บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดิน

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดิน ที่เก็บจากป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน โดยวัดค่าพีเอช และความชื้นของดิน รวมทั้งนับจำนวนแบคทีเรียสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 4 โดยในดินตัวอย่างมีจำนวนแบคทีเรียสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก 10^4 CFU/กรัมของดินตัวอย่าง ค่าพีเอชของดินแสดงความเป็นกรดอ่อนถึงกลาง และปริมาณความชื้นของตัวอย่างดิน 17 – 25 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 4 แสดงจำนวนแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกในดิน ค่าพีเอชและความชื้นของดิน

จุดเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวนแบคทีเรียสร้างเอนโดสปอร์		พีเอช	เปอร์เซ็นต์ความชื้น
		NA 10^4 CFU/g	Dilute NA 10^4 CFU/g		
ทอทิพย์	5	7.2	4.8	6.3	20.0
บ้านช้างเหยียบ	5	4. 9	3.4	6.7	25.1
ป่าละอู	6	3.4	5.3	6.9	18.1
พะเนินทุ่ง	7	4.4	5.1	6.4	19.0
เขาสามยอด	3	3.9	6.6	7.2	21.0
กม. 27	3	5.4	6.9	6.2	24.5
โป่งพรม	6	5.0	9.6	6.8	17.5

การคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

การคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกจากตัวอย่างดิน ด้วยเทคนิค heat treatment โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ diluted NA สาเหตุที่ใช้ dilute NA เนื่องจากสามารถจำกัดการเจริญของโคโลนี *B. mycoides* ที่มีลักษณะแผ่ขยายคล้ายรากไม้ (rhizoid) เป็นบริเวณกว้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลดีต่อการคัดแยกโคโลนีของแบคทีเรียต่างชนิด (Hashimoto, Whang and Nagaoka, 2006, pp.179–185; Janssen, et al., 2002, pp.2391-2396) หลังจากคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกจากตัวอย่างดินของอุทยานแห่งชาติแก่งกระจานจำนวน 35 ตัวอย่าง กำหนดรหัสของสายพันธุ์แบคทีเรียดังแสดงในตาราง 5 และ 6 โดยระบุถึงตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างดิน ชนิดของอาหารที่ใช้และลำดับของสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ จากการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายจากดิน สามารถรวบรวมแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก จำนวน 183 สายพันธุ์ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกแสดงรายละเอียดในตาราง 7 โดยพบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกที่แตกต่างกัน 11 กลุ่ม โดยจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี เซลล์และเอนโดสปอร์คล้ายคลึงกันในกลุ่มสัณฐานวิทยาเดียวกัน ทั้งนี้ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่พบมีความหลากหลาย และพบลักษณะเอนโดสปอร์แตกต่างกันคือ วงรี (ellipsoidal) และทรงกลม (round/spherical) โดยเอนโดสปอร์ที่พบมีลักษณะพองโต (swelling) และไม่พองโต ลักษณะดังกล่าวใช้เป็น key characters ในการจัดจำแนกแบคทีเรียตามหลักการนิวเมอริคัล

ตาราง 5 จุดเก็บและการกำหนดชื่อตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัย

จุดเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่างดิน
ทอทิพย์	5	TT1, TT2, TT3, TT4, TT5,
บ้านช้างเหยียบ	5	Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5
ป่าละอู	6	LU1, LU2, LU3, LU4, LU5, LU6
พะเนินทุ่ง	7	PN1, PN2, PN3, PN4, PN5, PN6, PN7
เขาสามยอด	3	SY1, SY2, SY3
กม. 27	3	27km1, 27km2, 27km3
โป่งพรม	6	PPR1, PPR2, PPR3, PPR4, PPR5, PPR6

ตาราง 6 แสดงรหัสและจำนวนของสายพันธุ์แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก คัดแยกจากดินป่าดิบแล้ง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน

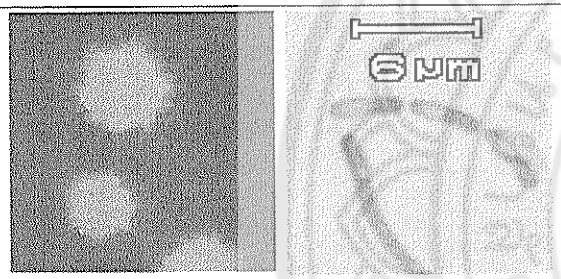
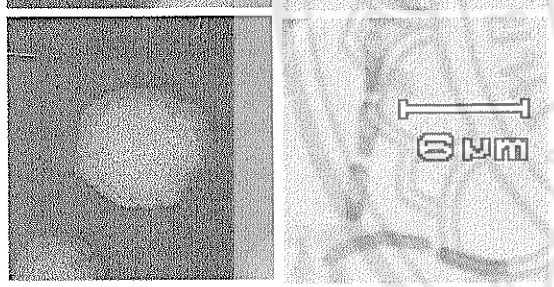
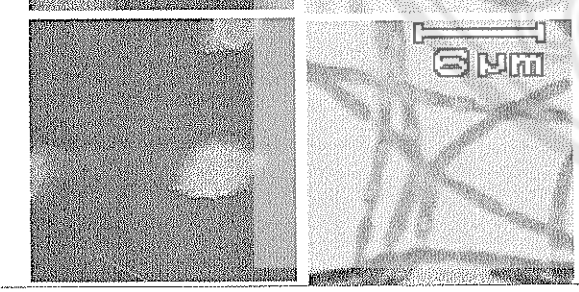
กลุ่ม	รหัสปฏิบัติการ	จำนวน
G1	PPR1.D4, PPR1.N3, PPR2.N1, PPR2.N10, PPR4.D6, LU1.N2, LU1.N7, LU1.D3, LU2.N2, LU3.D8, PN3.N9, PN4.N14, PN5.N7, PN7.D13, SY3.N8, SY6.N6, 27km1.N4, 27km3.N3, TT1.D1, TT3.N4, Ch1.N3, Ch3.D1, Ch4.N8, TT4.N3	24
G2	PPR1.N22, PPR2.D3, PPR3.N6, PPR4.D4, LU2.N3, LU3.D3, LU6.N10, LU4.D1, PN1.N10, PN1.D12, PN2.N16, PN4.N15, SY1.D6, SY3.N10, Ch1.N4,Ch2.N5, Ch3.N4, Ch4.N2, 27km1.N3, 27km3.N2, TT1.D8, TT2.N5, TT5.N2,	23
G3	PPR1.N23, PPR1.D5, PPR5.N13, LU1.N5, LU3.D5, LU4.D10, LU6.D12, PN2.N17, PN1.D14, PN3.N7, PN4.D3, SY3.N12, SY3.D7, Ch1.N8, Ch2.N7, Ch4.N4, 27km3.N5, TT2.N6, TT3.D4, TT4.D1, TT5.N3	21
G4	PPR2.D5, PPR3.N1, PPR5.N3, PPR6.N21, LU3.D6, PN1.D15, PN3.N8, Ch2.D1, Ch4. N7, 27km2.N6, TT3.N6	11
G5	PPR1.N25, PPR2.N18, PPR5.D4, LU2.N9, 1PN1.N7, PN2.N8, PN2.N10, PN2.D3, PN3.D1, PN6.D2, PN6.D7, PN7.N1, SY3.D2, SY2.D12, Ch3.N5, Ch5.N4, 27km3.N1, TT2.N9, TT3.D5	19
G6	PPR1.N4, PPR1.N8, PPR5.D11, LU2.D13, LU3.N9, PN3.D8, PN5.D11, SY1.N15, SY2.N8, SY3.D8, Ch2.N10, Ch3.N7, Ch5.N5, 27km1.N6, TT5.N5	15

ตาราง 6 (ต่อ)

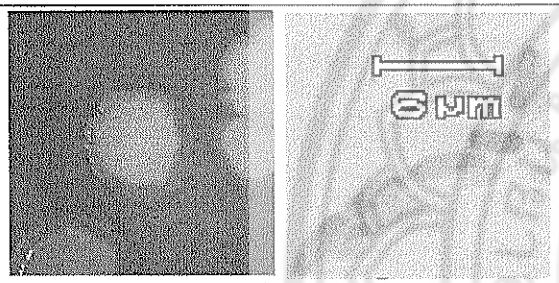
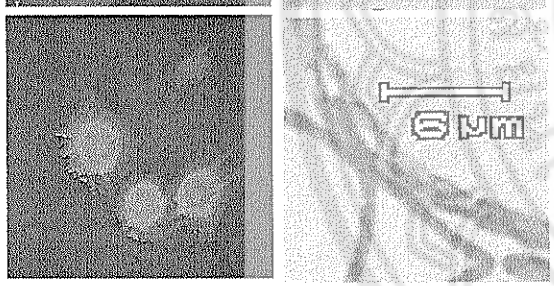
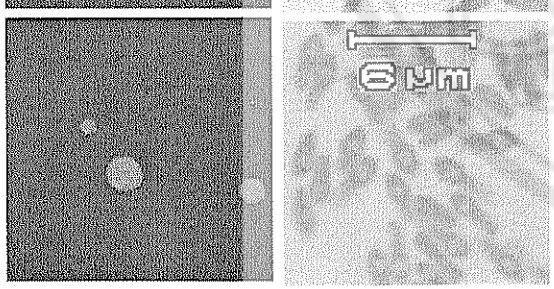
กลุ่ม	รหัสปฏิบัติการ	จำนวน
G7	PPR1.N29, PPR6.D6, LU3.N12, PN2.D6, LU4.N12, LU6.N13, PN4.N17, PN6.D6, PN6.N13, Ch3.N8, Ch5.N9, 27km2.N2, SY2.N9,TT4.N9, TT5.N6	15
G8	PN2.N15, PPR1.N28, PPR6.D4, LU2.D12, LU3.N8, LU3.D17, PN2.N11, PN3.N14, PN5.D10, SY2.N7, Ch2.N9, 27km2.N2, TT3.N9, TT4.D2	14
G9	PPR1.N17, PPR1.D7, PPR3.N11, PPR4.N8, LU4.N11, LU6.N12, PN4.N13, SY3.D5, LU1.N8, SY2.N10, Ch1.D3, TT5.D2, 27km2.N3	13
G10	PPR3.N5, PPR5.D7, PPR6.N14, LU2.D10, LU3.N5, PN3.N11, PN6.D11, SY2.D13, Ch5.N10, 27km3.D2, TT3.D6	11
G11	PPR1.N27, PPR3.D6, PPR5.D9, LU2.D11, LU3.N6, LU3.D13, PN3.D4, PN3.N12, PN3.D5, PN5.N10, PN3.D4, SY2.D14, Ch2.N8, 27km2.N1, TT1.N9, TT2.D6, TT5.N4	17

หมายเหตุ: N หมายถึง NA; D หมายถึง Diluted NA

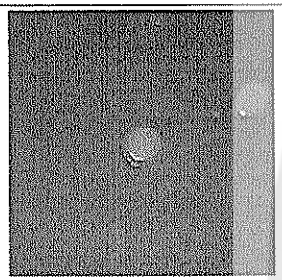
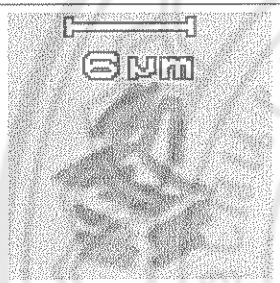
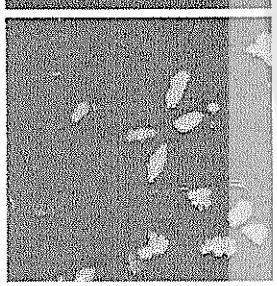
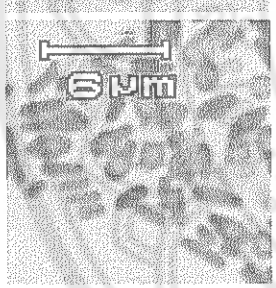
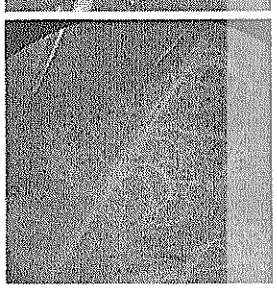
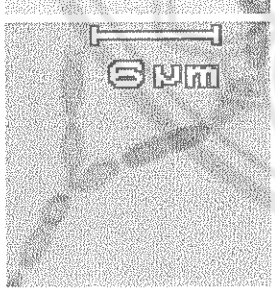
ตาราง 7 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี เซลล์และเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญ**ในสภาวะแอโรบิกที่คัดแยก**จากดินป่าดิบแล้ง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน

กลุ่ม		ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	ลักษณะเอนโดสปอร์	จำนวนสายพันธุ์
G1		เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก แบนราบ ผิวหน้าขรุขระและมันวาว สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	24
G2		เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก แบนราบ ผิวหน้าขรุขระและแห้ง สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	23
G3		เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร รูปร่างกระสวย ขอบหยัก ยกตัวสูง ผิวหน้าขรุขระและแห้ง สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	21

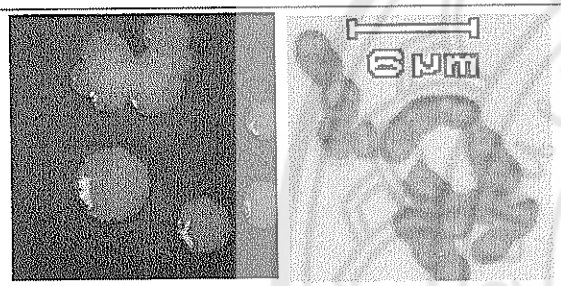
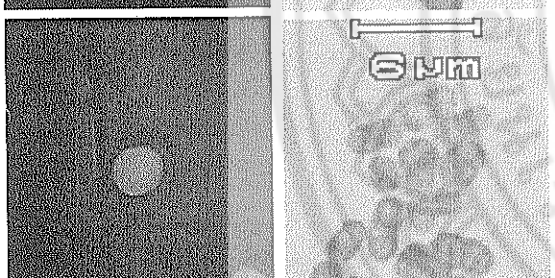
ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่ม		ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	ลักษณะเอนโดสปอร์	จำนวนสายพันธุ์
G4		เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก นูนตรงกลาง ผิวหน้าขรุขระและมันวาว สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	11
G5		เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร รูปร่างกระสวย ขอบหยัก ยกตัวสูง ผิวหน้าขรุขระและแห้ง สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	19
G6		เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม ขอบเรียบ แบนราบ ผิวหน้าเรียบและแห้ง สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงกลม	15

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่ม			ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	ลักษณะเอนโดสปอร์	จำนวนสายพันธุ์
G7			เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม ขอบเรียบ ยกตัวสูง ผิวหน้าเรียบและมันวาว สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	15
G8			เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยักเว้า ยกตัวสูง ผิวหน้าเรียบและมันวาว สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงกลม	14
G9			โคโลนีแตกแขนงคล้ายรากไม้ ผิวหน้าขรุขระและแห้ง สีขาว	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	13

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่ม		ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	ลักษณะเอนโดสปอร์	จำนวนสายพันธุ์
G10		เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร รูปร่างกลม ขอบหยัก ยกตัวสูง ผิวหน้าเรียบและมันวาว สีครีม	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	11
G11		เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร รูปร่างกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง ผิวหน้าเรียบและมันวาว สีครีม	แกรมบวก รูปท่อน	วงรี	17

