

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียใน  
กระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*)

GENETIC DIVERSITY OF BACTERIAL POPULATION IN  
SWAMP BUFFALO (*Bubalus bubalis*) RUMEN



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะพลศึกษาปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-AQ-M-101-989

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียใน

กระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*)

GENETIC DIVERSITY OF BACTERIAL POPULATION IN

SWAMP BUFFALO (*Bubalus bubalis*) RUMEN



ศรัณยา สติตย์มันวิวัฒน์

SARANYA SATITMANWIWAT

ช.หมู่.....  
ช.ทะเบียน..... 87071  
ม.เดือน,ปี..... 30 ส.ค. 2552

b.....  
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

บัณฑิตวิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษามาก่อน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
พ.ศ.2551

KMITL-2008-AQ-M-101-389

**GENETIC DIVERSITY OF BACTERIAL POPULATION IN  
SWAMP BUFFALO (*Bubalus bubalis*) RUMEN**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนและเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และตั้ง 2008 อิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**KMITL-2008-AQ-M-101-389**



**COPYRIGHT 2008**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES** การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น เรื่องนี้ห้ามมิให้คัดลอกไปเผยแพร่และต้องแจ้งถึงเจ้าของเอกสารฉบับนี้ที่  
**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**



หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียใน กระเพาะรูเมนของกระบือปลัก ( <i>Bubalus bubalis</i> )
นักศึกษา	นางสาวศรัณยา สถิตย์มันน์วิวัฒน์
รหัสประจำตัว	49063908
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ทักษวัน ทองอร่าม

### บทคัดย่อ

กระบือปลักเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบคุณภาพต่ำและผล  
พลอยได้ทางการเกษตร ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักประกอบด้วยระบบนิเวศวิทยาของ  
จุลินทรีย์ที่ซับซ้อน ปัจจุบันการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักยัง  
ค่อนข้างมีจำกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ  
ประชากรแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เริ่มต้น  
จากเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 3 ตัว แล้วผสม  
รวมกัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่  
มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย จากนั้นเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์กับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T  
จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  และสุ่มคัดเลือกรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับ  
พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 216 โคลน จากนั้นตรวจสอบริคอมบิแนนท์โคลนว่ามีชิ้น  
16S rRNA gene ถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวกเตอร์ด้วยการทำเทคนิคพีซีอาร์โดยตรงจากโคลนโดยใช้  
ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพลาสมิดเวกเตอร์ แล้ววิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการตัดด้วย  
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hha*I และจัดเป็นกลุ่มตามขนาดที่เหมือนกัน ได้ทั้งหมด 173 รูปแบบ  
จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นนำ  
ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 173 Phylotypes ที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย  
โปรแกรม BLASTN เพื่อหาความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลและสร้างแผนภูมิต้นไม้  
พันธุกรรม โดยใช้ค่าความเหมือนอ้างอิงที่น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดที่ยังไม่ได้  
รับการจำแนกมาก่อน ซึ่ง 56.7 เปอร์เซ็นต์ของโคลนทั้งหมดมีความเหมือนกับฐานข้อมูลน้อยกว่า  
97 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมพบ Low  
G+C gram-positive bacteria (57.8 เปอร์เซ็นต์ของโคลนทั้งหมด), *Cytophaga-Flexibacter-  
Bacteroides* (31.21 เปอร์เซ็นต์ของโคลนทั้งหมด), *Proteobacteria* (6.36 เปอร์เซ็นต์ของโคลน  
ทั้งหมด) , *Spirocheates* และกลุ่มอื่นๆ (3.7 เปอร์เซ็นต์ของโคลนทั้งหมด) จากผลการศึกษาข้างต้น  
ชี้ให้เห็นว่าประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักมีความหลากหลายสูง

<b>Thesis Title</b>	Genetic Diversity of Bacterial Population in Swamp Buffalo ( <i>Bubalus bubalis</i> ) Rumen
<b>Student</b>	Mr.Saranya Satitmanwiwat
<b>Student ID.</b>	49063908
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Agricultural Biotechnology
<b>Year</b>	2008
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Kanya Jirajoenrat
<b>Thesis Co-Advisor</b>	Dr. Takswan Thongaram

