# ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
# Method Validation for Identification of Bacteria in PGPR Biofertilizer

*อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์* *กัลยกร โปร่งจันทึก*
*Amnat Eamvijarn* *Kunlayakorn Prongjunthuek*

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

---

## ABSTRACT

The identification of *Azospirillum* (DASF04003 and DASF04008) and *Azotobacter* (DASF04141) that were bacterial reference strains for plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) biofertilizer production. In order to set up the standard operation procedure for quality control of biofertilizer. The 16S rRNA gene fragment were amplified by using universal primers. Then bacterial DNAs were sequenced and compared with other bacterial strains in NCBI database. The results showed that *Azospirillum* strains were grouped in *Azospirillum brasilense.* Whereas, *Azotobacter* strains were grouped in *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* and *Azotobacter salinestris*. The validation of bacterial classification method found that the Trueness of % similarity from molecular identification method of *Azospirillum brasilense* was 98 - 99% and score value of MALDI-TOF MS was 2.33 – 2.39. The Repeatability of analytical method of MALDI-TOF MS that shown Coefficient of Variation (%CV) value were 4.94 and 4.77. The Intermediate precision was 2.28 and 2.31 at 95% confidence level ($P$ = 0.481). Moreover, Trueness of % similarity from molecular identification method of *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* and *Azotobacter salinestris* were 98 – 99% and score value of MALDI-TOF MS was 2.55 2.45 and 2.45 respectively. The Repeatability of analytical method of MALDI-TOF MS that shown %CV were 1.14 3.95 and 3.23. The Intermediate precision was 2.55 and 2.51 at 95% confidence level ($P$ = 0.127). Thus, MALDI-TOF MS has Precision of the method and suitable for use according the standard of validation of analytical method.

**Keywords :** Validation, bacterial classification, Plant growth promoting bacteria, biofertilizer

## บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของแบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จำนวน 2 สกุล ได้แก่ *Azospirillum* (DASF04003 และ DASF04008) และ *Azotobacter* (DASF04141) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาหาลำดับเบส จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Azospirillum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azospirillum brasilense* เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบพบว่า ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98 – 99 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.33 – 2.39 ความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 4.94 และ 4.77 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มีค่า CV เท่ากับ 2.28 และ 2.31 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า $P$ เท่ากับ 0.481 ขณะที่ *Azotobacter* จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้

ของวิธีทดสอบพบว่า ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98 – 99 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 1.14 3.95 และ 3.23 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มีค่า CV เท่ากับ 2.55 และ 2.51 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.127 แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นวิธีทดสอบการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS จึงมีความเที่ยง และมีความเหมาะสม และให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้

**คำสำคัญ :** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี การจำแนก แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ปุ๋ยชีวภาพ

## คำนำ

*Azospirillum* และ *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ลำต้น และใบ ของพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free-living diazotrophs) เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช สร้างสารซิเดอโรฟอร์ (siderophores) ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช โดยการแย่งจับธาตุเหล็กบริเวณรอบรากพืช นอกจากนี้ยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxins) ซึ่งกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และลามินาริเนส (laminarinase) ย่อยเส้นใยเชื้อราโรคพืช (antagonistic) สร้างสารปฏิชีวนะ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เป็นต้น (หนึ่ง, 2548; ธงชัย, 2550; Glick *et al*., 1999; Choudhury and Kennedy, 2004) ซึ่งในแบคทีเรียบางสกุลมีความสามารถหลายอย่างรวมกัน ดังนั้นการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเป็นปุ๋ยชีวภาพจึงมีความสำคัญ การใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนอกจากจะช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีแล้ว ยังผลทำให้มีต้นทุนการผลิตลดลงอีกด้วย ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อจำหน่าย จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อขอขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เพื่อควบคุม กำกับ คุณภาพของปุ๋ยชีวภาพ โดยปริมาณจุลินทรีย์ขั้นต่ำ $1.0 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ และต้องจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ (scientific name) ของจุลินทรีย์ในระดับสกุล (genus) ด้วย

การจัดจำแนกจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนพื้นฐานในการศึกษาเพื่อให้รู้ถึงชื่อทางวิทยาศาสตร์ ก่อนการศึกษาในเชิงลึก เนื่องจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีทั้งประโยชน์และโทษ การจำแนกในปัจจุบันอาศัยรากฐานจากระบบการจำแนกของคาโรลัส ลินเนียส (Carolus Linnaeus) นักพฤกษศาสตร์ชาวสวีเดนเมื่อประมาณ 300 ปี เป็นผู้จัดกลุ่มต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตโดยดูจากลักษณะเฉพาะทางกายภาพ (morphological characteristics) ซึ่งการจัดกลุ่มแบบดังกล่าวได้มีการศึกษารายละเอียดที่จำเพาะเพิ่มมากขึ้น และมีการปรับปรุงให้ทันสมัยอยู่เสมอเพื่อเป็นพื้นฐานของการศึกษาด้านจุลินทรีย์ ทั้งนี้ในปัจจุบันการจัดจำแนกจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มหลัก ๆ ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) หมายถึง การศึกษาทางด้านกายภาพที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ลักษณะโคโลนี สี กลิ่น อาหารสูตรจำเพาะ หรือลักษณะที่มองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น สปอร์ รูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัว การสร้างแคปซูล และการติดสีแกรม (gram staining) เป็นต้น (Christopher and Bruno, 2003; Tshikhudo *et al*., 2013)

2. การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical testing) หมายถึง การทดสอบเอนไซม์ที่แบคทีเรียใช้ย่อยสลายสารอาหารและสังเคราะห์ชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาหารและชีวโมเลกุลที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจึงไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงใช้ทดสอบกับปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันด้วย เช่น pH indicator, Enzyme production หรือ Chromogenic media (Váradi *et al*., 2017)

3. การศึกษาทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) หมายถึง เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง และการทำงานของหน่วยพันธุกรรมในระดับโมเลกุล ซึ่งรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน

โดยเทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย เช่น Polymerase chain reaction (PCR), Gel electrophoresis, Southern blotting and Northern blotting, Western blotting, DNA microarrays, Whole genome sequencing หรือ Multi-omics approaches เป็นต้น (Wilson and Walker, 2010)

4. แมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry) หมายถึง การวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น เปปไทด์ (peptide) และสารประกอบทางเคมีอื่น ๆ โดยการทำงานคือทำให้สารประกอบเคมีกลายเป็นประจุ (ionize) เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีประจุและวัดสัดส่วนมวลต่อประจุของสาร (Sparkman, 2000)

**การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่นิยมมี 2 วิธี ดังนี้**

**1. การศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์** หมายถึง ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดใดชนิดหนึ่งในบริเวณยีนที่ต้องการได้ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเครื่อง thermocycler จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า โดยหลักการเพิ่มปริมาณของ DNA ช่วงใดช่วงหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างส่วนของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ทราบลำดับเบสแล้วเรียกว่า ไพร์เมอร์ (primer) และเรียกต้นแบบดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณว่า DNA template ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ Denaturating, Annealing และ Extension และดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ (Ethidium bromide, SYBR green, Gelstar, Gelred และ Gelgreen) ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (อำไพวรรณ และธันยชัย, 2534)

**2. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเครื่องมัลดิทอฟ (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI) โดยใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry)** เป็นเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งเป็นการตรึงโปรตีน (ribosomal protein) หรือเปปไทด์ (peptide) กับผลึกของ matrix (crystalline matrix) และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีนให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของสาร โดยสารที่มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) มีความสามารถในการแยก (resolution) โดยตรวจสอบจากการวัดเปปไทด์ มีซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของเครื่องและประมวลผลจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Identification and Classification for microorganism) มี Reference Library หรือ In-house Library ของ peptide mass fingerprint (PMF) ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากตัวอย่าง (Hosseini and Martinez-Chapa, 2017)

นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 มีงานวิจัยการใช้เครื่องมัลดิทอฟในการจำแนกชนิดจุลินทรีย์จำนวนมาก โดยส่วนใหญ่ประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรม จากการรายงานของ Váradi *et al*. (2017) สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Burkholderia multivorans*, *B. cenocepacia* และ *B. contaminans* ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุโรคของคนได้อย่างรวดเร็ว มีการศึกษาการการดื้อยาปฏิชีวนะ (antibacterial resistance) ของเชื้อแบคทีเรียโดยการศึกษาเอนไซม์ β-lactamase ต่อยากลุ่ม β-lactams (penicillins, cephalosporins, monobactams และ carbapenems) เป็นยากลุ่มใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางและมีบทบาทมากในการช่วยชีวิตมนุษย์ ซึ่งเครื่องมัลดิทอฟสามารถแยกเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่ต้านทานยากลุ่ม β-lactams ได้อย่างชัดเจน (Hrabák, *et al*., 2011) ในทางอุตสาหกรรมอาหาร Elbehiry *et al*. (2017) สำรวจอาหารจากร้านอาหารในประเทศซาอุดิอาระเบีย จำนวน 80 ตัวอย่าง โดยแยกเชื้อบนอาหารสูตรจำเพาะ (selective media) และใช้เทคนิคมัลดิทอฟ จำแนกแบคทีเรียได้ 69 ไอโซเลท และจำแนกราได้ 32 ไอโซเลท นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ทางด้านการเกษตรโดยทดสอบศักยภาพของวิธีเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน

วงศ์ Rhizobiaceae ได้แก่ *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, และ *Azorhizobium* เปรียบเทียบกับวิธี phylogenetic analyses พบว่าการใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีด้วยเครื่องมัลดิทอฟให้ผลการจำแนกเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถจำแนก *Bradyrhizobium japonicum* strain G49, *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 และ USDA257 ที่เจริญในปมรากของถั่ว (Ferreira *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2012; Jia *et al*., 2015) ในทางเดียวกัน Stets *et al.* (2013) ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าวสาลีด้วยเครื่องมัลดิทอฟ พบเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. amazonense, A. lipoferum, Pseudomonas, Pantoea, Acinetobacter, Enterobacter* และ *Curtobacterium* เป็นต้น

เทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีถูกพัฒนาและประยุกต์ใช้งานเพิ่มขึ้นจำนวนมากเพื่อให้การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างรวดเร็ว ทำให้นักวิจัยเลือกวิธีการที่สามารถปรับใช้ให้ทันต่อสถานการณ์ปัจจุบัน เพราะเทคนิค วิธีการ รวมทั้งเทคโนโลยีแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ซึ่งนักวิจัยจึงควรคำนึงถึงผลการจัดจำแนกที่รวดเร็ว ประหยัด น่าเชื่อถือ ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญต้องปลอดภัยกับผู้ปฏิบัติงาน (Singhal *et al.*, 2015) เมื่อพิจารณาข้อดีข้อเสียของเทคนิคพีซีอาร์และแมสสเปคโตรเมทรี พบว่า เทคนิคพีซีอาร์มีการใช้สารเคมี เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขั้นตอนและระยะเวลาดำเนินงาน ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญสูง ซึ่งเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีตอบโจทย์ความต้องการข้างต้น อีกทั้งสามารถสร้างฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เองและลดการพึ่งพาการส่งอย่างเพื่อวิเคราะห์กับหน่วยงานภายนอก ทั้งนี้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีโดยใช้เครื่องมัลดิทอฟยังไม่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล ทำให้ขาดข้อมูลที่ใช้ยืนยันความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) กลุ่ม micro aerophilic ได้แก่ *Azospirillum brasilense* (DASF04003, DASF04005, DASF04008, PGPR16/63 และ AP1) และกลุ่ม aerophilic ได้แก่ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141), *Azotobacter beijerinckii* (AT2, AT4 และ AT9) และ *Azotobacter salinestris* (AT10)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen free semisolid malate (NFb), LGI, Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR)

3. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้บ่มเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) เครื่องเขย่าสาร และเครื่อง MALDI-TOF MS

4. สารเคมีในกระบวนการสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ (primer) เอนไซม์ Taq polymerase

5. ชุดทำความสะอาดสารพันธุกรรม (PCR clean-up)

6. Bacterial Test Standard (BTS), $\alpha$-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)

7. เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

### วิธีการ

**1. การจัดจำแนกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (Molecular identification)**

1.1 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พีจีพีอาร์กลุ่ม micro aerophilic จำนวน 5 สายพันธุ์ และ aerophilic จำนวน 10 สายพันธุ์ในอาหาร Nutrient broth ปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์

1.2 สกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์สายพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการของชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)

1.3 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ต้องการโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTAC GAC TT-3') (Weisburg *et al*., 1991) จากนั้น นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยา (PCR reaction condition) ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ขั้นตอนที่ 1 | 94 องศาเซลเซียส 3 นาที | จำนวน 1 รอบ |
| ขั้นตอนที่ 2 | 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที | 35 รอบ |
| | 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที | |
| | 72 องศาเซลเซียส 1 นาที | |
| ขั้นตอนที่ 3 | 72 องศาเซลเซียส 10 นาที | จำนวน 1 รอบ |

1.4 ตรวจปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

1.5 ทำความสะอาดสารพันธุกรรมตามวิธีของ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)

1.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง DNA Sequencer

1.7 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์แต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ด้วย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

1.8 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์ในฐานข้อมูลที่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์สายพันธุ์อ้างอิง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ชนิดใดในฐานข้อมูล และบ่งบอกชนิด (species) ของเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง

**2. การจัดจำแนกโดยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS**

2.1 ใช้ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แตะโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ เกลี่ยเชื้อลงบน Target plate โคโลนีละ 2 จุด รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 10-15 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ

2.2 หยด 70% Formic acid จำนวน 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15-30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ

2.3 หยด HCCA จำนวน 1 ไมโครลิตร เป็นลำดับสุดท้าย รอให้ตัวอย่างแห้งโดยสังเกตตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นคราบสีขาว

2.4 ใช้ BTS เป็น Calibration

2.5 นำ Target plate เข้าเครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ Bruker รุ่น Maldi Biotyper

2.6 บันทึกค่า score value

ค่า score value ที่ได้จากเครื่อง MALDI-TOF MS คำนวณจากการวิเคราะห์แมสสเปคตรัมของเชื้อที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับแมสสเปคตรัมของเชื้อในฐานข้อมูล (Reference library) ซึ่งค่าอยู่ระหว่าง 0.00-3.00 โดยแบ่งผลการวิเคราะห์เป็น 3 ช่วง ดังนี้

ช่วง 0.00-1.69 คือ ผลการวิเคราะห์ไม่สามารถจำแนกได้

ช่วง 1.70-1.99 คือ ผลการวิเคราะห์จำแนกได้ในระดับสกุล (genus)

ช่วง 2.00-3.00 คือ ผลการวิเคราะห์จำแนกได้ในระดับชนิด (species)

**3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)**

3.1 การทดสอบความถูกต้อง (trueness)

3.1.1 ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง (isolate) โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลด้วยการทำ Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ fD1 และ rP2 และหาลำดับเบสเพื่อนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) โดยการทำ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search รายงานผลการจำแนกชนิด และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (% similarity)

3.1.2 ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่าง (isolate) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ Bruker รุ่น Maldi Biotyper ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คะแนนความคล้ายคลึงกัน (score value) ของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล และรายงานผลการจำแนกชนิด

3.1.3 นำผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้จากวิธีที่ 3.1.1 และ 3.1.2 มาเปรียบเทียบกัน หากผลการจำแนกชนิดเดียวกัน จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ของเครื่อง MALDI-TOF MS