การจัดจำแนกแบคทีเรียตามหลักการอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัล

ทดสอบ test error โดยใช้สายพันธุ์แบคทีเรียอ้างอิง ตัวแทนของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก จำนวน 3 ชนิดคือ *Bacillus cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC6748 และ *B. subtilis* ATCC6633 โดยทดสอบลักษณะทางฟีโนไทป์สำคัญที่ประยุกต์จากวิธีจัดจำแนกแบบนิวเมอริคัลมาตรฐานของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์เจริญในสภาวะแอโรบิกในรายงานวิจัยของ Gordon, et al. (Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) โดยเทียบกับข้อมูลงานวิจัยของ Priest และคณะ ที่ใช้วิธีมาตรฐานเดียวกัน (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882) ผลการวิจัยแสดงในตาราง 8 และเมื่อคำนวณค่าความน่าจะเป็นของ test error พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.6 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ในการศึกษาของผู้วิจัย ยอมรับได้ถึงความถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ ทั้งนี้สนับสนุนจากทฤษฎีที่กำหนดว่า ความน่าจะเป็นของ test error ต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถยอมรับได้ (Priest and Austin, 1993, pp.20-22)

$S_i^2 = n/2t$ (Equation 15; Sneath and Johnson, 1972)

$S^2_{oval} = 0/2(3)$

$S^2_{round} = 0/2(3)$

$S^2_{gelatin} = 0/2(3)$

$S^2_{starch} = 0/2(3)$

$S^2_{urea} = 0/2(3)$

$S^2_{citrate} = 0/2(3)$

$S^2_{37} = 0/2(3)$

$S^2_{50} = 0/2(3)$

$S^2_{anaerobe} = 0/2(3)$

$S^2_{indole} = 0/2(3)$

$S^2_{nitrate} = 0/2(3)$

$S^2_{ONPG} = 0/2(3)$

$S^2_{oxidase} = 0/2(3)$

$S^2_{VP} = 0/2(3)$

$S^2_{galactose} = 1/2(3) = 1/6 = 0.16$

$S^2_{galactose} = 0/2(3)$

$S^2_{lactose} = 0/2(3)$

$S^2_{maltose} = 0/2(3)$

$S^2_{mannitol} = 0/2(3)$

$S^2_{mannose} = 2/2(3) = 2/6 = 0.33$

$S^2_{raffinose} = 1/2(3) = 1/6 = 0.16$

$S^2_{salicin} = 0/2(3)$

$S^2_{sucrose} = 1/2(3) = 1/6 = 0.16$

$S^2_{adonitol} = 0/2(3)$

$S^2_{arabinose} = 0/2(3)$

$S^2_{cellobiose} = 0/2(3)$

$S^2_{inositol} = 0/2(3)$

$S^2_{rhamnose} = 0/2(3)$

$S^2_{trehalose} = 0/2(3)$

$S^2_{sorbitol} = 0/2(3)$

$S^2_{xylose} = 0/2(3)$

$S^2 = 1/N*(S_A^2 + S_B^2 + \ldots S_N^2)$

$S^2 = 1/31*(S^2_{galactose} + S^2_{mannose} + S^2_{raffinose} + S^2_{sucrose})$

$S^2 = 1/31*(0.16+0.33+0.16+0.16)$

$S^2 = 1/31*(0.81)$

$S^2 = 0.026$

$P_i = 1/2*[1 - \sqrt{(1 - 4S^2)}]$ (Equation 4; Sneath and Johnson, 1972)

$P_i = 1/2*[1 - \sqrt{(1 - 4* 0.026)}]$

$P_i = 1/2*[1 - \sqrt{(1 - 0.104)}]$

$P_i = 1/2*[1 - \sqrt{(0.896)}]$

$P_i = 1/2*(1 - 0.946)$

$P_i = 1/2*(0.083102514)$

$P_i = 0.026$ ดังนั้น $P_i = 2.6$ เปอร์เซ็นต์

ตาราง 8 แสดงข้อมูลของการทดสอบ test error

Clusters	No. OTUs	Spores	oval	round	Gelatin	Starch	Urea	Citrate	Growth at	37 °C	50 °C	Anaerobe	Indole	Nitrate	ONPG	Oxidase	VP	Acid from:	Galactose	Glucose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Adonitol	Arabinose	Cellobiose	meso-inositol	Rhamnose	Sorbitol	Trehalose	Xylose
B. cereus data	1		+	-	+	-	-	-		+	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B. cereus	1		+	-	+	-	-	-		+	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
B. megaterium data	2		+	-	-	+	-	+		+	-	-	-	-	+	-	-		+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
B. megaterium	2		+	-	-	+	-	+		+	-	-	-	-	+	-	-		-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
B. subtilis data	3		+	-	+	+	-	-		+	-	-	-	+	+	-	+		-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
B. subtilis	3		+	-	+	+	-	-		+	-	-	-	+	+	-	+		-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-

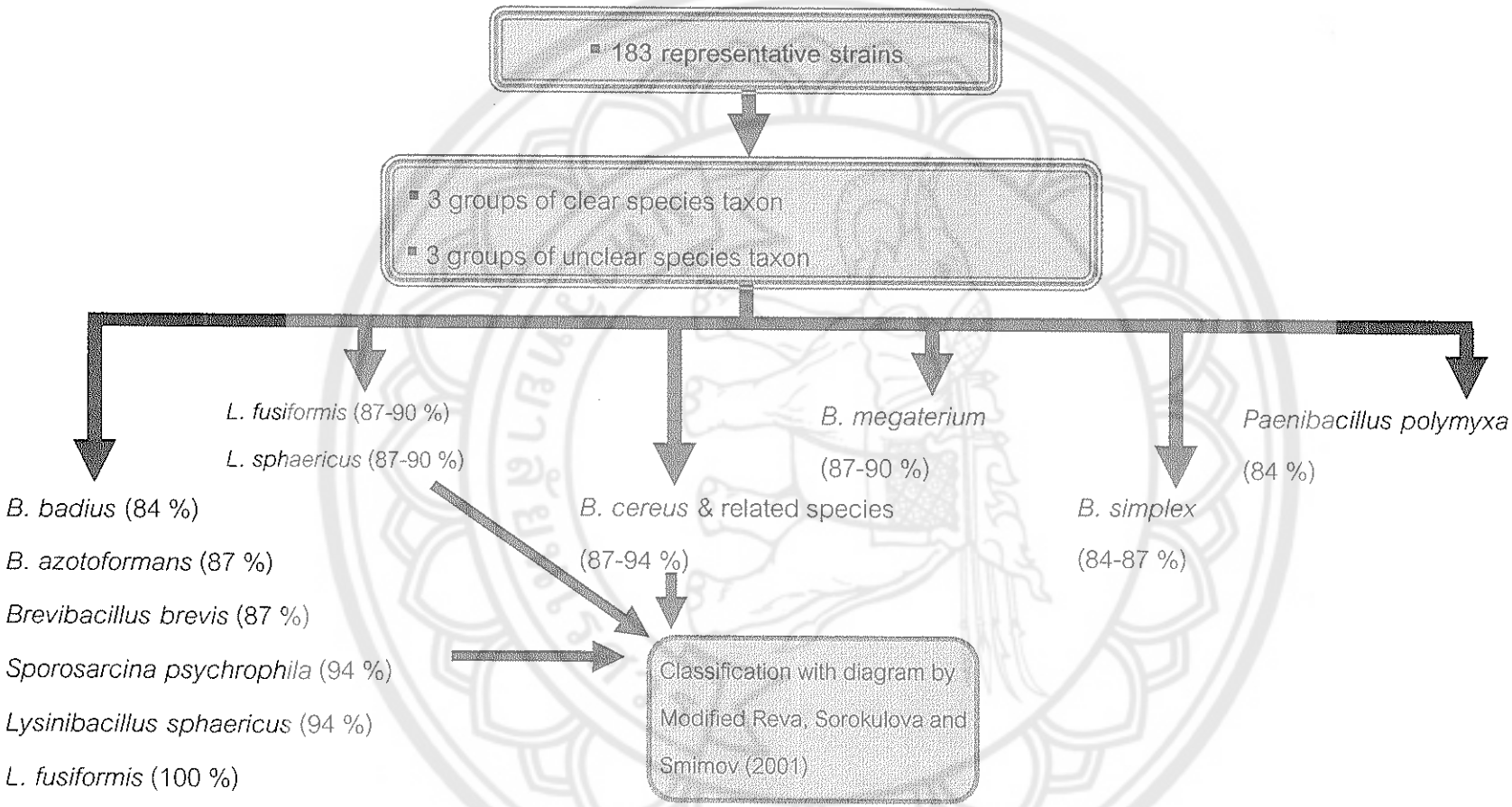
หมายเหตุ: ข้อมูลอ้างอิงจาก Priest, et al., 1988, pp.1847-1882

ตาราง 9 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก 13 กลุ่ม

Clusters	Strain number	oval	round	Gelatin	Starch	Urea	Citrate	Growth at	37 °C	50 °C	Anaerobe	Indole	Nitrate	ONPG	Oxidase	VP	Acid from:	Galactose	Glucose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Adonitol	Arabinose	Cellobiose	meso-inositol	Rhamnose	Sorbitol	Trehalose	Xylose
G1/1	14	+	-	+	+	-	+		+	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
G1/2	10	+	-	+	-	-	+		+	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
G2	23	+	-	+	+	-	-		-	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
G3	21	+	-	+	-	-	+		+	-	+	+	+	-	+	-		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G4	11	+	-	+	+	-	+		+	-	+	-	+	-	-	+		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
G5	19	+	-	+	-	-	+		-	-	+	-	+	-	+	-		-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
G6/1	10	-	+	+	-	+	+		+	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6/2	5	-	+	+	-	+	+		+	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	15	-	+	+	-	+	+		+	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	14	-	+	+	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
G9	13	-	+	+	-	+	+		+	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G10	11	+	-	+	-	+	+		+	-	+	-	-	+	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
G11	17	+	-	+	-	-	+		+	-	+	-	-	+	-	-		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

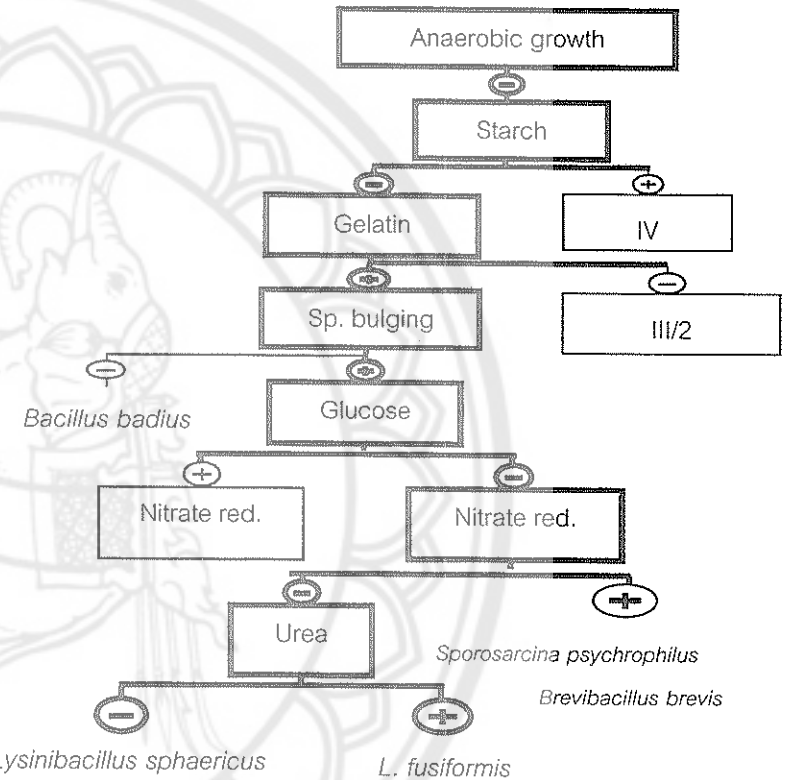
	case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	*polymyxa*	100																						
2	*cereus*	61	100																					
3	*megaterium*	68	61	100																				
4	*brevis*	45	71	45	100																			
5	*azotoformans*	45	71	45	100	100																		
6	*badius*	35	74	55	90	90	100																	
7	*psychrophilus*	32	58	39	87	87	84	100																
8	*fusiformis*	32	58	45	87	87	84	94	100															
9	*sphaericus*	29	68	48	84	84	94	90	90	100														
10	*simplex*	61	68	74	65	65	61	52	58	55	100													
11	G1/1	55	87	61	65	65	61	52	58	55	68	100												
12	G2	58	90	58	74	74	71	61	68	65	71	90	100											
13	G3	61	74	74	58	58	61	52	58	55	87	74	77	100										
14	G4	58	90	65	68	68	65	55	61	58	71	97	94	77	100									
15	G1/2	61	94	61	71	71	68	58	65	61	74	94	97	81	97	100								
16	G5	65	77	71	61	61	65	55	55	58	84	71	74	97	74	77	100							
17	G10	77	52	87	35	35	39	29	35	32	65	58	55	65	61	58	61	100						
18	G11	68	61	90	52	52	55	45	52	48	74	68	65	74	71	68	71	84	100					
19	G8	32	58	45	87	87	84	94	100	90	58	58	68	58	61	65	55	35	52	100				
20	G6/1	29	48	42	77	77	74	90	90	81	48	48	58	48	52	55	45	32	48	90	100			
21	G6/2	32	52	39	74	74	71	87	87	77	45	52	61	45	55	58	42	35	45	87	97	100		
22	G7	84	58	71	48	48	45	42	42	39	58	52	55	65	55	58	68	74	71	42	39	35	100	
23	G9	55	87	61	65	65	68	65	65	61	68	87	90	81	90	94	77	58	68	65	61	65	58	100

ภาพ 19 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน จากการใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_{SM} ของการจัดกลุ่มลักษณะทางฟีโนไทป์ด้วย UPGMA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับข้อมูลเชื้ออ้างอิงที่เกี่ยวข้องจาก Priest และคณะ (Priest, et al., 1988, pp. 1847-1882)



