แตกต่างจาก *Bacillus* sp. เนื่องจากไม่พบชนิดของ R_f ที่ต่ำกว่าจุด 0.50 นอกจากนี้จุด R_f ที่ 0.75 ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบมีขนาดใหญ่ชัดเจน โคเค้นกว่าที่พบใน *Bacillus* sp. สนับสนุนข้อมูลของ Matsuyama *et al.* (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชแกรมลบ และแกรมบวกมีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ต่างกันอย่างชัดเจน

ผลจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสกุลอื่น โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง โดยอ่านผลจากจำนวนจุดที่ปรากฏในแต่ละค่า R_f สรุปและแสดงข้อมูลดังตารางที่ 8 ดังนี้

ตารางที่ 8 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบสกุลอื่นโดยวัดจากค่า R_f

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	ค่า R_f											
	0.09	0.17	0.22	0.28	0.38	0.48	0.50	0.56	0.60	0.65	0.70	0.75
แบคทีเรียแกรมบวก												
<i>C. glutanicum</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. simulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
แบคทีเรียแกรมลบ												
<i>Burkholderia cepacia</i> (2 สายพันธุ์)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichai coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Erwinia carotovora</i> (2 สายพันธุ์)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

หมายเหตุ + = ปรากฏจุดของอะมิโนลิพิดบนแผ่นซิลิกาเจล

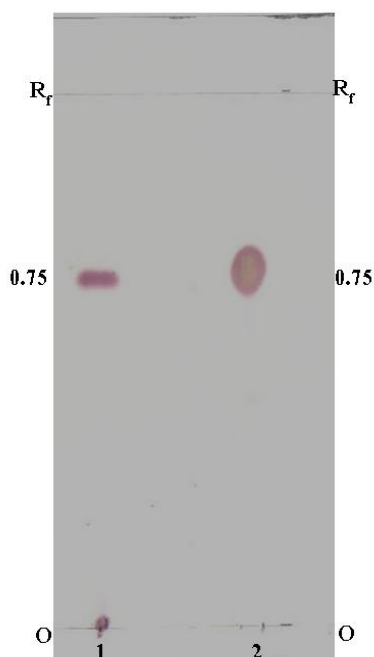
- = ไม่ปรากฏจุดใดๆบนแผ่นซิลิกาเจล

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในสกุล *Bacillus* จากตารางที่ 7 กับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสกุลอื่น จากตารางที่ 8 พบว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกจะพบจุด R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.56 เช่นเดียวกับที่พบในสกุล *Bacillus* ต่างกันเพียงในแบคทีเรียแกรมบวกไม่พบจุด R_f 0.75 กับทุกสกุลทั้งหมดที่ได้นำมาศึกษา ขณะที่รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบไม่พบจุด R_f ที่ต่ำกว่า 0.50 และพบจุด R_f 0.75 เช่นเดียวกับที่พบในสกุล *Bacillus* แต่จะมีขนาดใหญ่มากกว่าจากข้อสังเกตตรงนี้จึงสามารถใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดเป็นเอกลักษณ์ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกความแตกต่างของรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในสกุล *Bacillus* กับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสกุลอื่นได้

1.2 การศึกษาหาชนิดของอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง

จากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์ เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบอย่างละ 4 สกุล พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38 และ 0.48 เช่นเดียวกับที่พบใน *Bacillus* sp. มีเพียงสกุล *Staphylococcus* sp. ที่มีอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.56 เช่นเดียวกับที่พบใน *Bacillus* sp. แต่แบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้ขาดชนิด R_f เท่ากับ 0.75 ซึ่งพบได้ในทุกสกุลของแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ และที่สำคัญชนิดนี้มีขนาดใหญ่กว่าที่พบใน *Bacillus* sp.

ขั้นต่อไปจึงศึกษาอะมิโนลิพิดเหล่านี้เป็นสารประกอบไขมันประเภทฟอสโฟลิพิดหรือไม่ โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดแต่เปลี่ยนวิธีการพ่นด้วย 0.3% ninhydrin เป็นสาร molybdenum blue ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการตรวจสอบฟอสโฟลิพิด ผลการทดสอบที่ได้พบว่าใน *Bacillus* sp. ที่ใช้เป็นตัวแทน 2 สปีชีส์ คือ *B. thuringiensis* JC397 และ *B. megaterium* ATCC 14581^T พบว่ามีเพียงอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.75 เพียงจุดเดียวที่ติดสีน้ำเงินเข้มจนถึงค่าของ molybdenum blue แสดงให้เห็นว่าที่ R_f เท่ากับ 0.75 เป็นฟอสโฟลิพิด (ไม่ได้แสดงภาพ) ส่วนจุดอื่นที่พบจากการพ่นด้วย 0.3% ninhydrin ไม่ใช่ฟอสโฟลิพิด และเนื่องจาก Leechevalier (1989) รายงานว่า PE เป็นฟอสโฟลิพิดที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียแกรมลบ และพบในปริมาณมาก แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก มีรายงานว่าพบเฉพาะในสกุล *Bacillus*, *Planococcus* sp., *Micrococcus cryophilus* และ *Actinomycetes* การทดสอบขั้นต่อไปจึงตั้งสมมติฐานว่าชนิด R_f เท่ากับ 0.75 ที่ปรากฏอาจเป็น PE เนื่องจากพบในแบคทีเรียแกรมลบทุกสกุลที่ทดสอบในปริมาณมาก จึงทำการทดลองใช้ PE ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน spot เทียบกับอะมิโนลิพิดที่ตำแหน่ง R_f 0.75 ของ *B. megaterium* ATCC 14581^T โดยจุดจากแผ่นซิลิกาเจลเฉพาะจุดดังกล่าว และฉีดพ่นด้วย 0.3% ninhydrin ปรากฏว่าสารมาตรฐาน PE ติดสีของ ninhydrin และมีค่า R_f เท่ากับ 0.75 เช่นเดียวกับจุด R_f 0.75 ของแบคทีเรียตัวแทน (ภาพที่ 29) ผลการทดลองนี้จึงยืนยันว่าอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.75 คือ phosphatidyl ethanolamine (PE)



ภาพที่ 29 อะมิโนลิพิดที่สกัดจาก R_f 0.75 ที่พบใน *B. megaterium* ATCC 14581^T (lane 1)

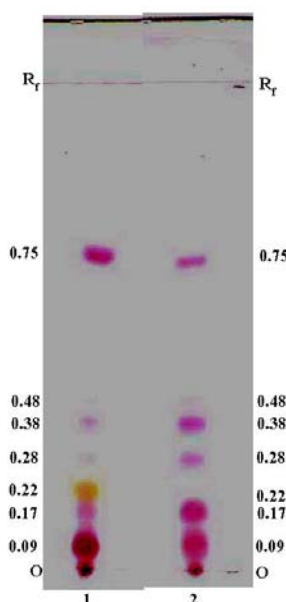
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟอสโฟลิพิด; phosphatidyl ethanolamine, PE (lane 2)

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนข้อมูลของ Leechevalier (1989) ว่า phosphatidylethanolamine หรือ PE เป็นฟอสโฟลิพิดที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียแกรมลบ และพบในปริมาณมาก แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก เคยมีรายงานว่าพบในสกุล *Bacillus* ดังกล่าวมาแล้ว จากผลการทดลองในข้างต้นพบว่ารูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบที่จุด R_f 0.75 ที่พบว่าคือ phosphatidyl ethanolamine มีขนาดใหญ่กว่าที่พบใน *Bacillus* มากจึงยืนยันให้ชัดเจนขึ้นในเรื่องปริมาณ

2. การประยุกต์ใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

จากการแยกเชื้อหาแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. จากไส้ติ่งไก่ ตัวอย่างอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์ และจากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น พบว่าแยกได้ 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TB015 จากไส้ติ่งไก่ สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 จากตัวอย่างอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์ และสายพันธุ์ N3A จากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น เมื่อนำสายพันธุ์ทั้งหมดมาศึกษาารูปแบบอะมิโนลิพิดโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง ได้ผลดังต่อไปนี้

2.1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ TB 015 แยกจากไส้ติ่งไก่



ภาพที่ 30 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ TB 015 (lane 2) เปรียบเทียบกับ *B. megaterium* ATCC 14581^T (lane 1)

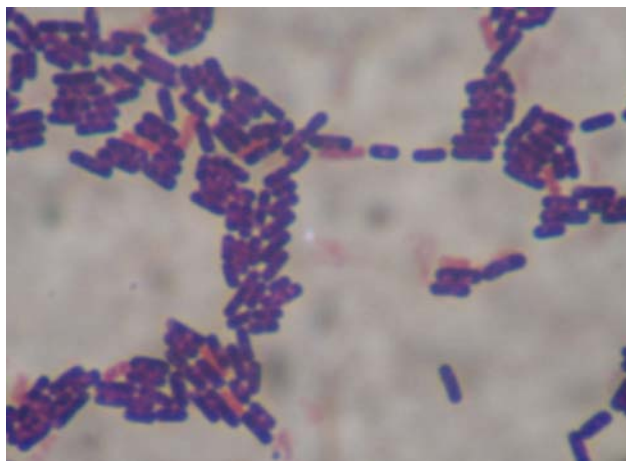
จากภาพที่ 30 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ TB 015 (lane 2) เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในสกุล *Bacillus* แน่แน่นอน เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 เหมือนกับที่พบใน *Bacillus* sp. แต่อะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.22 และ 0.48 เห็นจางๆ ดังนั้นผลจากการศึกษาารูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ TB015 เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่ไม่พบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.56 ดังที่กล่าวไปแล้วในข้างต้น ซึ่ง

ได้แก่ *Bacillus* กลุ่ม IA คือ *B. megaterium* หรือสายพันธุ์ใกล้เคียง *Bacillus* กลุ่ม IB ได้แก่ *B. marisflavi* และ *B. badius* หรือ *Bacillus* กลุ่ม III ได้แก่ *B. sphaericus* และ *B. fusiformis* หรืออาจเป็นสปีชีส์อื่นที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงที่ไม่ได้นำมาทดสอบในงานวิจัยครั้งนี้ และจากข้อมูลที่ได้นี้ทำให้สามารถช่วยในการคัดเลือกเบื้องต้นได้ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวน่าจะจัดอยู่ใน *Bacillus* sp. กลุ่มใด โดยนำไปศึกษาต่อโดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสายพันธุ์ TB 015 มีโคโลนีสีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 มิลลิเมตรที่อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาขย้อมสีแกรมที่อายุ 48 ชั่วโมง ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าติดสีแกรมบวก เซลล์มีขนาดเล็กกว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์รูปวงรีไม่ทำให้เซลล์โป่ง (ภาพที่ 31) แต่เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างแกรนูลได้ในอาหาร NA ผสมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มย่อยของ *Bacillus* ตามสัณฐานวิทยาจึงกำลังระหว่างกลุ่ม IA และ IB เพราะตามเกณฑ์ที่ Gordon (1989) รายงาน *Bacillus* กลุ่ม IA และ IB ไม่มีความแตกต่างในเรื่องรูปร่างสปอร์ เพราะเป็นรูปวงรีเช่นเดียวกัน แต่ต่างที่กลุ่ม IA มีขนาดเซลล์กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตร และมีการสร้างแกรนูล ดังนั้นจากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงระบุได้ว่ากำลังระหว่างกลุ่ม IA และ IB จึงตัดประเด็นที่ว่าจะมีโอกาสเป็นสปีชีส์ใดใน *Bacillus* กลุ่ม III ออกไปได้