## ABSTRACT

Swamp buffalo is a ruminant that can utilize low-quality roughage feed and agricultural crop-residues. Its rumen contains a complex symbiotic microbial ecosystem. A large number of buffalo ruminal bacteria have not been identified to date. In this study, diversity of the ruminal bacteria population was investigated through comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. Rumen samples from 3 buffalos were collected from slaughter house and pooled out. Total DNA was extracted from both rumen fluids. The 16S rRNA gene fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers specific to the domain Bacteria. The PCR products were cloned into pTZ57R/T vector and transformed into the competent cells *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . For the bacterial rRNA gene, 216 clones were randomly selected and 16S rRNA gene insert was screened by PCR using plasmid vector specific primers. Inserts were grouped according to the DNA patterns after double-digestion by restriction enzymes with *Rsa*I and *Hha*I endonuclease. A total of 173 different digestion patterns were obtained from the rumen fluid library. The DNA representative from each pattern was selected for sequencing. After that 173 Phylotypes comprising nearly full length sequences (~1,500 kb in length) were subjected to on-line similarity search and phylogenetic analysis. Using less than 97% criterion similarity with the GenBank database with unidentified bacteria, 56.70 % of sequences shared less than 97% similarity. Phylogenetic analysis showed that the obtained sequences were affiliated with the following phyla: low G+C Gram-positive bacteria (53.70 %), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (30.09%), *Proteobacteria* (7.40 %), *Spirochetes* and other group (3.70 %). The results indicated that the bacterial population in swamp buffalo rumen presents a highly genetic diversity.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ทักษวัน ทองอร่าม จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร. ลีลี เอื้อวิไลจิตร ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ ดร.ปิยะนันท์ หาญพิชาญชัย คุณภรรตทพ กนกรัตน์ รวมทั้งนักวิจัยและผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ห้องปฏิบัติการวิจัยเอนไซม์ เทคโนโลยี (Enzyme Technology Laboratory) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จดี เป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับเงินสนับสนุนบางส่วนจากทุน โครงการพัฒนาบุคลากรวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระหว่าง สวทช. กับ สจล. ของสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ขอกราบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรและสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ได้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง  
ศรัณยา สติชัยมันวิวัฒน์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของกระบือปลัก.....	4
2.2 ลักษณะ โครงสร้างและระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	6
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรีย.....	13
2.4 การใช้เทคนิค Culture-independent approach เพื่อศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....	17
2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยโปรแกรม คอมพิวเตอร์.....	22
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักและการสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่าง.....	29
3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	29
3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	29

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.3 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	30
3.1.4 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลต.....	30
3.1.5 การแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....	30
3.2 การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene.....	31
3.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	31
3.2.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	31
3.2.3 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	32
3.2.4 การเตรียมเชื้อ <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ ให้เป็น Competent cell.....	32
3.2.5 การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ Competent cell <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	33
3.2.6 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม.....	33
3.2.7 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์.....	33
3.2.8 วิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> และ <i>HhaI</i> .....	33
3.2.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	35
3.2.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	36
3.3 การวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....	36
3.3.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	36
3.3.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยแผนภูมิต้นไม้ พันธุกรรม.....	36
3.3.3 การขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์.....	37
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	38
4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	38
4.2 การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene.....	40
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	40
4.2.2 ผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์.....	41