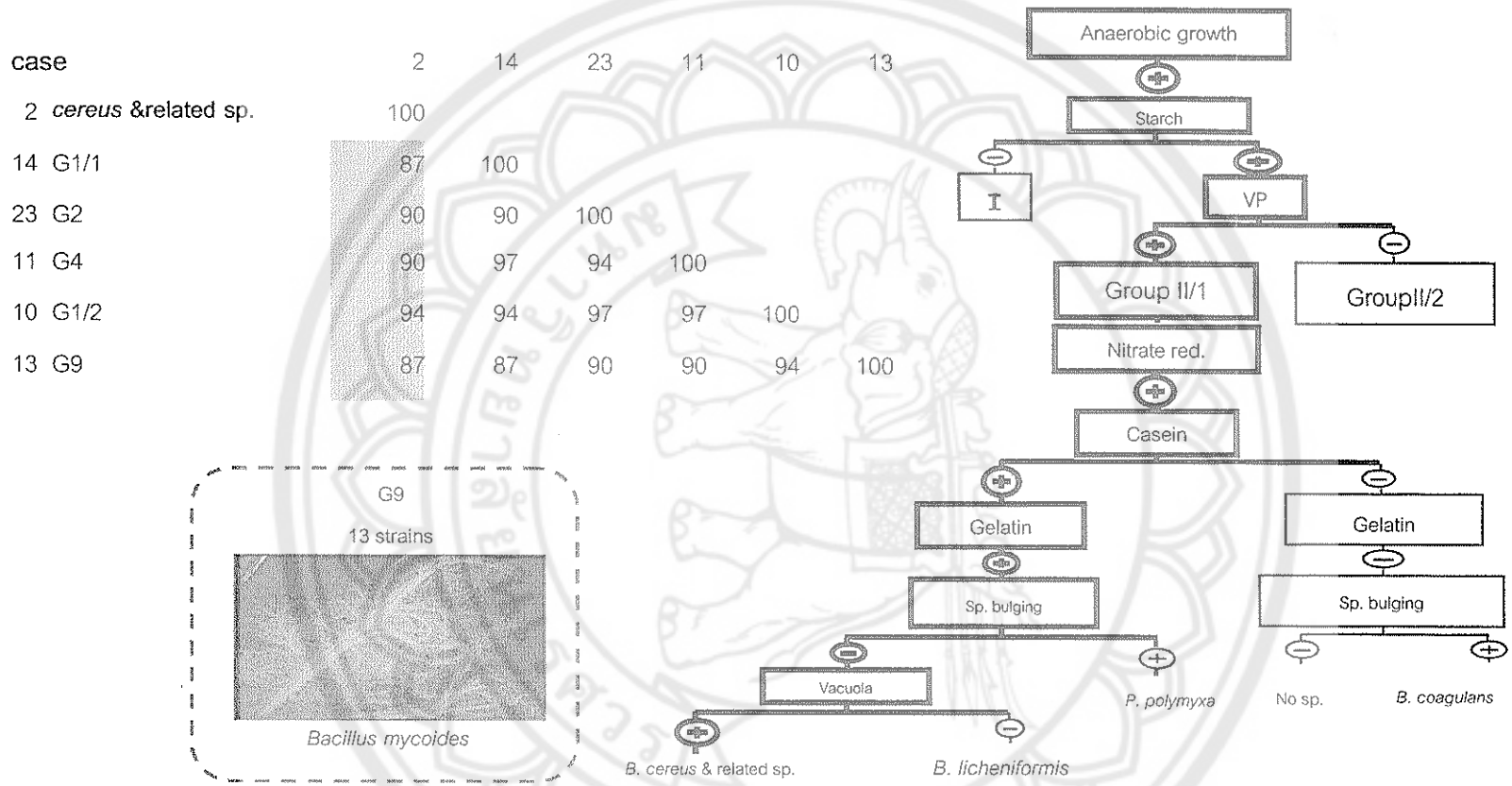
ภาพ 20 แสดงผลการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก แยกจากดินป่าดิบแล้ง อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน

case		4	5	6	7	8	9	14	10	5
4	*brevis*	100								
5	*azotoformans*	100	100							
6	*badius*	90	90	100						
7	*psychrophilus*	87	87	84	100					
8	*fusiformis*	87	87	84	94	100				
9	*sphaericus*	84	84	94	90	90	100			
14	G8	87	87	84	94	100	90	100		
10	G6/1	77	77	74	90	90	81	90	100	
5	G6/2	74	74	71	87	87	77	87	97	100



ภาพ 21 แสดงการจัดจำแนกชนิด *L. fusiformis* **และ** *L. sphaericus* **ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนร่วมกับแผนผังการจัดจำแนกของ** Reva, et al.

ที่มา: Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371



ภาพ 22 แสดงการจัดจำแนกชนิด *B. cereus* & related sp. ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนร่วมกับแผนผังการจัดจำแนก**ของ** Reva, et al.

ที่มา: Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371

จากการจัดกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยใช้คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 11 กลุ่ม เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (ผลการทดสอบแสดงในตาราง 9) และวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ พบว่า จัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างกันจำนวน 13 กลุ่ม โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในแต่ละกลุ่มมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) ผลการจัดกลุ่มแสดงในตาราง 10 จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ตามหลักการของอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัล (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ด้วย species cut-off line ของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 83 เปอร์เซ็นต์ (S_{SM}) (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882) แสดงความสัมพันธ์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างข้อมูลของแบคทีเรียสาย-พันธุ์อ้างอิงกับแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกจำนวน 13 กลุ่ม ในภาพ 19 และจากผลของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนดังกล่าว สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ออกเป็น 6 กลุ่มชนิด ดังแผนผังในภาพ 20 ซึ่งพบว่ามี 3 กลุ่มชนิดที่มีความชัดเจนในการระบุสกุลและชนิด คือ กลุ่ม G3 และ G5 จำนวน 40 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *B.simplex* (84-87 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม G10 และ G11 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *B. megaterium* (87-90 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม G7 จำนวน 15 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *Paenibacillus polymyxa* (84 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้มี 3 กลุ่มชนิดที่ไม่สามารถระบุสกุลและชนิดได้ชัดเจน โดยอาศัยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนจาก 31 ลักษณะของลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ใช้ทดสอบ ประกอบด้วยกลุ่ม G8 จำนวน 14 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *B. badius* (84 เปอร์เซ็นต์) *Brevibacillus brevis* (87 เปอร์เซ็นต์) *B. azotoformans* (87 เปอร์เซ็นต์) *Lysinibacillus sphaericus* (90 เปอร์เซ็นต์) *Sporosarcina psychrophila* (94 เปอร์เซ็นต์) และ *L. fusiformis* (100 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับกลุ่ม G6/1 และ G6/2 จำนวน 15 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *L. fusiformis* (87-90 เปอร์เซ็นต์) และ *L. sphaericus* (87-90 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากงานวิจัยก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่า กลุ่มชนิดข้างต้นมีลักษณะทางฟีโนไทป์ โดยเฉพาะความสามารถในการสร้างกรดจากการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะ *L. sphaericus* และ *L. fusiformis* ความใกล้ชิดกันมากด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในหลายชนิดของกลุ่ม G8 สามารถแก้ไขได้ด้วยการเทียบเคียงและจัดจำแนกโดยอาศัยแผนผังในการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกของ Reva, et al. (Reva, Sorokulova and Smimov,

2001, pp.1361-1371) แสดงในภาพ 21 โดยแยกออกจากกันโดยใช้ความสามารถในการย่อยยูเรีย โดย *L. sphaericus* ไม่สามารถย่อยยูเรียได้ กลุ่ม G8 ให้ผลการย่อยยูเรียเป็นบวก จึงจัดเป็น *L. fusiformis* และไม่จัดเป็น *S. psychrophila* (การใช้ citrate ให้ผลลบ 100 เปอร์เซ็นต์) จากผลการใช้ citrate เป็นบวก (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Ahmed, et al., 2007, pp.1112-1125) ร่วมกับการมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียง *L. fusiformis* มากกว่า จึงจัดเป็น *L. fusiformis* ซึ่งรวมทั้งกลุ่ม G6/1 และ G6/2 ที่มีผลการย่อยยูเรียเป็นบวก และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียง *L. fusiformis* มากกว่า จึงจัดเป็น *L. fusiformis* เช่นเดียวกับกลุ่ม G8 และจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ 31 คุณสมบัติที่เลือกใช้จาก 118 คุณสมบัติของวิธีมาตรฐานสามารถจำแนกชนิดในกลุ่มที่จำแนกออกจากกันยาก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้ร่วมกับแผนผังเทียบเคียงของ Reva, et al. จึงสามารถนำฐานข้อมูลที่ได้จากการทดสอบนี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก แยกจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในงานวิจัยอื่น เพื่อลดระยะเวลาและจำนวนการทดสอบที่ใช้ ในการจัดจำแนก

กลุ่ม G1/1, G1/2, G2, G4, และ G9 จำนวน 71 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *B. cereus* & related species 87-94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *B. cereus* & related species ประกอบด้วย *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* และ *B. antharcis* เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกจากกันได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) ทั้งนี้ในแผนผังของ Reva, et al. จัด *B. cereus* & related species ไว้ด้วยกัน ตามแผนผังแสดงในภาพ 22 ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า ความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้บางชนิดไม่สามารถแยกกันได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยข้อมูลจากเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยพิจารณาในการจัดจำแนกร่วมด้วยจึงจะเพิ่มความถูกต้อง (Porwal, et al., 2009, pp.1-27)

ตาราง 10 แสดงผลการจัดกลุ่มแบคทีเรีย เป็นกลุ่มฟีโนไทป์ โดยการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี

กลุ่มสัณฐานวิทยา	กลุ่มฟีโนไทป์	รหัสลายพันธุ์	จำนวน
G1	G1/1	PPR1.D4, PPR2.N10, LU1.N2, LU1.D3, LU2.N2, LU3.D8, PN4.N14, PN7.D13, SY3.N8, 27km1.N4,TT1.D1, TT3.N4, Ch1.N3, Ch3.D1	14
	G1/2	PPR1.N3, PPR4.D6, LU1.N7, PPR2.N1, PN3.N9, PN5.N7, SY6.N6, Ch4.N8, 27km3.N3, TT4.N3	10
G2	G2	PPR1.N22, PPR2.D3, PPR3.N6, PPR4.D4, LU2.N3, LU3.D3, LU6.N10, LU4.D1, PN1.N10, PN1.D12, PN2.N16, PN4.N15, SY1.D6, SY3.N10, Ch1.N4, Ch2.N5, Ch3.N4, Ch4.N2, 27km1.N3, 27km3.N2, TT1.D8, TT2.N5, TT5.N2	23
G3	G3	PPR1.N23, PPR1.D5, PPR5.N13, LU1.N5, LU3.D5, LU4.D10, LU6.D12, PN2.N17, PN1.D14, PN3.N7, PN4.D3, SY3.N12, SY3.D7, Ch1.N8, Ch2.N7, Ch4.N4, 27km3.N5, TT2.N6, TT3.D4, TT4.D1, TT5.N3	21
G4	G4	PPR2.D5, PPR3.N1, PPR5.N3, PPR6.N21, LU3.D6, PN1.D15, PN3.N8, Ch2.D1, Ch4. N7, 27km2.N6, TT3.N6	11
G5	G5	PPR1.N25, PPR2.N18, PPR5.D4, LU2.N9, PN1.N7, PN2.N8, PN2.N10, PN2.D3, PN3.D1, PN6.D2, PN6.D7, PN7.N1, SY3.D2, SY2.D12, Ch3.N5, Ch5.N4, 27km3.N1, TT2.N9, TT3.D5	19

ตาราง 10 (ต่อ)

กลุ่มสัณฐานวิทยา	กลุ่มพีโนไทป์	รหัสสายพันธุ์	จำนวน
G10	G10	PPR3.N5, PPR5.D7, PPR6.N14, LU2.D10, LU3.N5, PN3.N11, PN6.D11, SY2.D13, Ch5.N10, 27km3.D2, TT3.D6	11
G11	G11	PPR1.N27, PPR3.D6, PPR5.D9, LU2.D11, LU3.N6, LU3.D13, PN3.D4, PN3.N12, PN3.D5, PN5.N10, PN3.D4, SY2.D14, Ch2.N8, 27km2.N1, TT1.N9, TT2.D6, TT5.N4	17
G8	G8	PN2.N15, PPR1.N28, PPR6.D4, LU2.D12, LU3.N8, LU3.D17, PN2. N11, PN3.N14, PN5.D10, SY2.N7, Ch2.N9, 27km2.N2, TT3.N9, TT4.D2	14
G6	G6/1	PPR1.N4, PPR5.D11, LU2.D13, PN3.D8, SY2.N8, SY3.D8, Ch2.N10, Ch5.N5, 27km1.N6, TT5.N5	10
	G6/2	PPR1.N8, LU3.N9, PN5.D11, SY1.N15, Ch3.N7	5
G7	G7	PPR1.N29, PPR6.D6, LU3.N12, PN2.D6, LU4.N12, LU6.N13, PN4.N17, PN6.D6, PN6.N13, Ch3.N8, Ch5.N9, 27km2.N2, SY2.N9,TT4.N9, TT5.N6	15
G9	G9	PPR1.N17, PPR1.D7, PPR3.N11, PPR4.N8, LU4.N11, LU6.N12, PN4.N13, SY3.D5, LU1.N8, SY2.N10, Ch1.D3, TT5.D2, 27km2.N3	13

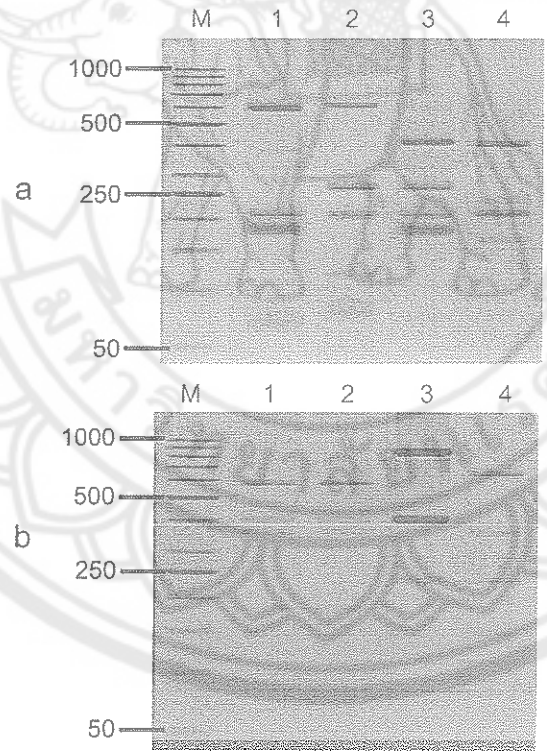
การจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค ARDRA

เทคนิค ARDRA เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบ DNA fingerprint ที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถจัดกลุ่มเทียบเคียงแบคทีเรียได้ดีจากระดับสกุลไปจนถึงชนิด (Savelkoul, et al., 2004, pp.3083-3091; Heyndrickx, et al., 1996a, pp.988-1003) เนื่องจากสามารถสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีได้ ซึ่งได้รับการพิสูจน์จากงานวิจัยก่อนหน้าว่า restriction fragment ที่ได้จากการทดลองส่วนใหญ่เป็นไปตามทฤษฎี (Porwal, et al., 2009, pp.1-27) ARDRA จึงเป็นเทคนิคทาง DNA fingerprint ที่นิยมใช้เพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรีย ทั้งนี้เพื่อลดจำนวนสายพันธุ์ที่จะนำไปทำ 16S rDNA sequencing รวมถึงลดระยะเวลา ขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ปัจจุบันนักอนุกรมวิธานของแบคทีเรียอาศัยเทคนิค ARDRA ร่วมกับเทคนิค 16S rDNA sequencing เพื่อ reclassification แบคทีเรียหลายกลุ่มในปัจจุบัน