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา (ตารางที่ 9) พบว่าคุณสมบัติส่วนใหญ่คล้ายกับ *B. megaterium* แต่มีข้อแตกต่างที่ชัดเจน คือ ขนาดของเซลล์กว้างเพียง 0.8 ถึง 0.9 ไมโครเมตร ซึ่งค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับเซลล์ของ *B. megaterium* ซึ่งกว้าง 1.2 ถึง 1.5 ไมโครเมตร นอกจากนี้สายพันธุ์ TB 015 ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล แอล(-)-อะราบิโนส และ ดี(+)-แมนนิทอล และไม่สามารถสร้างเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนดีแอมิเนส และยูรีเอส ซึ่งการสร้างเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนดีแอมิเนสเป็นคุณสมบัติหลักที่ใช้แยก *B. megaterium* ออกจาก *Bacillus* สปีชีส์อื่นในกลุ่ม IA ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ยูรีเอสนั้น ถ้าเป็น *B. megaterium* ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. simplex* และ *B. flexus* ซึ่งเป็นสปีชีส์ใกล้เคียงที่แยกมาจาก *B. megaterium* และผลทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp. TB 015 ก็ใกล้เคียงกับผลของ *B. simplex* และ *B. flexus* เช่นกัน ต่างกันที่สายพันธุ์ TB 015 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเอสคิวรีนได้ ขณะที่ทั้ง *B. flexus* และ *B. simplex* สร้างไม่ได้ ดังนั้นจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี

และสรีรวิทยา โดยข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอที่จะจำแนกชนิดได้ ระบุได้เพียงว่าเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียง *B. megaterium* จึงควรศึกษาให้ชัดเจนต่อไปโดยวิธีอื่น เช่น การทำ 16S rRNA การหาปริมาณ GC เป็นต้น



ภาพที่ 31 ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ *Bacillus* sp. TB 015 ที่อายุ 48 ชั่วโมง

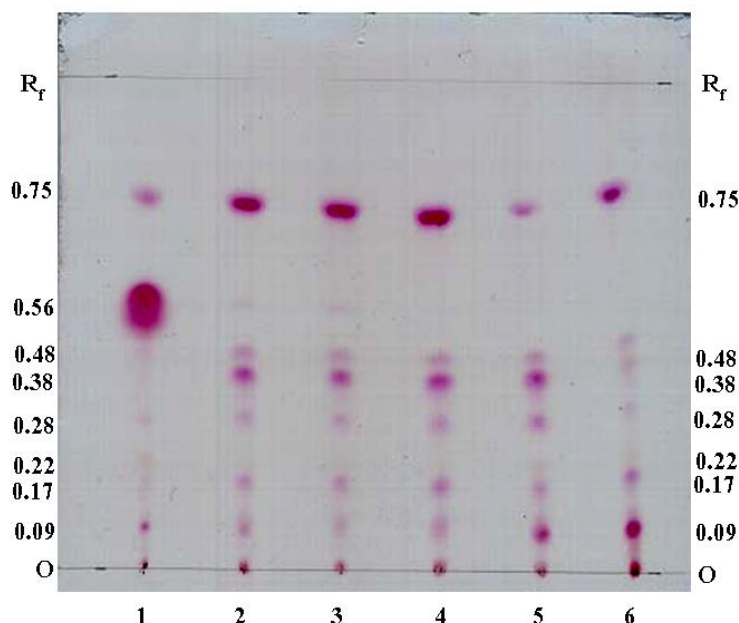
ตารางที่ 9 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาบางประการของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TB 015 เปรียบเทียบกับ *B. megaterium* ATCC 14581^T, *B. flexus* DSM 1320^T และ *B. simplex* DSM 1321^T

คุณสมบัติ	TB 015	<i>B. megaterium</i> ATCC 14581 ^{T*}	<i>B. flexus</i> DSM 1320 ^{T*}	<i>B. simplex</i> DSM 1321 ^{T*}
ขนาดของเซลล์กว้าง (μm)	0.8-0.9	>1	0.9	0.8-1.0
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+
การทดสอบ VP	-	-	-	-
พีเอชในอาหาร VP	6.57	5.68	5.70	6.50
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	+
การเจริญใน NB + NaCl				
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	+	-	ND	-
การเจริญใน NB พีเอช 5.7	+	+	+	+
การผลิตกรดจาก				
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	-	+	-	+
ดี(+)-ไซโลส	+	-	-	+
ดี(+)-แมนนิทอล	-	+	+	+
แลกโตส	+	-	ND	ND
การใช้				
ซีเตรท	+	+	+	+
โพρφิไรนด์	-	-	-	-
การย่อยสลาย				
แป้ง	+	+	+	+
เอสคิวรีน	+	+	-	-
ฟีนอลอะลานีน	-	+	-	-
ยูเรีย	-	+	+	-

หมายเหตุ + = positive, - = negative, ND = ไม่พบข้อมูล, ^T = type strain

* = ผลการทดสอบจากทาริน (2548)

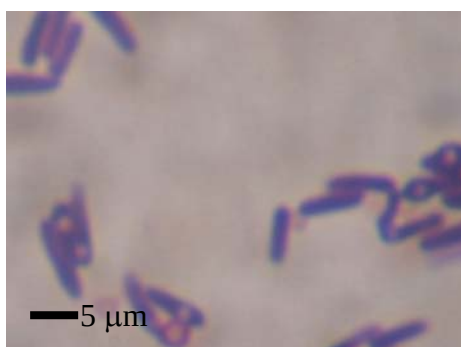
2.2 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 จากอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์



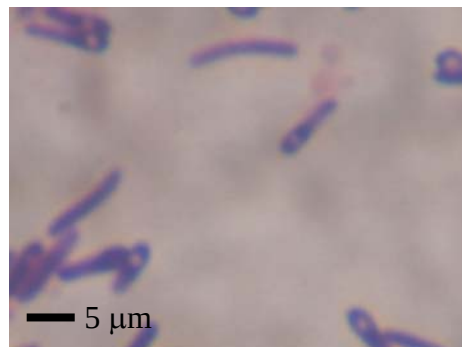
ภาพที่ 32 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ No.1-No.4; lane 1; *B. thuringiensis* JC 397, lane 2; สายพันธุ์ No.1, lane 3; สายพันธุ์ No.2, lane 4; สายพันธุ์ No.3, lane 5; สายพันธุ์ No.4 และ lane 6; *B. sphaericus* ATCC 14577^T

จากภาพที่ 32 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียที่ยังสายพันธุ์ No.1 (lane 2), No.2 (lane 3), No.3 (lane 4) และ No.4 (lane 5) สามารถจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ได้ เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 เหมือนกับที่พบใน *Bacillus* sp. ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ดังนั้นผลจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่ไม่พบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.56 ดังที่กล่าวไปแล้ว ซึ่งเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 ลักษณะโคโลนีมีสีครีม โคโลนีมีขนาดเล็กกลม ผิวเรียบ ขอบเรียบ เมื่อนำมาขย้อมสีแกรมที่อายุ 48 ชั่วโมง ปรากฏได้กล้องจุลทรรศน์พบว่าติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อน เซลล์มีขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์รูปกลมทำให้เซลล์โป่งทั้ง 4 สายพันธุ์ (ภาพที่ 33 ก-ง) ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 4 สาย

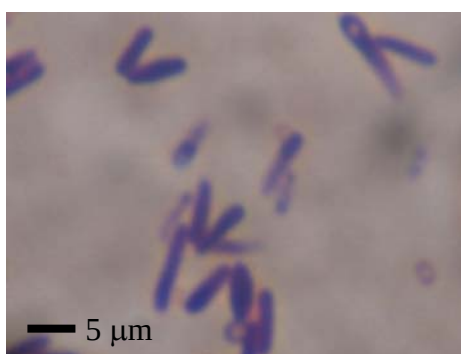
พันธุ์จึงจัดอยู่ใน *Bacillus* กลุ่ม III เนื่องจาก *Bacillus* ในกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างกลม และทำให้เซลล์โป่งตามเกณฑ์ที่ Gordon (1989) ได้อธิบายไว้



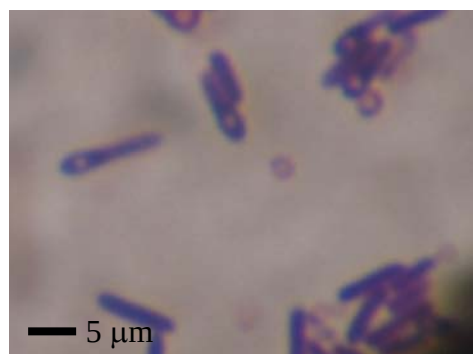
ก



ข



ค



ง

ภาพที่ 33 ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่อายุ 48 ชั่วโมง; ก-ง แสดงสายพันธุ์ No.1-No.4 ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา (ตารางที่ 10) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 ให้ผลทดสอบเหมือนกัน และส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับ *B. sphaericus* คือ VP และการเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศเป็นลบ ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่เจริญในอาหาร NB ผสม NaCl 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล แอล(-)-อะราบิโนส, ดี(+)-ไซโลส, ดี(+)-แมนนิทอล และแลคโตส แต่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี(+)-กลูโคส และไม่สามารถใช้ ซิเตรท และโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้ง และเคซีน ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เลซิทีเนส โดยที่ 4 สายพันธุ์ต่างกันเพียงค่าพีเอชที่วัดได้ในอาหาร VP โดยสายพันธุ์ No.1 และ No.4 มีค่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ 7 วัน อยู่ที่ 7.4 ถึง

8.6 ซึ่งอยู่ในช่วงพีเอชของ *B. sphaericus* ส่วนสายพันธุ์ No.2 และ No.3 ที่มีค่าพีเอชในอาหาร VP ต่ำกว่า คุณสมบัติบางประการที่ต่างกับ *B. sphaericus* อย่างชัดเจนคือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล ดี(+)-กลูโคส ได้ ขณะที่ *B. sphaericus* ไม่สามารถสร้างได้ ดังนั้นจากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาจึงยังไม่สามารถจำแนกชนิด *Bacillus* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ จึงสามารถระบุได้เพียงว่าเป็น *Bacillus* ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ และอยู่ในกลุ่ม III จึงควรศึกษาหาชนิดโดยวิธีอื่นต่อไป

อย่างไรก็ตามเนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของแบคทีเรีย สายพันธุ์ No.1-No.4 นี้คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างจาก *B. sphaericus* (ตารางที่ 10) การที่พบว่ามีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่คล้ายกัน ชี้ให้เห็นว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกันในแง่ที่ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีสปอร์กลมเช่นเดียวกับ *B. sphaericus* ดังนั้นจึงควรหา *Bacillus* sp. ที่มีสปอร์กลมกลุ่ม III สปีชีส์อื่นๆมาตรวจสอบรูปแบบอะมิโนลิพิดโดยวิธีนี้ให้มากขึ้น

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาบางประการของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3, No.4 และ N3A เปรียบเทียบกับ *B. sphaericus*