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.3 ผลการโคลนผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และ ทรานส์ฟอร์มพลาสมิดคือเอ็นเอลูกผสมเข้า Competent cell <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	42
4.3 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม.....	43
4.3.1 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์.....	43
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ (RFLP).....	44
4.3.3 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	45
4.4 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....	46
4.4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	46
4.4.2 ผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยแผนภูมิต้นไม้ พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis).....	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	58
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	65
ภาคผนวก ก.....	65
ภาคผนวก ข.....	67
ภาคผนวก ค.....	72
ประวัติผู้เขียน.....	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จำนวนแบคทีเรียในกระป๋องและโคที่ได้รับฟางข้าว และฟางข้าวหมักยูเรีย.....	13
4.1 คุณภาพและปริมาณจีโนมิกส์เอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระป๋องปลักที่ได้จากการ วัดค่าการดูดกลืนแสง.....	40
4.2 การจัดประเภทของโคลนและ Phylotypes ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่มาจาก Swamp buffalo rumen fluid library.....	48
ค 1 ผลการจำแนกโคลนจาก Rumen fluid library ของกระป๋องปลักโดยใช้โปรแกรม BLASTN จาก ฐานข้อมูล GenBank และ Similarity Classifier จากฐานข้อมูล RDP-II .....	73



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระบือปลัก.....	5
2.2 แสดงกระเพาะส่วนต่างๆของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	6
2.3 สภาพภายในกระเพาะรูเมน.....	7
2.4 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องแรกเกิดถึง 20 วันแรก.....	11
2.5 แสดงส่วนประกอบของไรโบโซมของโพรคาริโอต.....	14
2.6 โครงสร้างทุติยภูมิของ 16S rRNA gene ของ <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.7 แสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มหลักจากข้อมูล 16S rRNA gene.....	17
2.8 แสดงเทคนิค Culture-independent approachที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน.....	18
2.9 แสดงเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).....	20
2.10 ขั้นตอนการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม.....	23
4.1 ผลจีโนมิกส์เอ็นเอทีที่ได้จากการสกัดเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	39
4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	41
4.3 ผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์.....	42
4.4 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบ โคลนว่ามีชิ้น 16S rRNA gene.....	43
4.5 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> และ <i>HhaI</i> .....	44
4.6 แสดงแผนภูมิความหลากหลายของดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Gel ComparII <sup>®</sup> .....	45
4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป.....	46
4.8 กราฟแสดงไฟลัมต่าง ๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง (173 Phylotypes) กับฐานข้อมูลRDP-II.....	49
4.9 กราฟแสดง Sourceต่าง ๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง (173 Phylotypes) กับฐานข้อมูล GenBank.....	50
4.11 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	55

# สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.11 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C gram- positive bacteria (LGCGPB) ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	56
4.11 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย ( <i>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides</i> , CFB) ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก.....	57
ก 1 แสดงการเก็บของเหลวในกระเพาะหมักของกระบือปลักหลังฆ่า.....	66
ข 1 แสดงแผนที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	71



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบือปลักเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในตระกูล Bovidae มีกลไกและระบบการย่อยอาหารที่ยู่ยากซับซ้อน โดยกระเพาะของกระบือปลักแบ่งเป็น 4 ส่วน คือ กระเพาะรูเมน (Rumen) กระเพาะเรติคูลัม (Reticulum) กระเพาะโอม่าซัม (Omasum) และกระเพาะอะโบมาซัม (Abomasum) โดยที่กระเพาะรูเมนเป็นส่วนของกระเพาะที่มีความสำคัญมากและมีขนาดใหญ่ที่สุด เนื่องจากกระบวนการหมักย่อยอาหารทั้งหมดจะเกิดขึ้นในบริเวณนี้ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ภายในกระเพาะรูเมนส่วนล่าง บรรจุของเหลวที่มีอาหารละเอียดแขวนลอยอยู่ รวมทั้งโภชนาที่ละลายได้ ขณะที่ส่วนบนมีชิ้นอาหารหยาบแขวนลอยอยู่และภายในกระเพาะรูเมนยังมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมากโดยจะพบ จุลินทรีย์อาศัยอยู่ในตัวสัตว์ตั้งแต่อายุประมาณ 6 สัปดาห์ โดยติดมากับน้ำ อาหาร หรือการสัมผัสกับตัวสัตว์ใหญ่ (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) สำหรับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา (เมธา วรณพัฒน์. 2533) พบว่าแบคทีเรียมีปริมาณมากที่สุดในการหมักย่อยที่เกิดขึ้น จะถูกควบคุมโดยสมดุลของระบบนิเวศวิทยาภายในกระเพาะรูเมน ซึ่งเป็นสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 37-40 องศาเซลเซียสและมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 5-7 (Woolcock. 1991)