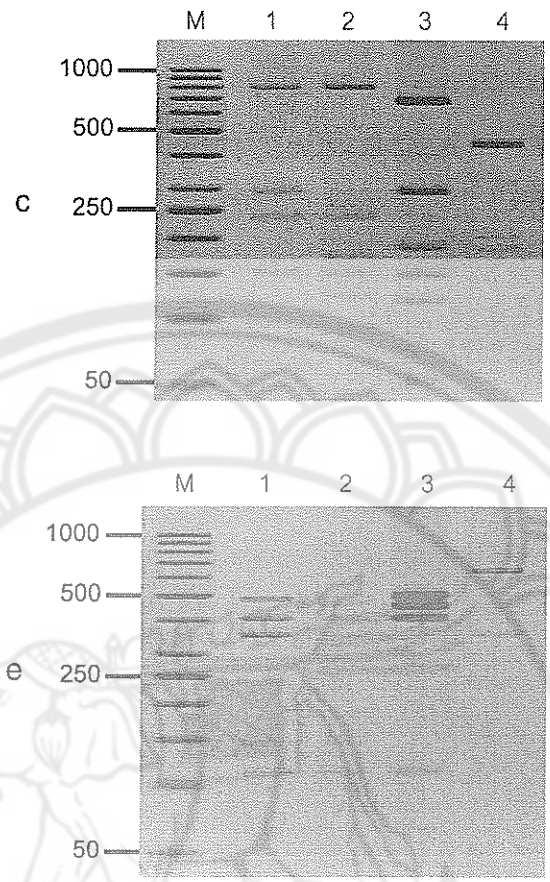
1. **การเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบ ARDRA จากการทดลองกับรูปแบบ ARDRA** (Comparison between experimental and theoretical ARDRA patterns)

เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยได้จากการตัด DNA fragment ในส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง คือ *B. cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC6748, *B. subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* DMST4739 (ATCC25983) และ *Escherichia coli* ATCC25922 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิดคือ *Alu*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Rsa*I ให้ รูปแบบ ARDRA ทั้งจำนวนและขนาดของ band เป็นไปตามทฤษฎีดังแสดงในภาพ 23 และตาราง 11 แม้ว่าขนาด fragment จะไม่เท่ากัน 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถอธิบายได้จากการที่ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ (16S rDNA sequences) ในฐานข้อมูลออนไลน์ สามารถพบตำแหน่งที่ไม่สามารถระบุชนิดนิวคลีโอไทด์ (undetermined nucleotide positions หรือ non-base letters:N) ได้เสมอ ดังนั้นการสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีอาจให้ restriction fragment ที่มีขนาดใหญ่หรือเล็กกว่า restriction fragment จากการทดลอง ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการที่ software จะจดจำ recognized restriction sites ของเอนไซม์ตัดจำเพาะหนึ่งชนิดได้ 1 ตำแหน่ง หรือมากกว่าเป็นผลมาจากตำแหน่ง N ที่พบในฐานข้อมูล (Heyndrickx, et al., 1996b, pp.247-259) รวมทั้งจากงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโร-บิก ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* เกือบทั้งหมด เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีจำนวนอัลลีล (alleles) ของ 16S rDNA มากกว่า 1 alleles เช่น *B. subtilis* พบ 8 alleles และภายใน 8 alleles (Gurtler, Wilson and Mayall, et al, 1991, pp.2673-2679; Heyndrickx, et al., 1995, pp.661-669) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเล็กน้อยในแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แสดงจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ยอมให้แตกต่างกันได้ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามหลักอนุกรมวิธานแบบโพลีฟาสิก (Sneath, et al.,

1986, pp.1104-1207; Holt, et al., 1994, pp.559-564; Vandamme, et al., 1996, pp.407-438) ส่งผลต่อรูปแบบ ARDRA ซึ่งมีรายงานการศึกษากับ 16S rDNA โดยสามารถมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่แตกต่างกันได้ในแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (รูปแบบ ARDRA มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถอนุมานเป็นชนิดเดียวกันได้) (Vaerewijck, et al., 2001, pp. 1074-1084) และความละเอียดในการแยก fragment จาก agarose ก็เท่ากับ polyacrylamide ขนาด fragment ที่ได้จึงไม่เท่ากัน 100 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี และเมื่อทำการ match band type ออกมาในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างรูปแบบ ARDRA จากการทดลองและผลทางทฤษฎีพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพ 24 จากผลการทดลองเมื่อนำเทคนิค ARDRA มาทดสอบกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินตัวอย่างซึ่งเป็นชุดทดลอง จึงสามารถนำรูปแบบ ARDRA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี แล้วจัดกลุ่มเทียบเคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบได้



ภาพ 23 แสดงรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (a) *Alu*I restriction profiles (b) *Hha*I restriction profiles (c) *Mbo*I restriction profiles (d) *Msp*I restriction profiles (e) *Rsa*I restriction profiles; lane M, 50 bp; lane 1, *B. cereus*; lane 2, *B. megaterium*; lane 3, *B. subtilis*; land 4, *Ps. aeruginosa*



ภาพ 23 (ต่อ)

ตาราง 11 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA ตามทฤษฎี กับผลจากการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

Restriction enzyme	ARDRA patterns					
	B. cereus		*B. subtilis*		*B. megaterium*	
	Theor.	Exp.	Theor.	Exp.	*Theor.	**Exp.
Alu I	600	604.361	430	431.012	620	619.879
	220	220.121	270	272.002	270	267.936
	190	192.112	210	213.114	210	212.954
	170	173.121	190	189.651	120	121.557
			170	170.532		
Hha I	580	580.045	870	869.432	580	580.855
	390	404.030	400	398.212	390	394.350
	350	352.140	240	240.051	350	348.337
	180	182.142			180	181.712
Mbo I	810	812.243	700	703.004	820	820.612
	300	304.332	300	305.001	240	240.891
	240	241.583	190	190.065	170	168.348
	150	150.340	150	151.345	150	150.516
			120	122.780	130	129.701
Msp I	610	611.345	540	540.345	610	611.327
	390	391.325	390	392.421	390	391.120
	210	210.451	210	213.122	210	209.261
	150	153.012	140	139.003	170	169.160
	120	120.990	120	117.055	120	119.995
Rsa I	490	494.012	500	506.101	460	461.019
	410	410.345	460	461.324	410	411.499
	360	362.100	410	413.112	360	360.660
	150	149.045	110	106.023	150	150.570
	110	112.122			110	111.836

หมายเหตุ: * Theory หรือทฤษฎี; ขนาดของ restriction fragment ตามทฤษฎี (± 5 bp)

** Experiment หรือการทดลอง; ขนาดของ restriction fragment ที่ได้จากการทดลอง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100.0								
2	100.0	100.0							
3	100.0	100.0	100.0						
4	60.0	60.0	60.0	100.0					
5	60.0	60.0	60.0	100.0	100.0				
6	60.0	60.0	60.0	100.0	100.0	100.0			
7	40.0	40.0	40.0	38.5	38.5	38.5	100.0		
8	40.0	40.0	40.0	38.5	38.5	38.5	100.0	100.0	
9	40.0	40.0	40.0	38.5	38.5	38.5	100.0	100.0	100.0

ภาพ 24 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ combined ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS จากการ match band type; 1, *B. cereus* ตามทฤษฎี; 2, *B. cereus* จากการทดลอง1; 3, *B. cereus* จากการทดลอง2; 4, *B. megaterium* ตามทฤษฎี; 5, *B. megaterium* จากการทดลอง1; 6, *B. megaterium* จากการทดลอง2; 7, *B. subtilis* ตามทฤษฎี; 8, *B. subtilis* จากการทดลอง1; 9, *B. subtilis* จากการทดลอง2

2. การทำซ้ำได้ของเทคนิค ARDRA (Reproducibility of the combined ARDRA technique)

การทดสอบกับเชื้ออ้างอิงแต่ละชนิดคือ *B. cereus* ATCC11778, *B. megaterium* ATCC6748 และ *B. subtilis* ATCC6633 ในสภาวะเงื่อนไขที่การสกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการแตกต่างกัน ทำการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยใช้ปฏิกิริยา PCR ในคราวที่แตกต่างกัน ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในแต่ละครั้งซึ่งอิสระจากกัน เมื่อนำมาทำ DNA fingerprint ด้วยเทคนิค ARDRA ที่ทำการทดสอบด้วยเงื่อนไขดังกล่าวมาข้างต้นให้เมื่อหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและสร้าง dendrogram ของรูปแบบ combined ARDRA ดังแสดงในภาพ 25 และภาพ 26 ให้ผลการทดลองคงที่ในการแสดงความเป็นชนิดเดียวกันโดยให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเกิน 90 เปอร์เซ็นต์ ในทุกเชื้ออ้างอิงที่ใช้ทดลอง (Vaerewijck, et al., 2001, pp.1074-1084) และจากการทำการสกัดดีเอ็นเอ *B. cereus* ครั้งเดียวกัน ทำ PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใน agarose gel ต่างเจลกันให้ผลการทดลองทั้งจำนวนและขนาด restriction fragment คงที่และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน S_D 100 เปอร์เซ็นต์ (โปรแกรมสถิติ SPSS) ดังแสดงในตาราง 12 และภาพ 27 จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าว่าเทคนิค

ARDRA สามารถทำซ้ำได้ ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอ universal primer ที่เลือกใช้ condition ในการทำ PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงใช้ทดสอบกับสายพันธุ์ทดสอบต่อไปได้

Calculation Method Dice Coefficient

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	100.0										
2	96.4	100.0									
3	99.8	96.6	100.0								
4	61.9	63.4	62.0	100.0							
5	62.7	63.1	62.8	98.3	100.0						
6	62.5	62.7	62.8	95.3	94.8	100.0					
7	42.5	45.3	42.8	34.9	34.2	34.7	100.0				
8	42.7	45.5	43.0	34.5	33.8	34.2	98.5	100.0			
9	42.2	45.1	42.5	34.4	33.7	34.1	94.1	94.5	100.0		
10	20.1	20.8	20.0	19.2	17.9	18.5	19.3	20.3	20.6	100.0	
11	22.7	23.7	22.8	25.1	24.4	25.3	14.9	14.7	14.6	14.3	100.0

ภาพ 25 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ combined ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar จากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียโดยการต้มและการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด kit; 1, *B. cereus* (boil1); 2, *B. cereus* (boil2); 3, *B. cereus* (kit); 4, *B. megaterium* (boil1); 5, *B. megaterium* (boil2); 6, *B. megaterium* (kit); 7, *B. subtilis* (boil1); 8, *B. subtilis* (boil2); 9, *B. subtilis* (kit); 10, *Ps. aeruginosa*; 11, *E. coli*

ภาพ 26 แสดง Dendrogram ของรูปแบบ combined ARDRA จากการรวมกันของ restriction pattern ที่ได้จากเอนไซม์ *Alu*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Rsa*I คำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar; lane M, 50 bp DNA leader

ตาราง 12 แสดงจำนวนและขนาด DNA fragment ของ 16S rDNA ของ *B. cereus* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis ในเวลาแตกต่างกัน

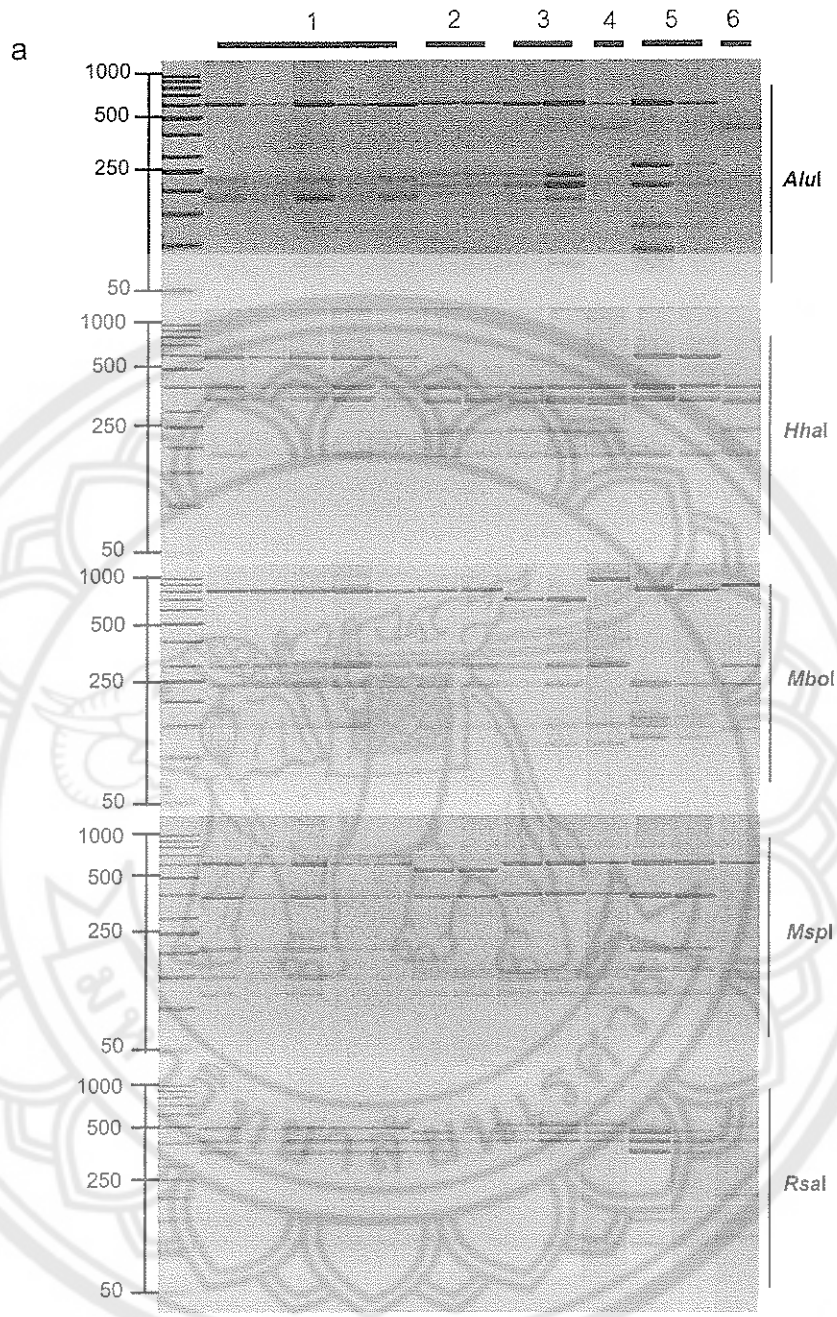
	gel 1			gel 2			gel 3			gel 4		
	well	well	เฉลี่ย	well	well	เฉลี่ย	well	well	เฉลี่ย	well	well	เฉลี่ย
	581.	580.	580.	582.	582.	582.	581.	582.	581.	584.	581.	582.
Hh	401.	404.	403.	400.	401.	401.	402.	401.	402.	401.	403.	402.
	348.	348.	348.	350.	348.	349.	348.	349.	349.	348.	351.	350.
	181.	179.	180.	181.	183.	182.	182.	181.	182.	183.	181.	182.