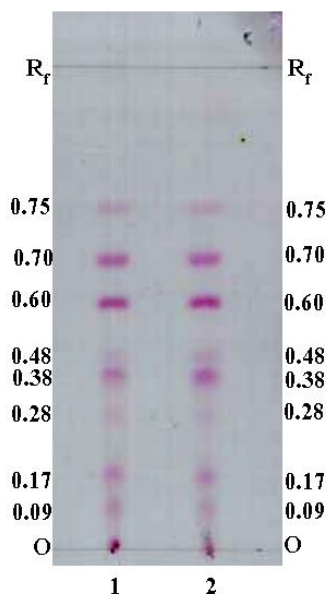
คุณสมบัติ	No.1	No.2	No.3	No.4	N3A	<i>B. sphaericus</i> *
ขนาดของเซลล์กว้าง (μm)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	-	-	-	-	-	-
ฟิเอชในอาหาร VP	8.02	6.31	6.53	7.40	7.62	7.4-8.6
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	+	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	-	-	-
การเจริญใน NB + NaCl						
5 เปอร์เซนต์	-	-	-	-	-	b
7 เปอร์เซนต์	-	-	-	-	-	b
10 เปอร์เซนต์	-	-	-	-	-	-
การผลิกรดจาก						
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	-
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-ไซโลส	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	-	-	-	-	-	-
แลกโตส	-	-	-	-	-	-
การใช้						
ซีเตรท	-	-	-	-	-	b
โพรพิโอเนต	-	-	-	-	-	ND
การย่อยสลาย						
แป้ง	+	+	+	+	+	-
เคซีน	+	+	+	+	+	b
การย่อยสลาย						
เลซิดิน	-	-	-	-	-	-
ซูเรีย	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ + = 85-100% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive,

- = 0-14% ให้ผล positive, ND = ไม่ได้ทำการทดลอง

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

2.3 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ N3A จากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น



ภาพที่ 34 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์ N3A (lane 1 และ 2)

รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้สายพันธุ์ N3A (ภาพที่ 34) ซึ่งแยกเชื้อได้จากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาจจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* เนื่องจากพบจุด R_f 0.09, 0.17, 0.28, 0.38, 0.48, 0.60, 0.70 และ 0.75 หรืออาจเป็นสกุลอื่นในกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.60 และ 0.70 เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับที่พบว่า *Brevibacillus choshinensis* และ *Paenibacillus polymyxa* เดิมเคยจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* มาก่อนปัจจุบันถูกแยกออกมาอยู่ในสกุลดังกล่าวตามการจัดจำแนกด้วยวิธี 16S rRNA ก็มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ได้ต่างไปจากที่พบในสกุล *Bacillus* เช่นกันเนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f อื่นปรากฏเพิ่มขึ้นมานอกเหนือจากที่พบในสกุล *Bacillus* และเนื่องจากผลของรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบนี้ยังไม่พบใน *Bacillus* sp. สปีชีส์ใดเลยดังที่ได้ศึกษามาแล้ว จึงสามารถบอกได้ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ใช่ *Bacillus* sp. ทั้ง 21 สปีชีส์ ที่ได้นำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้แน่นอน



ภาพที่ 35 ลักษณะเซลล์และรูปร่างสปอร์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A ที่อายุ 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก ขอบเรียบ เมื่อนำมาขย้อมสีแกรมที่อายุ 48 ชั่วโมง ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์พบว่าติดสีแกรมบวก เซลล์มีขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์รูปกลมทำให้เซลล์โป่งเช่นกัน (ภาพที่ 35) สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จึงจัดอยู่ใน *Bacillus* กลุ่ม III เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ที่มีรูปทรงกลม และทำให้เซลล์โป่งตามเกณฑ์ที่ Gordon (1989) ได้อธิบายไว้ เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา (ตารางที่ 10) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A ให้ผลทดสอบเหมือนกับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N0.1, No.2, No.3 และ No.4 ต่างกันเพียง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A สามารถเจริญใน anaerobic agar ได้ และมีคุณสมบัติส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับ *B. sphaericus* ยกเว้น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล ดี(+)-กลูโคส ได้ ขณะที่ *B. sphaericus* ไม่สามารถสร้างได้ จากผลคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาจึงแยก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N0.1, No.2, No.3 และ No.4 กับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A ด้วยความสามารถในการเจริญใน anaerobic agar ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งให้เห็นว่าต้องแตกต่างกันอย่างน้อยระดับสปีชีส์อย่างแน่นอน แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ ควรอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาต่อไปเพื่อหาสปีชีส์ที่ชัดเจน อาจจะโดยศึกษาลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rRNA ก่อน แล้วจึงหาปริมาณ G+C ว่าแตกต่างกันอย่างไร รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาเพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ เนื่องจากสายพันธุ์ N3A แยกตัวอย่างมาจากน้ำหล่อเย็น ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะที่ใส่เพื่อยับยั้งแบคทีเรียและราทั่วไปในอาหาร selective media ที่ใช้แยกเชื้อ *Legionella* ได้ คงต้องรวมข้อมูลเหล่านี้ และศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดให้ชัดเจนต่อไป

ดังนั้นจากผลการทดลองจากการใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง สามารถบอกได้ว่ามีแนวโน้มว่าแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่มใด ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประกอบการวิเคราะห์ร่วมกับวิธีอื่น ซึ่งช่วยทำข้อมูลชัดเจนมากขึ้นและตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และในกรณีของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A นี้พบว่าถ้าหากใช้วิธีดั้งเดิม เช่น การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวก็จะไม่รู้สายพันธุ์ดังกล่าวนี้อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ หรือเป็นสปีชีส์ที่ปัจจุบันอาจถูกแยกออกจากสกุล *Bacillus* ไปอยู่ในสกุลใหม่ เนื่องจากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้ผลเช่นเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์ สามารถแบ่ง *Bacillus* sp. ได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.56 และกลุ่มที่ไม่มีอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.56 โดยทั้ง 2 กลุ่ม พบอะมิโนลิพิดร่วมกัน 7 ชนิด คือ R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38, 0.48 และ 0.75 ตามลำดับ โดย *Bacillus* sp. ที่มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.56 มีทั้งหมด 12 สปีชีส์ ได้แก่ *B. cereus* 6 สายพันธุ์, *B. mycoides* 1 สายพันธุ์, *B. thuringiensis* 28 สายพันธุ์, *B. amyloliquefaciens* 22 สายพันธุ์, *B. atrophaeus* 6 สายพันธุ์, *B. firmus* 3 สายพันธุ์, *B. licheniformis* 10 สายพันธุ์, *B. mojavensis* 1 สายพันธุ์, *B. pumilus* 3 สายพันธุ์, *B. subtilis* 12 สายพันธุ์, *B. circulans* JCM 2504 และ *B. sporothermodurans* SB4 ส่วน *Bacillus* sp. ที่มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่ไม่มี R_f 0.56 มีทั้งหมด 9 สปีชีส์ ได้แก่ *B. megaterium* 46 สายพันธุ์, *B. flexus* 1 สายพันธุ์, *B. simplex* 1 สายพันธุ์, *B. badius* 1 สายพันธุ์, *B. marisflavi* 1 สายพันธุ์, *Brevibacillus choshinensis* 1 สายพันธุ์, *Paenibacillus polymyxa* 1 สายพันธุ์, *B. fusiformis* 1 สายพันธุ์ และ *B. sphaericus* 2 สายพันธุ์ และถึงแม้ว่า *Brevibacillus choshinensis* และ *Paenibacillus polymyxa* จะไม่มีจุด R_f 0.56 ก็ตาม แต่ก็มีความแตกต่างจาก แต่ทั้งสองสปีชีส์นี้ก็มีความแตกต่างไปจากกลุ่ม *B. megaterium* และกลุ่ม *B. sphaericus* คือพบว่า *Brevibacillus choshinensis* TB2 มีจุด R_f 0.60 และ 0.65 เพิ่มมา เช่นเดียวกับ *Paenibacillus polymyxa* N-10 ที่มีจุด R_f 0.60

นอกจากนี้สามารถใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดเป็นเอกลักษณ์ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกความแตกต่างระหว่างรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในสกุล *Bacillus* กับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสกุลอื่นได้ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *Bacillus* sp. ที่ศึกษาทั้งหมด 149 สายพันธุ์ 21 สปีชีส์ มีความแตกต่างจากที่พบในแบคทีเรียแกรมบวกสกุล *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Sarcina* sp. และ *Corynebacterium* sp. เนื่องจากในแบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้ไม่มีสกุลใดพบอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.75 และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora* และ *Burkholderia cepacia* ยิ่งพบความแตกต่างชัดเจน เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบดังกล่าวมีอะมิโนลิพิดที่มีค่า R_f 0.75 ขนาดใหญ่ชัดเจนกว่าที่พบใน *Bacillus* sp. จำนวน อะมิโนลิพิดที่พบน้อยชนิดกว่า และพบในตำแหน่ง R_f ที่มากกว่า 0.50 ขึ้นไป ขณะที่ใน *Bacillus* sp.

และแบคทีเรียแกรมบวกตัวอื่นๆ พบอะมิโนลิพิดตั้งแต่ค่า R_f 0.09, 0.17, 0.22, 0.28, 0.38 และ 0.48 โดยอาจพบทั้งหมด หรือพบบางส่วนขึ้นกับสกุล หรือสปีชีส์

การศึกษาชนิดอะมิโนลิพิดเป็นสารประกอบไขมันประเภทฟอสโฟลิพิดพบว่ามีเพียง R_f เท่ากับ 0.75 เพียงชนิดเดียวที่เป็นฟอสโฟลิพิดและเป็น phosphatidyl ethanilamine (PE)

การประยุกต์ใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TB015 (คัดแยกจากไส้ติ่งไก่), สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3 และ No.4 (คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์) และสายพันธุ์ N3A (คัดแยกจากตัวอย่างน้ำหล่อเย็น) โดยใช้โครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. เนื่องจากพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เดียวกันที่พบใน *Bacillus* sp. คือ R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.22, 0.38, 0.48 และ 0.75 มีเพียงสายพันธุ์ N3A เท่านั้นที่นอกจากจะพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.17, 0.38 และ 0.75 ยังพบอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f 0.60 และ 0.70 เพิ่มขึ้น ดังนั้นจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดสามารถบอกได้ว่ามีแนวโน้มว่าแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกลุ่มใด ซึ่งจากผลการทดลองสามารถคัดเลือกเบื้องต้นได้อย่างคร่าวๆ และเมื่อนำผลจากการศึกษารูปแบบอะมิโนลิพิดมาวิเคราะห์ร่วมกับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิถีทางชีวิตเคมีและสรีรวิทยา พบว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เนื่องจากติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน มีการสร้างสปอร์ เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe ทดสอบกะเลสให้ผลบวก โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TB015 ถูกจัดให้อยู่ก้ำกึ่งระหว่าง *Bacillus* sp. กลุ่ม IA และ IB ขณะที่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3, No.4 และ N3A จัดอยู่ใน *Bacillus* sp. กลุ่ม III เนื่องจากมีการสร้างสปอร์รูปกลม และทำให้เซลล์โป่งออก แต่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N3A มีรูปแบบอะมิโนลิพิดที่แตกต่างไปจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ No.1, No.2, No.3, No.4 และแตกต่างไปจาก *Bacillus* sp. กลุ่ม III คือ *B. sphaericus* และ *B. fusiformis* ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสายพันธุ์ N3A เป็น *Bacillus* sp. กลุ่ม III อาจเป็นสายพันธุ์ใกล้ชิดกับ *B. sphaericus* ที่ปัจจุบันอาจถูกจัดแยกออกจากสกุล *Bacillus* ไปอยู่ในสกุลใหม่ ดังนั้น *Bacillus* sp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้

