



รายงานวิจัย

ความหลากหลายทางอนุกรมวิธานและกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส
ของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมในระบบนิเวศป่าชายเลน
Taxonomic Diversity and Cellulolytic Activities of Microorganisms
from Mangrove-derived Metagenomes

สุตารัตน์ สนวนจิตร
อภिरตี ปิรันธนภาคย์

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2557
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
ภายใต้สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
ประจำปีงบประมาณ 2557

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของตะกอนดินในระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งอยู่ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ทำโดยนำตะกอนดินป่าชายเลนมาสกัดเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน rRNA ของแบคทีเรียทั่วไปและแอกติโนแบคทีเรีย ยีสต์ราและทรอสโทคิทริดส์ โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปโคลนเพื่อสร้างห้องสมุดยีน rRNA และคัดเลือกโคลนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank บน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) หรือ EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) ผลการศึกษาพบแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria มากที่สุด (50.3%) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (45.6%) และไฟลัม Proteobacteria (4%) แบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria พบยีสต์ *Streptomyces* มากที่สุด (66.7%) ในขณะที่แบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes พบยีสต์ *Bacillus* บ่อยที่สุด สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์รา พบสมาชิกในยีสต์ *Aspergillus* มากที่สุด (28.8%) รองลงมาคือ *Trichoderma* spp. (17.3%) และจุลินทรีย์กลุ่มทรอสโทคิทริดส์ พบสมาชิกในยีสต์ *Aurantiochytrium* มากที่สุด (48.1%) ในอีกทางหนึ่งได้มีการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนม โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าดีเอ็นเอที่โคลนได้จำนวน 2 โคลน มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความคล้ายคลึงกับข้อมูลของยีนนำรหัสเอนไซม์ Endo-1,4- β -glucanase และ β -glucosidase ของแบคทีเรียในยีสต์ *Bacillus* และ *Streptomyces* ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีสที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตะกอนดินในพื้นที่ป่าชายเลนที่ศึกษาได้จำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมาย 16S rRNA ได้เป็น *Pseudomonas balearica*, *Bacillus* sp., *Microbacterium paraoxydans* และ *Streptomyces levis* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นแหล่งรวมจุลินทรีย์ที่หลากหลาย โดยสิ่งที่น่าสนใจคือบทบาทของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนี้ โดยเฉพาะในด้านการผลิตสารชีวภาพที่มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งหากมีการศึกษาในรายละเอียดให้มากขึ้น อาจนำไปสู่การค้นพบจุลินทรีย์แทกซอนใหม่และสารชีวภาพที่มีคุณค่า รวมถึงความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์และสารชีวภาพจากป่าชายเลนในอนาคต

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ ป่าชายเลน จุลินทรีย์ เมตาจีโนมิกส์ เอนไซม์เซลลูเลส

ABSTRACT

This research was conducted to explore microbial diversity in mangrove ecosystem located in Chon Buri province. Mangrove sediment was collected and used as a source of metagenomic DNA. The rRNA gene library was constructed for a respective group of microorganisms, *i.e.* bacteria, actinobacteria, fungi and thraustochytrids. Recombinant clones were screened and sequenced. Similarity searching of nucleotide sequences was carried out in the database of GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>). Bacterial distribution was found in three phyla by which Actinobacteria was the most dominant (50.3 %) followed by Firmicutes (45.6 %) and Proteobacteria (4 %%). The representative genera of Actinobacteria and Firmicutes were *Streptomyces* and *Bacillus* respectively. In the fungal point of view, the genus *Aspergillus* was the most abundant and diversified. Thraustochytrid, another group of microbes frequently found in marine ecosystem, was also revealed in the study site. Members of *Aurantiochytrium* were the predominance. Two cellulase encoding genes amplified from metagenome were cloned and sequenced. The analyses of sequence identity revealed that they resemble those proposed for endo-1,4- β -glucanase and β -glucosidase gene of *Bacillus* and *Streptomyces*, respectively. Four strains of cellulase-producing bacteria and actinobacteria were successfully isolated from the same ecological niche and their 16S rRNA gene-based identities are *Pseudomonas balearica*, *Bacillus* sp., *Microbacterium paraoxydans*, and *Streptomyces levis*. Overall results taken from this investigation reflects the fact that mangrove ecosystem is a crucial reservoir of diverse microorganisms capable of producing biotechnological important enzymes including cellulases. In depth investigation would fulfill knowledge that could benefit not only the discovery of novel microbial taxonomic positions and valuable biological compounds but also their future applications.

Keywords: Biodiversity Mangrove Microorganisms Metagenomics Cellulases

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูปภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	
จุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน	5
ศักยภาพทางด้านการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ ในระบบนิเวศป่าชายเลน	8
เมตาจีโนมิกส์: เครื่องมือระดับโมเลกุลสำหรับค้นหา ยีนเข้ารหัสเอนไซม์เซลลูเลส	11
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินจากป่าชายเลน	16
การวิเคราะห์ยีนเข้ารหัสเอนไซม์เซลลูเลส	26
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลอง	29
อภิปรายผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	
การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต เอนไซม์เซลลูเลสจากตะกอนดินป่าชายเลน	41

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2-1	ตัวอย่างแทกซอนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	10
3-1	คู่มือที่ใช้ในเพิ่มปริมาณยีน rRNA จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน	13
4-1	การระบุแทกซอนของแบคทีเรียทั่วไป	17
4-2	การระบุแทกซอนของแอกทิโนมัยซีต	20
4-3	การระบุแทกซอนของราและยีสต์	21
4-4	การระบุแทกซอนของทรอสโทคริทริดส์	24
ผ-1	ดัชนีเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน	42
ผ-2	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	47
ผ-3	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon	48
ผ-4	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	49
ผ-5	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	51
ผ-6	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon โดยใช้โปรแกรม BLAST ร่วมกับ Robust pair-wise sequence alignment algorithm	52
ผ-7	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon ซึ่งนำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	53
ผ-8	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแอกทิโนมัยซีตไอโซเลท B4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
ผ-9	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท B4 กับ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon	57
ผ-10	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	58
ผ-11	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon	59
ผ-12	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีส สายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาวิเคราะห์ เพื่อสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ร่วมกับ B4 และ I2	60
ผ-13	ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียและแอกทีโนมัยซีส สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน	62

สารบัญญภาพ

ภาพ		หน้า
2-1	การย่อยสลายเซลล์โดยระบบเอนไซม์เซลลูเลส	9
4-1	ความถี่ของการพบจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนแบคทีเรีย ราและทรอสโทคริทริดส์ จากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มซึ่งเพิ่มปริมาณได้จากเมตาจีโนม ของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี	16
4-2	ความถี่ของการพบแบคทีเรียฟิแลมต่างๆ จากโคลนที่ปรากฏ ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งได้จาก เมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี	17
4-3	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-MAS03 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Maximum Likelihood บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Maximum Composite Likelihood (MCL) ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	18
4-4	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-MAS11 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Kimura 2-parameter ในการคำนวณ ระยะห่างทางวิวัฒนาการ	19
4-5	แอคทีโนมัยซีสจีสต่างๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏ ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ซึ่งได้จากเมตาจีโนม ของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี	20
4-6	ราสายและยีสต์ในจีสต่างๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏ ในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มรา ซึ่งได้จาก เมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี	21
4-7	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-NS07 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	23

สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
4-8	ทรอสโทคิทรินส์จีนัสต่างๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏ ในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มทรอสโทคิทรินส์ ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี 23
4-9	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทรอสโทคิทรินส์ ที่พบในพื้นที่ป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ 25
4-10	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนำรหัสเอนไซม์ Cellulase (endo-1,4)- β -glucanase) ของ Clone 1042 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining จากโปรแกรม Mega 6 โดยใช้ Tamura 3-parameter method ในการคำนวณ ระยะห่างทางพันธุกรรม 28
4-11	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนำรหัสเอนไซม์ β -glucosidase ของ Clone 0246 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining จากโปรแกรม Mega 6 โดยใช้ Tamura 3-parameter method ในการ คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม 28
ผ-1	การปรากฏของโซนไฮรอปโคโลนี ซึ่งบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตจากแบคทีเรียและแอกทีโนมัยซีสที่คัดแยกจากป่าชายเลน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar 41
ผ-2	ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 43
ผ-3	ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 44
ผ-4	ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแบคทีเรียไอโซเลท B4 45
ผ-5	ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแบคทีเรียไอโซเลท I2 46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
ผ-6	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 ซึ่งแยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6.0 โดยอาศัยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	50
ผ-7	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย ไอโซเลท AS1-321R.1 ที่แยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	54
ผ-8	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอกทิโนมัยซีส B4 และ I2 ที่แยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี UPGMA บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	61

บทที่ 1 บทนำ

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล ตั้งอยู่ในบริเวณน้ำขึ้นน้ำลง (Intertidal zone) ในภูมิภาคเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน จัดเป็นระบบนิเวศที่มีความอุดมสมบูรณ์เนื่องจากมีอัตราการผลิตสารอินทรีย์สูง รวมทั้งมีความโดดเด่นในด้านการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ รวมถึงการหมุนเวียนของสารอินทรีย์ระหว่างมหาสมุทรและสภาพแวดล้อมบนบก พื้นที่ป่าชายเลนมีพืชชายเลนที่ช่วยป้องกันการกัดเซาะชายฝั่งอันเป็นความเสียหายที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติ เช่น พายุ และคลื่น เป็นต้น บริเวณนี้จึงถือว่าเป็นที่อยู่อาศัยที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ตามชายฝั่ง ระบบนิเวศป่าชายเลนจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และนับเป็นระบบนิเวศทางทะเลที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ ในตะกอนดิน เนื่องจากเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุจากบนบก และปากแม่น้ำที่ถูกชะและไหลลงสู่ทะเล นอกจากนี้ยังมีซากสารอินทรีย์ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ ทั้บวมกันอยู่ในตะกอนดิน ซึ่งถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว (Sahoo & Dhal, 2009; Thatoi *et al.*, 2013)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลน มีทั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ต่างถิ่น ซึ่งพบได้เป็นครั้งคราว จุลินทรีย์ประจำถิ่นเป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ เพื่อรักษาสมดุลของระบบนิเวศป่าชายเลน สืบเนื่องจากความหลากหลายของสารอาหารที่สามารถพบได้ในป่าชายเลน จุลินทรีย์ที่พบในพื้นที่นี้จึงมีความหลากหลายทั้งในด้านชนิดและเมแทบอลิซึม การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนจึงมีความน่าสนใจ การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมประเภทนี้ อาศัยหลักการของวิธีดั้งเดิมซึ่งเป็นการคัดแยกเชื้อที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้บนอาหารคัดเลือก (Cultured-dependence) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าว อาจทำให้เกิดการสูญหายของข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกดังกล่าว ดังนั้นการนำวิธีการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics) เข้ามาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เป็นการช่วยทำให้นักวิทยาศาสตร์มีโอกาสเข้าถึงจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม

นอกจากศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์แล้ว การนำวิธีการทางเมตาจีโนมิกส์มาใช้ในการค้นหาเอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ธรรมชาติของจุลินทรีย์สิ่งแวดล้อมกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของพืชหรือเนื้อไม้ เช่น เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (lignolytic enzymes) เฮมิเซลลูเลส (เช่น xylanase) และเซลลูเลส เป็นต้น (Xing *et al.*, 2012) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ โดยเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืช โมเลกุลของเซลลูโลสประกอบกันขึ้นจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic linkage) เนื่องด้วยมีการนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ การผลิตสิ่งทอและกระดาษ เป็นต้น จึงทำให้ในอุตสาหกรรมมีความสนใจค้นหาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจำนวนมาก เช่น การผลิตอาหารสัตว์ เครื่องดื่ม เบเกอรี่และเยื่อกระดาษ เป็นต้น (Sukumaran *et al.*, 2005; Kuhad *et al.*,

2011) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสพบได้ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนมัยซีสและรา ซึ่งมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์และโคคลนยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ในเชื้อที่แยกและเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในสิ่งแวดล้อมมีจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงให้เจริญในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งเชื่อว่าจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งสำคัญของสารชีวภาพชนิดต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ รวมทั้งเอนไซม์เซลลูเลสที่มีคุณสมบัติใหม่ ๆ หรือคุณสมบัติพิเศษ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในป่าชายเลนที่อยู่ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่อยู่ท่ามกลางสิ่งแวดล้อมของสังคมเมืองและอุตสาหกรรมที่กำลังมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้มีโอกาสส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศแห่งนี้ได้ในไม่ช้า ข้อมูลในด้านความหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์ของพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณนี้ยังไม่ได้มีการศึกษากันมากนัก การเข้ามาศึกษาข้อมูลในส่วนนี้จะช่วยทำให้ทุกภาคส่วนมีความตระหนักถึงความสำคัญของทรัพยากรพื้นฐานของระบบนิเวศ กระบวนการที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดจากตะกอนดินป่าชายเลน หรือที่เรียกว่าเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ (Metagenomic DNA) หรือเมตาจีโนม (Metagenome) และนำมาเป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีนที่นำรหัสการสร้าง ribosomal RNA (rRNA genes) ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ โดยใช้ยีน 16S rRNA สำหรับจำแนกจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอต ได้แก่แบคทีเรียทั่วไปและแอคทีโนมัยซีส และใช้ยีน 18S rRNA สำหรับจำแนกจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอต ได้แก่ ยีสต์ราและทรอสโทคริทริดส์ นอกจากนี้ยังมีความสนใจศึกษาการปรากฏอยู่ของยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของตัวอย่างดินตะกอนจากป่าชายเลนดังกล่าว ซึ่งสามารถเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงศักยภาพของพื้นที่ป่าชายเลนที่ศึกษาในการใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต อีกทั้งการศึกษาคความหลากหลายของจุลินทรีย์ยังทำให้ได้ข้อมูลของความหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งสามารถจัดทำเป็นฐานข้อมูลสำหรับการศึกษาและการจัดการทรัพยากรเพื่อใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมที่ได้จากตะกอนดินในป่าชายเลน
- (2) เพื่อศึกษายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของตะกอนดินในป่าชายเลน

สมมติฐาน

- (1) เมตาจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างตะกอนดินในระบบนิเวศป่าชายเลน สามารถใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอแม่แบบที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้
- (2) จุลินทรีย์ที่พบในระบบนิเวศป่าชายเลนมีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานหรือแทกซอน (Taxon) ที่แสดงความหลากหลายสูง เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลของยีน rRNA

- (3) จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลนมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่พบได้มากในระบบนิเวศนี้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีโอกาสตรวจพบยีนที่เข้ารหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของระบบนิเวศนี้

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ป่าชายเลน 2 แห่ง คือบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ และป่าชายเลนตำบลบางทราย อำเภอมะนัง จังหวัดชลบุรี นำมาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดหรือเมตาจีโนม (Metagenomic DNA, Metagenome) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยนำเมตาจีโนมมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน rRNA (16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไปและแอกทิโนแบคทีเรีย และยีน 18S rRNA สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ราและทรอสโทคริทรดส์) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) จากนั้นสร้างห้องสมุดยีน rRNA สำหรับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม และนำโคลนที่ปรากฏในแต่ละห้องสมุดไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณยีนที่เข้ารหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนม วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนชนิดนี้ที่ปรากฏอยู่ในเมตาจีโนมของตะกอนดินจากระบบนิเวศป่าชายเลนที่ศึกษา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) ทราบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนที่ศึกษา
- (2) ทราบข้อมูลของยีนที่เข้ารหัสเอนไซม์เซลลูเลสในระบบนิเวศป่าชายเลนที่ศึกษา

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. จุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน
2. ศักยภาพทางการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน
3. เมตาจีโนมิกส์: เครื่องมือระดับโมเลกุลสำหรับค้นหาเอ็นอาร์หัสเอนไซม์เซลลูเลส

1. จุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน

1.1 ระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลน (Mangrove) เป็นระบบนิเวศที่พบทั่วไปในเขตร้อน (Tropical) และเขตกึ่งร้อน (Sub-tropical) อยู่บริเวณชายฝั่งซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างสภาพแวดล้อมบนบก (Terrestrial environment) และสภาพแวดล้อมทางทะเล (Marine environment) พื้นที่ป่าชายเลนอยู่ในบริเวณเขตน้ำขึ้นสูงสุดและน้ำลงต่ำสุด มีความแปรผันของคุณลักษณะด้านกายภาพและเคมีค่อนข้างสูง โดยได้รับอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ จากทั้งบนบกและทะเล

ป่าชายเลนในไทยพบแพร่กระจายอยู่ตามภาคต่าง ๆ ตั้งแต่ภาคกลางตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือไปจนถึงภาคใต้ทั้งสองฝั่ง รวม 22 จังหวัด โดยมีพื้นที่รวม 1,047,390 ไร่ ภาคกลางมีพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 3% ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมดของไทย ซึ่งพบในบริเวณพื้นที่แก่งอ่าวไทย เช่น สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ป่าชายเลนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบอยู่ในแถบชายฝั่งทะเล เช่น จันทบุรี ระยอง ตราดและชลบุรี คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 8% ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมด สำหรับพื้นที่ป่าชายเลนในภาคใต้ซึ่งมีมากถึง 89% ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมดของไทย พบกระจายอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน ตั้งแต่จังหวัดระนอง พังงา กระบี่ ภูเก็ต ชุมพร ตรัง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สตูล สงขลา ปัตตานี เป็นต้น (วีระ เทพภรณ์, 2552)

จากการสำรวจของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง รายงานว่าจังหวัดชลบุรีมีพื้นที่ป่าชายเลนรวมทั้งหมดประมาณ 41,313 ไร่ พื้นที่ส่วนใหญ่ (34,746 ไร่) อยู่ในเขตอำเภอเมืองชลบุรี ในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ป่าชายเลนในจังหวัดชลบุรีเป็นอย่างมาก โดยเกิดจากการใช้ประโยชน์ที่ดินในพื้นที่ป่าชายเลนเพื่อกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การเกษตร นาเกลือ และทำเทียบเรือ เป็นต้น โดยมีพื้นที่ที่ยังคงเป็นป่าชายเลนตามธรรมชาติอยู่ประมาณ 5,554 ไร่ โดยอยู่ในพื้นที่เขตอำเภอเมืองชลบุรีประมาณ 4,872 ไร่ อย่างไรก็ตาม จังหวัดชลบุรีมีอัตราการลดลงของพื้นที่ป่าชายเลนโดยเฉลี่ยต่อปีมากที่สุดถึง 5.42% เนื่องจากการขยายตัวทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะการพัฒนาพื้นที่ชายฝั่งทะเลและการพัฒนาแหล่งท่องเที่ยว ไร่ (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2555) อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ป่าชายเลนดังกล่าว ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญในการใช้เป็นฐานข้อมูลและแนวทางในการวางแผนการจัดการทรัพยากรป่าชายเลนต่อไป

ป่าชายเลนมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพและเคมีค่อนข้างแปรผัน เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากทั้งบนบกและทะเล มีรายงานว่า pH และของน้ำทะเลในบริเวณป่าชายเลนอยู่ในช่วง 7.0-8.5 (กรมควบคุมมลพิษ, 2552) ในขณะที่ความเค็มของน้ำทะเลในบริเวณป่าชายเลนมีค่าประมาณ 10-30 ppt (ชมรมนักชีววิทยา อพ.สธ, ม.ป.ป.) ในบางครั้งพบว่า pH ของดินในพื้นที่ป่าชายเลนมีความแปรผันสูง โดยอาจพบ pH อยู่ในช่วงที่เป็นกรด 2.87-6.40 หรือมี pH ที่สูงขึ้นกว่านี้ก็ได้ (ประมาณ 7.0-8.2) (Hossain & Nuruddin, 2016) อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพบว่า ดินป่าชายเลนในจังหวัดชลบุรีมีคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและเคมีที่ค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดความลึกของชั้นดิน (5-40 เซนติเมตร) โดยอุณหภูมิของดินอยู่ในช่วง 27.0-29.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 27.5 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.60-7.50 แต่ส่วนมากอยู่ระหว่าง 7.00-7.39 จึงจัดอยู่ในกลุ่มดินที่เป็นกลาง (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2555)

1.2 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลนถือเป็นระบบนิเวศที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยเป็นแหล่งอาศัยสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งหลบภัยและแหล่งวางไข่ของสัตว์น้ำ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนี้ค่อนข้างมีความซับซ้อน จุลินทรีย์เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตพื้นฐานของระบบนิเวศ มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของระบบนิเวศแห่งนี้ โดยทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ผลิตและผู้ย่อยสลาย ทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ จุลินทรีย์ที่พบในระบบนิเวศนี้มีหลากหลายทั้งแบคทีเรีย อาร์เคีย แอคทิโนมัยซีส รา สาหร่าย เป็นต้น (Thatoi *et al.*, 2013) โดยมีผู้ให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนในพื้นที่ต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษามีทั้งวิธีที่อาศัยการเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อเพื่อนำมาจำแนกและการใช้วิธีทางด้านเมตาจีโนมิกส์

จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในป่าชายเลนโดยอาศัยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อพบจุลินทรีย์หลากหลายกลุ่ม ทั้งแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนมัยซีสและรา กลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบนิเวศป่าชายเลนทำหน้าที่ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในป่าชายเลนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นหลักในการเจริญ (Bano *et al.*, 1997) ซึ่งแบคทีเรียที่พบในระบบนิเวศป่าชายเลนมีอยู่หลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ แบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟ (Heterotrophic bacteria) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfate-reducing bacteria) เช่น *Desulfovibrio sp.*, *Desulfotomaculum sp.* และ *Desulfococcus sp.* เป็นต้น แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixing bacteria) เช่น *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.* และ *Clostridium sp.* เป็นต้น แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate-solubilizing bacteria) เช่น *Bacillus sp.*, *Xanthobacter sp.* และ *Pseudomonas sp.* เป็นต้น และแบคทีเรียสร้างมีเทน (Methanogenic bacteria) เช่น *Methanococcus sp.* และ *Methylobacter sp.* เป็นต้น (Thatoi *et al.*, 2013)

แอคทิโนมัยซีสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่เป็นแหล่งของสารชีวภาพชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) โดยเฉพาะจันัส *Streptomyces* ซึ่งมีความสำคัญในการผลิตสารชีวภาพจำนวนมาก เช่น ยาปฏิชีวนะ โดยพบว่ามากกว่า 50% ของยาปฏิชีวนะที่ค้นพบ

จากอดีตจนถึงปัจจุบันได้มาจาก *Streptomyces* (Othman *et al.*, 2015) ป่าชายเลนเป็นแหล่งอาศัยของแอกติโนมัยซีสที่หลากหลาย จากรายงานการศึกษาของ Sivakumar (2001) ซึ่งคัดแยกแอกติโนมัยซีสจากป่าชายเลน Pichavaram รัฐ Tamil Nadu ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย พบแอกติโนมัยซีสจำนวน 23 สปีชีส์ ซึ่งเมื่อนำมาจัดจำแนกพบว่าแอกติโนมัยซีสที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในจีนัส *Streptomyces* นอกจากนี้ Hong *et al.* (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยซีสจากดินและพืชในป่าชายเลนประเทศจีน พบแอกติโนมัยซีสหลายจีนัส ได้แก่ *Actinomadura*, *Microbispora*, *Verrucosipora*, *Arthrobater*, *Isoptericola*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces* นอกจากนี้ในการศึกษาของ ชุมพล รักศิลป์ (2557) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตะกอนดินในพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณศูนย์ศึกษาระบบนิเวศและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศและป่าชายเลนตำบลบางทราย อำเภอมะนัง จังหวัดชลบุรี พบแอกติโนมัยซีสหลายสายพันธุ์แสดงกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าว

เนื่องจากป่าชายเลนเป็นบริเวณรอยต่อระหว่างบกและทะเล ดังนั้นจึงสามารถพบได้ทั้งรากบก และรากทะเลอยู่ด้วยกัน โดยรากบกและไลเคนจะอาศัยอยู่บริเวณลำต้นและรากอากาศของพืช ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมไม่ถึง ส่วนรากทะเลจะอาศัยอยู่ตามรากพืชที่น้ำทะเลท่วมถึง (Sarma & Hyde, 2001) ในป่าชายเลนมีราที่ได้รับการจัดจำแนกมากกว่า 100 สปีชีส์ ซึ่งราเหล่านี้สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ ที่จำเป็นในการย่อยสลายลิกนิน เซลลูโลส และส่วนประกอบอื่น ๆ ของพืช (Fell *et al.*, 1984; Findlay *et al.*, 1986; Singh & Steinke, 1992; Bremer, 1995) มีรายงานการพบรา 120 สปีชีส์ จากป่าชายเลน 29 แห่งทั่วโลก (Hyde, 1990) การศึกษาของ Liu *et al.* (2007) พบราเอนโดไฟต์มากกว่า 200 สปีชีส์ ซึ่งแยกได้จากป่าชายเลนโดยพบว่ามีสมาชิกส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* และ *Tricoderma*

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนโดยอาศัยวิธีทางด้านเมตาจีโนมิกส์ อาทิเช่น Ghosh *et al.* (2010) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินตะกอนจากป่าชายเลน Sundarban ประเทศอินเดีย โดยสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA จากนั้นนำโคลนที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแล้วพบว่ามี ความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างดินตะกอนจากป่าชายเลนที่นำมาศึกษาเป็นอย่างมาก โดยตรวจพบแบคทีเรียในไฟลัมต่าง ๆ อย่างน้อย 8 ไฟลัม คือ Proteobacteria (คลาส Alpha-, Beta-, Gamma- และ Delta-Proteobacteria), Flexibacteria (CFB group), Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes และ Gammatimonadates นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Yan *et al.* (2006) ที่ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มอาร์เคีย (Archaea) ในตัวอย่างดินซึ่งเก็บจากป่าชายเลนใน Dongzhaigang National Nature Reserve, Hainan Island, ประเทศจีน (เดือนตุลาคม ค.ศ. 2004) โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดังกล่าว และนำมาสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA จากนั้นวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบ อาร์เคียส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัม Crenarchaeota (80.4%) ส่วนที่เหลือ (19.6%) เป็นสมาชิกในไฟลัม

Euryarchaeota โดยพบว่าอาร์เคียเหล่านี้อาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา หรือในงานวิจัยของ Thompson *et al.* (2013) ที่สำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียในดินป่าชายเลน 2 แห่งในประเทศบราซิล โดยจากการวิเคราะห์เมตาจีโนม พบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria มากที่สุด (57.8% และ 44.6%) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (11% และ 12.3%) และไฟลัม Actinobacteria (8.4% และ 7.5%) ตามลำดับ นอกจากนี้ Vincent *et al.* (2015) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตะกอนดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลเมือง Kochi ประเทศอินเดีย โดยใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ สร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA ขึ้นมา เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนต่าง ๆ ที่อยู่ในห้องสมุดยีน 16S rRNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Basak *et al.* (2016) ที่ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตะกอนดินของป่าชายเลน Dhulibhashani ซึ่งตั้งอยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย โดยพื้นที่ดังกล่าวตั้งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติ Sundarbans วิธีศึกษาที่คณะผู้วิจัยใช้คือการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA จากเมตาจีโนม และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ MG-RAST software พบแบคทีเรียจำนวน 56,547 สปีชีส์ ซึ่งจัดอยู่ใน 44 ไฟลัม โดยไฟลัมที่พบมากที่สุดคือ Proteobacteria นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Nitrospirae, Cyanobacteria, Planctomycetes และ Fusobacteria group เป็นจำนวนมากเช่นกัน สิ่งที่น่าสนใจจากการศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำเทคนิค Pyrosequencing มาใช้ในการอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ผสมที่อยู่ในเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ทำให้สามารถเข้าถึงแทกซอนที่มีอยู่ในตัวอย่างได้อย่างครอบคลุม โดยเทคนิคดังกล่าวจัดเป็นเทคโนโลยีที่เรียกว่า Next generation sequencing (NGS) ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในปัจจุบัน (De Mandal *et al.*, 2015)

1.3 บทบาทของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน

นอกจากสามารถพบแทกซอนของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนได้อย่างหลากหลายแล้ว ยังพบว่าจุลินทรีย์ในป่าชายเลนมีกิจกรรมเมแทบอลิซึมที่หลากหลาย จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในห่วงโซ่อาหารภายในป่าชายเลน โดยมีหน้าที่ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนสารอาหารและการถ่ายทอดพลังงาน (Holmer & Storkholm, 2001) แหล่งพลังงานที่สำคัญในระบบนิเวศป่าชายเลนคือ ใบไม้ที่ร่วงหล่นทับถมกันซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส ดังนั้นบทบาทที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ในป่าชายเลนคือการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งมีจุลินทรีย์จำนวนมากในป่าชายเลนที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยสร้างเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ในป่าชายเลนมีกิจกรรมเอนไซม์อื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น มีกิจกรรมเอนไซม์อะกาเรส (Saravanan *et al.*, 2015) อะไมเลส (Amylases) นิวคลีเอส (Nucleases) ฟอสฟาเทส (Phosphatases) โปรตีเอส (Proteases) (Ventosa & Nieto, 1995) จากบทบาทดังกล่าวข้างต้น การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในป่าชายเลนจึงมีความน่าสนใจทั้งในด้านการสร้างฐานข้อมูลเพื่อการอนุรักษ์และจัดการการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน

2. ศักยภาพทางการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน

เนื่องจากระบบนิเวศป่าชายเลนมีความหลากหลายในด้านชนิดของสารอินทรีย์ที่สะสมอยู่ จึงเป็นที่คาดการณ์ได้ว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศดังกล่าวน่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านั้น จุลินทรีย์หลายชนิดในป่าชายเลนมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยย่อยสลายเซลลูโลสจากพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ ปัจจุบันเอนไซม์ชนิดนี้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

2.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulases)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชและเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวนมากเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic โดยเอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ β -1,4-glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ส่วนได้แก่ ส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส (Catalytic domain) และส่วนที่ทำหน้าที่จับกับเซลลูโลส (Cellulose-binding domain) โดยทั้ง 2 ส่วนของเอนไซม์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ การเร่งปฏิกิริยาทำให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายและละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งทำให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสง่ายขึ้น (Sukumaran *et al.*, 2005)

2.1.1 ประเภทของเอนไซม์เซลลูเลส

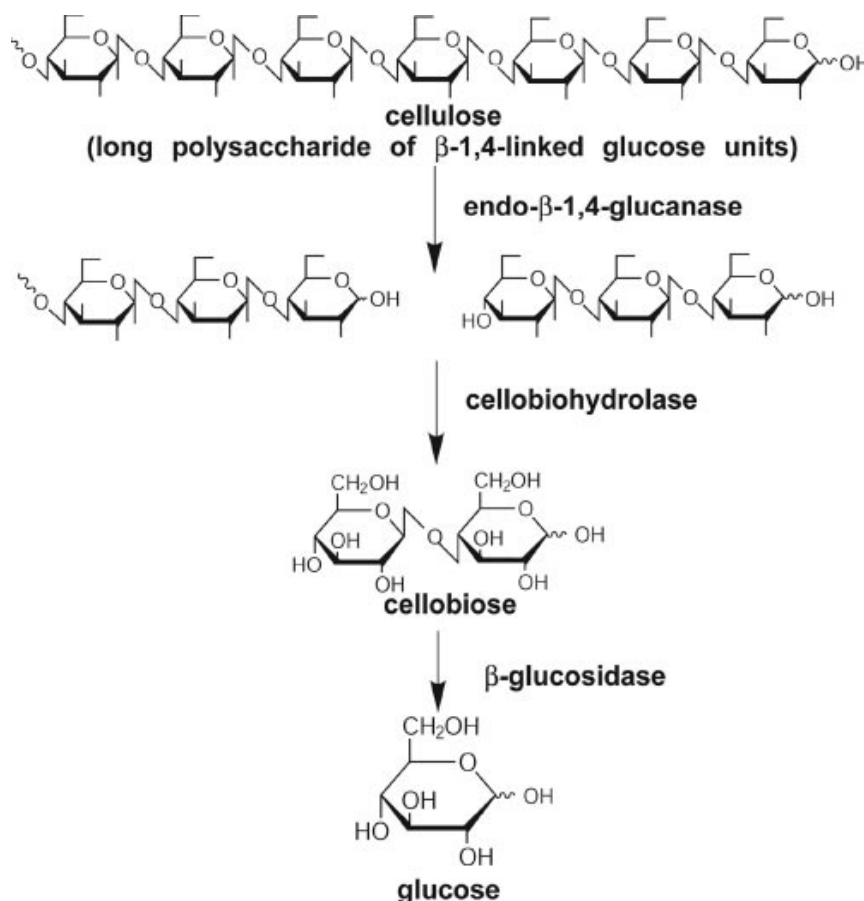
กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม หลัก ๆ ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ได้แก่

(1) Endo-glucanase (Endo- β -1,4-glucanase, Endo- β -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (Phosphoric swollen cellulose) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxyl methylcellulose) เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -1,4-glycosidic แบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) (Wood, 1989) นอกจากนี้ยังทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส (Cellobiose) และกลูโคสอีกด้วย (Sharada, Venkateswarlu, Venkateswar, & AnandRao, 2014)

(2) Exo-glucanase (Exo- β -1,4-D-glucan-4-cellobiohydrolase, E.C.3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยแยกหน่วยย่อยเซลโลไบโอส (Cellobiose) ออกจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing end) ของสายเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้เอนไซม์กลุ่มนี้ยังสามารถย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่จัดเรียงตัวเป็นระเบียบ (Microcrystalline cellulose) เช่น Avicel (Sharada *et al.*, 2014; Sadhu & Maiti, 2013)

(3) β -1,4-Glucosidase หรือ Cellobiase (E.C.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลาย เซลโลไบโอส (Cellobiose) และเซลโลแตกซ์ทรีน (Cellodextrin) ที่ละลายน้ำได้ไปเป็นน้ำตาล กลูโคส (Shewale, 1982; Ryu & Mandels, 1980)

การย่อยสลายเซลลูโลสที่สมบูรณ์จะเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสแสดงดังภาพที่ 2-1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งได้ด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกล่าวคือ ถ้ามีปริมาณของกลูโคสที่ผลิตได้มากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -Glucosidase ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของ เซลโลไบโอส เมื่อเซลโลไบโอสมีปริมาณมากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นได้ช้าลง และปฏิกิริยาจะหยุดลง ในที่สุด (Xie *et al.*, 2007; Sharada *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2-1 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยระบบเอนไซม์เซลลูเลส
(ที่มา : Xie *et al.*, 2007)

2.1.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลน

มีรายงานว่าจุลินทรีย์จำนวนมากที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลนมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ จุลินทรีย์ในป่าชายเลนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีทั้งกลุ่มแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีตและรา (Immanuel *et al.*, 2006; Thatoi *et al.*, 2013) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบนิเวศป่าชายเลน แสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ตัวอย่างแบคทีเรียจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

แบคทีเรีย	รา	แอคติโนมัยซีต
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Streptomyces gancidicus</i>
<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Clostridium stercorarium</i>	<i>cladosporoides</i>	<i>malachitofuscus</i>
<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Streptomyces stramineus</i>
<i>Acidothermus</i>	<i>sphaerospermum</i>	<i>Streptomyces glomeratus</i>
<i>cellulolyticus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
<i>Saccharophagus</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	
<i>degradans</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>	
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Verticillium cyclosporum</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chaetomium hamadae</i>	
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Cladosponium herbarum</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	
<i>Planococcus citreus</i>	<i>Cirrenalia basiminuta</i>	
<i>Pseudomonas balearica</i>	<i>Halophytophthora</i>	
	<i>vesicular</i>	

(ที่มา: สิริธิดา ประสิทธิ์สุข, 2559; Taylor *et al.*, 2006; Hastuti, Sangur, & Khasanah, 2015; Raghukumar, Sharma, Raghukumar, Sathe-Pathak, & Chandramohan, 1994; El-Morsy, 2000; Jeffrey & Azrizal, 2007)

3. เมตาจีโนมิกส์: เครื่องมือระดับโมเลกุลสำหรับค้นหาเอ็นไซม์เซลลูเลสในระบบนิเวศป่าชายเลน

การนำกระบวนการด้านเมตาจีโนมิกส์มาใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ส่วนหนึ่งที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบถึงกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนของสารต่าง ๆ ในระบบนิเวศ (Myrold *et al.*, 2013) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากที่สุดในสิ่งแวดล้อมรวมถึงป่าชายเลน ถือว่าเป็นแหล่งของสารอินทรีย์แหล่งใหญ่ที่ต้องการการย่อยสลายเพื่อทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารประกอบคาร์บอนสำหรับนำไปใช้โดยสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม การย่อยสลายเซลลูโลสเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่าง ๆ โดยเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ามีหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมี 3 กลุ่มด้วยกันคือ endoglucanases, exoglucanase และ β -glucosidase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามกลุ่มนี้ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์โมโนแซคคาไรด์คือน้ำตาลกลูโคส (Lynd *et al.*, 2002) เมื่อพิจารณาตามโครงสร้างของระบบเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ cellulosome (multi-enzyme complex) ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบบางชนิด และ non-cellulosome ซึ่งเป็นระบบที่พบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์กลุ่มแอโรบ โดยเอนไซม์ในระบบนี้เข้าจับกับโมเลกุลของเซลลูโลสโดยตรง (Lynd *et al.*, 2002) มีรายงานจำนวนมากที่กล่าวถึงการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสจากห้องสมุดเมตาจีโนมประเภทต่าง ๆ (Healy *et al.*, 1995; Ree *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2013) เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทั้งในเชิงของการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและในเชิงอุตสาหกรรมและการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ การค้นหาเอนไซม์เซลลูเลสชนิดใหม่ ๆ ยังมีความสำคัญและจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

ตัวอย่างงานวิจัยที่รายงานการใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ในการค้นหาเอ็นไซม์เซลลูเลส เช่น งานวิจัยของ Thompson *et al.* (2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่เพียงรายงานถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลนในประเทศบราซิลเท่านั้น แต่คณะผู้วิจัยยังรายงานถึงการค้นหาและพบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมที่ศึกษาอีกด้วย นอกจากนี้ Gonçalves *et al.* (2015) รายงานการตรวจพบเอ็นไซม์เซลลูเลสจากโคลนที่ปรากฏอยู่ในห้องสมุดเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลนที่เก็บมาจากบริเวณ Camamu Bay ประเทศบราซิล

การศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการแยกเอ็นไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินที่เก็บจากระบบนิเวศป่าชายเลนของประเทศไทย ได้มีการนำเสนอไว้ในรายงานวิจัยของ Wiwat & Sillapee (2011) ซึ่งใช้วิธีทางด้านเมตาจีโนมิกส์ศึกษาเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลส ในตัวอย่างดินซึ่งเก็บจากป่าชายเลนในจังหวัดสตูล จากการสุ่มโคลนจำนวน 100 โคลนจากห้องสมุดเมตาจีโนม มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อาหารที่มี Carboxymethylcellulose (CMC) เป็นสับสเตรท พบโคลนจำนวน 20 โคลน แสดงกิจกรรมการย่อยสลาย CMC ได้ โดยปรากฏวงใสรอบโคโลนีภายหลังการย้อมด้วย Congo red เมื่อนำโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ดีที่สุด จำนวน 2 โคลน คือ celP8 และ celP24 มาตรวจสอบ

ขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนเวกเตอร์ พบว่า celP8 และ celP24 มีขนาด 421 และ 127 คู่เบส ตามลำดับ โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ไม่พบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับข้อมูลของยีนเซลล์ูเลสที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แต่อย่างไรก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนเซลล์ูเลสดังกล่าวน่าจะเป็นยีนชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่พบรายงานวิจัยที่นำวิธีทางด้านเมตาจีโนมิกส์มาใช้ในการสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนนำรหัสเอนไซม์เซลล์ูเลสในพื้นที่ป่าชายเลนในจังหวัดชลบุรี

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. ตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลน

เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากพื้นที่ป่าชายเลน (เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2556) เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C ระหว่างการขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างทั้งหมดมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากตัวอย่างตะกอนดิน ทำโดยนำดิน 5 กรัม มาบดให้ละเอียดในสถานะที่ใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Soil sample DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)

3. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์

3.1 การเพิ่มปริมาณยีน rRNA

การเพิ่มปริมาณยีน rRNA จากเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนมัยซีส ยีสต์ราและทรอสโทคริทริดส์ ใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน rRNA จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน

ยีนเป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'... 3')	Amplicon size (~bp)	อ้างอิง
ยีน 16S rRNA (แบคทีเรีย)	MAS2F MAS1R	TCCTGGCTCAGATTGAACGCT CTTGTTACGACTTCACCCAG	1,500	สุดารัตน์ สวนจิตร (2558)
ยีน 16S rRNA (แอคทีโนมัยซีส)	ACT-F ACT-R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG AGAAAGGAGGTGTACCAGC	1,500	การศึกษานี้
ยีน 18S rRNA (ยีสต์และรา)	NS1 NS8	GTAGTCATATGCTTGTCTC TCCGCAGTTTCACCTACG GA	1,800	White <i>et al.</i> (1990)
ยีน 18S rRNA (ทรอสโทคริทริดส์)	18S001 18S13	AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA CCTTGTTACGACTTCACCTCCTCT	1,800	Honda <i>et al.</i> (1999)

นำเมตาจีโนมิกส์ที่เตรียมได้ (ข้อ 2) มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร องค์ประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้ 1X PCR buffer, MgCl₂ 1.5 mM, Deoxynucleoside triphosphate ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) ชนิดละ 0.2 mM, ไพร์เมอร์ (แต่ละสาย) 0.5 µM, Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) 2.5 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบ (10 ng/µl) ปริมาตร 5 µl เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย (16S rRNA หรือ 18S rRNA) ในเครื่อง DNA thermal cycler (Biometra® TGradient) โดยดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 °C 3 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ที่ 94 °C 45 วินาที Annealing ที่ 55 °C 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.2% agarose gel; 1X TAE buffer) เก็บสารละลายจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป โดยดำเนินการตามวิธีที่ระบุในชุด Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA)