	1	2	3	4
1	100.0			
2	100.0	100.0		
3	100.0	100.0	100.0	
4	100.0	100.0	100.0	100.0

ภาพ 27 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS จากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ *B. cereus* โดยการต้ม ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis ในเวลาที่แตกต่างกัน; 1-4 แสดงหมายเลขเจลที่กำหนดการวิเคราะห์ในเวลาที่แตกต่างกัน

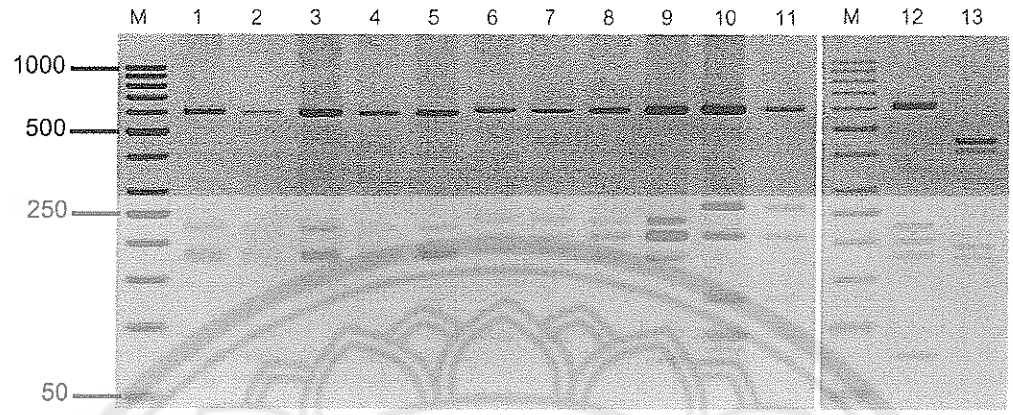
3. การจัดกลุ่มสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัยรูปแบบ ARDRA (Applicability of combined ARDRA profiles in bacterial phylogeny and taxonomy)

เมื่อทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัยความแตกต่างกันของรูปแบบ ARDRA โดยแต่ละเอนไซม์ตัดจำเพาะให้รูปแบบ ARDRA แสดงในภาพ 28 เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA จากโปรแกรมสถิติ SPSS ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกเป็น 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีขนาดและจำนวน fragment แสดงในตาราง 13 แบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกระจายอยู่ในกลุ่มรูปแบบ ARDRA มีความสอดคล้องกับกลุ่มฟีโนไทป์ กล่าวคือสายพันธุ์ทดสอบที่จัดอยู่ในชนิดเดียวกันโดยใช้ลักษณะฟีโน-ไทป์ ส่วนใหญ่มีรูปแบบ ARDRA เหมือนกัน ดังแสดงในตาราง 14 โดยในแต่ละกลุ่มรูปแบบ ARDRA ให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) จากการคำนวณโดยโปรแกรมสถิติ SPSS ด้วย S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA

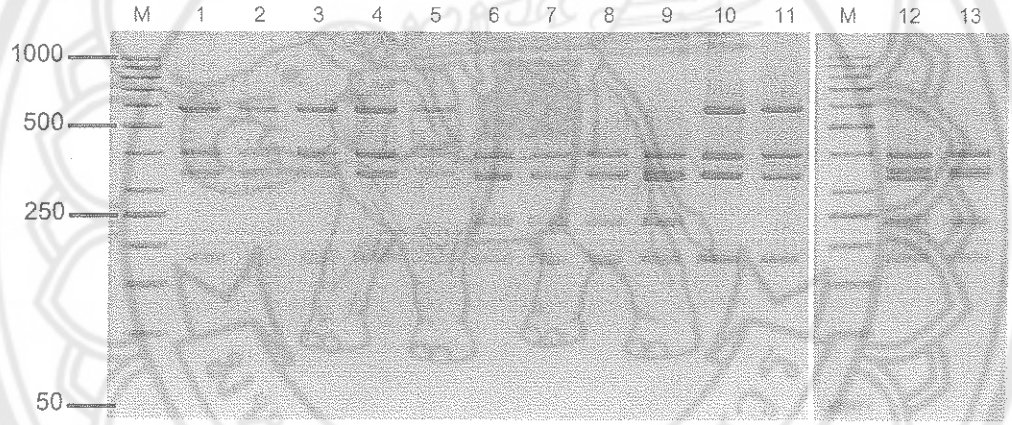


ภาพ 28 แสดงรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบจากตัวแทนของกลุ่มต่างๆ (a) กลุ่มของรูปแบบ combined ARDRA ทั้ง 6 กลุ่มที่แตกต่างกัน (b) *Alu*I restriction profiles (c) *Hha*I restriction profiles (d) *Mbo*I restriction profiles (e) *Msp*I restriction profiles (f) *Rsa*I restriction profiles; lane M, 50 bp; lane 1, G1/1; lane 2, G1/2; lane 3, G2; lane 4, G4; lane 5, G9; lane 6, G3; lane 7, G5; lane 8, G6/1; lane 9, G6/2; lane 10, G10; lane 11, G11; lane 12, G8; lane 13, G7

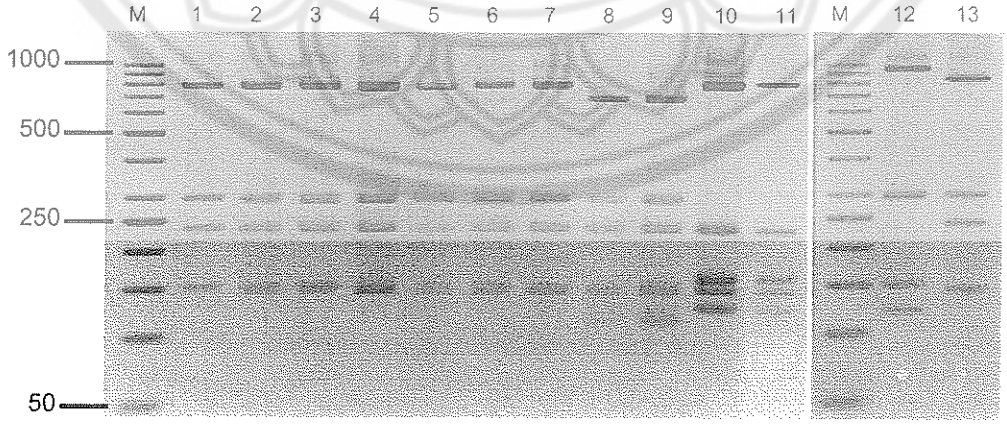
b


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13
1000
500
250
50

c

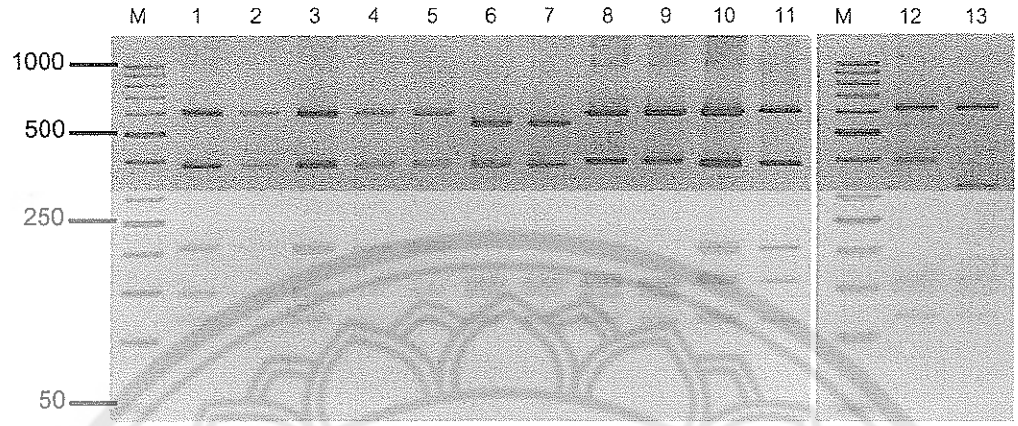

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13
1000
500
250
50

d

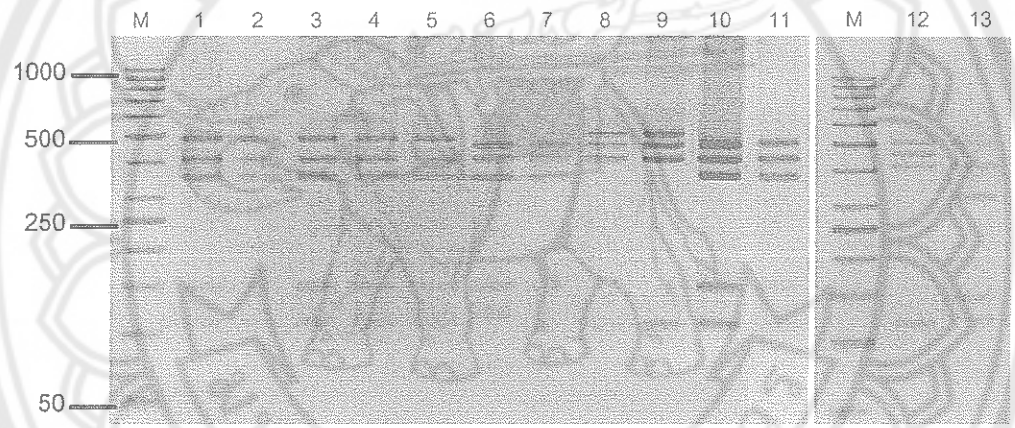

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13
1000
500
250
50

ภาพ 28 (ต่อ)

e


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13
1000
500
250
50

f


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13
1000
500
250
50

ภาพ 28 (ต่อ)

ตาราง 13 แสดงกลุ่มรูปแบบ ARDRA ที่แตกต่างกันจากการตัดชิ้นส่วนของ 16S rDNA ขนาด 1500 bp ของแบคทีเรียสาย**พันธุ์ทดสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง** 5 ชนิด

ARDRA profile groups	Restriction fragment sizes (bp; ± 5 bp)				
	Alu I	*Hha* I	*Mbo* I	*Msp* I	*Rsa* I
1	600+220+190+170	580+400+350+180	810+300+240+150	610+390+210+150+120	490+410+360+150+110
2	620+240+210+190	390+350+340+240+180	820+300+240+150	560+390+160+150+120	460+410+360+150+120
3	620+230+210+180	390+350+340+240+180	700+300+240+150+120	610+400+160+150+120	500+460+410+110
4	620+230+210+180	390+350+340+240+180	970+300+150+120	610+400+160+150+120	500+460+410+110
5	620+270+210+180	580+390+350+180	820+240+160+150+130	610+390+210+170+120	460+410+360+150+110
6	450+430+190+180	400+350+340+240+180	870+300+240+140	610+340+160+150+120	490+410+210+150+130

ตาราง 14 แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบในแต่ละกลุ่มรูปแบบ ARDRA

ARDRA profile groups	*สายพันธุ์ในกลุ่ม	ชนิด (ลักษณะทางฟีโนไทป์)	จำนวนสายพันธุ์
1	G1/1, G1/2, G2, G4, G9	*Bacillus cereus* & related species	71
2	G3, G5	*B. simplex*	40
3	G6/1, G6/2	*Lysinibacillus fusiformis*	15
4	G8	*L. fusiformis*	14
5	G10, G11	*B. megaterium*	28
6	G7	*Paenibacillus polymyxa*	15

หมายเหตุ: * ทุกสายพันธุ์ในกลุ่มฟีโนไทป์

ตาราง 15 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบที่ได้จากการทดลอง กับ restriction fragment ของ *B. cereus*, *B. megaterium* และ *B. simplex* type strain ตามทฤษฎี

Restriction enzyme	ARDRA patterns					
	B. cereus		*B. megaterium*		*B. simplex*	
	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.
Alu I	600	602.324	620	619.879	620	617.595
	220	222.675	270	267.936	430	240.595
	190	190.684	210	212.954	210	210.740
	170	174.552	120	121.557		190.414
Hha I	580	581.274	580	580.855	390	394.558
	390	401.792	390	394.350	350	347.601
	350	348.791	350	348.337	340	337.048
	180	181.712	180	181.712	240	238.775
					180	181.712

ตาราง 15 (ต่อ)

Restriction enzyme	ARDRA patterns					
	B. cereus		*B. megaterium*		*B. simplex*	
	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.
Mbo I	810	807.891	820	820.612	820	823.907
	300	300.000	240	240.891	300	300.000
	240	238.774	170	168.348	240	240.347
	150	151.031	150	150.516	150	151.031
			130	129.701		
Msp I	610	610.980	610	611.327	610	556.877
	390	391.462	390	391.120	390	391.462
	210	209.694	210	209.261	160	160.903
	150	150.000	170	169.160	150	151.056
	120	120.579	120	119.995	120	120.579
Rsa I	490	491.803	460	461.019	460	460.339
	410	410.041	410	411.499	410	413.444
	360	359.774	360	360.660	360	358.418
	150	150.456	150	150.570	150	150.000
	110	112.207	110	111.836	120	120.504

หมายเหตุ: * Theory หรือทฤษฎี; ขนาดของ restriction fragment ตามทฤษฎี (± 5 bp)

** Experiment หรือการทดลอง; ขนาดของ restriction fragment ที่ได้จากการทดลอง

เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบ ARDRA ที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีจากการสุ่มตัวแทนของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank มีชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลที่มีรูปแบบ ARDRA สามารถเทียบกันได้กับรูปแบบ ARDRA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบดังแสดงในตาราง 15 และตาราง 16 ประกอบด้วย 6 กลุ่มชนิดคือ *B. megaterium*, *B. simplex*, *P. polymyxa*, *L. fusiformis* และ *L. sphaericus* และ *B. cereus* & related species เนื่องจากในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนโดยอาศัยรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของตัวแทนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูล

จึงคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสายพันธุ์ทดสอบโดยอ่านผลขนาดและจำนวนของ band เทียบ กับ Marker (50 bp, fermentus) โดยอ่านผล band ที่ปรากฏเป็น 1 และ band ที่ไม่ปรากฏ เป็น 0 แล้วคำนวณด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS โดยเลือกใช้ค่าสัมประสิทธ์ S_D ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน และใช้ตัวสถิติ UPGMA ในการจัดกลุ่ม เพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ทดสอบในระดับสกุลและชนิด ดังแสดงในภาพ 29 โดยมี 3 กลุ่มชนิดจากการทดลองที่จำแนกและเทียบเคียงอนุมานเป็นสกุลและชนิดจากการ match band type กับ รูปแบบ combined ARDRA ได้ชัดเจน คือสายพันธุ์ทดสอบในกลุ่ม G3 และ G5 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. simplex* กลุ่ม G7 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *P. polymyxa* สุดท้ายคือกลุ่ม G10 และ G11 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. megaterium* และมี 3 กลุ่ม รูปแบบ combined ARDRA ที่สามารถ match band type ได้กับรูปแบบ combined ARDRA ตามทฤษฎีได้มากกว่า 1 ชนิด คือ กลุ่ม G6/1 และ G6/2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *L. fusiformis* และ 94 เปอร์เซ็นต์ กับ *L. sphaericus* กลุ่ม G8 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 92 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *L. fusiformis* และ 89 เปอร์เซ็นต์กับ *L. sphaericus* กลุ่ม G1/1, G1/2, G2, G4 และ G9 ให้ผลรูปแบบ ARDRA เหมือนกันและมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. cereus* & related species

เมื่อนำรูปแบบ ARDRA ตัวแทนของแต่ละกลุ่มของสายพันธุ์ทดสอบทั้ง 6 กลุ่มของรูปแบบ ARDRA จำนวน 13 กลุ่มซึ่งเป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่มฟีโนไทป์ข้างต้น มาหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและสร้าง dendrogram จากการทดลองด้วยโปรแกรม GelCompar ในภาพ 30 และ 31 ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเทียบกับ รูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีข้างต้นกล่าวคือกลุ่ม G3 และ G5 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างกัน 97.6 เปอร์เซ็นต์ และทั้ง 2 กลุ่ม มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA 90 เปอร์เซ็นต์ กับ *B. simplex* จึงจัดเป็นกลุ่มจีโนไทป์ *B. simplex* กลุ่ม G7 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแตกต่างจากกลุ่มอื่นชัดเจนและมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *P. polymyxa* จึงจัดให้เป็น *P. polymyxa* กลุ่ม G10 และ G11 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างกัน 98.7 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 2 กลุ่มมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. megaterium* จึงจัดเป็นกลุ่มจีโนไทป์ *B. megaterium* กลุ่ม G6/1 และ G6/2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างกัน 97.1 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ G8 90.7-