ดังนั้นการใช้รูปแบบอะมิโนลิพิดโดยโครมาโทกราฟีแผ่นเคลือบบางสามารถใช้เป็น Phenotypic characteristic อีกข้อหนึ่งเพื่อช่วยในการจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ออกจากแบคทีเรียสกุลอื่นได้ และเป็นอีกวิธีที่มีความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ผล ประหยัด และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บข้อมูลพื้นที่ที่อบแผ่นซิลิกาเจล เสร็จแล้วเนื่องจากจะทำให้ได้ภาพชัดที่สุด เพราะเมื่อเวลาผ่านไปสีชมพูของจุดที่ปรากฏอยู่บนแผ่นซิลิกาเจลจะเริ่มจางหายไปอย่างช้าๆ
2. การทดลองไม่ได้ทำการตรวจสอบว่าอะมิโนลิพิดทั้งหมดที่ปรากฏบนแผ่นซิลิกาเจลเป็นอะมิโนลิพิดชนิดใดบ้าง ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงชนิดอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จึงควรสกัดอะมิโนลิพิดในแต่ละจุดไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GLC หรือวิธีอื่นทางเคมี ซึ่งช่วยให้ทราบถึงองค์ประกอบของอะมิโนลิพิดของ *Bacillus* sp. ในแต่ละสปีชีส์
3. จากการทดลองควรทำการศึกษาต่อไปว่าอะมิโนลิพิดที่ค่า R_f เท่ากับ 0.56 ที่ปรากฏในสกุล *Bacillus* นั้นเป็นองค์ประกอบชนิดใดในเชื้อหุ้มเซลล์ *Bacillus* sp. เนื่องจากอะมิโนลิพิดดังกล่าวทำให้สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในสกุล *Bacillus* ได้ 2 กลุ่มหลักๆ
4. ในการทดลองแต่ละครั้งค่า R_f จะไม่คงที่ จึงควรทำพร้อมกับเชื้อ type strain ที่รู้รูปแบบอะมิโนลิพิดชัดเจนแล้ว เช่น *B. megaterium* ATCC 14581^T และ *B. subtilis* ATCC 6051^T เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ทาริน ศรีชื่นชม. 2548. การจัดจำแนก *Bacillus* sp. ที่ isolate ได้จากธรรมชาติโดยการทดสอบทางชีวเคมี. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิจกาล การอำนวยการ. 2550. การศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2550. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ.
- ภาควิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. 2552. คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. ประเทศไทย. แหล่งที่มา;
<http://coursewares.mju.ac.th/section2/pt331/05.htm>., 23 มีนาคม 2552.
- สิรินันท์ ชมพูแสง. 2550. การจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุบลพรรณ เหลืองอุบล. 2550. การคัดเลือกเมทิลโอโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีความสามารถสูงในการตรึงฟอสฟอรัสได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณี อิงคากุล. 2548. คู่มือปฏิบัติการชีวเคมี 1. ภาควิชาชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Anonymous. 2009. **Thin Layer Chromatography**. Available source;
<http://chemistry.csudh.edu/faculty/noel/CHE317L/ThinLayerChromatographyExperiment.htm>., February 26, 2009.

- Ash, C., J. A. E. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrand, and M. D. Collins. 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 41:343–346.
- _____, Priest, F. G. and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group3 *Bacilli* using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek.** 64: 253-260.
- Boonsuebsakul, W., K. Tsuchiya, K. Suyama, H. Negishi, M. daikohara, K. Manabe, N. Thavechai, N. Matsuyama. 2006. Preliminary study on rapid and easy differentiation of *Bacillus* species with TLC chromatograms for amino-lipid. **J. Agr. Sci.** 38 (3-4): 129-134.
- Bouzar, H., J. B. Jones and N. C. Hodge. 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon –source utilization patterns and fatty acids profiles. **Physiol. Bioch.** 83 (7): 733-739.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbon. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition.** The Williams & Wilking Company, Baltimore. 1246 pp.
- Chase, A. R., R. E. Stall., N. E. Hodge., and J. B. Jones. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological, and fatty acid analyses etiology. **Florida Agricultural Experiment Station Journal series R-01509.** 82 (7): 754-759.
- Clarice, Q. F. L., C. W. O. Souza., and S. R. A. Leite. 1998 . Identification of *Mycobacteria* by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. Technique improvement for *Mycobacteria* identification. **Physiol. Bioch.** 93(6): 801-805.
- Cohn, F. 1872. **"Untersuchungen über Bakterien"**. Beitr Biol Pflanzen 1(Heft 1): 127-224.

- Dandapat, P ., R. Verma., K. Venkatesan., V. D. Sharma., H. B. D. R singh., V. M. Katoch., 1999. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* on its lipid profile by thin layer chromatography, **Vet. Microbiol.** 65: 145-151.
- Doi, R. H. 1989. Sporulation and germination, pp. 169-205. In C. R. Harwood, ***Bacillus***. Plenum Press. London. 414 p.
- Ehrenberg, C. G. 1835. ***Bacillus subtilis***. Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835. Berlin University, Russia. pp. 145–336.
- Euzéby, J. P. 2008. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Paenibacillus***. Available source; <http://www.bacterio.cict.fr/p/paenibacillus.html>, June 9, 2008.
- Folch J. 1947. The chemical structure of phosphatidyl serine. **J. Biol. Chem**, 174(2): 439-450.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzky and J. R. P. Jurtshuk. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **J. Syst. Bacteriol**, 42(1): 166-170.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. pp. 1245-1248. **Symposium on The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp.** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany.
- Furuya, N., T. Masunaga., A. A. Khan., K. Iiyama., M. Matsumoto., and N. Matsuyama. 2000. Bacterial wilt of russell prairie gentian caused by *Burkholderia caryophylli*. **J. Gen. Plant Pathol.** 66 (4): 316-322.

- Galanos, D. S. 1970. Phospholipid complexes with molybdate. **Lipids**. 5(6): 573-575.
- Gordon, R. E. 1989. The Genus *Bacillus*, pp. 109-126. In W. M. O'Leary, ed. **Practical Handbook of Microbiology**. CNC Press, Florida. 681 p.
- Gwen, V. C., 2008. **Membrane Structure and Function**. Available source;
http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/membrane_intro.htm, April 5, 2008.
- Harwood, C. R. 1989. Taxonomy of *Bacillus*. **Biotechnology Handbooks, Vol. 2**. Plenum Press, New York. pp. 5-26.
- Khan, A. A., and N. Matsuyama., 1999. A Rapid extraction- TLC method for differentiation of *Burkholderia* spp., *Ralstonia solanacearum*, *herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Pseudomonas syringae*. **J. Fac. Agr.** 44(1·2): 49-58.
- Kori, Y., N. Furuya., K. Tsuno., and N. Matsuyama., 1992. Differentiation of *Erwinia chrysanthemi* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* by the cellular fatty acid analysis. **J. Fac. Agr.** 37(2): 173-178.
- Lechevalier, M. P. 1989. Lipid in bacterial taxonomy. In W.M. O'Leary, ed. **Practical Handbook of Microbiology**. CRC Press, Boston. 681 p.
- Lee, K. Y., J. S. So, T. R. Heo. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of *Bifidobacteria* at genus level. **J. Microbiol. Meth.** 45(1): 1-6.
- Matsuyama, N. 1995a. Trials for rapid identification of phytopathogenic bacteria by HPLC and the direct colony TLC. **J. Fac. Agr.** 40(1·2): 87-91.

- _____, 1995b. Application of the direct colony TLC for Identification of phytopathogenic bacteria (III). Distinction of the *Pseudomonads* in the rRNA-homology group II (*Burkholderia* spp.). **J. Fac. Agr.**, 40(1·2): 189-196.
- _____, I. H. Mian, A. M. Akanda, and N. Furuya. 1993. Comparative studies on thin-layer chromatograms of lipid from various phytopathogenic bacteria. *Ann. Phyto-pathol. Soc. Jap.* 59 (5): 528-534.
- _____, Md A. A. Khan, K. Yoshimura, N. Furuya, K. Manabe , M. Daikohara , K. Suyama, and H. Negishi. 2003. Rapid identification of phytopathogenic bacteria by an improved extraction-TLC method. **Proceeding 8th. International Congress of Plant Pathology (ICPP2003)**, Chrischurch, New Zealand. p. 96.
- _____, Y. Ueda, K. Iiyama, N. Furuya, H. Ura, A. A. Khan, and M. Matsumoto. 1998. Rapid extraction-HPLC as a tool for presumptive identification of *Burkhoderia gladioli*, *B. glumae* and *B. plantarii*, causal agents of various rice diseases. **J.Fac. Agr.** 42 (3·4): 265-272.
- Minnikin, D. E., A. G. O' Donnell, M. Goodfellow, G. Alderson, M. Athalye, A. Schaal and J. H. Parlett. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **J. Microbiol. Meth.** 2: 233-241.
- Mutsuyama, T., M. Sogawa., and I. Yano ., 1987. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (5): 1186-1188.
- Nakamura, L. K. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness of lactose-positive *Bacillus subtilis* strains and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37: 444-445.

- Mungmanakij, S. 2006. **Cabofuran Degradation by Soil Bacteria Isolated from Cabofuran-Treated Soils**. M.S. Thesis, Kasetsart University. 81 p.
- Munoz, M., E. Julian, M. G. Barcelo, V. Ausina, M. Luquin., 1997. Easy differentiation of *Mycobacterium mucogenicum* from other species of the *Mycobacterium fortuitum* complex by thin-layer and gas chromatography of fatty esters and alcohols. **J. Chromatogr B Biomed Appl.** 689: 341-347.
- Poole, C. F., S. K. Poole. 1994. **Instrumental Thin-Layer Chromatography**. Department of Chemistry, University of Adelaide. Available source; <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/tlc.htm>., October 2, 2007.
- Priest, F. G., M. Goodfellow and C. Todd, 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **J. Gen. Microbiol.** 134: 1847-1882.
- Robert, M. S., L. K. Nakamura and F. M. Cohan. 1994. *Bacillus mojavenensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and difference in fatty acid composition. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 256-264.
- Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt., A. Boras, R. S. Weyant, and T. Popovic. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene : a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerg. Infect. Diseases.** 8 (10): 1117-1123.
- Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, L. K. Nakamura and K. Komakata. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus acuedlanalyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of genus *Paenibacillus*. **Int. J.Syst. Bacteriol.** 47:289-298.

Sneath, 1986. P.H.A. Sneath, Endospore-forming Gram-positive rods. *In* P.H.A. Sneath, N.S.

Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**

Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore (1986), pp. 1104–1138.

Wisotzky, J. D., P. Jurtshuk, G.E. Fox, G. Deinhard and K. Poralla. 1992. Comparative

sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus*

acidoterrestis, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus,

Int. J. Comp. Bacteriol. 42: 263–269.