3.2 การสร้างห้องสมุดยีน rRNA และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน rRNA ที่ได้จากการใช้เมตาจีโนมเป็นแม่แบบและผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega) นำดีเอ็นเอที่ได้เคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อแล้วเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ *E. coli* JM109 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี blue-white screening บนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar ที่ผสม IPTG และ X-gal เก็บโคลนสีขาวทุกโคลน (ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์โคลน) พร้อมทั้งนำไปเก็บรักษาในอาหาร LB broth ที่ผสมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30%

นำรีคอมบิแนนท์โคลนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิด (รีคอมบิแนนท์พลาสมิด; pGEM[®]-T Easy + insert) โดยใช้ชุดสกัด PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega) ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนพลาสมิด โดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ (เอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการตัดเพื่อปล่อยชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนพลาสมิดออกมาเป็นอิสระ ได้แก่ *Bst*ZI, *Eco*RI และ *Not*I ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ *Eco*RI)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการตรวจยืนยันขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนโมเลกุลส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับข้อมูลใน GenBank บน NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST และฐานข้อมูล EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในห้องสมุดยีน rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์เปรียบเทียบในลักษณะเป็นคู่ (Pairwise analysis PSA) โดยในการศึกษานี้ใช้ค่า similarity cutoff สำหรับแทกซอนระดับจีโนสและสปีชีส์ที่ 97% และ 99% ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของจุลินทรีย์

คัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rRNA ของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลนรวมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงในระดับต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่กำลังศึกษาจากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) และ EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) โดยจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้อยู่ในรูปแบบ Fasta (Fasta format) พร้อมกับบันทึกไฟล์ด้วยโปรแกรม Notepad จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คัดเลือกมาทำการจัดเรียงแบบ Multiple sequence alignment (MSA) โดยใช้โปรแกรม ClustalW ผ่านทางโปรแกรม BioEdit นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการทำ MSA แล้วมาคัดเลือกบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นข้อมูล (Informative site) ด้วยโปรแกรม Gblock และนำไฟล์ข้อมูลจาก Gblocks มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิไฟโลแกรม (Phylogram) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 เลือกทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrapping (1,000 ซ้ำ)

3.4 การระบุแทกซอน

ระบุแทกซอนของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมที่ศึกษา โดยใช้ระดับความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rRNA 97% ในการระบุแทกซอนระดับจีนัส และ 99% สำหรับระบุ แทกซอนระดับสปีชีส์ ร่วมกับข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

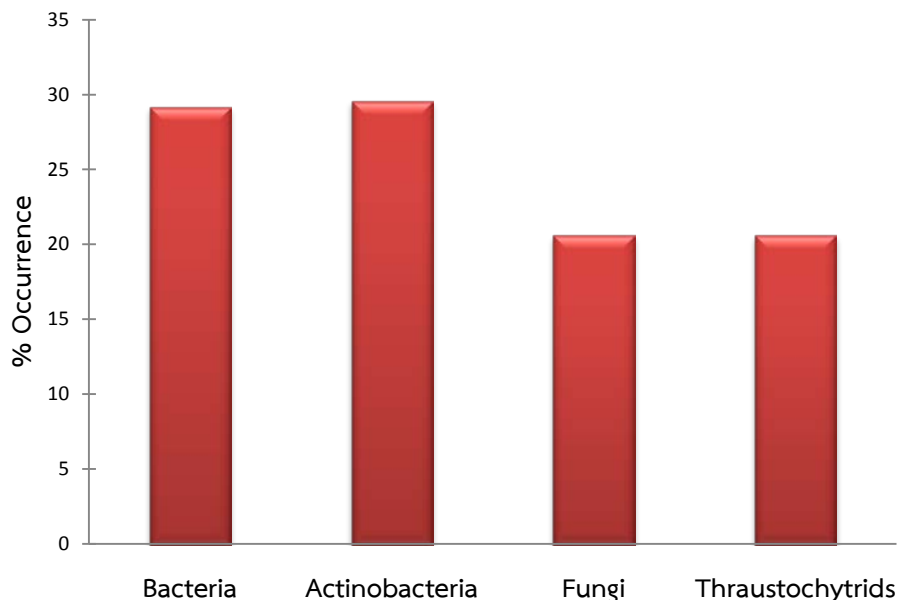
4. การเพิ่มปริมาณยีนเซลล์บางส่วนจากเมตาจีโนม

นำตัวอย่างเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลล์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่มือที่ออกแบบขึ้นในห้องปฏิบัติการ จากนั้นเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ซึ่งเป็นบางส่วนของยีนเซลล์) เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega, USA) คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนและนำไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยใช้โปรแกรม BLAST พร้อมทั้งใช้โปรแกรม MEGA 6 วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนำรหัสเอนไซม์เซลล์ที่ได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินจากป่าชายเลน

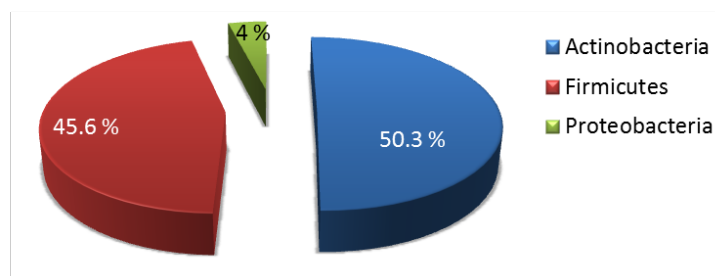
จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมของตะกอนดินที่เก็บจากพื้นที่ป่าชายเลนของอำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี โดยสร้างห้องสมุดยีน rRNA จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้จำนวนโคลนรวมทั้งหมด 253 โคลน โดยแบ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย 74 โคลน (29.2%) แอคทีโนแบคทีเรีย 75 โคลน (29.6%) รา 52 โคลน (20.6%) และทรอสโทคริทริดส์ 52 โคลน (20.6%) ดังแสดงในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ความถี่ของการพบจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนแบคทีเรีย รา และทรอสโทคริทริดส์ จากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มซึ่งเพิ่มปริมาณได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

1.1 แบคทีเรียทั่วไปและแอคทีโนแบคทีเรีย

เมื่อนำโคลนที่ปรากฏอยู่ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของกลุ่มแบคทีเรียทั่วไปและแอคทีโนแบคทีเรียไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแทกซอนของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในไฟลัม Actinobacteria (50.3%) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (45.6%) และไฟลัม Proteobacteria ดังแสดงในภาพที่ 4-2



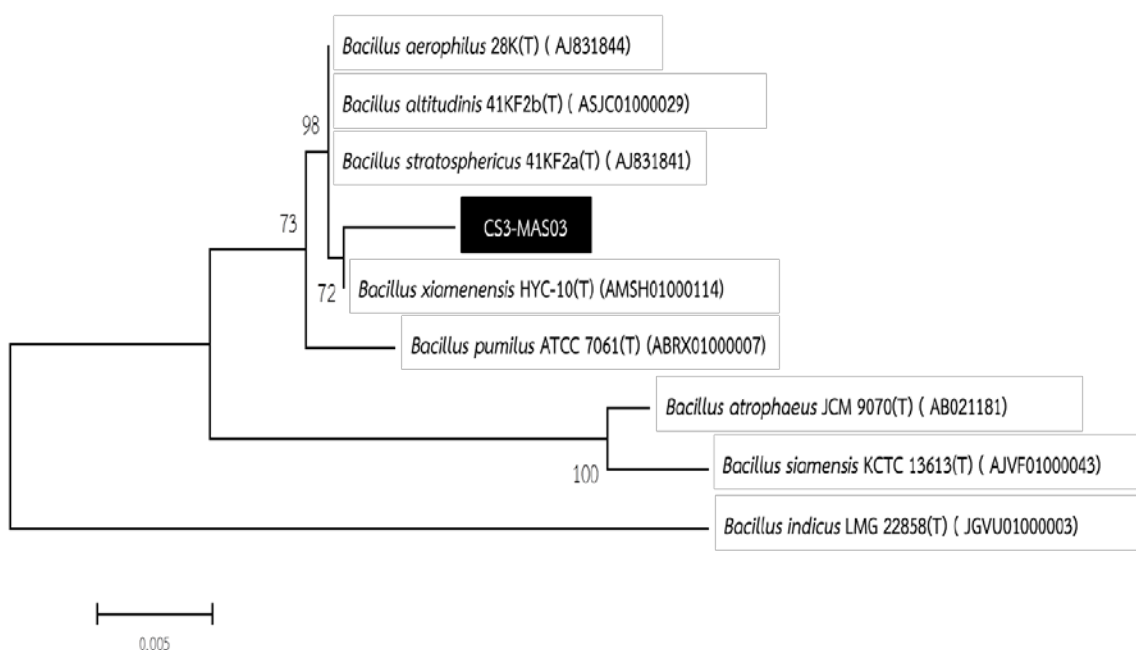
ภาพที่ 4-2 ความถี่ของการพบแบคทีเรียไฟลัมต่าง ๆ จากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

เมื่อพิจารณาแทกซอนในกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป พบว่าสมาชิกของไฟลัม Firmicutes ค่อนข้างโดดเด่น ซึ่งสมาชิกที่พบส่วนส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* ส่วนอีกไฟลัมหนึ่งที่พบคือ Proteobacteria โดยพบแบคทีเรียในคลาส Gamma-Proteobacteria (6.8%) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในจีนัส *Vibrio* รวมทั้งพบแบคทีเรียในคลาส Alpha-Proteobacteria (1.4%) ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 การระบุแทกซอนของแบคทีเรียทั่วไป (n=74)

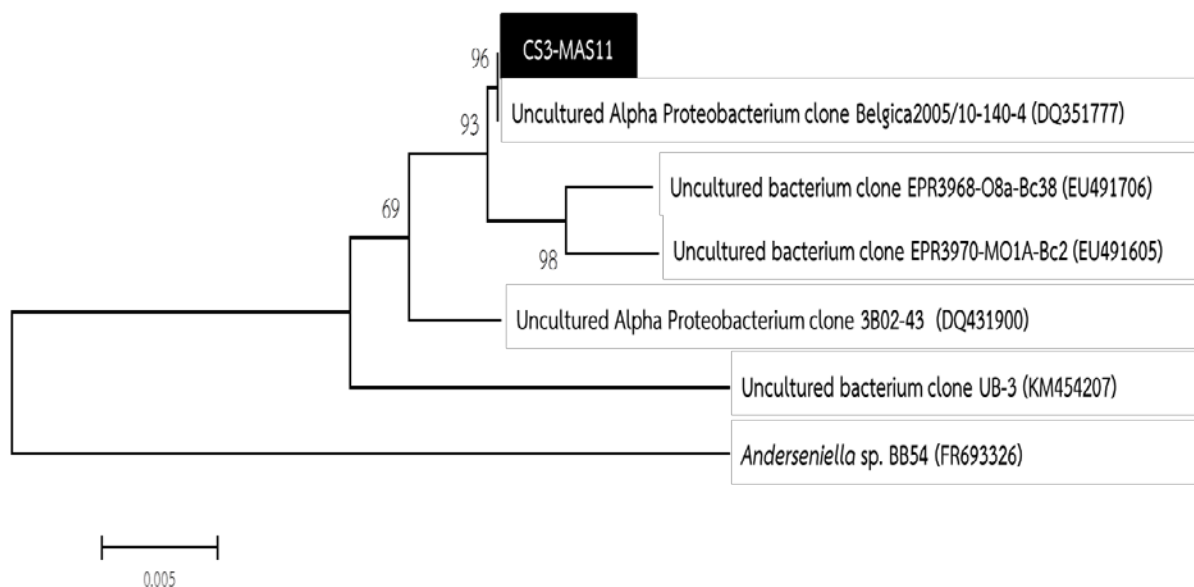
ไฟลัม/แทกซอน	จำนวน (โคลน)	ความถี่การพบ (%)
Firmicutes		
<i>Bacillus</i> sp. (CS3-MAS03)	14	18.9
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11	14.9
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	9.5
<i>Bacillus pumilus</i>	10	13.5
<i>Bacillus straosphericus</i>	7	9.5
<i>Bacillus subtilis</i>	4	5.4
<i>Bacillus polymyxa</i>	6	8.1
<i>Bacillus aerophilus</i>	4	5.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	4.1
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	2.7
Proteobacteria		
Gamma-Proteobacteria		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	4.1
<i>Vibrio</i> sp.	2	2.7
Alpha-Proteobacteria		
(CS3-MAS11)	1	1.4

แบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes จีโนสที่พบบ่อยคือ *Bacillus* เช่น *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus* และ *B. subtilis* นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* spp. ด้วยเช่นกัน แทกซอนที่น่าสนใจของแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes คือ *Bacillus* sp. ซึ่งบ่อยที่สุด เมื่อเลือกโคลนตัวแทนของสปีชีส์นี้มาศึกษาคือ CS3-MAS03 พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของโคลนนี้แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดประมาณ 99.5% กับ *Bacillus aerophilus* 28K^T, *Bacillus stratosphericus* 41KF2a^T, *Bacillus altitudinis* 41KF2b^T และ *Bacillus xiamenensis* HYC-10^T (ฐานข้อมูล EzTaxon) เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า *Bacillus* sp. CS3-MAS03 มีบรรพบุรุษล่าสุดร่วมกับ *B. xiamenensis* HYC-10^T ดังแสดงในภาพที่ 4-3 โดย *Bacillus* sp. CS3-MAS03 มีสายวิวัฒนาการแยกออกมาจากบรรพบุรุษร่วมยาวนานกว่า *B. xiamenensis* HYC-10^T



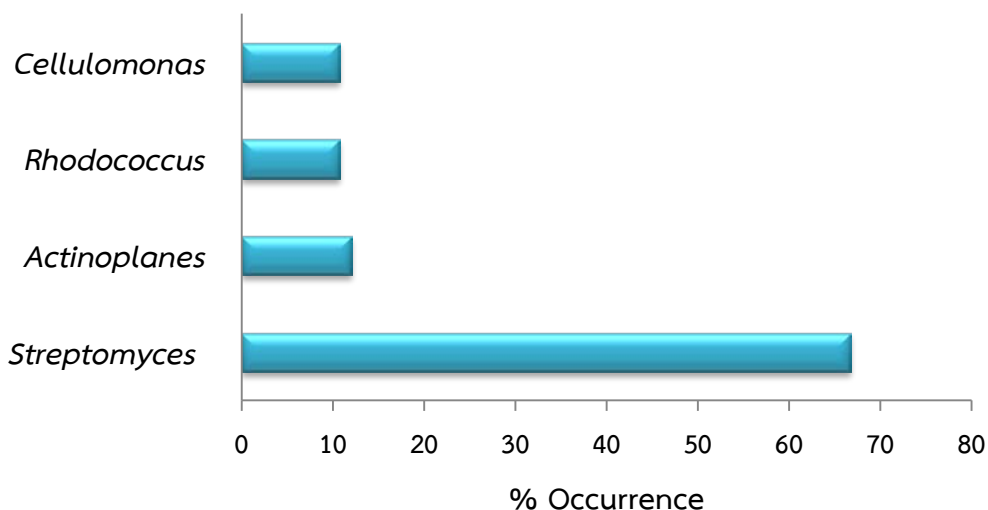
ภาพที่ 4-3 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-MAS03 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Maximum Likelihood บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Maximum Composite Likelihood (MCL) ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,470 ตำแหน่ง ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 9 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Bacillus indicus* LMG 22858 เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

เป็นที่น่าสังเกตว่ามีแบคทีเรียในคลาส Alpha-Proteobacteria 1 โคลน (CS3-MAS11) ที่ยังไม่สามารถระบุแทกซอนในระดับจีโนมและสปีชีส์ที่แน่นอนได้ โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียดังกล่าวนี้แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99-100% และมีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับ uncultured Alpha-Proteobacterium clone Belgica 2005/10 (DQ351777) ที่ปรากฏข้อมูลอยู่ใน GenBank และ EzTaxon-e (cultured & uncultured) (ภาพที่ 4-4) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับแทกซอนที่ระบุจีโนมและสปีชีส์ชัดเจน พบว่าแสดงความคล้ายคลึงสูงสุดเพียง 94.03% กับ *Andersenella baltica* BA141(T) ซึ่งต่ำกว่าระดับที่จะสามารถระบุว่าเป็นจีโนมเดียวกันได้ จึงทำให้คาดว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของโคลนนี้น่าจะเป็นแบคทีเรียแทกซอนใหม่ (จีโนมใหม่)



ภาพที่ 4-4 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-MAS11 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Kimura 2-parameter ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,318 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 7 ข้อมูลถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Andersenella* sp. BB54 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทะเล (คลาส Alpha-Proteobacteria) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

สำหรับในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอกทีโนแบคทีเรีย ตรวจพบสมาชิกจำนวน 4 จีโนม โดยจีโนมที่โดดเด่นที่สุดคือ *Streptomyces* (66.7%) รองลงมาคือจีโนม *Actinoplanes* (12%) ส่วนที่เหลืออีก 2 จีโนม คือ *Rhodococcus* และ *Cellulomonas* พบในความถี่ที่เท่ากันคือ 10.7% (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 แอกทีโนไมซีส์จีโนมต่าง ๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

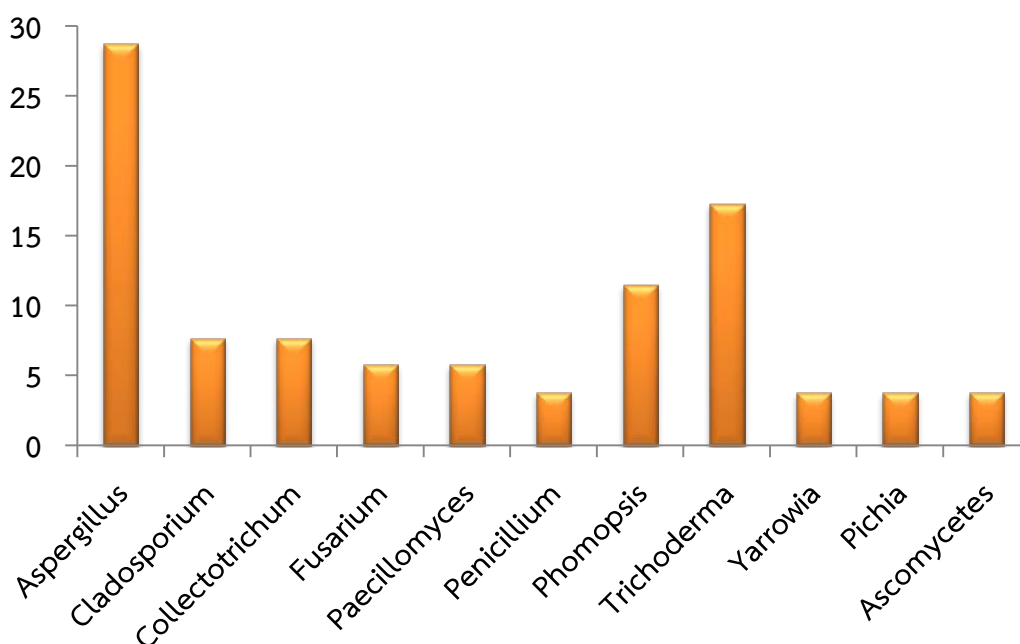
แอกทีโนไมซีส์ที่พบบ่อย คือ *Streptomyces griseorubens* (29.3%), *Streptomyces* sp.1 (22.7%), *Actinoplanes* sp. (12%), *Rhodococcus* sp. (10.7%) และ *Cellulomonas* sp. (10.7%) ดังแสดงในตารางที่ 4-2 นอกจากนี้ยังพบ *Streptomyces thermocarboxydus* (6.7%) และ *Streptomyces* sp.2 (8%)

ตารางที่ 4-2 การระบุแทกซอนของแอกทีโนไมซีส์ (n=75)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	% ที่พบ
<i>Streptomyces griseorubens</i>	22	29.3
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	5	6.7
<i>Streptomyces</i> sp.1	17	22.7
<i>Streptomyces</i> sp.2	6	8
<i>Actinoplanes</i> sp.	9	12
<i>Rhodococcus</i> sp.	8	10.7
<i>Cellulomonas</i> sp.	8	10.7

1.2 ราสายและยีสต์

ในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มรา ที่สร้างขึ้นจากตะกอนดินป่าชายเลน พบสมาชิกของราและยีสต์หลากหลายجنس (ภาพที่ 4-6) โดยجنسที่พบบ่อยที่สุดคือ *Aspergillus* (28.8%) รองลงมาคือ *Trichoderma* (17.3%) และ *Phomopsis* (11.5%) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-6 ราสายและยีสต์ในجنسต่างๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มรา ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

ราที่พบบ่อยที่สุดคือ *Aspergillus niger* (15.4%) รองลงมาคือ *Trichoderma* sp.1 (13.5%) และ *Phomopsis* sp. (11.5%) เป็นที่น่าสนใจว่าสมาชิกของราในجنس *Aspergillus* พบได้หลากหลายที่สุด (6 สปีชีส์) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