92.6 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 3 กลุ่มจึงจัดเป็นชนิดเดียวกันและมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน รูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีเกิน 90 เปอร์เซ็นต์ กับทั้ง *L. fusiformis* และ *L. sphaericus* ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 ชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันมากของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rDNA (Heyndrickx, et al, 1998, pp.99-106) ไม่สามารถจำแนกจากกันได้อย่างชัดเจนจากรูปแบบ combined ARDRA และ 16S rDNA sequencing แสดงให้เห็นในภาพ 32 กลุ่ม G1/1, G1/2, G2, G4 และ G9 จากการทดลองให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90.7-99.3 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปให้ถือว่าเป็นชนิดเดียวกัน) ทำให้อนุมานได้ว่าสายพันธุ์ทดสอบที่อยู่ใน 5 กลุ่มนี้จัดอยู่ในชนิดเดียวกัน และทั้ง 5 กลุ่ม มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA 100 เปอร์เซ็นต์ กับ *B. cereus* & related species จึงจัดเป็นกลุ่มจีโนไทป์ *B. cereus* & related species ซึ่งภายใน *B. cereus* & related species ไม่สามารถจำแนกจากกันได้อย่างชัดเจนจากรูปแบบ combined ARDRA และ 16S rDNA sequencing แสดงในภาพ 33 และจาก dendrogram ในภาพ 30 และ 31 แสดงว่าแต่ละกลุ่มรูปแบบ ARDRA ของสายพันธุ์ทดสอบมีการแตกกิ่งแขนงของ dendrogram ออกจากกันเป็น 5 กลุ่ม อย่างชัดเจน รวมทั้งภายในกลุ่มเดียวกันแสดงความเป็นชนิดเดียวกันด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และแตกกิ่งแขนงจากแบคทีเรียแกรมลบที่ให้เป็น out of group ได้อย่างชัดเจน

ตาราง 16 แสดงการเทียบกัน (match) ระหว่าง restriction fragment ของ 16S rDNA จากการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับ restriction fragment ของ *P. polymyxa* และ *L. fusiformis* ตามทฤษฎีที่ได้จากฐานข้อมูลออนไลด์

Restriction enzyme	ARDRA patterns			
	P. polymyxa		*L. fusiformis*	
	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.
AluI	450	452.405	620	617.595
	430	431.080	230	234.792
	190	192.758	210	212.214
	180	180.377	170	180.654
	90	91.082	70	72.647
HhaI	390	403.090	390	394.558

ตาราง 16 (ต่อ)

Restriction enzyme	ARDRA patterns			
	P. polymyxa		*L. fusiformis*	
	*Theor.	**Exp.	*Theor.	**Exp.
	350	350.264	350	347.601
	340	337.581	340	337.048
	240	241.434	240	238.775
	180	181.712	180	181.712
*Mbo*I	870	871.549	700	700.000
	300	302.221	300	302.112
	140	142.032	240	240.347
	120	119.501	150	151.031
			120	118.851
*Msp*I	410	611.673	610	610.980
	340	337.110	400	403.090
	210	161.797	160	160.903
	160	148.738	150	147.679
	150	120.423	120	120.579
	120			
*Rsa*I	490	492.094	500	504.360
	410	412.956	460	460.339
	210	211.855	410	413.444
	150	150.000	110	111.118
	130	131.037		
	110	111.080		

หมายเหตุ: * Theory หรือทฤษฎี; ขนาดของ restriction fragment ตามทฤษฎี (± 5 bp)

** Experiment หรือการทดลอง; ขนาดของ restriction fragment ที่ได้จากการทดลอง

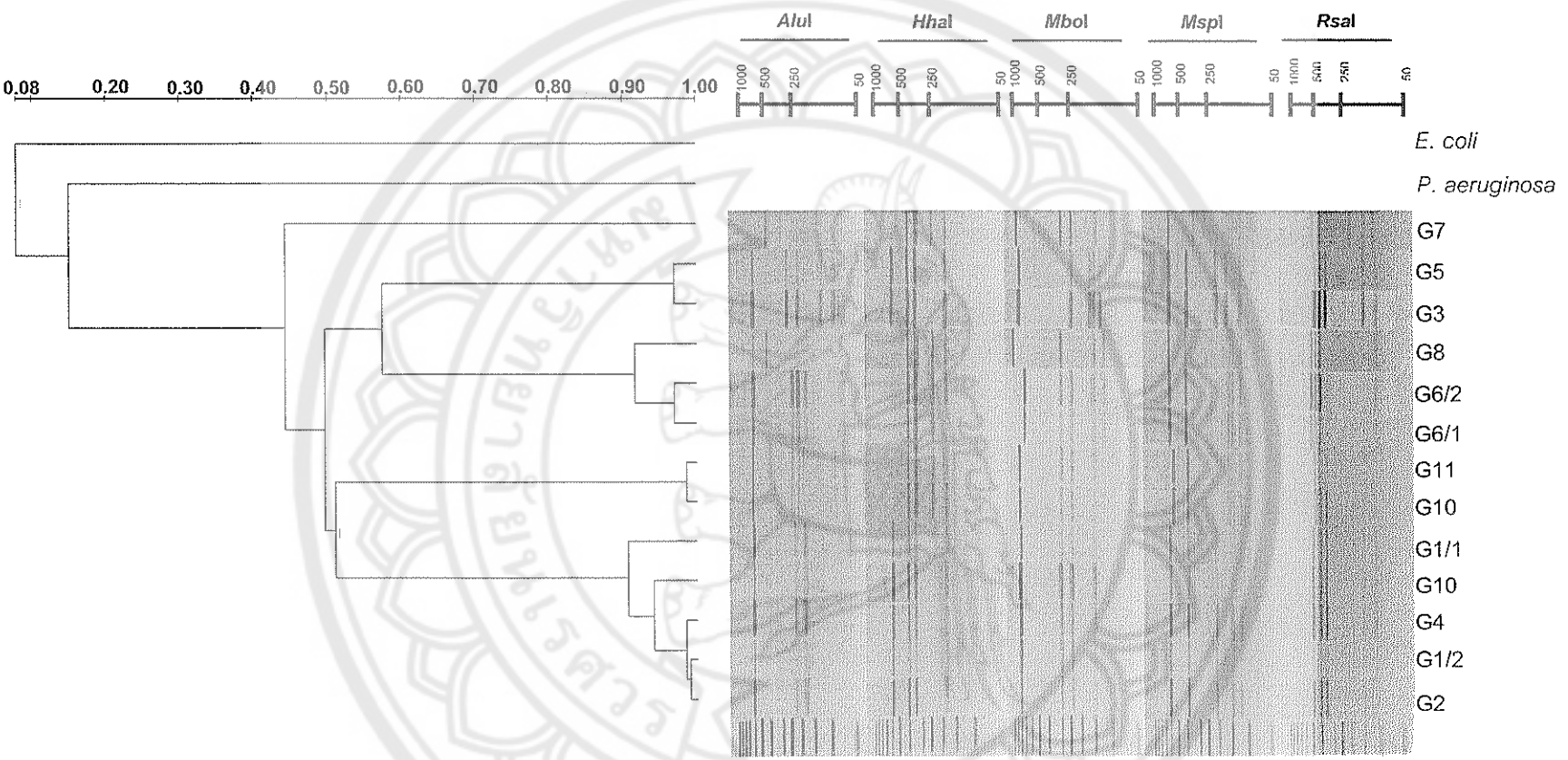
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2	*polymyxa*	100																										
3	*cereus*	49	100																									
4	*thuringiensis*	49	100	100																								
5	*megaterium*	36	60	60	100																							
6	*pantothenticus*	20	9	9	13	100																						
7	*aneurinilyticuss*	37	12	12	12	17	100																					
8	*brevis*	27	26	26	25	9	34	100																				
9	*azotoformans*	41	24	24	31	13	24	43	100																			
10	*badius*	65	60	60	54	21	27	33	43	100																		
11	*psychrophila*	50	47	47	38	24	27	20	27	72	100																	
12	*fusiformis*	52	53	53	51	34	32	30	28	75	73	100																
13	*sphaericus*	49	54	54	56	30	29	30	29	68	67	94	100															
14	*pabuli*	67	51	51	39	19	32	30	39	67	52	57	55	100														
15	*simplex*	56	57	57	67	21	32	38	44	78	58	72	78	64	100													
16	G1/1	49	100	100	60	9	12	26	24	60	47	53	54	51	57	100												
17	G2	49	100	100	60	9	12	26	24	60	47	53	54	51	57	100	100											
18	G3	55	56	56	62	17	31	38	43	77	57	67	72	63	90	56	56	100										
19	G4	49	100	100	60	9	12	26	24	60	47	53	54	51	57	100	100	56	100									
20	G1/2	49	100	100	60	9	12	26	24	60	47	53	54	51	57	100	100	56	100	100								
21	G5	55	56	56	62	17	31	38	43	77	57	67	72	63	90	56	56	100	56	56	100							
22	G10	36	60	60	100	13	12	25	31	54	38	51	56	39	67	60	60	62	60	60	62	100						
23	G11	36	60	60	100	13	12	25	31	54	38	51	56	39	67	60	60	62	60	60	62	100	100					
24	G8	50	51	51	49	27	29	31	25	65	68	92	89	52	67	51	51	61	51	51	61	49	49	100				
25	G6/1	52	53	53	51	34	32	30	28	75	73	100	94	57	72	53	53	67	53	53	67	51	51	92	100			
26	G6/2	52	53	53	51	34	32	30	28	75	73	100	94	57	72	53	53	67	53	53	67	51	51	92	100	100		
27	G7	93	51	51	38	20	31	29	38	60	48	50	47	62	54	51	51	49	51	51	49	38	38	52	50	50	100	
28	G9	49	100	100	60	9	12	26	24	60	47	53	54	51	57	100	100	56	100	100	56	60	60	51	53	53	51	100

ภาพ 29 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนจากการ combine **ของรูปแบบ** ARDRA **ของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบกับรูปแบบ** ARDRA **ตามทฤษฎีของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์** S_D **และจัดกลุ่มด้วย** UPGMA **ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป** SPSS

Calculation Method Dice Coefficient

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100.0														
2	91.4	100.0													
3	91.0	98.9	100.0												
4	91.8	99.2	98.3	100.0											
5	90.7	94.3	94.3	93.9	100.0										
6	54.8	51.7	51.6	51.9	50.3	100.0									
7	54.7	51.5	51.3	51.7	50.4	97.1	100.0								
8	52.1	51.7	52.2	51.9	49.2	58.0	58.4	100.0							
9	52.3	49.8	50.4	50.0	49.5	58.1	58.7	97.1	100.0						
10	49.3	48.4	48.8	48.5	46.4	55.9	56.2	92.6	90.7	100.0					
11	52.1	52.0	52.4	52.2	48.5	45.1	46.7	49.2	47.6	45.6	100.0				
12	51.4	51.3	51.6	51.5	47.8	44.5	46.1	50.4	48.8	46.9	98.7	100.0			
13	45.7	49.0	49.6	49.5	47.2	46.5	47.8	44.9	44.2	42.2	33.2	32.8	100.0		
14	13.4	12.5	12.6	12.6	11.6	21.4	22.0	15.7	15.6	16.1	14.4	14.2	14.2	100.0	
15	3.6	3.3	3.2	3.3	3.1	8.4	8.4	11.8	11.9	12.0	12.1	12.7	2.9	14.5	100.0

ภาพ 30 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน จาก combination ของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัด**กลุ่มด้วย** UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar จากตัวแทนของกลุ่มสายพันธุ์ทดสอบต่าง; 1, G1/1; 2, G1/2; 3, G2; 4, G4; 5, G9; 6, G3; 7, G5; 8, G6/1; 9, G6/2; 10, G10; 11, G11; 12, G8; 13, G7; 14, *Ps. aeruginosa*; 15, *E. coli*



ภาพ 31 แสดง Dendrogram จากcombination ของรูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรม GelCompar จากตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบต่างๆ

การจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดนสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และรูปแบบ ARDRA

จากผลเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลักษณะทางฟีโนไทป์ และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ได้จากรูปแบบ ARDRA แสดงให้เห็นผลที่สอดคล้องกันของเทคนิคในการจัดหมวดหมู่ทั้ง 2 เทคนิค จึงได้ข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำเสนอว่ารูปแบบ combined ARDRA ซึ่งสามารถสร้างได้รวดเร็วและให้ผลสอดคล้องกับผลลักษณะทางฟีโนไทป์ในการจัดหมวดหมู่ นอกจากจะใช้ในการยืนยันผลกับการจัดหมวดหมู่ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แล้ว ยังใช้แทนที่กันเพื่อประหยัดเวลาในการจัดกลุ่มหรือจัดหมวดหมู่ขั้นต้นให้กับสายพันธุ์ทดสอบได้ และจากการพิจารณาร่วมกันของอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลและรูปแบบ combined ARDRA ทำให้สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อนสร้าง เอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกได้ ดังแสดงรายละเอียดในตาราง 17 โดยกลุ่ม G3 และ G5 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลักษณะทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *B.simplex* (84-87 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. simplex* จัดเป็น *B. simplex* กลุ่ม G10 และ G11 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ลักษณะทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *B. megaterium* (84-87 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. megaterium* เช่นกัน จึงจัดเป็น *B. megaterium* กลุ่ม G7 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *P. polymyxa* (84 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *P. polymyxa* จึงจัดเป็น *P. polymyxa* ส่วนกลุ่ม G8 นั่นมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลักษณะทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับหลายชนิดคือ *B. badius* (84 เปอร์เซ็นต์), *B. brevis* (87 เปอร์เซ็นต์), *B. azotoformans* (87 เปอร์เซ็นต์), *L. sphaericus* (90 เปอร์เซ็นต์), *Sporosacina psychrophila* (94 เปอร์เซ็นต์) และ *L. fusiformis* (100 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อพิจารณารวมกับผลของรูปแบบ ARDRA พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 92 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *L. fusiformis* และ 89 เปอร์เซ็นต์ กับ *L. sphaericus* ดังนั้นจึงจัดเป็น *L. fusiformis* เพราะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลักษณะทางฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ใกล้เคียงกับชนิดนี้มากที่สุดอีกด้วย กลุ่ม G6/6 และ G6/10 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับ *L. fusiformis* (87-90 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *L. fusiformis* และ 94 เปอร์เซ็นต์ กับ *L. sphaericus* จัดเป็น *L. fusiformis* เช่นเดียวกับกลุ่ม G8 โดยเมื่อพิจารณาผลจากงานวิจัยก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าชนิด *L. sphaericus* และ *L. fusiformis* มีความเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของทั้งรูปแบบ combined ARDRA ใกล้เคียงกันมากหรือแม้แต่ 16S rDNA sequencing ก็ไม่สามารถจำแนกจากกันได้ชัดเจนดังแสดงในภาพ 33 ส่วนกลุ่ม G1/1, G1/2, G2,