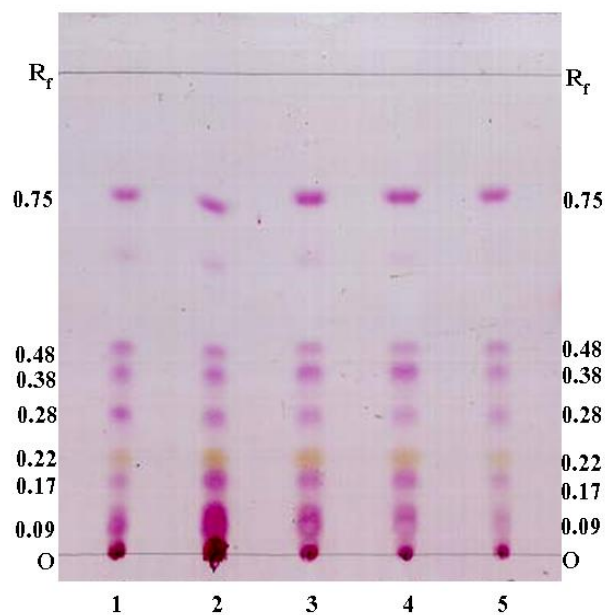
Zeigler, D. R., 2001. *Bacillus* genetic stock center catalog of strains, Seventh Edition. Volume 3:

The Genus *Geobacillus*. Department of Biochemistry, The Ohio State University. 25 p.

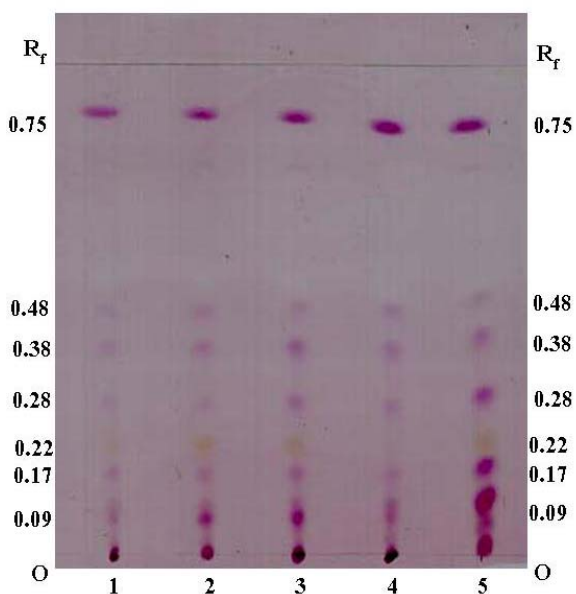
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

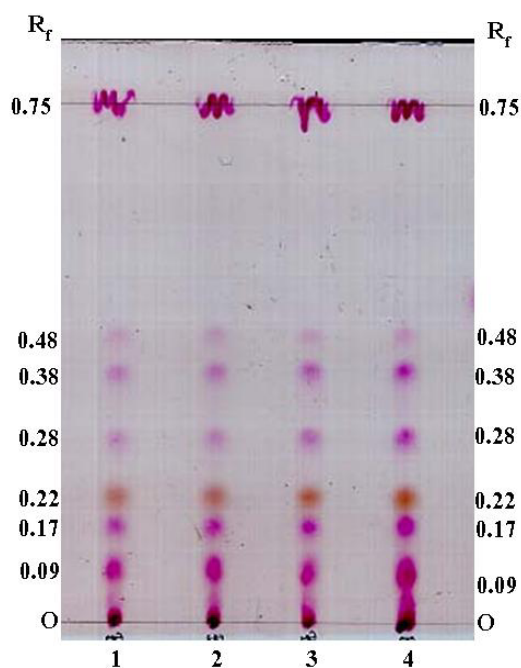
รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบในแบคทีเรียสกุล *Bacillus*



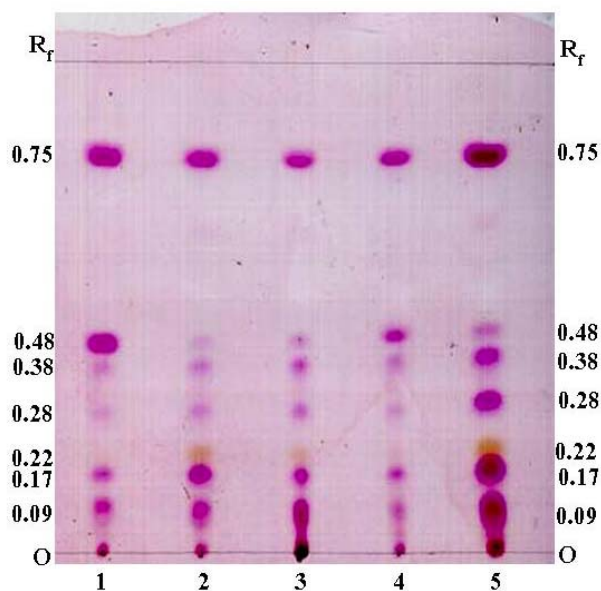
ภาพผนวกที่ ก1 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* DMKU OriBa-4-2, lane 2: *B. megaterium* DMKU OriBa12, lane3: *B. megaterium* DMKU OriBa 14-2, lane 4: *B. megaterium* DMKU OriBa 15-2 และ lane 5: *B. megaterium* DMKU6482 (2)/2



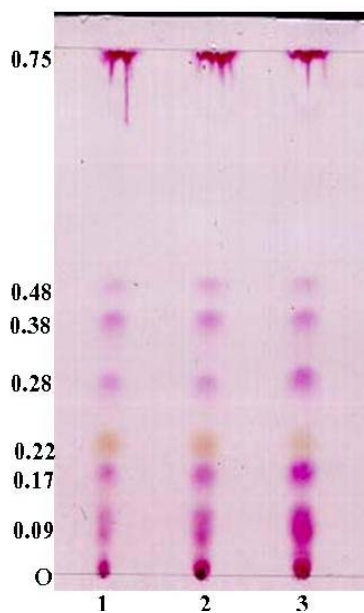
ภาพผนวกที่ ก2 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* DMKU OriBa-5-2 lane 2: *B. megaterium* DMKU C1 lane 3: *B. megaterium* DMKU C5 lane 4: *B. megaterium* DMKU C6 และ lane 5: *B. megaterium* DMKU C7



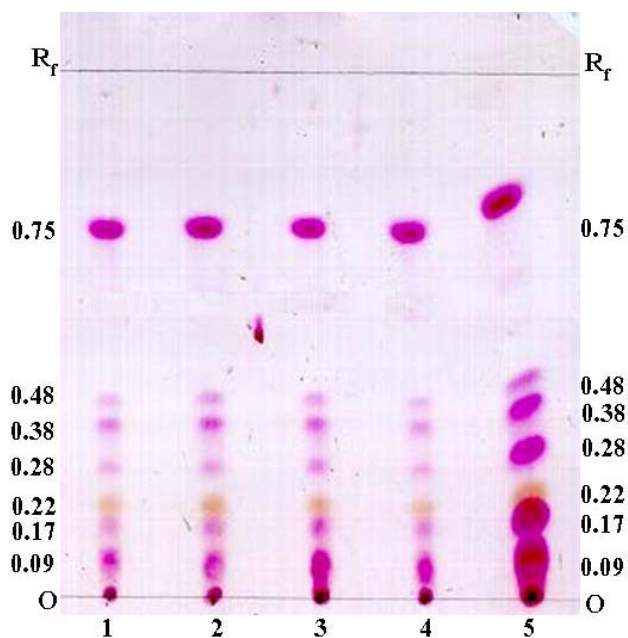
ภาพผนวกที่ ก3 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* P001
lane 2: *B. megaterium* P002 lane 3: *B. megaterium* P007 และ lane 4 :
B. megaterium P008



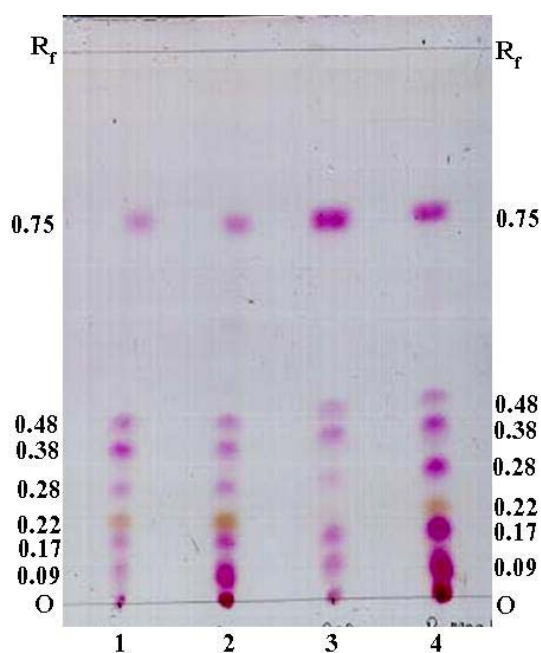
ภาพผนวกที่ ก4 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium*
BKRP5, lane 2: *B. megaterium* ExIII1, lane 3: *B. megaterium* P009, lane 4 :
B. megaterium LDD4 และ lane 5: *B. megaterium* BKRP10



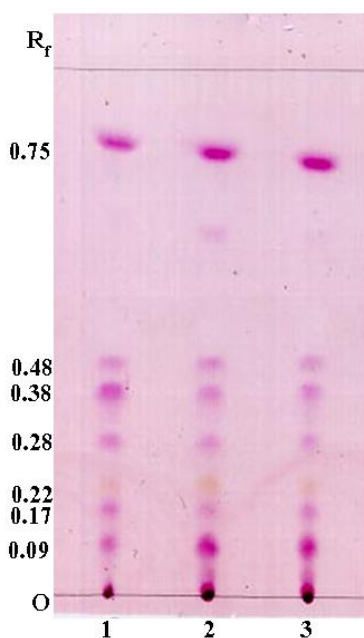
ภาพผนวกที่ ก5 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* P011, lane 2: *B. megaterium* P021 และ lane 3: *B. megaterium* DMKU Oriba-5-1



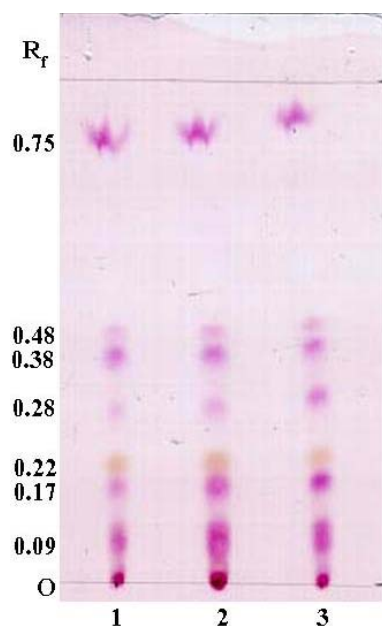
ภาพผนวกที่ ก6 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* P028 lane 2: *B. megaterium* P029 lane 3: *B. megaterium* K002, lane 4: *B. megaterium* K003 และ lane 5: *B. megaterium* K004