กระบือมีอุปนิสัยในการกินที่ต่างจากโค คือ สามารถกินหญ้าที่มีคุณภาพต่ำที่ขึ้นตามธรรมชาติหรือวัชพืช แม้แต่ผักตบชวาก็สามารถใช้เลี้ยงกระบือได้ ลักษณะการแทะเล็มของกระบือจะกินถึงโคนต้นหญ้าและดึงอย่างรุนแรงซึ่งต่างจากโคที่แทะเล็มเฉพาะส่วนยอด (วิวัฒน์ ชวนะนิกุล. 2531) ดังนั้นกระบือจึงสามารถใช้ประโยชน์จากหญ้าธรรมชาติที่เป็นวัชพืชฟางข้าวคุณภาพต่ำได้ดีกว่าในโคเนื่องจากระบบย่อยอาหารที่ยาวกว่าโค (กรมปศุสัตว์. ม.ป.ป.) นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) ที่มากกว่า จึงทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือมีมากกว่าในโคด้วยเช่นกัน (สุรชัย สุวรรณลี. 2546; Wanapat. 2001)

การจำแนกชนิดและความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการศึกษา เพื่อการเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม โดยเดิมทีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปจะอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัด เนื่องจาก

จุลินทรีย์บางกลุ่มยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ ทำให้จุลินทรีย์บางส่วนยังไม่เคยมีการตรวจพบ รวมทั้งไม่มีการศึกษาและรายงานมาก่อน นอกจากนี้ระยะเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ (Kamara. 2005) ในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมาการวิเคราะห์ในระดับจีโนมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการตรวจสอบความหลากหลายของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูง ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม รวมทั้งยังสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่ยากต่อการเพาะเลี้ยงได้ (ศรีสุภา ธรรมวิชูกร. 2004) โดย 16S rRNA gene เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดีในการใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็น โมเลกุลยูคโบริดและมีการอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการตรวจหาและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (Madigan and Martinko. 2006) โดยความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับเบสของยีน (Zhengdong *et al.* 2002)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ โดยวิธีทางจีโนมเลกุลนั้นยังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้ได้สนใจศึกษาการตรวจวิเคราะห์ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทางชีวภาพด้วยคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics) ที่สามารถจำแนกชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic Tree) ได้ เพื่อเป็นการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานและคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ออกมาใช้ในงานปศุสัตว์และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene
- 2) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

## 1.3 สถานที่ดำเนินงาน

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- 2) ห้องปฏิบัติการวิจัยเอนไซม์เทคโนโลยี หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ในด้านการค้า ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี

## 1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก นำมาสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอแบคทีเรียและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVb จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ Competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่อมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรแบคทีเรียรวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถจำแนกชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic Tree) ได้
- 2) ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การประยุกต์และคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ออกมาใช้ในงานปศุสัตว์และงานด้านอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ข้อมูลทั่วไปของกระบือปลัก

#### 2.1 การจำแนกกระบือทางสัตววิทยา

กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง(Ruminant) คำว่า Ruminant มาจากรากศัพท์ภาษาละติน Ruminare แปลว่าเคี้ยวซ้ำ (Chew over again) โดย Cockrill (1974) รายงานการจำแนกกระบือตามหลักสัตววิทยา ดังนี้