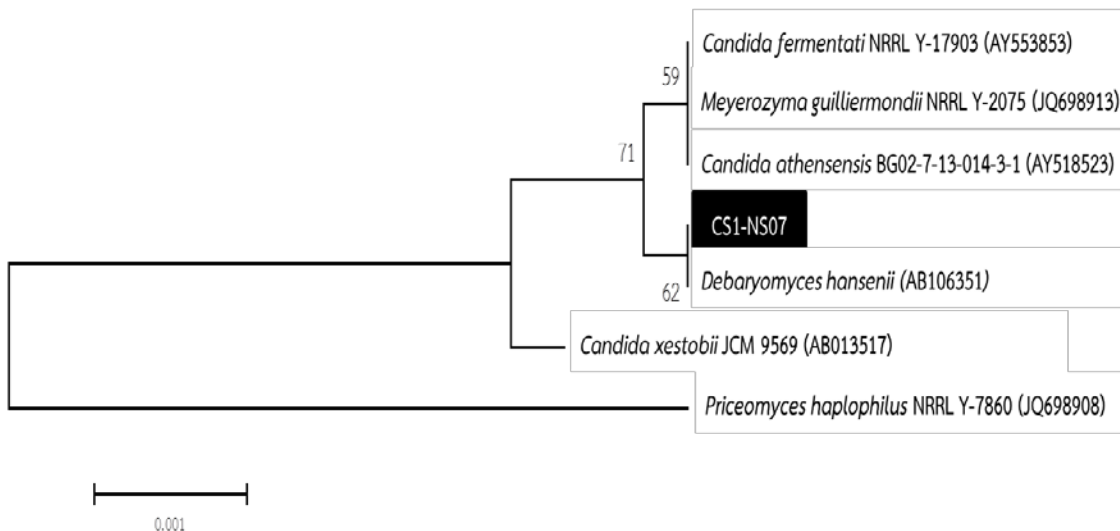
ตารางที่ 4-3 การระบุแทกซอนของราและยีสต์ (n=52)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	% ที่พบ
<i>Aspergillus niger</i>	8	15.4
<i>Aspergillus</i> sp.1	2	3.8
<i>Aspergillus</i> sp.2	1	1.9
<i>Aspergillus</i> sp.3	1	1.9

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	% ที่พบ
<i>Aspergillus</i> sp.4	2	3.8
<i>Aspergillus</i> sp.5	1	1.9
<i>Cladosporium herbarum</i>	2	3.8
<i>Cladosporium</i> sp.	2	3.8
<i>Collectotrichum</i> sp.	4	7.7
<i>Fusarium moniliforme</i>	3	5.8
<i>Paecilomyces</i> sp.	3	5.8
<i>Penicillium</i> sp.1	1	1.9
<i>Penicillium</i> sp.2	1	1.9
<i>Phomopsis</i> sp.	6	11.5
<i>Trichoderma</i> sp.1	7	13.5
<i>Trichoderma</i> sp.2	2	3.8
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2	3.8
<i>Pichia</i> sp.	2	3.8
Unidentified Ascomycota (CS1-NS07)	2	3.8

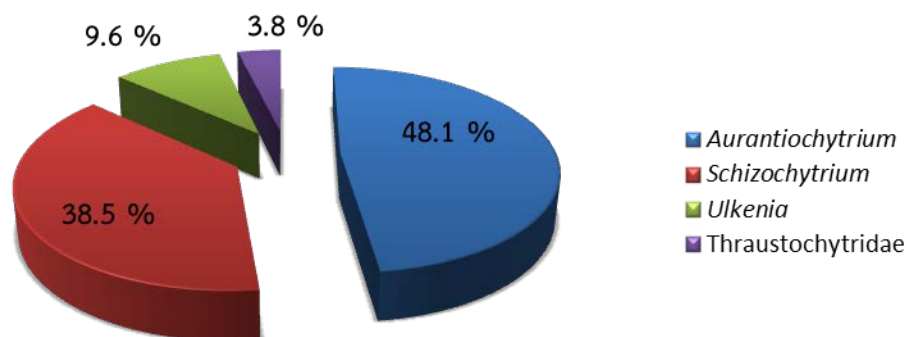
สิ่งที่น่าสนใจของผลการสำรวจความหลากหลายของยีสต์ราที่พบในพื้นที่ป่าชายเลนของบริเวณที่ศึกษาคือ พบยีสต์ 1 สายพันธุ์ (จำนวน 1 โคลนในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของยีสต์รา คิดเป็นความถี่การพบ 3.8% ดังแสดงในตารางที่ 4-3) ซึ่งยังไม่สามารถระบุแทกซอนในระดับจีนัสและสปีชีส์ได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99% กับยีสต์ในแฟมิลี Saccharomycetaceae หลายสปีชีส์ (ฐานข้อมูล GenBank) เช่น *Debaryomyces hansenii*, *Candida athensensis* BG02-7-13-014-3-1, *Candida fermentati* NRRL Y-17903 และ *Meyerozyma guilliermondii* NRRL Y-2075 เป็นต้น อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของยีสต์ CS1-NS07 มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ามีสายวิวัฒนาการที่แสดงบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *D. hansenii* (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 แผนภูมิต้นไม้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลน CS3-NS07 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแท่งขนาน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จำนวน 1,733 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 7 ข้อมูลถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Priceomyces haplophilus* NRRL Y-7860 (Ascomycetous yeast; Saccharomycetaceae) เป็นแท่งขนานนอกกลุ่ม

1.3 ทรอสโทคิทริดส์

ในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของทรอสโทคิทริดส์ ตรวจพบ *Aurantiochytrium* spp. มากที่สุด (48.1%) รองลงมาคือ *Schizochytrium* spp. (38.5%) นอกจากนี้ยังพบจิ้นัส *Ulkenia* (9.6%) และทรอสโทคิทริดส์ที่ยังไม่สามารถระบุจิ้นัสได้ (3.8%) ดังแสดงในภาพที่ 4-8



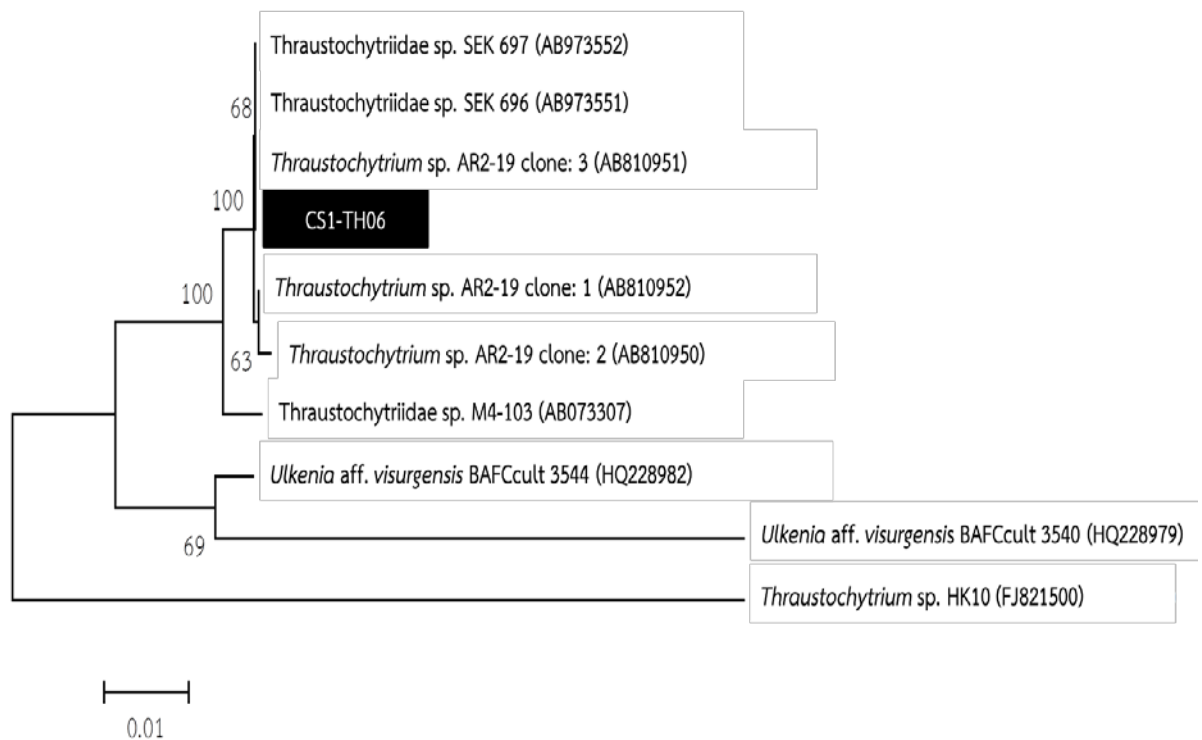
ภาพที่ 4-8 ทรอสโทคิทริดส์จิ้นัสต่าง ๆ ที่ตรวจพบจากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มทรอสโทคิทริดส์ ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของตะกอนดินป่าชายเลน ในพื้นที่อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

ทรอสโทคริทริดส์ที่พบสามารถระบุแทกซอนระดับสปีชีส์ได้มี 3 สปีชีส์ คือ *Aurantiochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei* และ *Ulkenia virsugensis* (ตารางที่ 4-4) เมื่อพิจารณาความหลากหลายของทรอสโทคริทริดส์ พบว่า *Aurantiochytrium* และ *Schizochytrium* เป็นจีนัสที่มีความหลากหลายของแทกซอนระดับสปีชีส์มากที่สุด กล่าวคือ 3 สปีชีส์ (ตารางที่ 4-4) และพบทรอสโทคริทริดส์อีก 1 สายพันธุ์ (CS1-TH06) ที่ยังไม่สามารถระบุแทกซอนที่ชัดเจนได้

ตารางที่ 4-4 การระบุแทกซอนของทรอสโทคริทริดส์ (n=52)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	% ที่พบ
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	15	28.8
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	3	5.8
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	7	13.5
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	11	21.2
<i>Schizochytrium</i> sp.1	7	13.5
<i>Schizochytrium</i> sp.2	2	3.8
<i>Ulkenia virsugensis</i>	5	9.6
Thraustochytridae (CS1-TH06)	2	3.8

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของ CS1-TH06 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดถึง 100% กับทรอสโทคริทริดส์ที่ยังไม่มีการระบุแทกซอนที่ชัดเจน คือ Thraustochytridae sp. SEK 697 (AB973552) รวมทั้งยังแสดงความคล้ายคลึงสูง 99% กับทรอสโทคริทริดส์จีนัส *Thraustochytrium* sp. AR2-19 cone: 1 *Thraustochytrium* sp. AR2-19 clone: 2 และ *Thraustochytrium* sp. AR2-19 clone: 3 อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของ CS1-TH06 กับทรอสโทคริทริดส์ในจีนัส *Thraustochytrium* ตามที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank มีความแปรผันตั้งแต่ 99% จนถึงระดับที่ต่ำกว่า 90% (เช่น 88% เมื่อเปรียบเทียบกับ *Thraustochytrium* sp. HK10; FJ821500 ซึ่งมีตำแหน่งเป็นแทกซอนนอกกลุ่มในแผนภูมิที่แสดงดังภาพที่ 4-9) ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่สามารถระบุแทกซอนในระดับจีนัสได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงยังไม่มีการระบุแทกซอนของ CS1-TH06 โดยในการระบุแทกซอนที่แน่นอนของทรอสโทคริทริดส์ไอโซเลทนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออื่นที่มีอัตราวิวัฒนาการที่สูงกว่ายีน 18S rRNA



ภาพที่ 4-9 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทรอสโทคริตรีดส์ที่พบในพื้นที่ป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Tamura-Nei method ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิ โดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,349 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 10 ข้อมูลถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Thraustochytrium* sp. HK10 เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

2. การวิเคราะห์ยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส

จากการตรวจสอบการปรากฏอยู่ของยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4- β -glucanase) และ β -glucosidase ของแบคทีเรียในจีส *Bacillus* และ *Streptomyces* ตามลำดับ จากการโคลนยีน ได้รีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 2 โคลน (Clone 1042 และ Clone 0246) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้จากรีคอมบิแนนท์ทั้ง 2 โคลนดังกล่าวไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1500 และ 1400 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ดังนี้

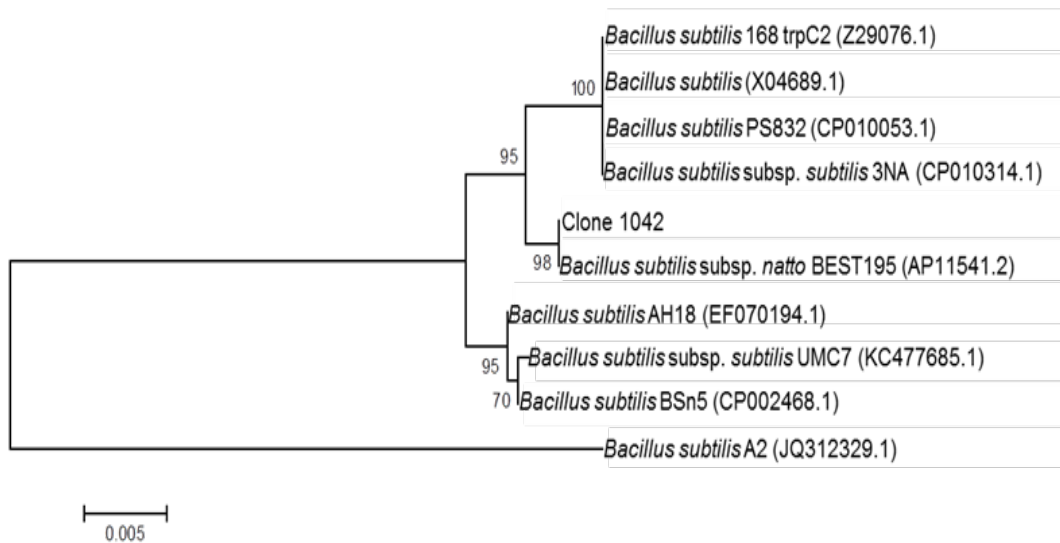
(1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Clone 1042 ความยาว 1,500 นิวคลีโอไทด์

1	ATGAAACGGT	CAATCTCTAT	TTTTATTACG	TGTTTATTGA	TTACGTTATT	GACAAATGGGC
61	GGCATGATAG	CTTCGCCGGC	ATCAGCAGCA	GGGACAAAAA	CGCCAGTAGC	CAAGAATGGC
121	CAGCTTAGCA	TAAAAGGTAC	ACAGCTCGTT	AACCGAGACG	GTAAAGCGGT	ACAGCTGAAG
181	GGGATCAGTT	CACACGGATT	GCAATGGTAT	GGAGAATATG	TCAATAAAGA	CAGCTTAAAA
241	TGGCTGAGAG	ATGATTGGGG	TATCACCGTT	TTCCGTGCAG	CGATGTATAC	GGCAGATGGC
301	GGTTATATTG	ACAACCCGTC	CGTGAAAAAT	AAAGTAAAAG	AAGCGGTTGA	AGCGGCAAAA
361	GAGCTTGGGA	TATATGTCAT	CATTGACTGG	CATATCTTAA	ATGACGGTAA	TCCAAACCAA
421	AATAAAGAGA	AGGCAAAGA	ATTCTTCAAG	GAAATGTCAA	GCCTTTACGG	AAACACGCCA
481	AACGTCATTT	ATGAAATTGC	AAACGAACCA	AACGGTGATG	TGAACTGGAA	GCGTGATATT
541	AAACCATATG	CGGAAGAAGT	GATTTCAGTT	ATCCGCAAAA	ATGATCCAGA	CAACATCATC
601	ATTGTCGGAA	CCGGTACATG	GAGCCAGGAT	GTGAATGATG	CTGCCGATGA	CCAGCTAAAA
661	GATGCAAACG	TTATGTACGC	ACTTCATTTT	TATGCCGGCA	CACACGGCCA	ATTTTTACGG
721	GATAAAGCAA	ACTATGCACT	CAGCAAAGGA	GCACCTATTT	TTGTGACAGA	GTGGGGAACA
781	AGCGACGCGT	CTGGCAATGG	CGGTGTATTC	CTTGATCAAT	CGAGGGAATG	GCTGAAATAT
841	CTCGACAGCA	AGACCATCAG	CTGGGTGAAC	TGGAATCTTT	CTGATAAGCA	GGAATCATCC
901	TCAGCTTTAA	AGCCGGGGGC	ATCTAAAACA	GGCGGCTGGC	GGTTGTGAGA	TTTATCTGCT
961	TCAGGAACAT	TCGTTAGAGA	AAACATTCTC	GGCACCAAAG	ATGCGACGAA	GGACATTCTT
1021	GAAACGCCAG	CAAAAGATAA	ACCCACACAG	GAAAACGGTA	TTTCTGTACA	ATACAGAGCA
1081	GGGGATGGGA	GTATGAACAG	CAACCAAATC	CGTCCGCGAC	TTCAAATAAA	AAATAACGGC
1141	AATACCACGG	TTGATTTAAA	AGATGTCACT	GCCCGTTACT	GGTATAAAGC	GAAAAACAAA
1201	GGCCAAAACG	TTGACTGTGA	CTACGCGCAG	ATTGGATGCG	GCAATGTGAC	ACACAAGTTT
1261	GTGACGTTGC	ATAAACCAAA	GCAAGGTGCA	GATACCTATC	TGGAACCTGG	GTTTAAAAAC
1321	GGAACGCTGG	GACCGGGAGC	AAGCACAGGG	AATATTCAGC	TTCGTCTTCA	CAATGATGAC
1381	TGGAGCAATT	ATGCACAAAG	CGGCGATTAT	TCCTTTTTCA	AATCAAATAC	GTTTAAAACA
1441	ACGAAAAAAA	TCACATTATA	TGATCAAGGA	AAACTGATTT	GGGGAACAGA	ACCAAATTAG

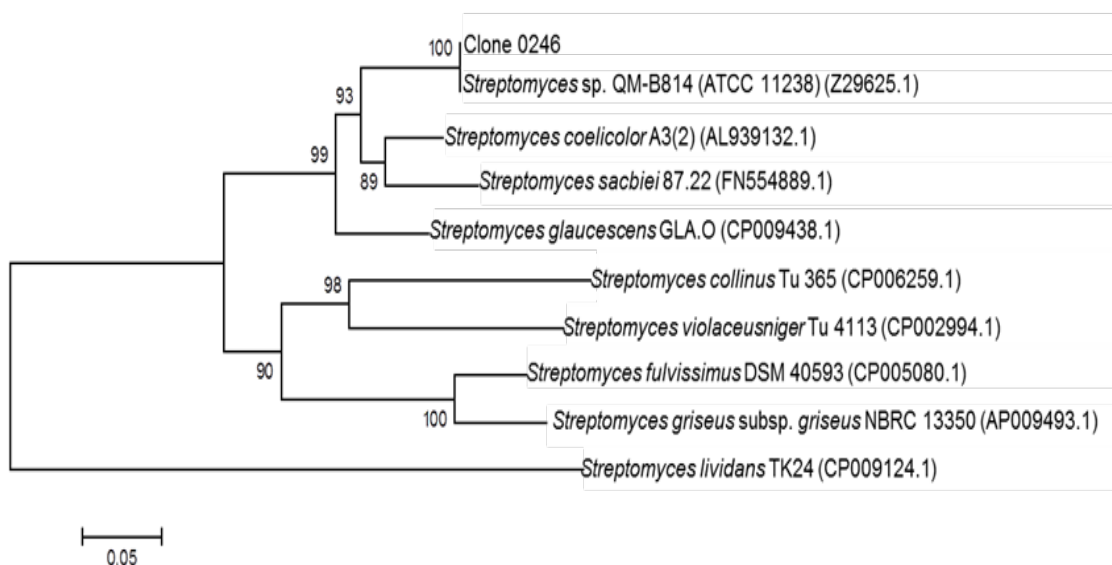
(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Clone 0246 ความยาว 1,440 นิวคลีโอไทด์