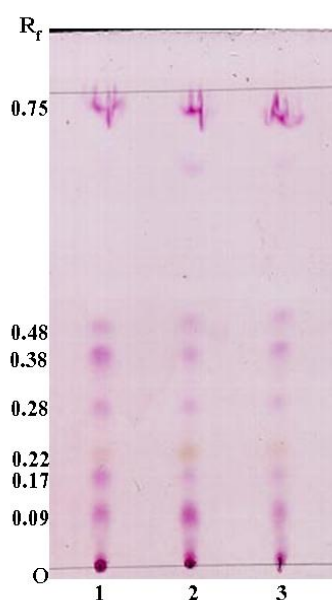
ภาพผนวกที่ ก7 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* K005, lane 2: *B. megaterium* K009, lane 3: *B. megaterium* K014 และ lane 4: *B. megaterium* K018



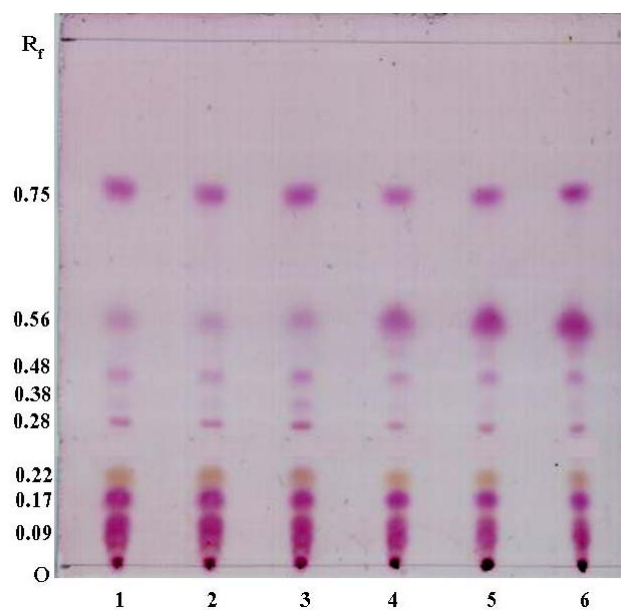
ภาพผนวกที่ ก8 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* K024 lane 2: *B. megaterium* DMKU A228 และ lane 3: *B. megaterium* DMKU C216



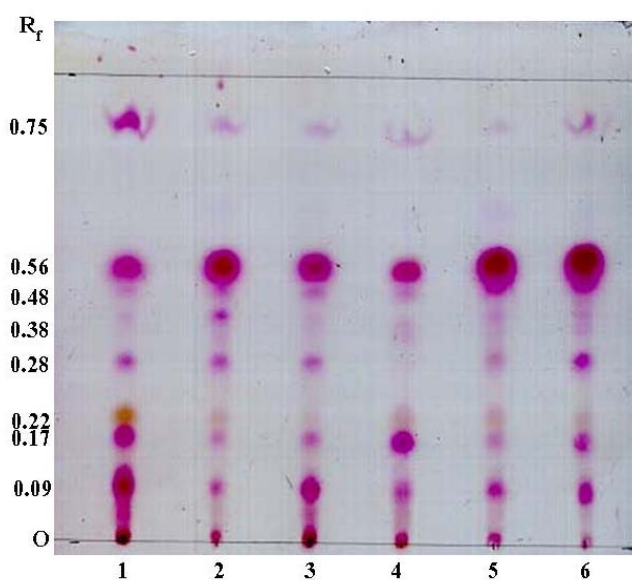
ภาพผนวกที่ ก9 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium* C46
lane 2: *B. megaterium* KORP17 และ lane 3: *B. megaterium* KORP23



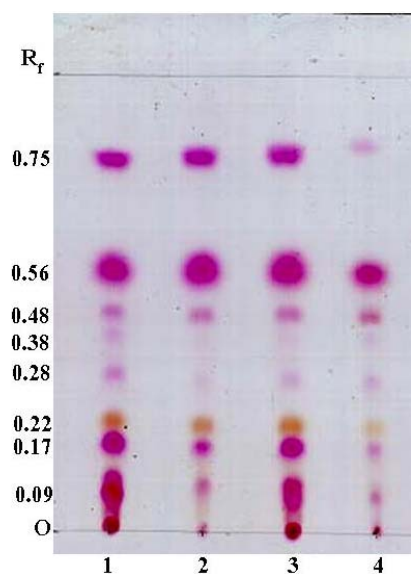
ภาพผนวกที่ ก10 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. megaterium*; lane 1: *B. megaterium*
KORP24 lane 2: *B. megaterium* T1RP13 และ lane 3: *B. megaterium* DMKU



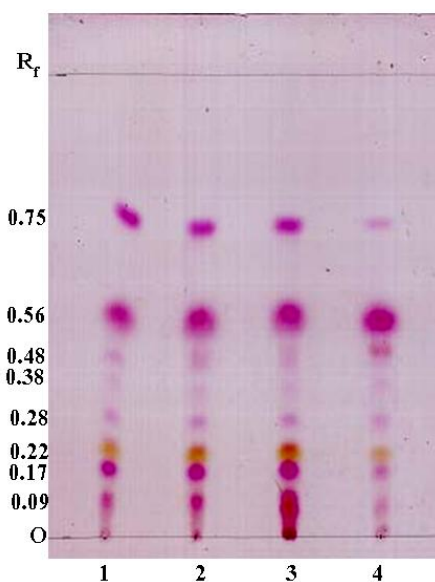
ภาพผนวกที่ ก11 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis*; lane 1: *B. thuringiensis* JC349, lane 2: *B. thuringiensis* Fong184, lane 3: *B. thuringiensis* KJP3A, lane 4: *B. thuringiensis* KJP3B, lane 5: *B. thuringiensis* P006 และ lane 6: *B. thuringiensis* P010



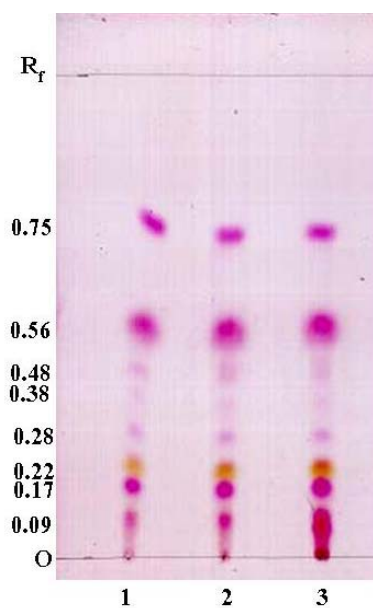
ภาพผนวกที่ ก12 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis*; lane 1: *B. thuringiensis* P012, lane 2: *B. thuringiensis* P023, lane 3: *B. thuringiensis* P024, lane 4: *B. thuringiensis* P026, lane 5: *B. thuringiensis* P027 และ lane 6: *B. thuringiensis* P030



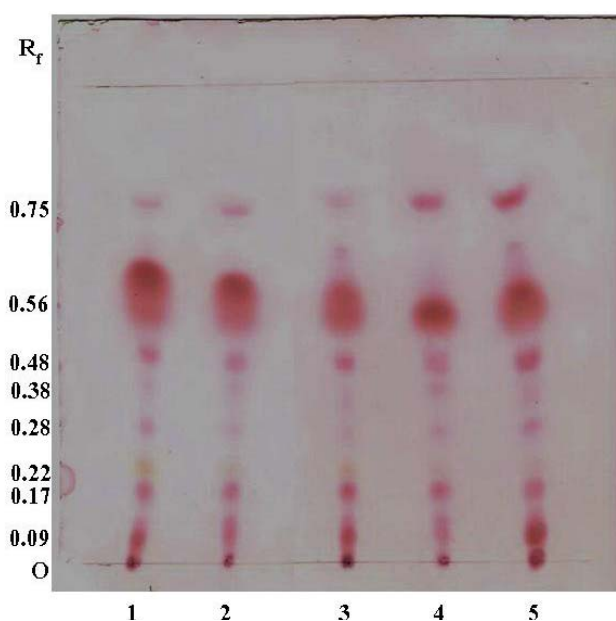
ภาพผนวกที่ ก13 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis*; lane 1: *B. thuringiensis* P031, lane 2: *B. thuringiensis* KJP4A, lane 3: *B. thuringiensis* KJP4B และ lane 4: *B. thuringiensis* P033



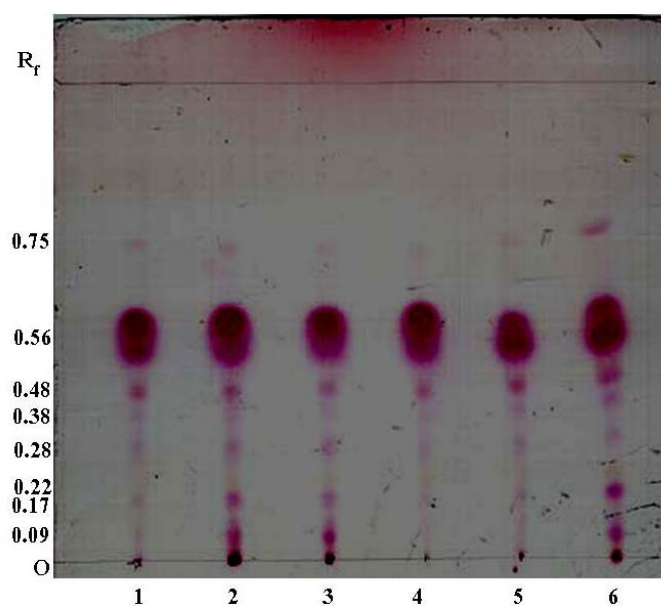
ภาพผนวกที่ ก14 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis*; lane 1: *B. thuringiensis* K006, lane 2: *B. thuringiensis* K011, lane 3: *B. thuringiensis* K015 และ lane 4: *B. thuringiensis* K026



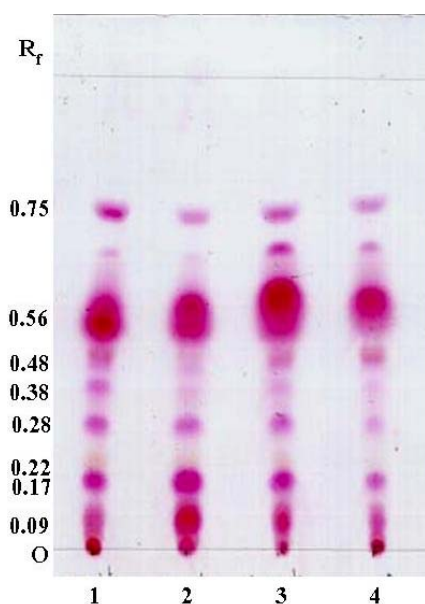
ภาพผนวกที่ ก15 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. thuringiensis*; lane 1: *B. thuringiensis* K031
lane 2: *B. thuringiensis* K032 และ lane 3: *B. thuringiensis* K033