Kingdom: Animal

Phylum : Chordata

Class : Mammalia

Order : Artiodactyla

Suborder: Ruminantia

Family : Bovidae

Genus : *Bovina*

*Bubalina*

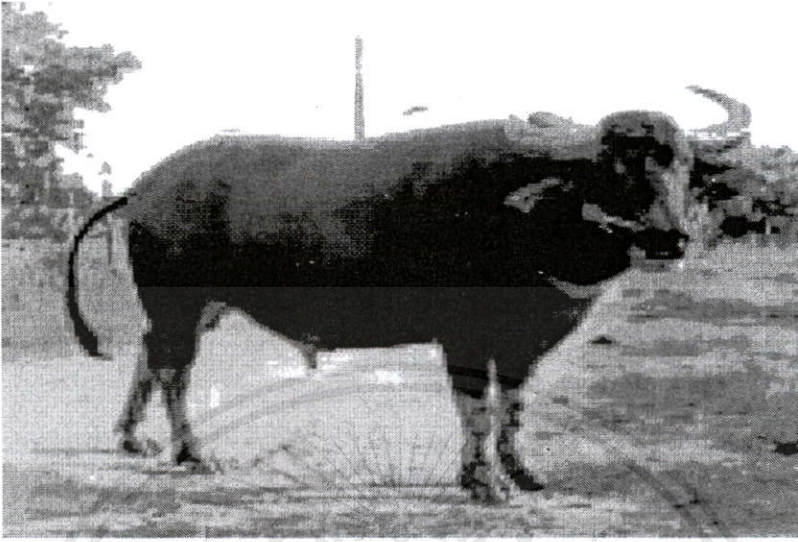
*Syncerina*

ใน Genus นี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 *Bovina* ได้แก่ โคยัคหรือจามรี (Yak) ไบซันหรือควายอเมริกา (Bison) กลุ่มที่ 2 *Bubalina* ได้แก่ กระบืออินเดีย กระบือทามารอ (Tamaraw) กระบือแอนเนา (Anoa) กระบือปลัก (Swamp buffalo) และกระบือแม่น้ำ (River buffalo) กลุ่มที่ 3 *Syncerina* ได้แก่ กระบือแอฟริกา (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

#### 2.1.2 กระบือปลัก (Swamp buffalo)

กระบือปลักมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ "*Bubalus bubalis*" เป็นกระบือเลี้ยงที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยและพบมากในแถบประเทศจีนตอนล่าง ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชา มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มีโครโมโซม 48 แท่ง ( $2n = 48$ ) กระบือปลักชอบแช่ปลักโคลนในเวลาที่อากาศร้อน โดยใช้เวลานานแช่ปลักวันละหลายชั่วโมง จึงเป็นเหตุให้มีชื่อเรียกว่า กระบือปลัก โดยพยายามตีปลักจนเป็นโคลนและใช้โคลนพอกส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อระบายความร้อนออกจากร่างกายและป้องกันความร้อนจากแสงแดด (จรัญ จันทลักขณา. 2527) ซึ่ง

ส่วนใหญ่จะถูกเลี้ยงเพื่อใช้งานเป็นหลัก และเมื่อเลิกใช้งานหรือไม่สามารถใช้งานได้แล้วก็จะถูกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์



ภาพที่ 2.1 กระบือปลัก

ที่มา: กองบำรุงพันธุ์สัตว์ (2546)

#### 2.1.2.1 การเลี้ยงและอาหารของกระบือ

การเลี้ยงกระบือของประเทศไทยส่วนใหญ่เลี้ยงดูโดยเกษตรกรรายย่อย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบการเกษตรไทย เพราะเลี้ยงดูง่ายและสามารถเพาะเล็มวัชพืชที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ตามธรรมชาติรวมทั้งพืชอาหารสัตว์คุณภาพต่ำได้ดี

1) แหล่งอาหารของกระบือ กระบือเป็นสัตว์ที่กินอาหารง่ายไม่ค่อยเลือก ซึ่งอาหารหลักของกระบือ คือ อาหารหยาบ และอาหารข้นเป็นอาหารเสริม โดยแหล่งอาหารส่วนใหญ่ของกระบือในฤดูฝน คือ หญ้าธรรมชาติตามคันนาหรือพื้นที่ป่าสาธณะของหมู่บ้าน ในขณะที่ฤดูแล้งหลังเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว ฟางข้าวที่เหลืออยู่ในท้องนา คือ แหล่งอาหารหลัก นอกจากนี้พืชพื้นบ้านชนิดต่าง ๆ ที่ขึ้นอยู่ทั่วไปตามคันนา หัวไร่ปลายนา ที่กร้าง ป่าสงวน พุ่มเลี้ยงสัตว์สาธณะก็ใช้เลี้ยงกระบือได้ ผักตบชวา ต้นหนุ่ยน้ำชนิดต่าง ๆ แม้แต่ใบสาบเสือ กระบือก็กินได้ในยามขาดแคลน (สุรชัย สุวรรณดี. 2546; อัญชติ ณ เชียงใหม่. ม.ป.ป.)