G4, และ G9 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลักษณะทางฟีโนไทป์กับ *B. cereus* & related sp. (87-94 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์-ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีของ *B. cereus* & related sp. จัดเป็น *B. cereus* & related sp. และสามารถจำแนกกลุ่ม G9 เป็น *B. mycoides* จากลักษณะเด่นของโคโลนีของกลุ่มนี้มีลักษณะเจริญแผ่ขยายคล้ายรากไม้ ซึ่งกลุ่มชนิดนี้ก็ไม่สามารถแยกกันได้ด้วย 16S rDNA sequencing แสดงให้เห็นในภาพ 33 เมื่อนำข้อมูลมาสร้าง dendrogram ทำให้ได้ผลดังภาพ 34 ด้วยเหตุนี้เองจึงได้มีความพยายามแก้ไขปัญหาในการจำแนกกลุ่มชนิดที่จำแนกจากกันยากทั้งด้วยลักษณะฟีโนไทป์และ 16S rDNA sequencing จึงมีการเสนอโครงร่างในการคิดหาเทคนิคใหม่ๆ เพื่อให้เอื้อประโยชน์ในการจำแนกชนิดเหล่านี้ เช่นเทคนิคการหา unique nucleotide signatures (Porwal, et al, 2009, pp.1-27) ในส่วนของ 16S rDNA sequence ช่วงประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ แสดงข้อมูลไว้ในตาราง 18 ซึ่งจากข้อมูลทำให้เห็นว่า *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ซึ่งเป็นกลุ่ม *B. cereus* & related sp. มีความต่างกันของ nucleotide signatures รวมทั้งใน *L. sphearicus* ก็มี nucleotide signatures ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะ (unique) ของชนิด ซึ่งโครงร่างนี้เมื่อได้มีการพัฒนาและทำไปทดลองใช้ให้แพร่หลายในงานวิจัย จะส่งเสริมประโยชน์และแก้ไขปัญหาของอนุกรมวิธานแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ได้อย่างมากเลยทีเดียว

เมื่อพิจารณารูปแบบ ARDRA นี้ร่วมกับงานวิจัยก่อนหน้า (Heyndricx, et al., 1998, pp.99-106) จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มไปทางเดียวกัน กล่าวคือไว้ว่าจะเป็น 16S rDNA sequencing หรือรูปแบบ ARDRA ระหว่างแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโอสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก กลุ่ม *Bacillus* rRNA groups 1 และ 2 ยังคงปะปนรวมกันอยู่เปรียบเทียบกันได้ในภาพ 35a และ 35b (*Bacillus* rRNA groups จัดทำขึ้นโดย Ash, et al. ซึ่งในปัจจุบันยังคงนิยมใช้เรียกแทนกลุ่มทางจีโนไทป์ของแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโอสปอร์ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก) (Ash, et al., 1991, pp.202-206) ด้วยเหตุนี้เองจึงมีงานวิจัยใหม่ๆ จึงยังคงดำเนินการ reclassification แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* rRNA groups 1 และ 2 แยกออกจากกันต่อไป เพื่อให้เกิดความกระจ่างชัดในการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโอสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิกนั่นเองดังเช่น *B. polymyxa* จัดอยู่ใน *Bacillus* rDNA groups 3 ได้ถูก reclassification ไปอยู่เป็นสกุลใหม่ชื่อ *Peanibacillus polymyxa* โดย Heyndrickx, et al. (Heyndrickx, et al., 1996a, pp.988-1003) *B. fusiformis* และ *B. sphearicus* ได้ถูก reclassification ไปอยู่เป็นสกุลใหม่ชื่อ *Lysinibacillus fusiformis* และ *L. sphearicus* โดย Ahmed, et al. (Ahmed, et al., 2007, pp.1117-1125) เป็นต้น

ตาราง 17 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ที่แยกได้จากดินตัวอย่างของอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และรูปแบบ ARDRA

กลุ่มฟีโนไทป์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนลักษณะทางฟีโนไทป์	แผนผังเทียบเคียง Reva, et al.	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนรูปแบบ ARDRA	การจัดจำแนกชนิด	รหัสสายพันธุ์
G1/1	87 % *B. cereus* & related sp.	-	100 % *B. cereus* & related sp.	*B. cereus* & related sp.	PPR1.D4, PPR2.N10, LU1.N2, LU1.D3, LU2.N2, LU3.D8, PN4.N14, PN7.D13, SY3.N8, 27km1.N4,TT1.D1, TT3.N4, Ch1.N3, Ch3.D1
G1/2	94 % *B. cereus* & related sp.	-	100 % *B. cereus* & related sp.	*B. cereus* & related sp.	PPR1.N3, PPR4.D6, LU1.N7, PPR2.N1, PN3.N9, PN5.N7, SY6.N6, Ch4.N8, 27km3.N3, TT4.N3
G2	90 % *B. cereus* & related sp.	-	100 % *B. cereus* & related sp.	*B. cereus* & related sp.	PPR1.N22, PPR2.D3, PPR3.N6, PPR4.D4, LU2.N3, LU3.D3, LU6.N10, LU4.D1, PN1.N10, PN1.D12, PN2.N16, PN4.N15, SY1.D6,SY3.N10, Ch1.N4,Ch2.N5, Ch3.N4, Ch4.N2, 27km1.N3, 27km3.N2, TT1.D8, TT2.N5, TT5.N2
G4	90 % *B. cereus* & related sp.	-	100 % *B. cereus* & related sp.	*B. cereus* & related sp.	PPR2.D5, PPR3.N1, PPR5.N3, PPR6.N21, LU3.D6, PN1,D15, PN3.N8, Ch2.D1, Ch4. N7, 27km2.N6, TT3.N6

ตาราง 17 (ต่อ)

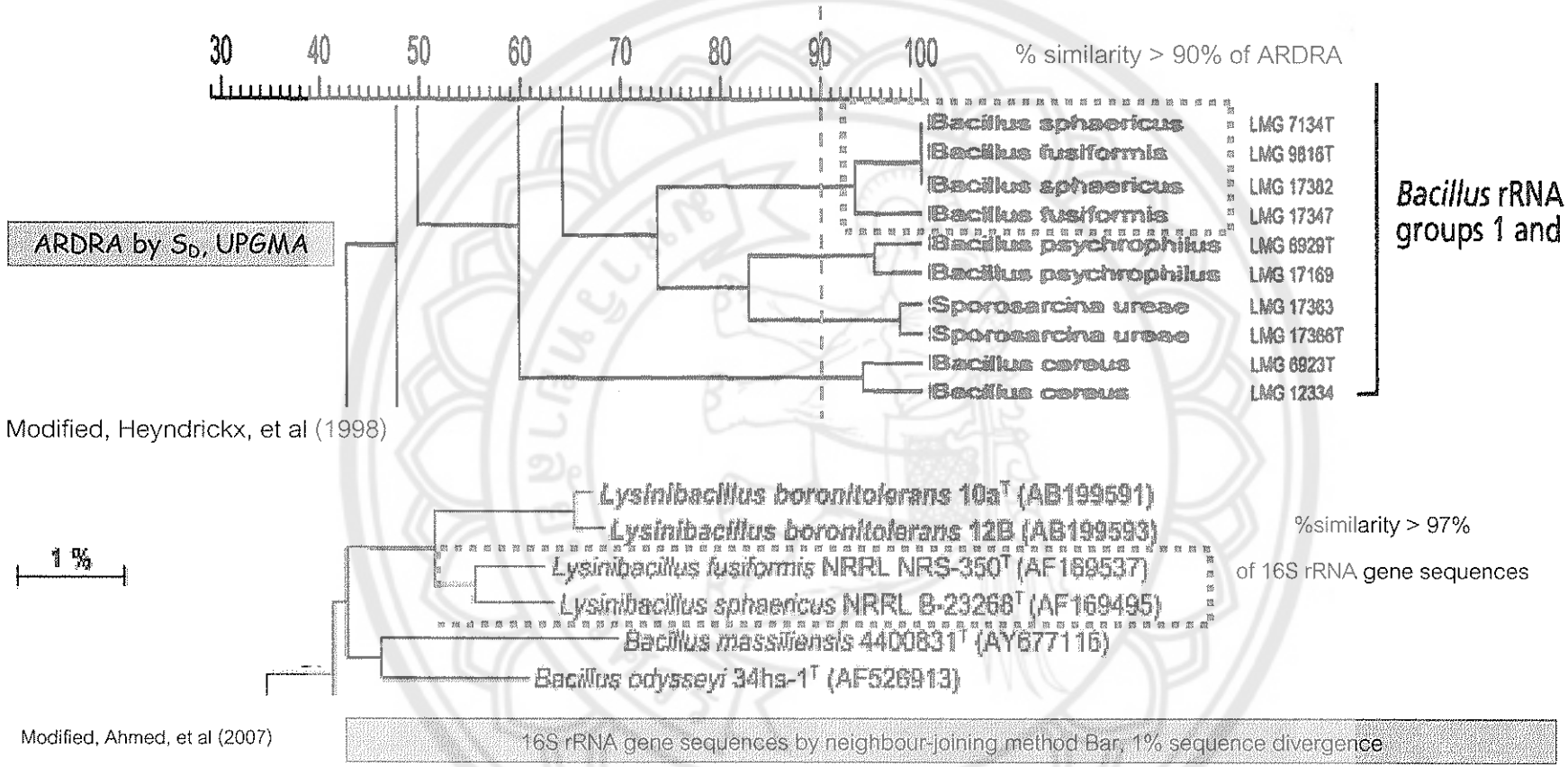
กลุ่มฟีโนไทป์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนลักษณะทางฟีโนไทป์	แผนผังเทียบเคียง Reva, et al.	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนรูปแบบ ARDRA	การจัดจำแนกชนิด	รหัสสายพันธุ์
G9	87 % *B. cereus* & related sp.	rhizoid colony *B. mycoides*	100 % *B. cereus* & related sp.	*B. mycoides*	PPR1.N17, PPR1.D7PPR3.N11, PPR4.N8, LU4.N11, LU6.N12, PN4.N13, SY3.D5, LU1.N8, SY2.N10, Ch1.D3, TT5.D2, 27km2.N3
G3	87 % *B. simplex*	-	90 % *B. simplex*	*B. simplex*	PPR1.N23, PPR1.D5, PPR5.N13, LU1.N5, LU3.D5, LU4.D10, LU6.D12, PN2.N17, PN1.D14, PN3.N7, PN4.D3, SY3.N12, SY3.D7, Ch1.N8, Ch2.N7, Ch4.N4, 27km3.N5, TT2.N6, TT3.D4, TT4.D1, TT5.N3
G5	84 % *B. simplex*	-	90 % *B. simplex*	*B. simplex*	PPR1.N25, PPR2.N18, PPR5.D4, LU2.N9, 1PN1.N7, PN2.N8, PN2.N10, PN2.D3, PN3.D1, PN6.D2, PN6.D7, PN7.N1, SY3.D2, SY2.D12, Ch3.N5, Ch5.N4, 27km3.N1, TT2.N9, TT3.D5

ตาราง 17 (ต่อ)

กลุ่มฟีโนไทป์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนลักษณะทางฟีโนไทป์	แผนผังเทียบเคียง Reva, et al.	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนรูปแบบ ARDRA	การจัดจำแนกชนิด	รหัสสายพันธุ์
G6/1	90 % *L. sphericus* 90 % *L. fusiformis*	urease (+) *L. fusiformis*	94 % *L. sphaericus* 100 % *L. fusiformis*	*L. fusiformis*	PPR1.N4, PPR5.D11, LU2.D13, PN3.D8, SY2.N8, SY3.D8, Ch2.N10, Ch5.N5, 27km1.N6, TT5.N5
G6/2	87 % *L. sphericus* 87 % *L. fusiformis*	urease (+) *L. fusiformis*	94 % *L. sphaericus* 100 % *L. fusiformis*	*L. fusiformis*	PPR1.N8, LU3.N9, PN5.D11, SY1.N15, Ch3.N7
G8	90 % *L. sphericus* 94 % *S. psychrophilus* 100 % *L. Fusiformis* 84 % *B. badius* 87 % *B. azotoformans* 87 % *Br. brevis*	urease (+) *L. fusiformis*	89 % *L. sphaericus* 92 % *L. fusiformis*	*L. fusiformis*	PN2.N15, PPR1.N28, PPR6.D4, LU2.D12, LU3.N8, LU3.D17, PN2. N11, PN3.N14, PN5.D10, SY2.N7, Ch2.N9, 27km2.N2, TT3.N9, TT4.D2

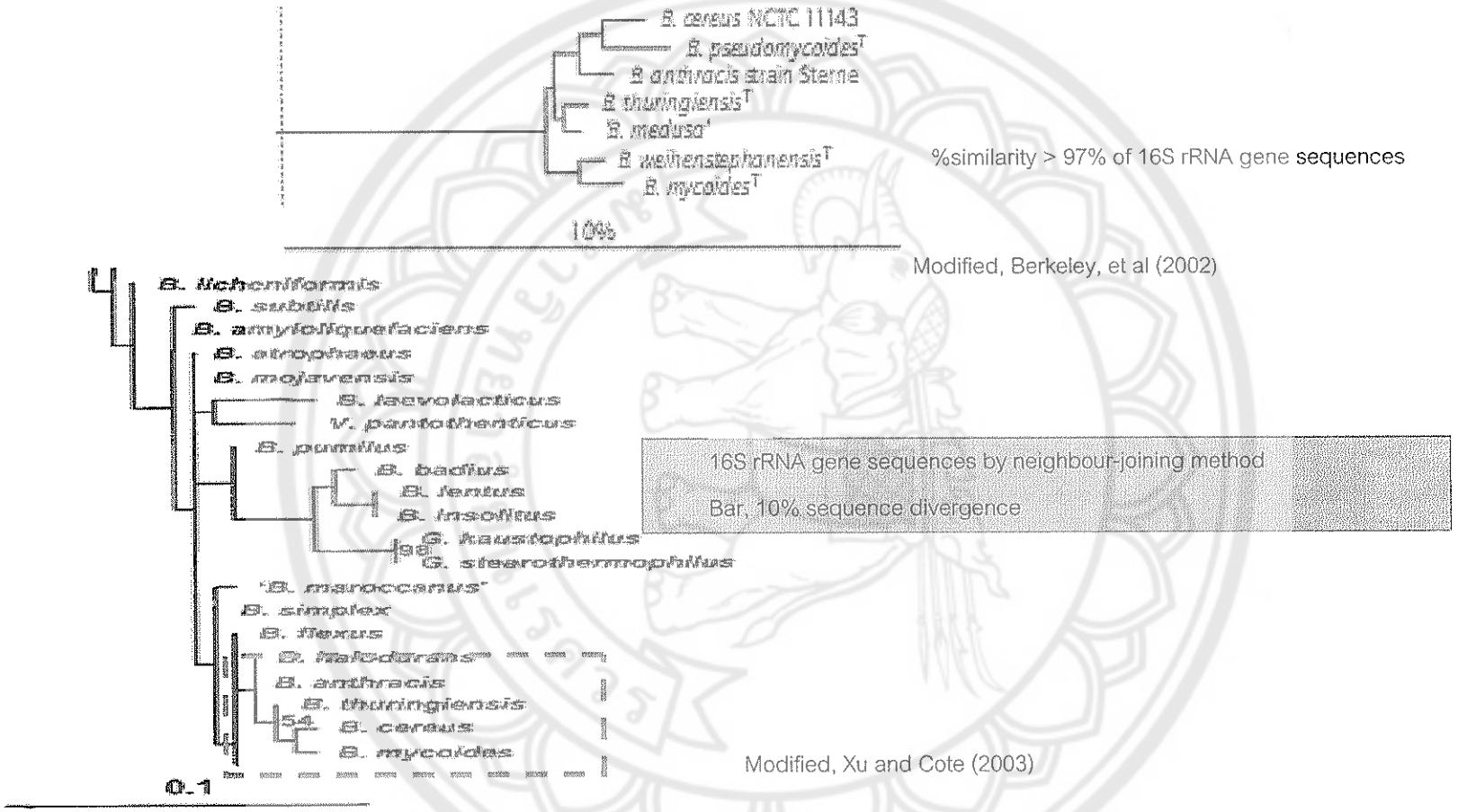
ตาราง 17 (ต่อ)

กลุ่มฟีโนไทป์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนลักษณะทางฟีโนไทป์	แผนผังเทียบเคียง Reva, et al.	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนรูปแบบ ARDRA	การจัดจำแนกชนิด	รหัสสายพันธุ์
G7	84 % *P. polymyxa*	-	93 % *P. polymyxa*	*P. polymyxa*	PPR1.N29, PPR6.D6, LU3.N12, PN2.D6, LU4.N12, LU6.N13, PN4.N17, PN6.D6, PN6.N13, Ch3.N8, Ch5.N9, 27km2.N2, SY2.N9,TT4.N9, TT5.N6
G10	87 % *B. megaterium*	-	100 % *B. megaterium*	*B. megaterium*	PPR3.N5, PPR5.D7, PPR6.N14, LU2.D10, LU3.N5, PN3.N11, PN6.D11, SY2.D13, Ch5.N10, 27km3.D2, TT3.D6
G11	90 % *B. megaterium*	-	100 % *B. megaterium*	*B. megaterium*	PPR1.N27, PPR3.D6, PPR5.D9, LU2.D11, LU3.N6, LU3.D13, PN3.D4,PN3.N12, PN3.D5, PN5.N10, PN3,D4, SY2.D14, Ch2.N8, 27km2.N1, TT1.N9, TT2.D6, TT5.N4



ภาพ 32 การจัดหมวดหมู่ด้วย combined รูปแบบ ARDRA และ phylogenetic tree จาก 16S rDNA sequencing

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Heyndrickx, et al, 1998, pp.99-106; Ahmed, et al, 2007, pp.1117-1125



ภาพ 33 การจัดหมวดหมู่ด้วย phylogenetic tree จาก 16S rDNA sequencing ของ *Bacillus cereus* & related sp.