1	GTGGTCCCG	CAGCACAGCA	GACCGCAACC	GCCCCGGACG	CCGCCCTCAC	CTTCCCCGAG
61	GGTTTCCTCT	GGGGCTCGGC	GACGGCCTCG	TACCAGATCG	AGGGTGCGGC	CGCCGAGGAC
121	GGCCGGACGC	CCTCCATCTG	GGACACCTAC	GCCCCGACCC	CGGGACGCGT	CCGGAACGGC
181	GACACCGGTG	ACGTGCGCAC	CGACCACTAC	CACCGCTGGC	GCGAGGACGT	CGCCCTCATG
241	GCCGAAGTGG	GCCTGGGCGC	CTACCGTTC	TCGCTCGCCT	GGCCGCGCAT	CCAGCCCACC
301	GGCCGGGGCC	CCGCCCTCCA	GAAGGGTCTG	GACTTCTACC	GCCGGCTCGC	CGACGAGCTC
361	CTCGCCAAGG	GCATCCAGCC	CGTCGCCACG	CTCTACCACT	GGGACCTGCC	GCAGGAAGTC
421	GAGAACCCCG	GCGGCTGGCC	CGAGCGCCCC	ACCGCCGAGC	GGTTCGCCGA	GTACGCCGCC
481	ATCGCCGCGG	ACGCCCTCGG	CGACCGCGTG	AAGACCTGGA	CCACCCTCAA	CGAGCCCTGG
541	TGCAGCGCGT	TCCTCGGCTA	CGGCTCCGGC	GTGCACGCCC	CCGGCCGCAC	CGACCCGGTC
601	GCCGCCCTGC	GCGCCGCGCA	CCACCTCAAC	CTGGGCCACG	GCCTGGCCGT	CCAGGCGCTG
661	CGCGACCGCC	TCCCCGCCGA	CGCGCAGTGC	TCGGTCACGC	TCAACATCCA	CCACGTACGG
721	CCGCTCACCG	ACAGCGAGGC	CGACGCCGAC	GCGGTCCGCC	GGATCGACGC	GCTCGCCAAC
781	CGGGTCTTCA	CCGGACCGAT	GCTCCAGGGC	GCCTACCCGG	AGGACCTCGT	CAAGGACACC
841	GCCGGGCTGA	CCGACTGGTC	CTTCGTCCGC	GACGGCGACC	TCCGACTGGC	CCACCAGAAG
901	CTGGACTTCC	TCGGCGTCAA	CTACTACTCC	CCCACCCTCG	TCTCCGAGGC	CGACGGCAGC
961	GGCACGCACA	ACTCCGACGG	ACACGGCAGG	AGCGCCACCA	GCCCCTGGCC	GGGGCCCGAC
1021	CGGGTCGCGT	TCCACCAACC	GCCCCGGCAG	ACCACCGCCA	TGGGCTGGGC	CGTCGACCCG
1081	TCGGGCCTGT	ACGAGCTGCT	GCGCCGCCTG	TCCTCCGACT	TCCCCGCGCT	CCCGTGGTTC
1141	ATCACCGAGA	ACGGCGCCGC	CTTCCACGAC	TACGCGGACC	CGGAGGGCAA	CGTCAACGAC
1201	CCCGAGCGGA	TCGCCTACGT	ACGCGACCAC	CTGGCCGCCG	TGCACCGGGC	CATCAAGGAC
1261	GGCTCGGACG	TGCGCGGCTA	CTTCTGTGG	TCCCTGCTGG	ACAACCTCGA	GTGGGCGCAC
1321	GGTACAGCA	AGCGCTTCGG	CGCCGTCTAC	GTCGACTACC	CCACCGGCAC	GCGGATCCCG
1381	AAGGCCAGCG	CCCGCTGGTA	CGCCGAGGTG	GCCCCGACGG	GCGTCCTGCC	CACCGCCTGA

เมื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จาก Clone 1042 มีความคล้ายคลึงสูงมาก (99%) กับยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์ Cellulase (endo-1,4- β -glucanase) จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดมากกับ *B. subtilis* subsp. *natto* BEST195 (accession no. AP11541.1) (ภาพที่ 4-10) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จาก Clone 0246 แสดงความคล้ายคลึงประมาณ 77-100% กับยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์ β -glucosidase จากสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Streptomyces* spp. ซึ่งเมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแล้วพบว่าแสดงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ *Streptomyces* sp. QM-B814 (ATCC11238) (accession no. Z29625.1) ดังแสดงในภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-10 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4- β -glucanase) ของ Clone 1042 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining จากโปรแกรม Mega 6 โดยใช้ Tamura 3-parameter method ในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี Bootstrapping 1000 ซ้ำ



ภาพที่ 4-11 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส (β -glucosidase) ของ Clone 0246 ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining จากโปรแกรม Mega 6 โดยใช้ Tamura 3-parameter method ในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี Bootstrapping 1000 ซ้ำ

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ห้องสมุดยีน rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่สร้างจากเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอของตะกอนดินซึ่งเก็บจากพื้นที่ป่าชายเลนเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี แสดงความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ โดยในกลุ่มแบคทีเรีย พบไฟลัม Actinobacteria มากที่สุด (50.3%) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (45.6%) และไฟลัม Proteobacteria (4%) จินัสตัวแทนที่พบโดดเด่นของแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนแบคทีเรีย ราและทรอสโทคริทริดส์ คือ *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus* และ *Aurantiochytrium* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในคลาส Alpha-Proteobacteria ที่ยังไม่สามารถระบุแทกซอนระดับจิ้นส์และสปีชีส์ได้จำนวน 1 แทกซอน ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แสดงความคลึงสูงสุดเพียง 94% กับ *Andersenella baltica* ดังนั้นจึงมีแนวโน้มเป็นแบคทีเรียแทกซอนใหม่ ยีนเข้ารหัสเอนไซม์เซลลูเลสที่ตรวจพบในเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอของตะกอนดินป่าชายเลนในพื้นที่ที่ศึกษาแสดงความคล้ายคลึงและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับยีนเข้ารหัสเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* และ *Streptomyces* spp.

อภิปรายผลการทดลอง

จุลินทรีย์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีบทบาทสำคัญในทุกระบบนิเวศ โดยถือเป็นสิ่งมีชีวิตพื้นฐานที่ช่วยให้เกิดการขับเคลื่อนและรักษาสมดุลของระบบนิเวศ บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลน เกี่ยวข้องโดยตรงกับการหมุนเวียนของสารอาหาร เพื่อส่งผ่านไปยังสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ และสืบเนื่องมาจากพื้นที่ป่าชายเลนมีปริมาณสารอินทรีย์ที่มากและหลากหลาย ทั้งที่ผลิตขึ้นเองในพื้นที่แห่งนี้และสารอินทรีย์ที่นำเข้ามาจากภายนอก เช่น จากบนบก ทะเลและมหาสมุทร ทำให้ระบบนิเวศป่าชายเลนมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากป่าชายเลนในพื้นที่เมืองชลบุรี ซึ่งเป็นป่าธรรมชาติที่เป็นเขตอนุรักษ์ นำมาศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ พบจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทีโนแบคทีเรีย ยีสต์และราสาย รวมทั้งทรอสโทคริทริดส์ ในกระบวนการศึกษาเบื้องต้นได้มีการใช้คู่ไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัล (Universal primers) เพิ่มปริมาณยีน rRNA ที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มขึ้นมา ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์แต่ละชุดนั้นเป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ผสมของแทกซอนต่าง ๆ จึงจำเป็นต้องนำมาโคลนเพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละชิ้นออกจากกัน โดยโคลน 1 โคลน มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แทรกอยู่ 1 ชิ้น เมื่อนำพลาสมิดที่สกัดจากรีคอมบิแนนท์โคลนไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ก็จะทำให้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rRNA ที่แทรกอยู่บนพลาสมิดว่าเป็นของแทกซอนใด

ในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria และ Firmicutes ในความถี่ที่สูง กล่าวคือ 45.6% และ 50.3% ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Vincent *et al.* (2015) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตะกอนดินป่าชายเลน บริเวณชายฝั่งทะเลเมือง Kochi ประเทศ

อินเดีย โดยใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ สร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA ขึ้นมา เมื่อวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนต่าง ๆ ที่อยู่ในห้องสมุดยีน 16S rRNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของ แบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes

แทกซอนของแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes พบ *Bacillus* sp. (CS3-MAS03) บ่อยที่สุด ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของโคลนนี้แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดประมาณ 99.5% กับ *Bacillus aerophilus* 28K(T), *Bacillus stratosphericus* 41KF2a(T), *Bacillus altitudinis* 41KF2b(T) และ *Bacillus xiamenensis* HYC-10(T) (ฐานข้อมูล EzTaxon) จากผลการวิเคราะห์ ดังกล่าวสามารถสะท้อนให้เห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ไม่สามารถใช้ในการ บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสปีชีส์เหล่านี้ของแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ได้ (*B. aerophilus*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* และ *B. xiamenensis*) อย่างไรก็ตามเมื่อ วิเคราะห์ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า *Bacillus* sp. (CS3-MAS03) มีบรรพบุรุษร่วมล่าสุด กับ *B. xiamenensis* HYC-10^T แต่ด้วยข้อจำกัดของยีนเครื่องหมายดังที่ได้กล่าว ใน งานวิจัยนี้จึงยังไม่ได้ระบุแทกซอนในระดับสปีชีส์ของ CS3-MAS03

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Aerobic) แต่ บางชนิดสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic) สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore-forming) *Bacillus* ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม ต่าง ๆ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งสารต้านจุลชีพอีกด้วย ในการ จัดจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิมนั้นจัดจำแนกโดยการทดสอบทางชีวเคมีและการวิเคราะห์กรดไขมัน เมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl ester (FAME) profiling) (Bobbie & White, 1980; Vaerewijck *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้ชุดทดสอบ API 20E และ API 50CHB ในการ จัดจำแนกทำให้มีความสะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น แต่อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้จึงได้นำไปสู่การใช้เทคนิค ทางอณูพันธุศาสตร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการทำไฮบริดเซชันของ ดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) (Olive & Bean, 1999; Wattiau *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 2009) ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ออกเป็นสปีชีส์ต่าง ๆ ในปัจจุบันแบคทีเรีย ในจีนัส *Bacillus* มีความหลากหลายมากโดยมีความแปรผันของเบส G และ C สูงประมาณ 31-69% (Priest, 1981) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์

อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ด้วยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถระบุแทกซอนของ *Bacillus* บางกลุ่มได้ เช่น ในกลุ่มของ *Bacillus aerophilus* (*Bacillus aerophilus* group) ที่มีสมาชิกคือ *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus altitudinis* และ *Bacillus xiamenensis* เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA นั้นมีความคล้ายคลึงกันมาก ด้วยเหตุนี้เองจึงมีการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมายอื่น ๆ เช่น Lai *et al.* (2014) รายงานถึงการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB* ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ทำให้สามารถระบุสปีชีส์ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ Clerck & Vos (2004) รายงานถึงการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* และ *gyrB* ในการจัดจำแนก

Bacillus licheniformis สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งพบว่าสามารถทำให้การจัดหมวดหมู่และการระบุแทกซอนในระดับสปีชีส์แบคทีเรียนี้ได้ชัดเจนมากขึ้น

Bacillus xiamenensis เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ซึ่งอยู่ในจีนัส *Bacillus* ถูกรายงานครั้งแรกโดย Lai *et al.* (2014) โดยคณะผู้วิจัยได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ HYC-10^T จากลำไส้ของปลากระบอก (*Mulgil cephalus*) ซึ่งจับมาจากทะเลบริเวณเกาะ Xiamen ประเทศจีน HYC-10^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์ Oxidase และ Catalase สามารถเจริญได้ที่ระดับความเค็มของเกลือ 0-12% อุณหภูมิ 8-45 °C แบคทีเรียสายพันธุ์ HYC-10^T สามารถย่อยสลาย Aesculin และ Gelatin แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ HYC-10^T พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับ *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus safensis* และ *Bacillus pumilus* อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาคุณลักษณะทางด้านฟีโนไทป์และจีโนไทป์ในด้านต่าง ๆ มากขึ้น เช่น วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gryB* ปริมาณ G+C แบบแผนกรดไขมัน ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์บนจีโนมโดยเฉลี่ย DNA-DNA hybridization ทำให้สรุปได้ว่า HYC-10^T เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ซึ่งเป็นสมาชิกในจีนัส *Bacillus* ผู้วิจัยจึงเสนอให้ชื่อว่า *Bacillus xiamenensis* sp. nov.

โดยสายพันธุ์ที่เป็น Type strain คือ HYC-10^T (= CGMCC NO.1.12326^T = LMG27143^T = MCCC 1A00008^T) ส่วนรายงานวิจัยอื่น ๆ เกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้จากสิ่งแวดล้อม ยังไม่ปรากฏชัดเจน ถึงแม้ว่าในรายงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ระบุสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. CS3-MAS03 แต่สามารถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความใกล้ชิดในเชิงวิวัฒนาการมากที่สุดกับ *B. xiamenensis* HYC-10^T ส่วนการรายงานความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *B. xiamenensis* HYC-10^T เห็นได้จากคุณสมบัติการย่อยสลาย Aesculin ซึ่งบ่งชี้ถึงกิจกรรมเอนไซม์ β -glucosidase

ในอีกทางหนึ่ง ข้อมูลยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโคลน CS3-MAS11 ยังไม่เพียงพอต่อการระบุแทกซอนในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99-100%) กับ Uncultured Alpha-Proteobacteria โดยหากเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CS3-MAS11 กับแบคทีเรียที่ทราบแทกซอนแน่นอน พบว่าแสดงความคล้ายคลึงสูงสุดประมาณ 94% กับ *Andersenella baltica* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลบอลติก (Baltic Sea) โดยสายพันธุ์ที่แยกได้นั้นคือ BA141 ซึ่งถือเป็น Type strain (BA141^T) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกเสนอให้เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ในปี 2007 โดย Brettar, Christen, Bötzel, Lünsdorf, and Höfle ภายหลังจากที่ได้มีการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ทั้งในด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี แบบแผนของกรดไขมัน คุณลักษณะของรงควัตถุ ปริมาณ G+C ในโมเลกุลดีเอ็นเอ รวมทั้งสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Brettar *et al.*, 2007) BA141^T เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) จนถึงรูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ ผลการทดสอบออกซิเดสและคะตะเลสเป็นบวก สร้างรงควัตถุสีแดง ถูกจำแนกให้อยู่ในคลาส Alpha-Proteobacteria โดยมีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดที่สุดกับแบคทีเรียจีนัส *Rhodobium* BA141(T) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเค็ม 0.8-6% โดยระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 1.5-3% สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-37 °C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ

การเจริญคือ 25-30 °C พบการสร้างรงควัตถุชนิด Carotenoids ร่วมกับรงควัตถุชนิดอื่น (ซึ่งไม่ใช่ Bacteriochlorophyll a) จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เห็นสมควรให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานระดับจีโนมและสปีชีส์ใหม่ โดยให้ชื่อว่า *Andersenella baltica* gen. nov., sp. nov. โดยสายพันธุ์ BA141^T (= CIP 109499^T = LMG 24028^T) ถือว่าเป็น Type strain อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถจำแนก CS3-MAS11 เป็น *Andersenella baltica* ได้ เนื่องจากระดับความคล้ายคลึงของข้อมูลยีน 16S rRNA ต่ำกว่าเกณฑ์การระบุจีโนมและสปีชีส์ ซึ่งต้องไม่น้อยกว่า 97% และ 99 % ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า CS3-MAS11 น่าจะเป็นแบคทีเรียจีโนมและสปีชีส์ใหม่ซึ่งยังไม่มีการนำเสนอมาก่อน

สิ่งที่น่าสนใจของผลการสำรวจความหลากหลายของยีสต์ราที่พบในพื้นที่ป่าชายเลนของบริเวณที่ศึกษาคือ พบโคลน CS1-NS07 ที่เป็นข้อมูลของยีน 18S rRNA ที่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีสต์ในแฟมิลี Saccharomycetaceae แต่ยังไม่สามารถระบุแยกซอนในระดับจีโนมและสปีชีส์ได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99% กับยีสต์ในแฟมิลี Saccharomycetaceae หลายแยกซอน (ฐานข้อมูล GenBank) เช่น *Debaryomyces hansenii*, *Candida athensensis* BG02-7-13-014-3-1, *Candida fermentati* NRRL Y-17903 และ *Meyerozyma guilliermondii* NRRL Y-2075 เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ไม่เพียงพอต่อการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างยีสต์เหล่านี้ได้ ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของยีสต์ CS1-NS07 แสดงสายวิวัฒนาการที่แสดงบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *D. hansenii* แต่ก็ยังไม่สามารถทำให้สรุปแยกซอนระดับจีโนมและสปีชีส์ของ CS1-NS07 ได้ ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกใช้เครื่องหมายอื่นๆ ที่มีขนาดของข้อมูลมากกว่า เช่น ยีน 26S rRNA และยีน 28S rRNA รวมทั้งการใช้ดีเอ็นเอในส่วนของ Internal transcribe spacers (ITS) ซึ่งมีอัตราการเกิดการเกิดวิวัฒนาการมากกว่ายีนนำรหัส rRNA หรือพิจารณาเลือกใช้เครื่องหมายประเภทที่เป็นยีนนำรหัสการสร้างโปรตีน ซึ่งมีอัตราการเกิดการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่ายีน rRNA โดยยีนที่มักนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ ยีนนำรหัสการสร้าง β -tubulin (β -Tubulin gene) เป็นต้น (Das et al., 2014)

ทรอสโทคริทรินด์เป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มสามารถพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศทางทะเล รวมทั้งป่าชายเลน สำหรับในห้องสมุดยีน 18S rRNA ของทรอสโทคริทรินด์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ตรวจพบ *Aurantiochytrium* spp. มากที่สุด (48.1%) รองลงมาคือ *Schizochytrium* spp. (38.5%) นอกจากนี้ยังพบทรอสโทคริทรินด์จีโนม *Ulkenia* อีกจำนวนหนึ่ง (9.6%) รวมทั้งทรอสโทคริทรินด์ที่ยังไม่สามารถระบุจีโนมได้ (3.8%) เป็นที่น่าสนใจว่า *Aurantiochytrium limacinum* (ชื่อเดิมคือ *Schizochytrium limacinum*: Yokoyama & Honda, 2007) เป็นทรอสโทคริทรินด์ที่มีรายงานว่ามีศักยภาพในการเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น Docosahexaenoic acid (DHA) (Sergi et al., 2015)

ในงานวิจัยนี้ เบื้องต้นได้สำรวจยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้กระบวนการตัดเมตาจีโนมด้วยเอนไซม์ EcoRI และนำมาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC (pUC 19) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาตรวจคัดกรองกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar ไม่พบโคลนที่แสดงผลบวก (ไม่ได้แสดงผล) ทั้งนี้อาจ

เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น ประสิทธิภาพของการโคลนที่ต่ำ ทำให้ไม่สามารถได้โคลนทั้งหมดที่ควรมีได้ อีกทั้งขั้นตอนการโคลนเกี่ยวข้องกับการตัดเมตาจีโนมด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ยีนเป้าหมายอาจถูกตัดจนเสียสภาพการทำงานไป อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พบในพื้นที่ที่ศึกษา รวมทั้งข้อมูลจากผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากพื้นที่ป่าชายเลนเดียวกันนี้ (ผลการศึกษาแสดงในภาคผนวก) ทำให้ผู้วิจัยได้ทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ซึ่งแต่ละคู่มีความจำเพาะของการออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสของแบคทีเรียในจีโนม *Bacillus* และ *Streptococcus* ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวได้จากแม่แบบที่เป็นเมตาจีโนมของตะกอนดิน เมื่อนำไปโคลนโดยใช้ pGEM[®]-T Easy เป็นเวกเตอร์ ได้รีคอมบิแนนท์โคลนจำนวน 2 โคลน คือ Clone 1042 และ Clone 0246 เมื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จาก Clone 1042 มีความคล้ายคลึงสูงถึง 99% กับยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (endo-1,4)- β -glucanase จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จาก Clone 0246 แสดงความคล้ายคลึงประมาณ 77-100% กับยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์ β -glucosidase จากสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Streptomyces* spp. อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในรายละเอียดของข้อมูลลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งโดเมนสำคัญต่าง ๆ ของเอนไซม์เซลลูเลสจากทั้งสองโคลน

การคัดแยกยีนที่สนใจโดยอาศัยกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ อาจมีอุปสรรคค่อนข้างมาก เนื่องจากโอกาสของการได้ยีนเป้าหมายมีค่อนข้างต่ำ โคลนที่ปรากฏในห้องสมุดอาจไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการเนื่องจากขาดความสมบูรณ์หรือความครบถ้วนของข้อมูลยีน รวมทั้งโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดอาจไม่ใช่โคลนทั้งหมดที่มีอยู่ เนื่องจากประสิทธิภาพของการโคลนยีนไม่ดีพอ การตรวจคัดกรองโคลนโดยอาศัยการของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ก็เป็นปัจจัยจำกัดอีกประการหนึ่ง ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีใหม่มาใช้ในการศึกษาทางด้านเมตาจีโนมิกส์ เช่น เทคโนโลยี NGS (Next generation sequencing technology) ซึ่งช่วยให้การตรวจคัดกรองโคลนจากห้องสมุดเมตาจีโนมเป็นไปด้วยความสะดวกและรวดเร็ว (De Mandal *et al.*, 2015)

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถสะท้อนให้เห็นได้ว่าป่าชายเลนเป็นแหล่งทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์และมีคุณค่า นอกเหนือจากพันธุ์พืชและสัตว์ชนิดต่าง ๆ แล้ว ป่าชายเลนยังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย และมีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งมนุษย์สามารถเข้ามาค้นหาและคัดแยกจุลินทรีย์เหล่านั้นเพื่อนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์ได้ตามความต้องการ ถึงแม้ว่าจะมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถคัดแยกได้ด้วยวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่ก็มีกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ที่สามารถทำให้นักวิจัยเข้าถึงข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งทำให้สามารถนำข้อมูลเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ได้เช่นกัน เช่น การโคลนยีนและคัดเลือกยีนนำรหัสการสร้างสารชีวภาพที่สำคัญชนิดต่าง ๆ จากระบบนิเวศป่าชายเลน ดังตัวอย่างจากงานวิจัยนี้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในระบบนิเวศป่าชายเลนมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ การได้มาซึ่งข้อมูลระดับโมเลกุลในด้านยีนเครื่องหมายที่บ่งชี้แทกซอนและ

สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อออกแบบการทดลองสำหรับตรวจคัดกรองค้นหายีนที่กำหนดลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพในการผลิตสารชีวภาพที่สำคัญชนิดต่าง ๆ ที่สนใจจากระบบนิเวศแห่งนี้ รวมทั้งข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมและสร้างความเข้าใจให้ทุกคนตระหนักถึงคุณค่าของทรัพยากรป่าชายเลน อันจะนำไปสู่การร่วมกันฟื้นฟูและอนุรักษ์ไว้เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. (2552). *ทะเลไทยกับการใช้ประโยชน์*. วันที่สืบค้นข้อมูล 7 พฤษภาคม 2559, เข้าถึงได้จาก http://www.pcd.go.th/info_serv/water_sea4use.html.
- ชุมพล รักศิลป์. (2557). *จุลินทรีย์จากป่าชายเลนที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส*. โครงการงานทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ชมรมนักชีววิทยา อพ.สธ. (ม.ป.ป.). *สวนป่าชายเลนทูลกระหม่อม*. วันที่สืบค้นข้อมูล 7 พฤษภาคม 2559, เข้าถึงได้จาก http://www.rspg.org/rspg_bioclub/mg_6.htm.
- วีระ เทพภรณ์. (2552). *ป่าชายเลน สูดยอดทรัพยากรชายฝั่ง*. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: ไทร่มเกล้า.
- สิริธิดา ประสิทธิ์สุข. (2559). การแยก จำแนกและวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะกาเรสจากระบบนิเวศป่าชายเลน. โครงการงานทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2555). *ทรัพยากรป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี*. วันที่สืบค้นข้อมูล 17 พฤษภาคม 2558, เข้าถึงได้จาก www.iceh.or.th/iceh/news_letter/chonburi-wetlands.pdf.
- Abad, S. & Turon, X. (2015). Biotechnological production of docosaheptaenoic acid using *Aurantiochytrium limacinum*: Carbon sources comparison and growth characterization. *Marine Drugs*, 13, 7275–7284.
- Azman, A-S., Othman, I., Velu, S. S., Chan, K-G., and Lee, L-H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 6(856), doi: 10.3389/fmicb.2015.00856.
- Basak, P., Pramanik, A., Sengupta, S., Nag, S., Bhattacharyya, A., Roy, D., Pattanayak, R., Ghosh, A., Chattopadhyay, D., & Bhattacharyya, M. (2016). Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani, Sundarbans using 16S rRNA genetag sequencing. *Genomics Data*, 7, 76–78.
- Bremer, G. B. (1995). Lower marine fungi (*Labyrinthulomycetes*) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia*, 295, 89-95.
- Brettar, I., Christen, R., Bötzel, J., Lünsdorf, H., & Manfred G. Höfle, M.G. (2007). *Andersenella baltica* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the Alphaproteobacteria isolated from sediment in the central Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2399–2405.

- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80–100.
- de Mandal, S., Panda, A.K., Bisht, S.S., & Kumar, N.S. (2015). Microbial ecology in the era of next generation sequencing. *Next Generation Sequencing & Application*, S1: 001. doi:10.4172/jngsa.S1-001.
- El-Morsy, E. (2000). Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea coast of Egypt. *Fungal Diversity*, 5, 43-54.
- Fell, J. W., Master, I. M., & Wiegert, R. G. (1984). Litter decomposition and nutrient enrichment. In S. C. Snedaker, & J. G. Snedaker (eds), *The mangrove ecosystem: Research methods* (pp. 239-251). Paris.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes-Duarte, D., Santos, V.A., Strompl, C., Elborough, K., Jarvis, G., Neef, A., Yakimov, M.M., Timmis, K.N., & Golyshin, P.N. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenomic library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 7, 1996–2010.
- Findlay, R. H., Fell, J. W., Coleman, N. K., & Vestal, J. R. (1986). Biochemical indicators of the role of fungi and thraustochytrids in mangrove detrital systems. In S. T. Moss (ed), *The biology of marine fungi* (pp. 91-104). Cambridge: Cambridge University Press.
- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*, 2012, 1-7.
- Ghosh, A., Dey, N., Bera, A., Tiwari, A., Sathyaniranjana, K.B., Chakrabarti, K., & Chattopadhyay, D. (2010). Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. *Saline Systems*, 6, 1-11 (Published online, doi: 10.1186/1746-1448-6-1).
- Gonçalves, A.C.S., dos Santos, A.C.F., dos Santos, T.F., Pessoa, T.B.A., Dias, J.C.T., & Rezende, R.P. (2015). High yield of functional metagenomic library from mangroves constructed in fosmid vector. *Genetics and Molecular Research*, 14 (4), 11841-11847.
- Hastuti, U. S., Sangur, K., & Khasanah, H. N. (2015). Biodiversity and enzyme activity of indigenous cellulolytic and amylolytic bacteria in decayed mangrove stem waste product at Waai seashore, Ambon Island. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5, 252-256.

- Healy, F.G., Ray, R.M., Aldrich, H.C., Wilkie, A.C., Ingram, L.O., & Shanmugam, K.T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Applied and Environmental Biotechnology*, 43, 667–674.
- Holmer, M., & Storkholm, P. (2001). Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review. *Freshwater Biology*, 46, 431-451.
- Honda, D., Yorochi, T., Nakahara, T., Raghukumar, S., Nakagiri, A., Schaumann, K., & Higashihara, T. (1999). Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequence of 18S ribosomal RNA gene. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 637-647.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. C., Goodfellow, M., & Ruan, J. S. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7, 24-44.
- Hong, W-K., Yu, A., Oh, B-R., Park, J. M., Kim, C. H., Sohn, J-H., Kondo, A., & Seo J-W. (2013). Large-scale production of microalgal lipids containing high levels of docosahexaenoic acid upon fermentation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 1-5.
- Hossain, M. D., & Nuruddin, A. A. (2016). Soil and mangrove: a review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9, 198-207.
- Jacobsen, J., Lydolph, & Lange, L. (2005). Culture independent PCR: an alternative enzyme discovery strategy. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 63-71.
- Jeffrey, L. S. H., & Azrizal, M. R. (2007). Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 35(1), 153-157.
- Khandeparker, R., Verma, P., Meena, R.M., & Deobagkar, D.D. (2011). Phylogenetic diversity of carbohydrate degrading culturable bacteria from Mandovi and Zuari estuaries, Goa, west coast of India. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 95, 359-366.
- Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R., Kim, M.Y., Yeo, Y.S., Yoon, S.H., Koo, B.S., & Jun, H.K. (2008). Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 282, 44–51.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A., (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, 1-10.
- Li, X., & Qin, L. (2005). Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *TRENDS in Biotechnology*, 23, 539-543.

- Liu, A., Wu, X., & Xu, T. (2007). Research advances in endophytic fungi of mangrove. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(4), 912-918.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., & Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577.
- Martins, D. A., Custódio, L., Barreira, L., Pereira, H., Ben-Hamadou, R., Varela, J., & Abu-Salah, K. M. (2013). Alternative sources of *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Marine Drugs*, 11, 2259-2281.
- Myrold, D.D., Zeglin, L. H., & Jansson, J. K. (2013). The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Science Society of America Journal*, 78, 3-10.
- Pang, H., Zhang, P., Duan, C-J., Mo, X-C., Tang, J-L, & Feng, J-X. (2009). Identification of cellulase genes from metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. *Current in Microbiology*, 58, 404-408.
- Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V., & Chandramohan, D. (1994). Thraustochytrid and fungal component of marine detritus, IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 183, 113-131.
- Rees, H.C., Grant, S., Jones, B., Grant, W.D., & Heaphy, S. 2003. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles*. 7, 415-421.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Reviews of Genetics*, 38, 525-552.
- Ryu, D. D. Y., & Mandels, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2), 91-102.
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: A review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235-258
- Sahoo, K., & Dhal, N. K. (2009). Potential microbial diversity in mangrove ecosystem: A Review. *Indian Journal of Marine Sciences*, 38(2), 249-256.
- Sarma, V. V., & Hyde, K. D. (2001). A review on frequently occurring fungi in mangrove. *Fungal Diversity*, 8, 1-34.
- Schloss, P.D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-310.

- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., & AnandRao, M. (2014). Applications of cellulases-review. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*, 4(2), 424-437.
- Shewale, J. G. (1982). Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry*, 14(6), 435-443.
- Singh, N., & Steinke, T. D. (1992). Colonization of decomposing leaves of *Bruguiera gymnorhiza* (Rhizophoraceae) by fungi and in vitro cellulolytic activity of the isolates. *South African Journal of Botany*, 58, 525-529.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases- production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832-844.
- Streit, W.R., & Schmiyz, R.A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492-489.
- Taylor, L. E., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Ekborg, N. A., Hutcheson, S. W., & Weiner, R. M. (2006). Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40 T. *Journal of Bacteriology*, 188, 3849-3861.
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., & Dutta, S. K. (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. *Annals of Microbiology*, 63, 1-19.
- Thompson, C. E., Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Berger, M., Vainstein, M. H., Guimaraes, J. A., & Vasconcelos, A. T. R. (2013). A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. *AMB Express*, 3:65 (open access at <http://www.amb-express.com/content/3/1/65>).
- Vincent, H., Nair, H. P., Bhat, S. G. (2013). Community genomics involving culture independent approach for assessing the phylogenetic diversity of mangrove sediment. *Indian Journal of Applied Research* 3(10), ISSN - 2249-555X.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR protocols: a guide to method and applications* (Innis, M.A., Gelfan, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J., Eds.), Academic Press Inc., pp. 315-322.
- Wiwat, C., & Sillapee, J. (2011). Prospecting for cellulase enzymes based on sequences and functional screening from metagenomic libraries. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 38(1-2), 32-46.

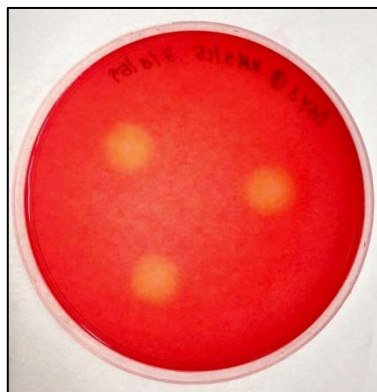
- Wood, T. M. (1989). Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi, In M. P. Coughlan (ed.), *Enzyme systems for lignocellulose degradation* (pp. 17-35). London: Elsevier Applied Science.
- Xie, G., Bruce, D. J., Challacombe, J. F., Chertkov, O., Detter, J. C., Gilna, P., Han, C. S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G. L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L. S., Brettin, T. S., Henrissat, B., Wilson, D. B., & McBride, M. J. (2007). Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3536-3546.
- Xing, M-N., Zhang, X-Z., & Huang, H. (2012). Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. *Biotechnology Advances*, 30, 920-929.
- Yan, B., Hong, K., and Yu, Z-N. 2006. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *The Journal of Microbiology*, 44(5), 566-571.
- Yokoyama, R. & Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 48, 199–211.

ภาคผนวก

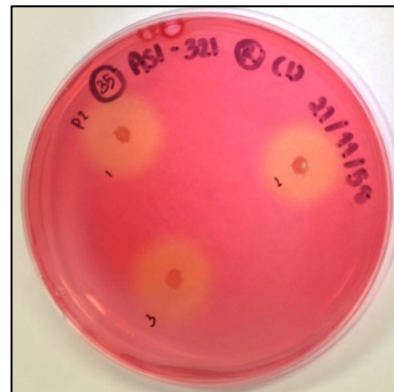
การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากตะกอนดินป่าชายเลน

ในงานวิจัยนี้ มีส่วนของการศึกษาเพิ่มเติมซึ่งเป็นการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตะกอนดินป่าชายเลน โดยนำตะกอนดินจากพื้นที่ป่าชายเลน (ตามที่ระบุในบทที่ 3) มาคัดแยกแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาตรวจคัดกรองกิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CMC agar เมื่อพบการเจริญ ย้อมจานเพาะเชื้อดังกล่าวด้วย 0.1 % Congo red (ย้อมเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างสีด้วย 1 M NaCl) จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของโซนใสรอบโคโลนีที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าโคโลนินั้นมีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งย่อยสลาย CMC ที่มีอยู่ในอาหาร

ผลการศึกษาพบแบคทีเรียที่แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่อนข้างดีจำนวน 4 ไอโซเลท (ภาพที่ ผ-1) โดยเป็นแบคทีเรียทั่วไป 2 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสไอโซเลทเป็น KC3-L5 และ AS1-321R.1 และแอคติโนมัยซีต 2 ไอโซเลท กำหนดรหัสไอโซเลทเป็น B4 และ I2



KC3-L5



AS1-321R.1



B4



I2

ภาพที่ ผ-1 การปรากฏของโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีตที่คัดแยกจากป่าชายเลน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 3 วัน

ในการศึกษานี้จึงได้นำแบคทีเรียและแอกทีโนมัยซีสดังกล่าวมาศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมทั้งจัดจำแนกเชื้อ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยนำแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ KC3-L5 และ AS1-321R.1 ที่เจริญบนอาหาร CMC agar เป็นเวลา 2 วัน มาเตรียมเซลล์แขวนลอยใน Ringer's solution ปรับเซลล์ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard หรือวัดค่า OD (600 nm) เท่ากับ 0.25 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/ml นำเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้มาใช้เป็นหัวเชื้อ โดยหยดหัวเชื้อปริมาตร 1 μ l หยดลงบนกลางจานอาหาร CMC agar ในอีกทางหนึ่งกรณีทดสอบกับแอกทีโนมัยซีส B4 และ I2 เตรียมหัวเชื้อโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CMC agar เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดเชื้อให้ติดอยู่บริเวณปลายเข็ม และนำมาจุด (point) ลงบนจานอาหาร CMC agar นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาย้อมด้วย 0.1% Congo red (ย้อมเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างสีด้วย 1 M NaCl) ตรวจสอบการปรากฏของโซนไฮรอปโคโลนี ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลาย CMC วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮรอป พร้อมทั้งประเมินความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทจากค่าดัชนีเอนไซม์ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮรอปต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย KC3-L5 และ AS1-321R.1 และแอกทีโนมัยซีสแบคทีเรีย B4 และ I2 แสดงค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 2.17 ± 0.44 , 4.77 ± 0.79 , 2.62 ± 0.21 และ 2.55 ± 0.25 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ ผ-1

ตารางที่ ผ-1 ดัชนีเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน

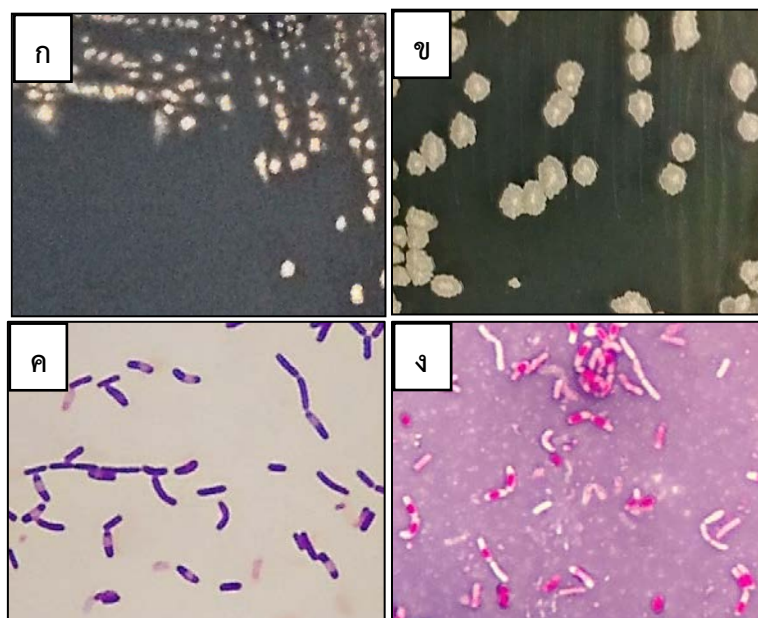
ไอโซเลท	ขนาดโซนไฮรอป (mm)	ขนาดโคโลนี (mm)	ดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส
KC3-L5	10.13 ± 0.82	4.66 ± 0.96	2.17 ± 0.44
AS1-321R.1	18.56 ± 0.91	3.89 ± 0.55	4.77 ± 0.79
B4	62.0 ± 2.65	23.67 ± 1.53	2.62 ± 0.21
I2	55.33 ± 3.21	21.67 ± 3.01	2.55 ± 0.25

หมายเหตุ ดัชนีเอนไซม์ได้จากรัตส่วนของอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮรอปซึ่งบ่งชี้กิจกรรมเอนไซม์และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CMC agar ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน ย้อมด้วย 0.1% Congo red ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

2. ลักษณะสัญญาณของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.1 แบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร CMC agar คือโคโลนีกลมแผ่ สีเนื้อ ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าขรุขระ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 mm เมื่อเชื้อมีอายุ 4 วัน (ภาพที่ ผ-2ก) ขณะที่เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหาร LB agar พบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีแตกต่างออกไปจากเดิม คือโคโลนีกลมรี ผิวหน้าขรุขระ ขอบหยัก หนูนกลาง สีขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 mm เมื่อเชื้อมีอายุ 2 วัน (ภาพที่ ผ-2ข) เมื่อนำเซลล์ที่เจริญบนอาหาร LB agar มาย้อมสีแกรมและย้อมเอนโดสปอร์ จากนั้นศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า AS1-321R.1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน เรียงต่อกันเป็นสายสั้น (2-4 เซลล์) (ภาพที่ ผ-2ค) และสร้างเอนโดสปอร์ ที่มีรูปร่างกลมรี และมีตำแหน่งอยู่เกือบปลายเซลล์ (ภาพที่ ผ-2ง)

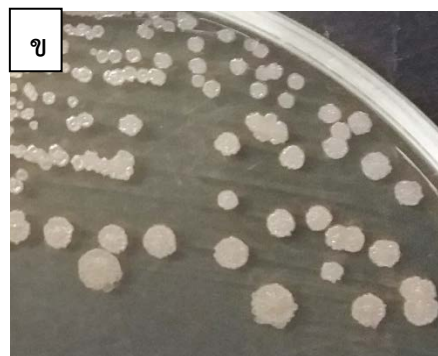


ภาพที่ ผ-2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1

- (ก) โคโลนีแบคทีเรียขณะเจริญบนอาหาร CMC agar เมื่ออายุเชื้อ 4 วัน
- (ข) โคโลนีแบคทีเรียขณะเจริญบนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar เมื่ออายุเชื้อ 2 วัน
- (ค) รูปร่าง การจัดเรียงตัวและการติดสีแกรมของเซลล์ ขณะเจริญบนอาหาร LB agar เป็นเวลา 1 วัน (กำลังขยาย 1000 เท่า)
- (ง) เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียขณะเจริญบนอาหาร LB agar เป็นเวลา 1 วัน (กำลังขยาย 1000 เท่า)

2.2 ลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5

ลักษณะโคโลนีบน CMC agar ของเชื้ออายุ 5 วัน คือ โคโลนีกลม ผิวหน้าเรียบ สีขาว เมื่อเชื้ออายุมากขึ้นโคโลนีจะแผ่ และมีสีเหลือง (ภาพที่ ผ-3ก) ลักษณะโคโลนีบน LB agar ของเชื้ออายุ 3 วัน คือ โคโลนีกลม ผิวหน้าขรุขระ ขอบหยัก สีครีม เมื่อเชื้ออายุมากขึ้นโคโลนีจะเยิ้ม (ภาพที่ ผ-3ข) เมื่อนำเชื้อมาย้อมสีแกรมและศึกษาลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า KC3-L5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เรียงตัวกระจัดกระจาย (ภาพที่ ผ-3ค)



ภาพที่ ผ-3 ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5

- (ก) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน CMC agar (อายุเชื้อ 5 วัน)
- (ข) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน LB agar (อายุเชื้อ 3 วัน)
- (ค) รูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรมของเซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB agar เป็นเวลา 1 วัน