3.2.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 2 ชนิด (species) โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน นำค่า score value ของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล มาหาค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

3.2.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด (species) ทำการทดสอบ 20 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน นำคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล มาหาค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์ และเปรียบเทียบคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่วัดได้จากผู้ทดสอบทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ระยะเวลา** ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

**สถานที่ทำการทดลอง** ณ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**1. การจัดจำแนกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (Molecular identification)**

เมื่อนำดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายพันธุ์ DASF04003, DASF04005, DASF04008, PGPR16/63 และ AP1 มีความคล้ายคลึงกัน (% similarity) กับเชื้อ *Azospirillum brasilense* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophilic จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายพันธุ์ DASF04141 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter vinelandii* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ AT2, AT4 และ AT9 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สายพันธุ์ AT10 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter salinestris* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

**2. การจัดจำแนกโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ (MALDI-TOF MS)**

ผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์อ้างอิงกลุ่ม micro aerophilic จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ DASF04003 และ DASF04008 คือ *Azospirillum brasilense* มีค่า score value เท่ากับ 2.33 และ 2.39 (Table 2) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophilic จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ DASF04141, AT1 และ AT10 คือ *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* ซึ่งมีค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ตามลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับรายงานของ Stets *et al.* (2013) ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าวสาลีด้วยเครื่อง มัลดิทอฟ ในกลุ่ม micro aerophilic 3 ชนิด ได้แก่ พบเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. Amazonense* และ *A. lipoferum* นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas, Pantoea, Acinetobacter, Enterobacter* และ *Curtobacterium* ได้อีกด้วย นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ทางด้านการเกษตรโดยทดสอบศักยภาพของวิธีเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในวงศ์ Rhizobiaceae ได้แก่ *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, และ *Azorhizobium* เปรียบเทียบกับวิธี phylogenetic analyses พบว่าการใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีด้วยเครื่องมัลดิทอฟให้ผลการจำแนกเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถจำแนก *Bradyrhizobium japonicum* strain G49, *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 และ USDA257 ที่เจริญในปมรากของถั่ว (Ferreira *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2012; Jia *et al*., 2015)

**3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)**

3.1 การทดสอบความถูกต้อง (trueness)

ผลเปรียบเทียบการจำแนกชนิด (species) ของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงกลุ่ม micro aerophilic จำนวน 2 สายพันธุ์ (DASF04003 และ DASF04008) ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (16S rRNA) และเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่ามีผลการจำแนกเป็น *Azospirillum brasilense* มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ และค่า score value เท่ากับ 2.33 และ 2.39 (Table 3) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophilic จำนวน 3 สายพันธุ์ (DASF04141, AT1 และ AT10) พบว่ามีผลการจำแนกเป็น *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ และค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ตามลำดับ (Table 3) ซึ่งค่าความคล้ายคลึงกันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและ MALDI-TOF MS อยู่ในเกณฑ์ประเมินการยอมรับผลการทดสอบ

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ของเครื่อง MALDI-TOF MS

3.2.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

ทดสอบการจำแนกชนิด (species) ของแบคทีเรียกลุ่ม micro aerophilic จำนวน 2 ชนิด โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล พบว่า ตัวอย่างที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.32 %CV เท่ากับ 4.939 ตัวอย่างที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.23 มีค่า %CV เท่ากับ 4.770 (Table 4) ขณะที่การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม aerophilic จำนวน 3 ชนิด พบว่า พบว่า ตัวอย่างที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.57 และมีค่า %CV เท่ากับ 1.14 ตัวอย่างที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.56 และมีค่า %CV เท่ากับ 3.95 ขณะที่ตัวอย่างที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.45 และมีค่า %CV เท่ากับ 3.23 (Table 5) ซึ่ง CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ จึงยอมรับและผ่านเกณฑ์การประเมินผลการทดสอบ