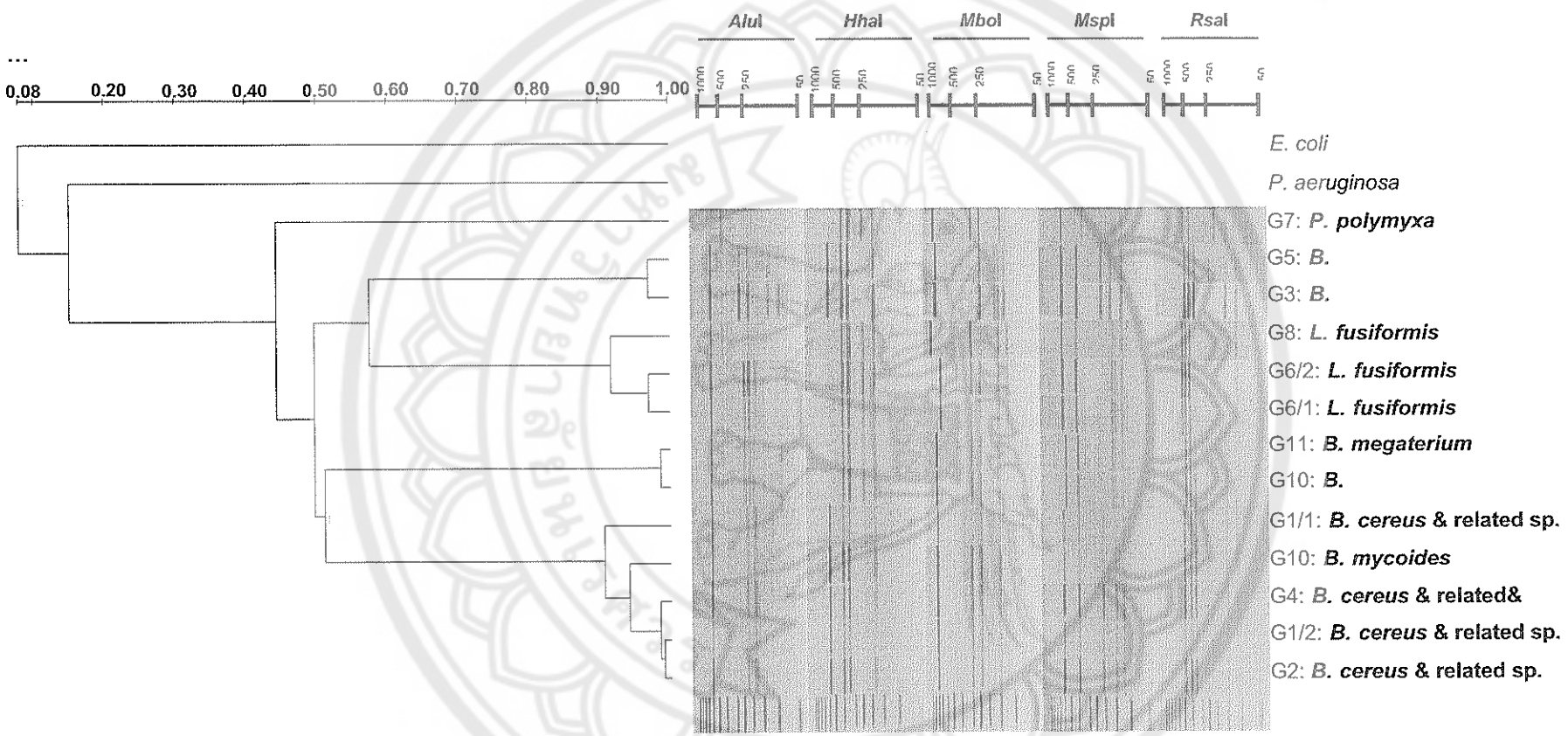
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Berkeley, et al, 2002, pp.141-159; Xu and Cote, 2003, pp.695-704

Characteristics of unique nucleotide signatures for 16S rDNA sequences of different *Bacillus* spp. and clusters of *Bacillus* sp.

Bacillus spp./Cluster[a]	Signature	Length (nts)[b]	Frequency[c]
Bacillus cereus	AAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	30	151/211
B. thuringiensis	ATAACATTTTGAACTGCATGGTTCGAAATT	30	43/108
	CTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCA	29	63/108
B. anthracis	No unique signature was detectable		0/153
B. clausii	AATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATT	30	14/39
	AAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	30	31/39
	AAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTT	30	14/39
	GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTA	30	15/39
	GTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACT	29	23/39
B. halodurans	ATAATAAAAAGAACTGCATGGTTCTTTTTT	30	21/36
	ACCAAAGGGAGCTTGCTCCTAGAGGTTAGC	30	01/36
B. pumilus	AAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT	30	14/83
	AAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCT	30	35/83
	ATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT	30	42/83
B. megaterium	ATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTT	30	35/47
	AATCCGATAAAACCATTCTCAGTTCGGATT	30	19/47
	AACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTT	30	28/47
	TCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATA	30	33/47
	TGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATA	30	34/47
B. sphaericus	TAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTA	30	23/42
	ATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAAT	30	14/42
	TAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGAT	30	23/42
	AGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTT	30	10/42
	TAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATT	30	27/42

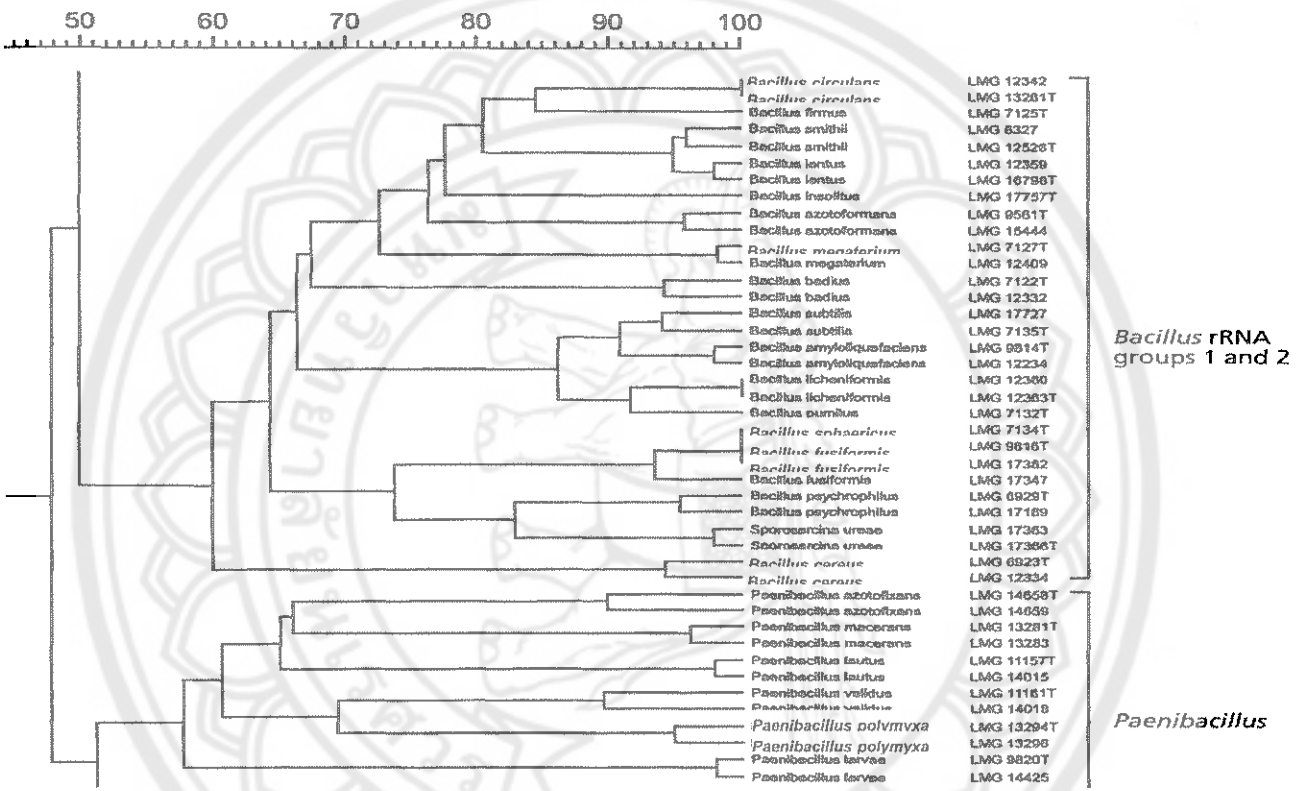
ภาพ 34 แสดงตัวอย่างโครงร่างวิธีการในการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียสกุล *Bacillus* กลุ่มชนิดที่จำแนกยากด้วย unique nucleotide signatures

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Porwal, et al, 2009, pp.1-27



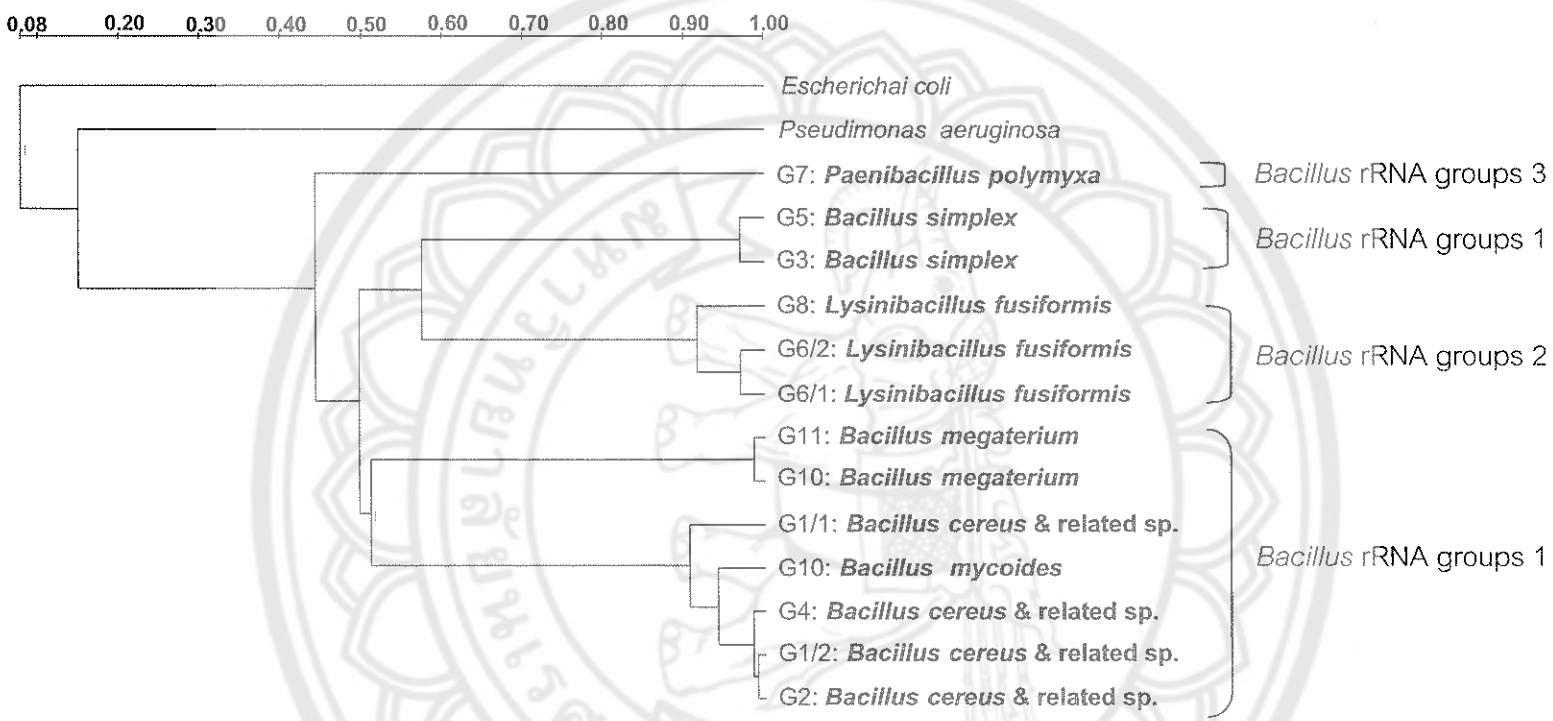
ภาพ 35 แสดง Dendrogram การจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยอาศัย**ลักษณะทางฟีโนไทป์**และ combined รูปแบบ ARDRA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่มด้วย UPGMA

a



ภาพ 36 แสดง Dendrogram การจัดจำแนกสายพันธุ์ทดสอบของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะ**แอโรบิก โดยอาศัย**ลักษณะทางฟีโนไทป์และ combine ของ ARDRA profiles ทั้ง 5 เอนไซม์ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ S_D และจัดกลุ่ม**ด้วย** UPGMA **อ้างอิง**ตามกลุ่ม *Bacillus* rRNA groups ของ Ash, et al. (a) สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลอง (b) ARDRA profiles จาก Heydrickx, et al.

b



ภาพ 36 (ต่อ)

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Heydrickx, et al., 1998, pp.99-106