2.3 แอคติโนมัยซิสไอโซเลท B4

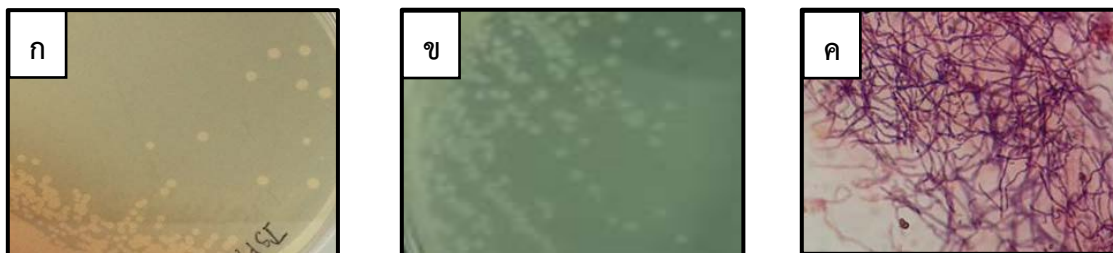
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP agar (International Streptomyces Project; ISP agar no. 2) คือ โคโลนีกลม ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีหยาบ มีสีเหลืองอ่อน โคโลนียึดติดกับผิวหน้าอาหาร เมื่ออายุเชื้อมากขึ้น (7 วันขึ้นไป) โคโลนีแผ่ขยาย มีสีขาว และสร้างรงควัตถุสีเทา (ภาพที่ ผ-4ก) ในส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง CMC คือมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบหยัก โคโลนีมีสีขาว โคโลนียึดติดกับผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ ผ-4ข) ผลจากการย้อมสีแกรมและศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า B4 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มในรูปเส้นสาย สามารถแตกแขนงได้ (ภาพที่ ผ-4ค)



ภาพที่ ผ-4 ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียไอโซเลท B4
 (ก) โคโลนีขณะเจริญบนอาหาร ISP agar อายุเชื้อ 4 วัน
 (ข) โคโลนีขณะเจริญบนอาหาร CMC agar อายุเชื้อ 7 วัน
 (ค) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (เซลล์เจริญบนอาหาร CMC agar อายุ 4 วัน)

2.4 แอคติโนมัยซิสไอโซเลท I2

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP agar คือ โคโลนีกลม ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีหยาบ มีสีเหลืองอ่อน โคโลนียึดติดกับผิวหน้าอาหาร เมื่ออายุเชื้อมากขึ้น โคโลนีแผ่ขยาย มีสีน้ำตาล และสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (ภาพที่ ผ-5ก) ในส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง CMC คือ มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ โคโลนีมีสีขาว เงาม โคโลนียึดติดกับผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ ผ-5ข) ผลจากการย้อมสีแกรมและศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า I2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มในรูปเส้นสาย สามารถแตกแขนงได้ (ภาพที่ ผ-5ค)



ภาพที่ ๕-5 ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียไอโซเลท I2

- (ก) โคโลนีขณะเจริญบนอาหาร ISP agar อายุเชื้อ 4 วัน
 (ข) โคโลนีขณะเจริญบนอาหาร CMC agar อายุเชื้อ 7 วัน
 (ค) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (เซลล์เจริญบนอาหาร CMC agar อายุ 4 วัน)

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมาย 16S rRNA

ในการศึกษานี้ได้นำแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 และ AS1-321R.1 และแอกทิโนมัยซีต ไอโซเลท B4 และ I2 มาจัดจำแนก โดยเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA อ่านและวิเคราะห์ข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เพื่อระบุแทกซอนของแบคทีเรียและ แอคทิโนมัยซีตดังกล่าว ผลการศึกษาแสดงดังต่อไปนี้

3.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5

(1) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,354 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

1	GGATGCCGGC	GAGCGGCGGA	CGGGTGAGTA	ATGCCTAGGA	ATCTGCCTGG	TAGTGGGGGA
61	TAACTCGGGG	AAACTCGAGC	TAATACCGCA	TACGTCTAC	GGGAGAAAGC	GGGGGATCTT
121	CGGACCTCGC	GCTACCAGAT	GAGCCTAGGT	CGGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GTAAAGGCTC
181	ACCAAGGCGA	CGATCCGTAG	CTGGTCTGAG	AGGATGATCA	GCCACACTGG	AACTGAGACA
241	CGGTCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG	GACAATGGGC	GAAAGCCTGA
301	TCCAGCCATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGTC	TTCGGATTGT	AAAGCACTTT	AAGTTGGGAG
361	GAAGGGCAGT	AAGTTAATAC	CTTGCTGTTT	TGACGTTACC	GACAGAATAA	GCACCGGCTA
421	ACTTCGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGAA	GGGTGCAAGC	GTTAATCGGA	ATTACTGGGC
481	GTAAAGCGCG	CGTAGGTGGT	TTGATAAGTT	GGATGTGAAA	GCCCCGGGCT	CAACCTGGGA
541	ATTGCATCCA	AAACTGTCTG	ACTAGAGTAT	GGCAGAGGGT	GGTGAATTTT	CCTGTGTAGC
601	GGTGAAATGC	GTAGATATAG	GAAGGAACAC	CAGTGGCGAA	GGCGACCACC	TGGGCTAATA
661	CTGACTCTGA	GGTGCGAAAG	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCCTG	GTAGTCCACG


```

721 CCGTAAACGA TGTCGACTAG CCGTTGGGAT CCTTGAGATC TTAGTGCCGC AGCTAACGCA
781 TTAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG
841 CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC
901 CTTGACATGC AGAGAAC TTT CCAGAGATGG ATTGGTGCCT TCGGGAAGCTC TGACACAGGT
961 GCTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG TAACGAGCGC
1021 AACCTTGTC CTTAGTTACC AGCACGTAA GGTGGGCACT CTAAGGAGAC TGCCGGTGAC
1081 AAACCGGAGG AAGGTGGGGA TGACGTCAAG TCATCATGGC CCTTACGGCC TGGGCTACAC
1141 ACGTGCTACA ATGGTCGGTA CAAAGGGTTG CCAAGCCGCG AGGTGGAGCT AATCCATAA
1201 AACCGATCGT AGTCCGGATC GCAGTCTGCA ACTCGACTGC GTGAAGTCGG AATCGTAGT
1261 AATCGTGAAT CAGAATGTCA CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA
1321 CACCATGGGA GTGGGTTGCT CCAGAAGTAG ACAT

```

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ KC3-L5 ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99% กับ *Pseudomonas balearica* SP1402 และแสดงความคล้ายคลึง 98% กับ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ต่าง ๆ (ตารางที่ ผ-2)

ตารางที่ ผ-2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	NR_025972	<i>Pseudomonas balearica</i> SP1402	99	99
2	NR_074829	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	98	98
3	NR_041715	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588	98	98
4	NR_118798	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	98	98
5	NR_113652	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NBRC 14165	98	98

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2559 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงคะแนนสูงสุด (Max score และ Total score) 5 ลำดับแรก โดยใช้ฐานข้อมูล Reference RNA sequence (Refseq_rna)

นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ชุดเดียวกันไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99.63%) กับ *Pseudomonas balearica* DSM 6083 นอกจากนี้ยังแสดงความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas songnenensis* (Invalid name) NEAU-ST5-5 (97.27%), *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 (97.12%), *Pseudomonas guariconensis* PCAVU11 (96.60%) และ *Pseudomonas gunmingersis* HL22-2 (96.53%) แสดงดังตารางที่ ผ-3

ตารางที่ ผ-3 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	CP007511	<i>Pseudomonas balearica</i> DSM 6083 ^T	100	99.63
2*	JQ762269	<i>Pseudomonas songnenensis</i> (Invalid name) NEAU-ST5-5 ^T	100	97.27
3	CP002881	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	100	97.12
4	HF674459	<i>Pseudomonas guariconensis</i> PCAVU11 ^T	100	96.60
5	JQ246444	<i>Pseudomonas gunmingersis</i> HL22-2 ^T	100	96.53

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2559 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 5 ลำดับแรก

* เนื่องจากแทกซอนของ *Pseudomonas songnenensis* NEAU-ST5-5^T ยังไม่ชัดเจน (Invalid name) ในการศึกษาจึงไม่นำข้อมูลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับ KC3-L5

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon บ่งชี้ได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99-99.63%) กับ *Pseudomonas balearica* ดังนั้นเมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การระบุแทกซอนระดับจีนัส/สปีชีส์ ซึ่งใช้ค่าความคล้ายคลึง 97% และ 99% ตามลำดับ ในเบื้องต้นจึงจำแนก KC3-L5 เป็น *Pseudomonas balearica* อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันแทกซอนตามที่ระบุไว้ดังกล่าว จึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมด้วย

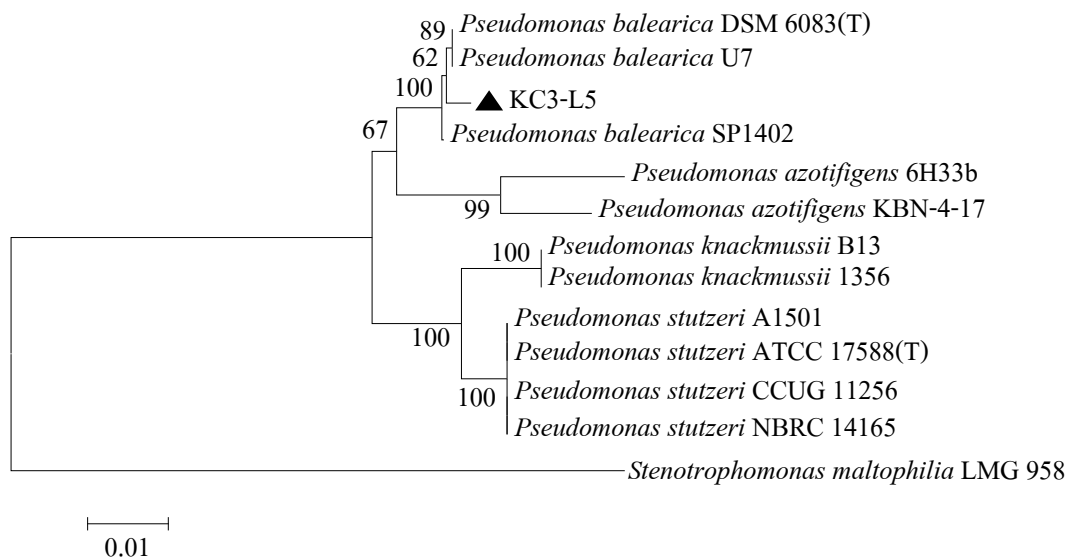
(2) สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ KC3-L5 และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงในระดับต่าง ๆ กับ KC3-L5 จากฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon (ตารางที่ ผ-4) มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกันโดยมี *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม (Outgroup taxon) พบว่า KC3-L5 ถูกจัดว่าอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Pseudomonas balearica* และ *Pseudomonas azotifigens* บนแผนภูมิต้นไม้ โดยมีสายวิวัฒนาการที่บ่งชี้บรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *Pseudomonas balearica* (ภาพที่ ผ-6) ซึ่งมีค่าสนับสนุน (Bootstrap) สูงถึง 100% อีกทั้ง KC3-L5 และสมาชิกที่อยู่ในเคลดของ *Pseudomonas balearica* สายพันธุ์ต่าง ๆ ยังแสดงค่าระยะห่างทางวิวัฒนาการ (Evolutionary distance) น้อยที่สุด (0.0014-0.0037) เมื่อเปรียบเทียบกับแทกซอนอื่น ๆ ที่นำมาวิเคราะห์ร่วม (ไม่ได้แสดงผล) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดระหว่าง KC3-L5 และ *Pseudomonas balearica*

ตารางที่ ผ-4 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ลำดับ	Bacteria	Accession	Source
1	KC3-L5	-	การศึกษานี้
2	<i>Pseudomonas balearica</i> DSM 6083 ^T	CP007511	EzTaxon
3	<i>Pseudomonas balearica</i> RMR34	KT731542	GenBank
4	<i>Pseudomonas balearica</i> U7	KJ940973	GenBank
5	<i>Pseudomonas balearica</i> SP1402	NR_025972	GenBank
6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	CP002881	EzTaxon
7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	NR_074829	GenBank
8	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	NR_118798	GenBank
9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NBRC 14165	NR_113652	GenBank
10	<i>Pseudomonas stutzeri</i> VKM B-975	NR_116489	GenBank
11	<i>Pseudomonas knackmussii</i> B13	NR_117756	GenBank
12	<i>Pseudomonas knackmussii</i> 1356	JN646015	GenBank
13	<i>Pseudomonas azotifigens</i> 6H33B	NR_041247	GenBank
14	<i>Pseudomonas azotifigens</i> KBN-4-17	KC967014	GenBank
15*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LMG 958	NR_119220	GenBank

หมายเหตุ * แบคทีเรียที่ใช้เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม (Outgroup taxon) สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของการศึกษานี้



ภาพที่ ผ-6 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท KC3-L5 ซึ่งแยกได้จาก ตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6.0 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping (1000 ซ้ำ) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1351 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 13 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958 เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

3.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1

(1) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 ซึ่งมีความยาว 1,496 นิวคลีโอไทด์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1	TCCTGGCTCA	GATTGAACGC	TGGCGGCGTG	CCTAATACAT	GCAAGTCGAG	CGGACAGATG
61	GGAGCTTGCT	CCCTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGTA	ACCTGCCTGT
121	AAGACTGGGA	TAACTCCGGG	AAACCGGGGC	TAATACCGGA	TGCTCGATTG	AACCGCATGG
181	TTCAATTATA	AAAGGTGGCT	TTTAGCTACC	ACTTACAGAT	GGACCCGCGG	CGCATTAGCT
241	AGTTGGTGAG	GTAACGGCTC	ACCAAGGCAA	CGATGCGTAG	CCGACCTGAG	AGGGTGATCG
301	GCCACACTGG	GACTGAGACA	CGGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTA	GGGAATCTTC
361	CGCAATGGAC	GAAAGTCTGA	CGGAGCAACG	CCGCGTGAGT	GATGAAGGTT	TTCGGATCGT
421	AAAACCTCTGT	TGTTAGGGAA	GAACAAGTAC	CGTTCGAATA	GGGCGGTACC	TTGACGGTAC
481	CTAACCGAGAA	AGCCACGGCT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGT	AGGTGGCAAG
541	CGTTGTCCGG	AATTATTGGG	CGTAAAGCGC	GCGCAGGCGG	TTTCTTAAGT	CTGATGTGAA
601	AGCCCCGGC	TCAACCGGGG	AGGGTCATTG	GAAACTGGGG	AACTTGAGTG	CAGAAGAGGA

661	GAGTGAATT	CCACGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGAGATG	TGGAGGAACA	CCAGTGGCGA
721	AGGCGACTCT	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	AGGCGCGAAA	GCGTGGGGAG	CGAACAGGAT
781	TAGATACCTT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAGTGCTA	AGCGTTAGAG	GGTTTCCGCC
841	CTTTAGTGCT	GCAGCAAACG	CATTAAGCAC	TCCGCCTGGG	GAGTACGGTC	GCAAGACTGA
901	AACTCAAAGG	AATTGACGGG	GGCCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAGC
961	AACGCGAAGA	ACCTTACCAG	GTCTTGACAT	CCTCTGACAA	CCCTAGAGAT	AGGGCTTCCC
1021	CTTCGGGGGC	AGAGTGACAG	GTGGTGCATG	GTTGTCGTCA	GCTCGTGTCTG	TGAGATGTTG
1081	GGTTAAGTCC	CGCAACGAGC	GCAACCCTTG	ATCTTAGTTG	CCAGCATTCA	GTTGGGCACT
1141	CTAAGGTGAC	TGCCGGTGAC	AAACCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC
1201	CCTTATGACC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGGCAGAA	CAAAGGCAG	CGAAGCCGCG
1261	AGGCTAAGCC	AATCCACAA	ATCTGTTCTC	AGTTCGGATC	GCAGTCTGCA	ACTCGACTGC
1321	GTGAAGCTGG	AATCGCTAGT	AATCGCGGAT	CAGCATGCCG	CGGTGAATAC	GTTCCCGGGC
1381	CTTGACACA	CCGCCCGTCA	CACCACGAGA	GTTTGTAAACA	CCCGAAGTCG	GTGAGGTAAC
1441	CTTTTGAGC	CAGCCGCCGA	AGGTGGGACA	GATGACTGGG	GTGAAGTCGT	AACAAG

จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่บนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า 98-100% ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99% กับ *Bacillus aerius* *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus sonorensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ ผ-5

ตารางที่ ผ-5 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	NR_118996	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	100	99
2	NR_074923	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	100	99
3	NR_113993	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234	98	99
4	NR_116023	<i>Bacillus licheniformis</i> BCRC 11702	98	99
5	NR_113588	<i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200	98	99
6	NR_042338	<i>Bacillus aerius</i> 24K	99	99

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 28 มีนาคม 2559 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงคะแนนสูงสุด (Max score และ Total score) 5 ลำดับแรก โดยใช้ฐานข้อมูล Reference RNA sequence (Refseq_rna)

นอกจากนี้ยังได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon โดยใช้โปรแกรม BLAST ร่วมกับ Robust pair-wise sequence alignment algorithm (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>) พบว่ายีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 แสดงความสูงสุด 99.06% กับ *Bacillus sonorensis* NBRC 101234^T รองลงมาคือ *Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T (99.00%) และ *Bacillus aerius*^T (98.93%) ดังแสดงในตารางที่ ผ-6

ตารางที่ ผ-6 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon โดยใช้โปรแกรม BLAST ร่วมกับ Robust pair-wise sequence alignment algorithm

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	AYTN01000016	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234	100	99.06
2	AE01733	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	100	99.00
3	AJ831843	<i>Bacillus aerius</i> 24K	100	98.93
4	AMXN01000021	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429	100	98.39
5	CP002905	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049	100	98.39

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 28 มีนาคม 2559 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 5 ลำดับแรก

จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวแสดงความคล้ายคลึง 99.06% กับ *B. sonorensis* และ 99.00% กับ *B. licheniformis* ซึ่งระดับความคล้ายคลึงดังกล่าวมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้ในเบื้องต้นสามารถระบุตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 ได้เพียงระดับจิ้นส์คือ *Bacillus* sp. และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อยืนยันตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน

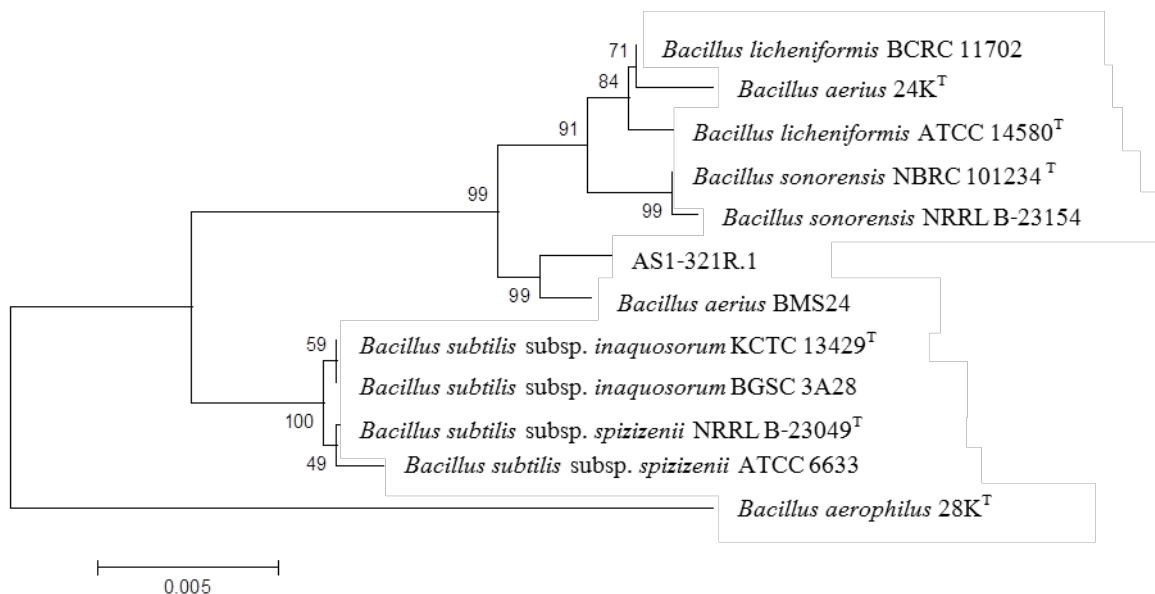
(2) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1

จากการคัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon ที่แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่กำลังศึกษา รวมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงในระดับต่างๆ (ตารางที่ ผ-7) มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining (NJ) ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงดังภาพที่ 15 ซึ่งพบว่า AS1-321R.1 ถูกจัดวางอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *B. sonorensis*, *B. licheniformis* และ *B. aerius* โดยแสดงสายสัมพันธ์ที่มีบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *B. aerius* BSM24 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันนี้ ไม่ได้แสดงตำแหน่งบนแผนภูมิที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน (ตำแหน่งของแบคทีเรียทั้ง 3 สปีชีส์ ครอบคลุมอยู่บนแผนภูมิ) โดยทุกวิธีของการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในการสร้างแผนภูมิ (Neighbor-Joining, Maximum likelihood, Maximum-evolution, UPGMA และ Maximum parsimony) ให้ผลสอดคล้องกัน (ไม่ได้แสดงผล) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สปีชีส์ มีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก โดยที่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่นำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการจำแนก ยังไม่เพียงพอต่อการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่าง *Bacillus* ทั้ง 3 สปีชีส์ดังกล่าวนี้