3.2.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic 1 ชนิด (species) โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบจำนวน 20 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล จำนวน 20 ซ้ำ ดัง Table 6 โดยได้ค่าเฉลี่ย 2.28 และมี %CV เท่ากับ 5.07 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล เฉลี่ยเท่ากับ 2.31 และมี %CV เท่ากับ 5.58 และเมื่อเปรียบเทียบผลคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของ

เชื้อจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลที่วัดได้ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *P* = 0.481 (Table 6) ในทางเดียวกันผลการทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerophilic พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่า score value เฉลี่ย 2.55 และมี %CV เท่ากับ 2.02 และเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่า score value เฉลี่ย 2.51 มีค่า %CV เท่ากับ 3.66 และ *P* = 0.127 (Table 7) ซึ่งแสดงว่าค่า score value ของเจ้าหน้าที่ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic และ aerophilic วิธีอณูชีวโมเลกุล มีความคล้ายคลึงกัน (% similarity) กับเชื้อ *Azospirillum brasilense, Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

2. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์เครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.33-2.55 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ มีค่าความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมี CV ของจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic เท่ากับ 4.94 และ 4.77 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม aerophilic มี CV เท่ากับ 1.14 3.95 และ 3.23 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มี CV เท่ากับ 5.32 และ 2.53 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.481 และ 0.127 แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงเพื่อใช้จัดจำแนกสกุล-ชนิด ของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ โดยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็ว และแม่นยำ และนำสายพันธุ์จุลินทรีย์ไอโซเลท DASF04003, DASF04008 และ DASF04141 ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง เพื่อรับรองการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตาม พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025: 2017

## เอกสารอ้างอิง


ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 300 หน้า.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 12(3): 249–258.

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และธันยชัย สุระ. 2534. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. ว. โลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1(4): 469-477.

Choudhury, A., I.R. Kennedy. 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. Biology and Fertility of Soils 39: 219–227.

Christopher, K. and E. Bruno. 2003. Identification of Bacterial Species. Pages 103-130. *In: Tested Studies for Laboratory Teaching*. O'Donnell M.A. (ed.). Proceedings of the 24th Workshop /Conference of the Association for Biology Laboratory Education.

Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, P. Gracia-Fraile, R. Rivas, P. Mateos, E. Martinez-Molina, J.M. Gonzales-Ziegler, D.A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2011. *In Situ* Identification of Plant-invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. PloS ONE. 7(5): e37189.

Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, Waterloo, Ontario, Canada. 276 p.

Hrabák, J., R. Walková, V. Studentová, E. Chudácková and T. Bergerová. 2011. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 49(9): 3222-3227.

Hosseini, S. and S.O. Martinez-Chapa. 2017. Fundamentals of MALDI-TOF-MS Analysis. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 68 p.

Jia, R.Z., R.J. Zhang, Q. Wei, W.F. Chen, I.K. Cho, W.X. Chen and Q.X. Li. 2015. Identification and Classification of Rhizobia by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Genom. Proteom. Bioinf. 8(6): 98-107.

Singhal, N., M. Kumar, P.K. Kanaujia and J.S. Virdi. 2015. MALDI-TOF Mass Spectrometry: an Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. Front. Microbiol. 6: 1-16.

Sparkman, D.O. 2000. Mass Spectrometry Desk Reference. Global View Publishing, Pittsburgh, PA USA. 110 p.

Stets, M. I., A. S. Pinto, L. F. Huergo, E. M.de Souza, V. F.Guimarães, A. C.Alves, M. B. R. Steffens, R. A. Monteiro, F. O. Pedrosa and L. M. Cruz. 2013. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. Journal of Biotechnology 165 (3-4): 167–174.

Tshikhudo, P., R. Nnzeru, K. Ntushelo and F. Mudau. 2013. Bacterial Species Identification Getting Easier. Afr. J. Biotechnol. 12(41): 5975-5982.

Váradi, L., J.L. Luo, D.E. Hibbs, J.D. Perry, R.J. Anderson, S. Orenga and P.W. Groundwater. 2017. Methods for the Detection and Identification of Pathogenic Bacteria: Past, Present, and Future. Chem. Soc. Rev. 46(16): 4818–4832.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J. Bacteriol. 173: 697-703.