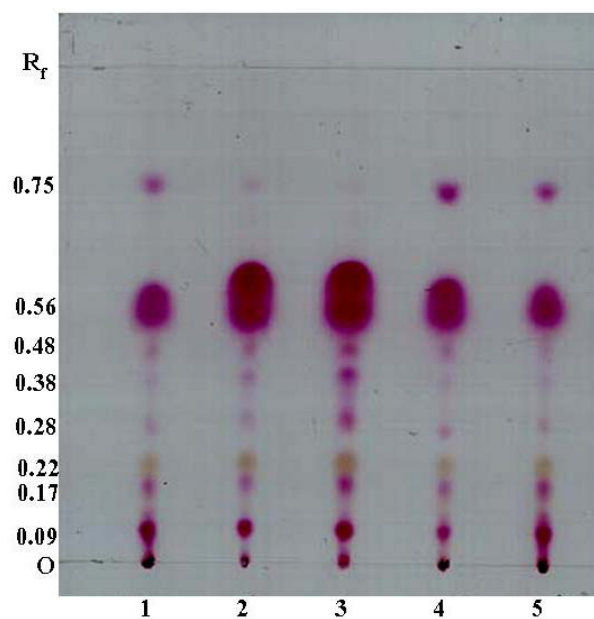
ภาพผนวกที่ ก16 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. amyloliquefaciens*; lane 1: *B. amyloliquefaciens* DSM7^T, lane 2: *B. amyloliquefaciens* DMKU A6, lane 3: *B. amyloliquefaciens* DMKU HB2/3, lane 4: *B. amyloliquefaciens* DMKU HB3/4 และ lane 5: *B. amyloliquefaciens* DMKU HB4



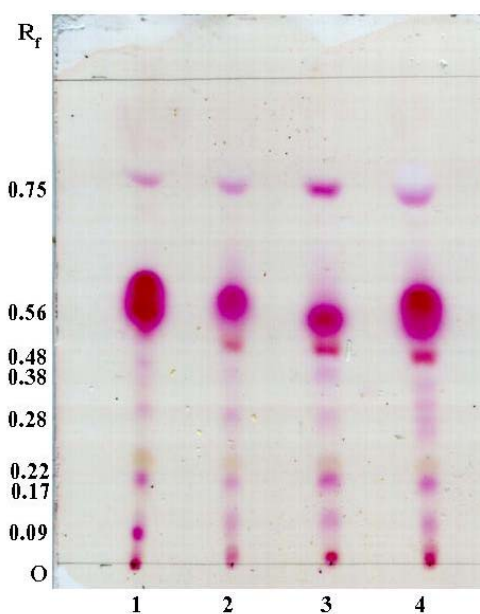
ภาพผนวกที่ ก17 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. amyloliquefaciens*; lane 1: *B. amyloliquefaciens* DMKU HB5/7, lane 2: *B. amyloliquefaciens* DMKU HB7, lane 3: *B. amyloliquefaciens* P014, lane 4: *B. amyloliquefaciens* P016, lane 5: *B. amyloliquefaciens* P018 และ lane 6: *B. amyloliquefaciens* K021



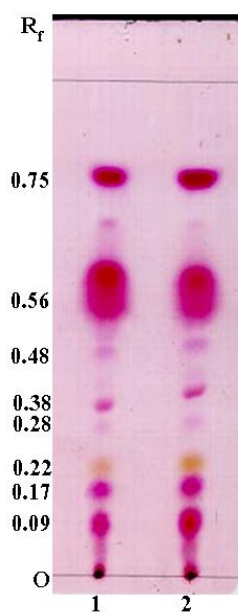
ภาพผนวกที่ ก18 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. amyloliquefaciens*; lane 1: *B. amyloliquefaciens* K027, lane 2: *B. amyloliquefaciens* P020, lane 3: *B. amyloliquefaciens* K016 และ lane 4: *B. amyloliquefaciens* K019



ภาพผนวกที่ ก19 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. licheniformis*; lane 1: *B. mojavensis* TISTR1047^T, lane 2: *B. licheniformis* K008, lane 3: *B. licheniformis* K013, lane 4: *B. licheniformis* K025 และ lane 5: *B. licheniformis* LDD2



ภาพผนวกที่ ก20 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. subtilis*; lane 1: *B. subtilis* ExIV6, lane 2: *B. subtilis* ExIII1, lane 3: *B. subtilis* ExIII3 และ lane 4: *B. subtilis* LDD1



ภาพผนวกที่ ก21 รูปแบบอะมิโนลิพิดที่พบใน *B. subtilis*; lane 1: *B. subtilis* LDD3a และ
lane 2: *B. subtilis* LDD3b

ภาคผนวก ข

คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp.

ตารางผนวกที่ ข1 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus megaterium* กลุ่มที่ไม่สามารถ
รีดิวส์ไนเตรท

คุณสมบัติ	<i>B. megaterium</i> *	DSM3228	DMKU78100	กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย carbofuran ได้									
				P001	P002	P007	P008	P009	P021	P029	K014	K018	K024
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.2-1.5	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ฟิเอชในอาหาร VP	4.5-6.8	5.21	5.24	มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.4-6.18									
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญใน NaCl													
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
การเจริญที่ฟิเอช 5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การผลิกรดจาก													
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	a	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	b	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
การใช้													
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย													
Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,
* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

คุณสมบัติ	<i>B. megaterium</i> *	กลุ่มที่สามารถละลายฟอสเฟตอินทรีย์											
		DMKU A228	DMKU C216	DMKU C46	DMKU C411	KORP16	KORP17	KORP23	KORP24	TIRP13	T2RP13	BKRP5	BKRP 10
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.2-1.5	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
พีเอชใน อาหารVP	4.5-6.8	5.0-5.29	5.0-5.29	5.0-5.41	5.0-5.32	5.0-5.32	5.0-5.41	5.0-5.32	5.0-5.32	5.0-5.41	5.0-5.29	5.10	5.0-5.41
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ในเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญใน NaCl													
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่พีเอช 5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การผลิกรดจาก													
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	a	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลกโตส	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การใช้													
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย													
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เอสคิวรีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ฟีนิลอะลานีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ยูเรีย	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive,

- = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข2 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus megaterium* กลุ่มที่ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท และสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5

คุณสมบัติ	<i>B. megaterium</i> *	กลุ่มที่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5				
		DMKU Ortba-5-1	DMKU Ortba-5-2	DMKU 6482(1)/1	DMKU C6	DMKU C7
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.2-1.5	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	-	-	-	-	-	-
พีเอชใน อาหารVP	4.5-6.8	4.67	4.54	5.12	4.86	5.24
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	-	-	-
การเจริญใน NaCl						
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	+	+	+	-	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	+	+	+	-	+
การเจริญที่พีเอช 4.5	-	+	+	+	+	+
การเจริญที่พีเอช 5.7	-	+	+	+	+	+
การผลิตกรดจาก						
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	a	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	-	-	-	-	-
แลคโตส	b	+	+	+	+	+
การใช้						
ซีเตรท	+	ND	ND	ND	ND	ND
โพรพิโอเนต	ND	ND	ND	ND	ND	ND
การย่อยสลาย						
แป้ง	+	ND	ND	ND	ND	ND
เอสคิวรีน	+	+	+	+	+	+
ฟิโนลอะลานีน	+	+	+	+	+	+
ยูเรีย	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive,

- = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข3 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus megaterium* กลุ่มที่สามารถ
รีดิวส์ไนเตรท

คุณสมบัติ	<i>B. megaterium</i> *	DMKU OriBa-4-2	DMKU OriBa12	DMKU OriBa 14-2	DMKU OriBa15-2	DMKU6482 (1)/1	DMKU C1	DMKU C5	กลุ่มที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต						
									P011	P028	K002	K003	K004	K005	K009
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.2-1.5	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
พีเอชในอาหาร VP	4.5-6.8	5.12	4.70	5.24	4.84	4.89	4.97	4.87	มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.4-6.18						
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl 5 เปอร์เซ็นต์	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญที่พีเอช 5.7	+	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
การผลิตกรดจาก															
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ดี(+)-ไซโลส	a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลกโตส	b	-	+	-	ND	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
การใช้															
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย															
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เอสคิวรีน	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ฟีนอลอะลานีน	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ซูเรีย	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive,

- = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ๔4 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus megaterium* และสายพันธุ์ใกล้เคียง

คุณสมบัติ	<i>B. megaterium</i> *	DMKU 1234(3)/1	LDD4	ExIII	<i>B. flexus</i> DSM 1320 ^T	<i>B. simplex</i> DSM 1321 ^T
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.2-1.5	>1	>1	>1	0.9	0.8-1.0
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	-	-	-	-	-	-
พีเอชใน อาหารVP	4.5-6.8	6.99	5.04	4.69	5.7	6.5
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	+	-	+
การเจริญใน NaCl						
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	-	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	+	ND	ND	-
การเจริญที่พีเอช 5.7	+	+	+	+	-	+
การผลิตภัณฑ์จาก						
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	-	-	+
ดี(+)-ไซโลส	a	-	+	-	-	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	-	+	+
แลคโตส	b	-	ND	-	ND	ND
การใช้						
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย						
แป้ง	+	+	+	+	+	+
เอสคิวรีน	+	+	ND	ND	-	-
ฟีนิลอะลานีน	+	+	+	+	-	-
ยูเรีย	+	+	ND	+	+	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive,

- = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข5 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus thuringiensis* กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลคี(+)-ไซโลส

คุณสมบัติ	<i>B. thuringiensis</i> *	KJP3A	KJP3B	KJP4A	KJP4B
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.0-1.2	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+
Crystalline parasporal bodies	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหารVP	4.3-5.6	5.26	5.24	5.44	5.38
การเจริญใน anaerobic agar	+	+	+	+	+
การรีดิวส์ในเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl					
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+
การผลิตกรดจาก					
คี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-	-	-
คี(+)-ไซโลส	-	+	+	+	+
คี(+)-แมนนิทอล	-	-	-	-	-
แลคโตส	ND	-	-	-	-
การใช้					
ซีเตรท	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-
การย่อยสลาย					
แป้ง	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+
เจลาติน	ND	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข6 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus thuringiensis* กลุ่มที่สามารถ
ย่อยสลายสารคาร์โบฟูแรน

คุณสมบัติ	<i>B. thuringiensis</i> *	P010	P012	P023	P024	P026	P027	P030	P031	P033
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.0-1.2	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crystalline parasporal bodies	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหารVP	4.3-5.6	อยู่ในช่วง 4.5-4.97								
การเจริญใน anaerobic agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การรีดิวส์ไนเตรทเป็น ไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl										
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	-
การผลิกรดจาก										
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-ไซโลส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
แลคโตส	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
การใช้										
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย										
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เกซีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เจลาติน	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข6 (ต่อ)

คุณสมบัติ	<i>B. thuringiensis</i> *	K006	K011	K015	K026	K031	K032	K033
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.0-1.2	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
แกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+	+	+	+
Crystalline parasporal bodies	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบVP	+	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหารVP	4.3-5.6	อยู่ในช่วง 4.5-4.97						
การเจริญใน anaerobic agar	+	+	+	+	+	+	+	+
การวัดสีในเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl								
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	-
การผลิตรกรดจาก								
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-ไซโลส	-	-	-	-	-	-	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	-	-	-	-	-	-	-	-
แลกโตส	ND	-	-	-	-	-	-	-
การใช้								
ซีเตรท	+	-	+	+	+	+	+	+
โพรฟิไอเนต	ND	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย								
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+	+
เจลาติน	ND	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข7 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus subtilis*