ตารางที่ ผ-7 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon ซึ่งนำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ลำดับ	Species/Strain	Accession no.	Source
1	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T	AYTN01000016	EzTaxon
2	<i>Bacillus sonorensis</i> NRRL B-23154	NR_025130	GenBank
3	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	EzTaxon
4	<i>Bacillus licheniformis</i> BCRC 11702	NR_116023	GenBank
5	<i>Bacillus aerius</i> 24K ^T	AJ831843	EzTaxon
6	<i>Bacillus aerius</i> BMS24	KC469615	GenBank
7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T	AMXN01000021	EzTaxon
8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC 3A28	NR_104873	GenBank
9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049 ^T	CP002905	EzTaxon
10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	NR_112049	GenBank
11*	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	AJ831844	EzTaxon

หมายเหตุ * แบคทีเรียที่ใช้เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม (Outgroup taxon) สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของการศึกษานี้



ภาพที่ ๗-7 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท AS1-321R.1 ที่แยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีนเครื่องหมาย และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrap test (1000 ซ้ำ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1402 ตำแหน่ง จากจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 12 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Bacillus aerophilus* 28K^T (AJ831844) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

3.3 การจัดจำแนกแอกทีโนมัยซีส์ไอโซเลท B4 และ I2

(1) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกทีโนมัยซีส์ไอโซเลท B4 ซึ่งมีความยาว 1,519 นิวคลีโอไทด์ มีรายละเอียดดังนี้

1	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ATGAACGCTG	GCGGCGTGCT	TAACACATGC	AAGTCGAACG
61	GTGAACACGG	AGCTTGCTCT	GTGGGATCAG	TGGCGAACGG	GTGAGTAACA	CGTGAGCAAC
121	CTGCCCCTGA	CTCTGGGATA	AGCGCTGGAA	ACGGCGTCTA	ATACTGGATA	TGTGACGTGA
181	CCGCATGGTC	TGCGTTTGGG	AAGATTTTTT	GGTTGGGGAT	GGGCTCGCGG	CCTATCAGCT
241	TGTTGGTGAG	GTAATGGCTC	ACCAAGGCGT	CGACGGGTAG	CCGGCCTGAG	AGGGTGACCG
301	GCCCACTGG	GACTGAGACA	CGGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG
361	CACAATGGGC	GAAAGCCTGA	TGCAGCAACG	CCGCGTGAGG	GATGACGGCC	TTCGGGTTGT

421	AAACCTCTTT	TAGCAGGGAA	GAAGCGAAAG	TGACGGTACC	TGCAGAAAAA	GCGCCGGCTA
481	ACTACGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGTA	GGGCGCAAGC	GTTATCCGGA	ATTATTGGGC
541	GTAAAGAGCT	CGTAGGCGGT	TTGTCGCGTC	TGCTGTGAAA	TCCCAGAGCT	CAACCTCGGG
601	CCTGCAGTGG	GTACGGGCAG	ACTAGAGTGC	GGTAGGGGAG	ATTGGAATTC	CTGGTGTAGC
661	GGTGGAAATGC	GCAGATATCA	GGAGGAACAC	CGATGGCGAA	GGCAGATCTC	TGGGCCGTAA
721	CTGACGCTGA	GGAGCGAAAG	GGTGGGGAGC	AAACAGGCTT	AGATACCCTG	GTAGTCCACC
781	CCGTAAACGT	TGGGAACTAG	TTGTGGGGTC	CATTCCACGG	ATTCCGTGAC	GCAGCTAACG
841	CATTAAGTTC	CCCGCCTGGG	GAGTACGGCC	GCAAGGCTAA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
901	GACCCGCACA	AGCGGCGGAG	CATGCGGATT	AATTCGATGC	AACGCGAAGA	ACCTTACCAA
961	GGCTTGACAT	ATACGAGAAC	GGGCCAGAAA	TGGTCAACTC	TTTGGAACACT	CGTAAACAGG
1021	TGGTGCATGG	TTGTCGTCGG	CTCGTGTCTG	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG
1081	CAACCCTCGT	TCTATGTTGC	CAGCACGTAA	TGGTGGGAAC	TCATGGGATA	CTGCCGGGGT
1141	CAACTCGGAG	GAAGGTGGGG	ATGACGTCAA	ATCATCATGC	CCCTTATGTC	TTGGGCTTCA
1201	CGCATGCTAC	AATGGCCGGT	ACAAAGGGCT	GCAATACCGT	GGGGTGGAGC	GAATCCCAAA
1261	AAGCCGGTCC	CAGTTCGGAT	TGAGGTCTGC	AACTCGACCT	CATGAAGTCG	GAGTCGCTAG
1321	TAATCGCAGA	TCAGCAACGC	TGCGGTGAAT	ACGTTCCCGG	GTCTTGACAA	CACCGCCCGT
1381	CAAGTCATGA	AAGTCGGTAA	CACCTGAAGC	CGGTGGCCTA	ACCCTTGTGG	AGGGAGCTGT
1441	CGAAGGTGGG	ATCGGTAATT	AGGACTAAGT	CGTAACAAGG	TAGCCGTACC	GGAAGGTGCC
1501	GCTGGTACAC	CTCCTTTCT				

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท 12 ซึ่งมีความยาว 1,520 นิวคลีโอไทด์ มีรายละเอียดดังนี้

1	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCT	TAACACATGC	AAGTCGAACG
61	ATGAAGCCCT	TCGGGGTGGA	TTAGTGGCGA	ACGGGTGAGT	AACACGTGGG	CAATCTGCCC
121	TGCACTCTGG	GACAAGCCCT	GGAAACGGGG	TCTGATACCG	GATATTGACC	ATCTTGGGCA
181	TCCTTGATGG	TGGAAAGCTC	CGGCGGTGCA	GGATGAGCCC	GCGGCCTATC	AGCTTGTGG
241	TGAGGTAATG	GCTCACCAAG	GCGACGACGG	GTAGCCGGCC	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA
301	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	ATTGCACAAT
361	GGGCGAAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCGCGT	GAGGGATGAC	GGCCTTCGGG	TTGTAAACCT
421	CTTTCAGCAG	GGAAGAAGCG	AAAGTGACGG	TACCTGCAGA	AGAAGCCCG	GCTAACTACG
481	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CGTAGGGCGC	GAGCGTTGTC	CGGAATTATT	GGGCGTAAAG

541	AGCTCGTAGG	CGGCTTGTCG	CGTCGGTTGT	GAAAGCCCGG	GGCTTAACCC	CGGGTCTGCA
601	GCCGATACGG	GCAGGCTAGA	GTTCCGTAGG	GGAGATCGGA	ATTCCTGGTG	TAGCGGTGAA
661	ATGCGCAGAT	ATCAGGAGGA	ACACCGGTGG	CGAAGGCGGA	TCTCTGGGCC	GATACTGACG
721	CTGAGGAGCG	AAAGCGTGGG	GAGCGAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA
781	ACGGTGGGCA	CTAGGTGTGG	GCAACATTCC	ACGTTGTCCG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA
841	GTGCCCCGCC	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTAAAACCTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCCG
901	CACAAGCGGC	GGAGCATGTG	GCTTAATTCG	ACGCAACGCG	AAGAACCTTA	CCAAGGCTTG
961	ACATACACCG	AAAAACCCTG	GAGACAGGGT	CCCCCTTGTG	GTCGGTGTAC	AGGTGGTGCA
1021	TGGCTGTCGT	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCSCAACGA	GCCCAACCCT
1081	TGTCCCGTGT	TGCCAGCAGG	CCCTTGTGGT	GCTGGGGACT	CACGGGAGAC	CGCCGGGGTC
1141	AACTCGGAGG	AAGGTGGGGA	CGACGTCAAG	TCATCATGCC	CCTTATGTCT	TGGGCTGCAC
1201	ACGTGCTACA	ATGGCCGGTA	CAATGAGCTG	CGATACCGCG	AGGTGGAGCG	AATCTCAAAA
1261	AGCCGGTCTC	AGTTCGGATT	GGGGTCTGCA	ACTCGACCCC	ATGAAGTCGG	AGTCGCTAGT
1321	AATCGCAGAT	CAGCATTGCT	GCGGTGAATA	CGTTCCCGGG	CCTTGTACAC	ACCGCCCGTC
1381	ACGTCACGAA	AGTCGGTAAC	ACCCGAAGCC	GGTGGCCCAA	CCCCTTGTGG	GAGGGAGCTG
1441	TCGAAGGTGG	GA CTGGCG AT	TGGGACGAAG	TCGTAACAAG	GTAGCCGTAC	CGGAAGGTGC
1501	GGCTGGTACA	CCTCCTTTCT				

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท B4 มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ B4 แสดงความคล้ายคลึง 99% กับสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Microbacterium paraoxydans* และ *Microbacterium oxydans* ดังแสดงในตารางที่ ผ-8 ทำให้ไม่มีความชัดเจนในการระบุแทกซอนในระดับสปีชีส์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ในฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ B4 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99.80% กับ *Microbacterium paraoxydans* สายพันธุ์ CF 36 ซึ่งเป็น Type strain (ตารางที่ ผ-9) ดังนั้นจึงความเป็นไปได้สูงที่จะจัดจำแนกแทกซอนของแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท B4 เป็น *Microbacterium paraoxydans*

ตารางที่ ผ-8 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จาก แอคทีโนมัยซีสไอโซเลท B4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	NR025548.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain CF36	97	99
2	EU714377.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 76	97	99
3	KF150345.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain JN 32	97	99
4	EU714354.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 3131	97	99
5	EU373400.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain TPR 04	97	99
6	EU373379.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain TPL 09	97	99
7	EU373335.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain SSR 09	97	99
8	EU373332.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain HNL 03	97	99
9	EU373321.1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain SSL 09	97	99
10	EU714372.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 58	97	99
11	KF557585.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain DH 1b	97	99

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2558 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 11 ลำดับแรก

ตารางที่ ผ-9 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จาก แอคทีโนมัยซีสไอโซเลท B4 กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	AJ491806	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF 36 ^T	100.00	99.80
2	AJ853910	<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM 12512 ^T	97.70	99.37
3	Y17227	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 ^T	99.40	99.31
4	AB004718	<i>Microbacterium luteolum</i> IFO 15038 ^T	99.00	99.16
5	X77444	<i>Microbacterium liquefaciens</i> DSM 20638 ^T	100.00	99.04

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2558 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 5 ลำดับแรก

ในการทำงานเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 พบว่า 99-98% ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่อ่านได้ (1,520 นิวคลีโอไทด์) จากยีน 16S rRNA ของ I2 แสดงความคล้ายคลึง 99% กับสปีชีส์ต่าง ๆ ในจีนัส *Streptomyces* ได้แก่ *Streptomyces levis*, *Streptomyces azureus*, *Streptomyces misionensis* และ *Streptomyces gancidicus* เป็นต้น (ตารางที่ ผ-10) และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ในฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ I2 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 99.38% กับ *Streptomyces levis* NBRC 15423 ซึ่งเป็น Type strain ดังแสดงในตารางที่ ผ-11 ในเบื้องต้นจึงได้ระบุแทกซอนของ I2 เป็น *Streptomyces levis*

เพื่อยืนยันตำแหน่งทางอนุกรมวิธานที่ชัดเจนของ B4 และ I2 จึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ B4 และ I2 ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ ผ-10 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Identity
1	NR115778.1	<i>Streptomyces levis</i> strain B-16370	98	99
2	NR044136.1	<i>Streptomyces azureus</i> strain NRRL B-2655	97	99
3	JN869290.1	<i>Streptomyces misionensis</i> strain PESB 25	98	99
4	JX042473.1	<i>Streptomyces gancidicus</i>	97	99
5	NR104281.1	<i>Streptomyces purpurascens</i> strain JMC 4509	97	99

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2558 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 5 ลำดับแรก

ตารางที่ ผ-11 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จาก แอคทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzTaxon

ลำดับ	Accession no.	Species/Strain	% Coverage	% Similarity
1	AB184670	<i>Streptomyces levis</i> strain NBRC 15423 (T)	99.00	99.38
2	AB184837	<i>Streptomyces azureus</i> strain NBRC 12744 ^T	99.90	99.11
3	AB184285	<i>Streptomyces misionensis</i> strain NBRC 13063 ^T	99.90	99.04
4	AB184660	<i>Streptomyces gancidicus</i> strain NBRC 15412 ^T	99.20	99.04
5	AB184859	<i>Streptomyces purpurascens</i> strain NBRC 13077 ^T	99.90	98.97

หมายเหตุ เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2558 ข้อมูลที่แสดงเป็นผลจากการวิเคราะห์ซึ่งแสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 5 ลำดับแรก

(2) สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคทีโนมัยซีส B4 และ I2

เพื่อให้เห็นตำแหน่งทางอนุกรมวิธานและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ชัดเจนของ แอคทีโนมัยซีสทั้ง 2 ไอโซเลท คือ B4 และ I2 จึงได้คัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA จากฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon ที่แสดงความคล้ายคลึงในระดับต่าง ๆ กับแบคทีเรียที่ศึกษา (ตารางที่ ผ-12) เพื่อสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrapping (1,000 ซ้ำ) จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี UGPMA (ภาพที่ ผ-8) บ่งชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า B4 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุดกับ *Microbacterium paraoxydans* CF36 ซึ่งเป็น Type strain โดยในคลัสเตอร์เดียวกันนี้ มี *Microbacterium oxydans* อยู่ร่วมด้วย เป็นที่สังเกตว่าสายวิวัฒนาการของแอคทีโนมัยซีส B4 และ *M. paraoxydans* CF36 แยกตัวออกจากคลัดที่ประกอบด้วย *M. paraoxydans* สายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามจากผลของความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดระหว่าง B4 และ *M. paraoxydans* (ภาพที่ ผ-8) จึงสามารถยืนยันแทกซอนของ B4 ได้เป็น *Microbacterium paraoxydans*

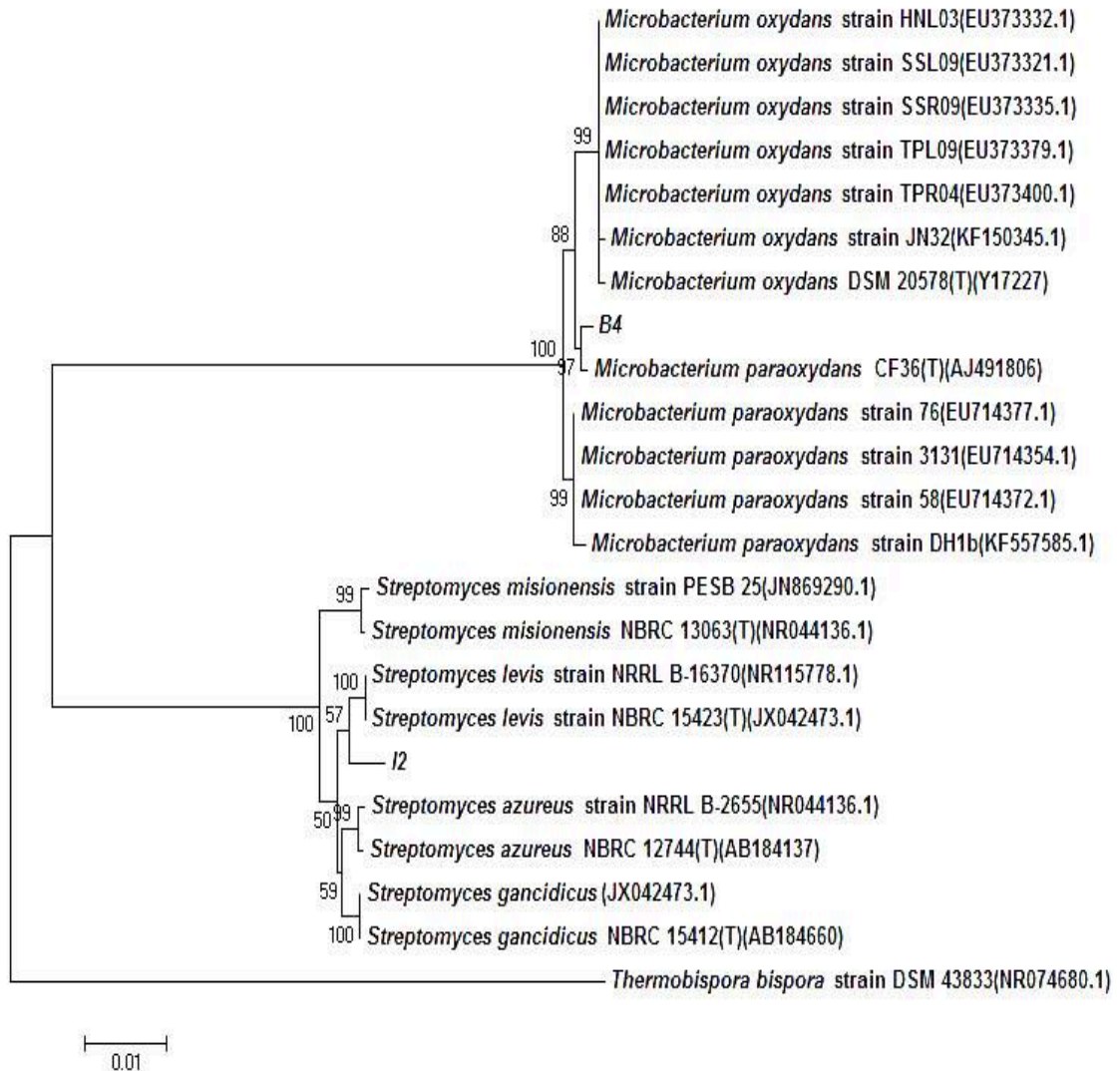
ในอีกทางหนึ่ง ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ของแอคทีโนมัยซีสไอโซเลท I2 แสดงให้เห็นถึงการมีบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *Streptomyces levis* จำนวน 2 สายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ร่วมคือ *Streptomyces levis* NBRC15423(T) และ *Streptomyces levis* B-16370 ดังแสดงในภาพที่

ผ-8 จากผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจิงระบุแทกซอนของ I2 ได้เป็น *Streptomyces levis*

ตารางที่ ผ-12 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแอกทีโนมัยซีสสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาวิเคราะห์ เพื่อสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับ B4 และ I2

ลำดับ	Strain	Accession no.	ฐานข้อมูล
1	B4	-	การศึกษานี้
2	I2	-	การศึกษานี้
3	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain CF36 (T)	AJ491806	EzTaxon
4	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 76	EU714377.1	GenBank
5	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 58	EU714372.1	GenBank
6	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain 3131	EU714354.1	GenBank
7	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain DH1b	KF557585.1	GenBank
8	<i>Microbacterium oxydans</i> strain SSR09	EU373335.1	GenBank
9	<i>Microbacterium oxydans</i> strain JN32	KF150345.1	GenBank
10	<i>Microbacterium oxydans</i> strain TPR04	EU373400.1	GenBank
11	<i>Microbacterium oxydans</i> strain TPL09	EU373379.1	GenBank
12	<i>Microbacterium oxydans</i> strain HNL03	EU373332.1	GenBank
13	<i>Microbacterium oxydans</i> strain DSM 20578 (T)	Y17227	EzTaxon
14	<i>Microbacterium oxydans</i> strain SSL09	EU373321.1	GenBank
15	<i>Streptomyces levis</i> strain NRRL B-16370	NR115778.1	GenBank
16	<i>Streptomyces levis</i> strain NBRC 15423 (T)	JX042473.1	EzTaxon
17	<i>Streptomyces azureus</i> strain NBRC 12744 (T)	AB184137	EzTaxon
18	<i>Streptomyces azureus</i> strain NRRL B-2655	NR044136.1	GenBank
19	<i>Streptomyces gancidicus</i>	JX042473.1	GenBank
20	<i>Streptomyces gancidicus</i> strain NBRC 15412 (T)	AB184660	EzTaxon
21	<i>Streptomyces misionensis</i> strain PESB 25	JN869290.1	GenBank
22	<i>Streptomyces misionensis</i> strain NBRC 13063 (T)	NR044136.1	EzTaxon
23*	<i>Thermobispora bispora</i> strain DSM 43833	NR074680.1	GenBank

หมายเหตุ * เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม (Outgroup taxon) สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของการศึกษานี้



ภาพที่ ๘-8 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคทีโนมัยซีส B4 และ I2 ที่แยกได้จาก ตะกอนดินป่าชายเลน แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี UPGMA บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่ง บนยีนเครื่องหมาย และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrap test (1000 ซ้ำ) โดยมี *Thermobispora bispora* DSM 43833 เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ สามารถจำแนกแบคทีเรีย KC3-L5 และ AS1-321R.1 ได้เป็น *Pseudomonas balearica* และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ รวมทั้งสามารถจำแนกแอคทีโนมัยซีส B4 และ I2 ได้เป็น *Microbacterium paraoxydans* และ *Streptomyces levis* ตามลำดับ ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานในระดับต่างๆ ของแบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีส ทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ ผ-13

ตารางที่ ผ-13 ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินป่าชายเลน

Taxonomic rank	Strain			
	KC3-L5	AS1-321R.1	B4	I2
Phylum	Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria	Actinobacteria
Class	Gamma-Proteobacteria	Bacilli	Actinobacteria	Actinobacteria
Order	Pseudomonadales	Bacillales	Micrococcales	Streptomycetales
Family	Pseudomonadaceae	Bacillaceae	Microbacteriaceae	Streptomycetaceae
Genus	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
Species	<i>balearica</i>	sp.	<i>paraoxydans</i>	<i>levis</i>