Wilson, K. and J. Walker. 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (7$^{th}$ Eds). Cambridge University Press. 744 p.

Ziegler, D., A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2012. *In Situ* Identification of Plant-invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. PloS ONE. 7 (5): e37189.

**Table 1** Identification of micro aerophilic and aerophilic bacteria by by partial 16S rDNA sequence

| Strain | Genus-species | % Similarity |
|---|---|---|
| DASF04003* | *Azospirillum brasilense* | 98 |
| DASF04005* | *Azospirillum brasilense* | 99 |
| DASF04008* | *Azospirillum brasilense* | 98 |
| PGPR16/63 | *Azospirillum brasilense* | 98 |
| AP1 | *Azospirillum brasilense* | 99 |
| DASF04141* | *Azotobacter vinelandii* | 99 |
| AT1 | *Azotobacter beijerinckii* | 99 |
| AT4 | *Azotobacter beijerinckii* | 98 |
| AT9 | *Azotobacter beijerinckii* | 99 |
| AT10 | *Azotobacter salinestris* | 99 |

***** DASF04003, DASF04005, DASF04008 and DASF04141 are used as PGPR biofertilizer inoculants

**Table 2** Identification of micro aerophilic and aerophilic bacteria by MALDI-TOF MS

| Strain | Genus-species | Score value* |
|---|---|---|
| DASF04003 | *Azospirillum brasilense* | 2.33 |
| DASF04008 | *Azospirillum brasilense* | 2.39 |
| DASF04141 | *Azotobacter vinelandii* | 2.55 |
| AT1 | *Azotobacter beijerinckii* | 2.45 |
| AT10 | *Azotobacter salinestris* | 2.45 |

***** score values ≥2.0 indicate identification at the species level; score values 1.7 to 2.0 indicate identification at the genus level; score values <1.7 indicate no organism identification possible

**Table 3** Identification of micro aerophilic and aerophilic bacteria by partial 16S rDNA sequence and MALDI-TOF MS

| Strain | partial 16S rDNA sequence | | MALDI-TOF MS | |
|---|---|---|---|---|
| | Genus-species | % Similarity | Genus-species | Score values* |
| DASF04003 | *Azospirillum brasilense* | 98 | *A. brasilense* | 2.33 |
| DASF04008 | *Azospirillum brasilense* | 98 | *A. brasilense* | 2.39 |
| DASF04141 | *Azotobacter vinelandii* | 99 | *A. vinelandii* | 2.55 |
| AT1 | *Azotobacter beijerinckii* | 99 | *A. beijerinckii* | 2.45 |
| AT10 | *Azotobacter salinestris* | 99 | *A. salinestris* | 2.45 |

***** score values ≥2.0 indicate identification at the species level; score values 1.7 to 2.0 indicate identification at the genus level; score values <1.7 indicate no organism identification possible

**Table 4** Precision of micro aerophilic bacteria included in the database for MALDI-TOF MS-based species identification

| No. | Sample A | Sample B |
|---|---|---|
| 1 | 2.18 | 2.31 |
| 2 | 2.08 | 2.27 |
| 3 | 2.31 | 2.28 |
| 4 | 2.35 | 2.38 |
| 5 | 2.34 | 2.28 |
| 6 | 2.39 | 2.2 |
| 7 | 2.43 | 2.44 |
| 8 | 2.32 | 2.06 |
| 9 | 2.47 | 2.38 |
| 10 | 2.33 | 2.38 |
| Species | *Azospirillum brasilense* | *Azospirillum brasilense* |
| $\bar{x}$ | 2.32 | 2.298 |
| %CV* | 4.939 | 4.770 |