คุณสมบัติ	<i>B. subtilis</i> *	DMKU A3	DMKU A5	DMKU A7(2)	DMKU HA3	DMKU HA8	ExIII3	ExIV6	LDDI	LDD3a	LDD3b
ขนาดเซลล์ (μm)	0.7-0.8	————		0.5-0.7	————		<1	<1	<1	<1	<1
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ฟิเอชใน อาหาร VP	5.4-8.0	7.14	8.09	4.93	6.45	6.19	5.40	5.80	5.49	5.39	5.52
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl											
5 เปอร์เซนต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซนต์	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10 เปอร์เซนต์	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
การผลิตกรดจาก											
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบีโนส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การใช้											
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย											
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เจลาติน	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative , ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข8 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus amyloliquefaciens*

คุณสมบัติ	<i>B. amyloliquefaciens</i> *	<i>B. amyloliquefaciens</i> [†]	P014	P016	P018	K021	K027	P020	K016	K019
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.7-0.8	0.8-0.9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
แกนรูปภายในเซลล์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบVP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหารVP	ND	5.20	ค่า pH อยู่ในช่วง 5.4-6.23				—	5.74	4.99	5.77
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl										
5 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	-	-	-
การผลิตกรดจาก										
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การใช้										
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย										
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เลซิทิน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative,

ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

คุณสมบัติ	<i>B. amyloliquefaciens</i> *	DMKU A1	DMKU A6	DMKU HA1	DMKU HA4	DMKU HA6	DMKU HA8	DMKU HB2/3	DMKU HB3/4
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.7-0.8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
แกนกลางในเซลล์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหาร VP	ND	7.24	7.41	6.83	6.38	6.92	6.92	5.45	5.38
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ในเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl									
5 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	-	-	-	-	-	-	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
การผลิตกรดจาก									
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	a	+	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การใช้									
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โพธิ์ฟิโอนด์	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยสลาย									
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เลซิดิน	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative,

ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

คุณสมบัติ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> *	DMKU HB4	DMKU HB5/7	DMKU HB7
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.7-0.8	<1	<1	<1
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-
การทดสอบVP	+	+	+	+
ฟิเอชใน อาหารVP	ND	6.73	7.15	5.59
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl				
5 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	-	+	-
10 เปอร์เซ็นต์	ND	-	-	-
การผลิตกรดจาก				
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	a	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	a	+	+	+
แลคโตส	+	+	+	+
การใช้				
ซีเตรท	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-
การย่อยสลาย				
แป้ง	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+
เลซิทิน	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่

พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข9 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus pumilus*

คุณสมบัติ	<i>B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i> ATCC 7061 ^T	KJP (1)/8	DMKU A2
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.6-0.7	0.7	<1	<1
เกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-
การทดสอบ VP	+	+	+	+
พีเอชใน อาหาร VP	4.8-5.6	5.02	4.98	4.93
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-	-
การเจริญใน NaCl				
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	-	+	-	-
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	-	-
การผลิตกรดจาก				
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	-	+
แลกโตส	-	-	-	-
การใช้				
ซีเตรท	+	+	+	+
โพรพิโอเนต	-	-	-	-
การย่อยสลาย				
แป้ง	-	-	-	ND
เกฮีน	+	+	+	+
เลซิดิน	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข10 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus licheniformis*

คุณสมบัติ	<i>B. licheniformis</i> *	TISTR1109	TISTR1110	P013	P015	P017	P019	K008	K013	K025	LDD2
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.6-0.8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหาร VP	5.0-6.5	6.4	5.20	ค่า pH อยู่ในช่วง 5.32-5.98				5.96	5.78	5.32	5.35
การเจริญใน anaerobic agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl											
5 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การผลิตกรดจาก											
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การใช้											
ซีเตรท	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
โพรพิโอเนต	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การย่อยสลาย											
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เลซิทิน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข11 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus atrophaeus*

คุณสมบัติ	<i>B. atrophaeus</i> *	<i>B. atrophaeus</i> DSM 5151 ^T	DMKU HA2	DMKU HA7	DMKU HA9	DMKU HA10	DMKU HA11
ขนาดของเซลล์ (μm)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	+	+	+	+	+	+	+
พีเอชใน อาหาร VP	5.1-5.52	5.56	5.93	6.42	6.59	7.08	6.24
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-	-	-	-
การรีดิวส์ในเตรทเป็น ไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl							
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	ND	-	+	-	+	-	-
10 เปอร์เซ็นต์	ND	-	-	-	-	-	-
การผลิตกรดจาก							
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	+	+	+
แลคโตส	-	-	-	-	-	-	-
การใช้							
ซีเตรท	-	-	-	-	-	-	-
โพรฟิโอนต	+	+	+	+	+	+	+
การย่อยสลาย							
แป้ง	+	+	+	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+	+	+	+
เจลาติน	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ตารางผนวกที่ ข12 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* กลุ่ม IB

คุณสมบัติ	<i>B.adius</i> TEI ***	<i>B. firmus</i> K029	<i>B. firmus</i> LDD7	<i>B. firmus</i> LDD9	<i>B. firmus</i> *
ขนาดของเซลล์ (μm)	0.6	<1	<1	<1	<1
เกรนูลภายในเซลล์	-	-	-	-	-
การทดสอบ VP	-	-	-	-	-
พีเอชใน อาหาร VP	7.12	6.0-6.8	5.9	6.13	4.5-6.0
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	ND	ND	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	+	+	-
การเจริญใน NaCl					
5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	ND
7 เปอร์เซ็นต์	ND	+	+	+	+
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	+	+	ND
การผลิตกรดจาก					
ดี(+)-กลูโคส	-	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-	-	-
ดี(+)-ไซโลส	-	-	-	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	-	-	+	+	+
แลกโตส	-	-	-	-	ND
การใช้					
ซีเตรท	-	-	ND	ND	-
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	-
การย่อยสลาย					
แป้ง	-	-	-	-	+
เคซีน	+	+	+	+	+
เลซิทิน	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

*** = คุณสมบัติจาก อุบลพรรณ (2550)

ตารางผนวกที่ ข13 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* กลุ่ม II

คุณสมบัติ	<i>B. circulans</i> *	<i>B. circulans</i> ICM 2504	<i>P. polymyxa</i> N-10	<i>P. polymyxa</i> **	<i>Brevibacillus</i> <i>choshienensis</i> TB2***	<i>B.sporothermodurans</i> SB4***
ขนาดของเซลล์ (μm)	<1	<1	<1	0.7-1.0	<1	0.6
แกรนูลภายในเซลล์	-	-	+	-	-	-
การทดสอบ VP	-	-	+	+	-	-
พีเอชใน อาหาร VP	4.5-6.6	5.43	5.5	<6	5.5	5.6
การเจริญใน anaerobic agar	ND	+	+	+	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็น ไนไตรท์	b	+	+	+	+	+
การเจริญใน NaCl						
5 เปอร์เซ็นต์	a	+	-	-	-	-
7 เปอร์เซ็นต์	a	-	-	-	ND	ND
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-
การผลิกรดจาก						
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+	-	-
แอล(-)-อะราบิโนส	+	+	+	+	-	-
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+	-	-
แลคโตส	+	+	ND	ND	-	-
การใช้						
ซีเตรท	b	+	-	-	-	-
โพรพิโอเนต	ND	-	-	-	ND	ND
การย่อยสลาย						
แป้ง	+	+	+	+	-	-
เคซีน	+	+	+	+	ND	ND
เลซิติน	-	-	-	-	ND	ND

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, a = 50-84% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative, ND = ไม่พบข้อมูล,

* = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

** = คุณสมบัติจาก Claus and Berkeley (1986) และ Gordon (1989)

*** = คุณสมบัติจาก อุบลพรรณ (2550)

ตารางผนวกที่ ข14 คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *Bacillus* sp. กลุ่ม III

คุณสมบัติ	<i>B. sphaericus</i> *	<i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 ^T	K022
ขนาดของเซลล์ (μm)	<1	<1	<1
เกรนูลภายในเซลล์	-	-	-
การทดสอบ VP	-	-	-
พีเอชใน อาหาร VP	7.4-8.6	7.3	8.11
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	-	-	-
การเจริญใน NaCl			
5 เปอร์เซ็นต์	b	+	+
7 เปอร์เซ็นต์	b	-	-
10 เปอร์เซ็นต์	-	-	-
การผลิตกรดจาก			
ดี(+)-กลูโคส	-	-	-
แอล(-)-อะราบิโนส	-	-	-
ดี(+)-ไซโลส	-	-	-
ดี(+)-แมนนิทอล	-	-	-
แลคโตส	-	-	+
การใช้			
ซีเตรท	b	-	-
โพรพิโอเนต	ND	-	-
การย่อยสลาย			
แป้ง	-	-	-
เคซีน	b	+	+
เลซิทิน	-	-	-

หมายเหตุ : + = 85 – 100% ให้ผล positive, b = 15-49% ให้ผล positive, - = 0-14% ให้ผล negative,

ND = ไม่พบข้อมูล, * = คุณสมบัติจาก Gordon (1989)

ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 King's medium B

1) Proteose peptone	20	g/l
2) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2.5	g/l
3) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6.0	g/l
4) Agar	15.0	g/l
5) Glycerol	15.0	ml/l

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.2 ± 0.2 จากนั้นนำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient agar (NA)

1) Peptone	5	g/l
2) Beef extract	3	g/l
3) Agar	15.0	g/l

นำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 Extraction solvent

ใช้ Chloroform (CH_3Cl) - methanol (CH_3OH) - 0.3%NaCl solution (2:1:0.2, v:v:v) โดยจะใส่สารทีละอย่างตามลำดับลงในขวดสีชา ระวังสาร chloroform ซึ่งเป็นสารอันตรายมาก การสูดดมเข้าไปมากๆจะเป็นพิษกับร่างกาย ภาชนะที่ใส่ต้องปิดสนิท ส่วน NaCl 0.3% solution เตรียมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ NaCl 0.3 กรัม

2.2 Mobile solvent

ใช้ Chloroform (CH_2Cl) – methanol (CH_3OH) - 0.2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution (55:35:8, v:v:v) โดยจะใส่สารตามลำดับข้างต้นลงในขวดสีชา ภาชนะที่ใส่ต้องปิดสนิท ส่วน $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2% solution เตรียมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ NaCl 0.2 กรัม

2.3 ซิลิกาเจลเฟลต

เตรียมแผ่นซิลิกาเจล โดยใช้ดินสอดะทำเครื่องหมายลงบนแผ่นโดยให้จุดห่างจากขอบล่างและขอบด้านข้างเป็นระยะ 1.5 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างจุดเป็นระยะ 1.5 เซนติเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของแผ่นซิลิกาเจลที่ใช้ในการทดสอบ

2.4 0.3% ninhydrin

ชั่ง ninhydrin 0.3 กรัม เตรียมโดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร เตรียมเสร็จใส่ลงในขวดสีชา ภาชนะที่ใส่ต้องปิดสนิท

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเชาวนี มีหวัง Miss Chowwanee Meewang
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากสถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2547 ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2552
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-
ผลงานที่ได้รับการเสนอ	เชาวนี มีหวัง, วงษ์ บุญสืบสกุล, กรรณิการ์ ดวงมัลย์ และสุรางค์ สุธิราวุธ. การใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography เพื่อการจำแนก <i>Bacillus</i> sp. เรื่องเต็มใน งานประชุมวิชาการครั้งที่ 46 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2551. วันที่ 26 ม.ค.-1 ก.พ., หน้า 569-577. (ภาค โปสเตอร์)