***** %CV less than 10 indicates

**Table 5** Precision of aerophilic bacteria included in the database for MALDI-TOF MS-based species identification

| No. | Sample A | Sample B | Sample C |
|---|---|---|---|
| 1 | 2.57 | 2.45 | 2.31 |
| 2 | 2.53 | 2.45 | 2.46 |
| 3 | 2.55 | 2.47 | 2.44 |
| 4 | 2.59 | 2.52 | 2.50 |
| 5 | 2.52 | 2.69 | 2.48 |
| 6 | 2.58 | 2.68 | 2.44 |
| 7 | 2.60 | 2.46 | 2.31 |
| 8 | 2.58 | 2.68 | 2.48 |
| 9 | 2.54 | 2.61 | 2.55 |
| 10 | 2.60 | 2.56 | 2.50 |
| Species | *Azotobacter vinelandii* | *Azotobacter beijerinckii* | *Azotobacter salinestris* |
| $\bar{x}$ | 2.57 | 2.56 | 2.45 |
| %CV* | 1.14 | 3.95 | 3.23 |

***** %CV less than 10 indicates

**Table 6** Precision of micro aerophilic bacteria from MALDI-TOF MS by between-analyst variation test

| Replication | Score Values from MALDI-TOF MS | |
|---|---|---|
| | Analyst 1 | Analyst 2 |
| 1 | 2.38 | 2.40 |
| 2 | 2.27 | 2.39 |
| 3 | 2.18 | 2.37 |
| 4 | 2.3 | 2.4 |
| 5 | 2.16 | 2.26 |
| 6 | 2.0 | 2.45 |
| 7 | 2.19 | 2.28 |
| 8 | 2.34 | 2.36 |
| 9 | 2.27 | 1.88 |
| 10 | 2.33 | 2.38 |
| 11 | 2.34 | 2.22 |
| 12 | 2.38 | 2.32 |
| 13 | 2.26 | 2.34 |
| 14 | 2.42 | 2.35 |
| 15 | 2.34 | 2.40 |
| 16 | 2.35 | 2.28 |

| Replication | Score Values from MALDI-TOF MS | |
|---|---|---|
| | Analyst 1 | Analyst 2 |
| 17 | 2.27 | 2.37 |
| 18 | 2.38 | 2.16 |
| 19 | 2.36 | 2.16 |
| 20 | 2.02 | 2.38 |
| $\bar{x}$ | 2.28 | 2.31 |
| %CV | 5.07 | 5.58 |
| $\bar{x}$ | 2.30 | |
| %CV | 5.32 | |
| Sig. (2-tailed)* | 0.481 | |

***** According to Student's t-test of mean at 95% confidence level ($P$ = 0.05)

**Table 7** Precision of aerophilic bacteria from MALDI-TOF MS by between-analyst variation test

| Replication | Score values from MALDI-TOF MS | |
|---|---|---|
| | Analyst 1 | Analyst 1 |
| 1 | 2.57 | 2.5 |
| 2 | 2.53 | 2.48 |
| 3 | 2.55 | 2.57 |
| 4 | 2.59 | 2.58 |
| 5 | 2.52 | 2.44 |
| 6 | 2.58 | 2.5 |
| 7 | 2.6 | 2.62 |
| 8 | 2.58 | 2.51 |
| 9 | 2.54 | 2.36 |
| 10 | 2.6 | 2.63 |
| 11 | 2.53 | 2.6 |
| 12 | 2.55 | 2.26 |
| 13 | 2.46 | 2.49 |
| 14 | 2.39 | 2.54 |
| 15 | 2.51 | 2.58 |
| 16 | 2.59 | 2.57 |
| 17 | 2.61 | 2.56 |
| 18 | 2.58 | 2.55 |
| 19 | 2.58 | 2.4 |

| Replication | Score values from MALDI-TOF MS | |
|---|---|---|
| | Analyst 1 | Analyst 1 |
| 20 | 2.54 | 2.55 |
| $\bar{x}$ | 2.55 | 2.51 |
| %CV | 2.02 | 3.66 |
| $\bar{x}$ | 2.53 | |
| %CV | 3.01 | |
| Sig.(2-tailed)* | 0.127 | |

***** According to Student's t-test of mean at 95% confidence level (*P* = 0.05)