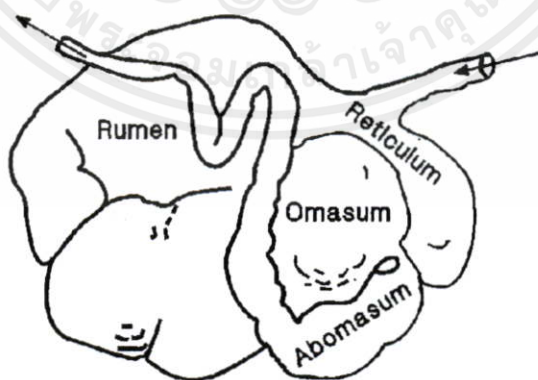
2) พฤติกรรมการเพาะเล็มอาหารของกระบือ อุบัติสัยในการกินของกระบือนั้นไม่เลือกหญ้าที่กินเหมือนโค โดยกระบือกินหญ้าเกือบทุกชนิดและสามารถกินหญ้าคุณภาพต่ำที่ขึ้นตามธรรมชาติหรือที่เป็นวัชพืชได้ แม้แต่ผักตบชวา ก็สามารถใช้เลี้ยงกระบือได้ ลักษณะการเพาะเล็มของกระบือจะกินถึงโคนต้นหญ้าและดึงอย่างรุนแรง ซึ่งต่างจากโคที่เพาะเล็มเฉพาะส่วนยอด กระบือมีความสามารถในการย่อยอาหารได้ดีกว่าโค เนื่องจากการกิน อัตราการย่อยอาหาร ปริมาณ

และชนิดของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ขนาดของกระเพาะและลำไส้ อาหารอยู่ในรูเมนมากกว่า กินอาหารไม่ค่อยเลือก การดูดซึมอาหารดี และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ยากลำบาก (จรัญ จันทลักษณ์. 2527)

## 2.2 ลักษณะโครงสร้างและระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของกระบือ

กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยระบบทางเดินอาหารมีลักษณะคล้าย ๆ กับของโค ยกเว้น ลิ้นและตับ ซึ่งลิ้นของกระบือจะสั้นกว่า เรียบและกลมน้อยกว่าโค ส่วนตับของกระบือมีลักษณะกลมกว่า ขนาดใหญ่กว่า และหนากว่าของโค (เมธา วรณพัฒน์. 2533) โดยมีกระเพาะทั้งหมด 4 ส่วน และกระเพาะทั้ง 4 ส่วนนี้ไม่ได้เรียงกันตามลำดับความสำคัญ แต่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ดังภาพที่ 2.2 คือ

- 1) กระเพาะเรติคูลัม (Reticulum) ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมดอาหารในรูปของแข็งและเหลวสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้สะดวก
- 2) กระเพาะรูเมน (Rumen) ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมด
- 3) กระเพาะโอม่าซั่ม (Omasum) ประมาณ 7 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมด เป็นทางผ่านอาหารและดูดซึมของเหลวกลับทำให้อาหารมีลักษณะแห้งสะดวกในการเคลื่อนที่ลงสู่กระเพาะจริง
- 4) กระเพาะอะโบมาซั่ม (Abomasum) ประมาณ 7-8 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมด ทำหน้าที่ทุกอย่างคล้ายกับกระเพาะของสัตว์กระเพาะเคี้ยว เพราะภายในมีต่อมที่ทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อยกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อเมือก ส่วนปลายของกระเพาะเปิดเข้าสู่ส่วนลำไส้เล็ก



ภาพที่ 2.2 กระเพาะส่วนต่าง ๆ ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

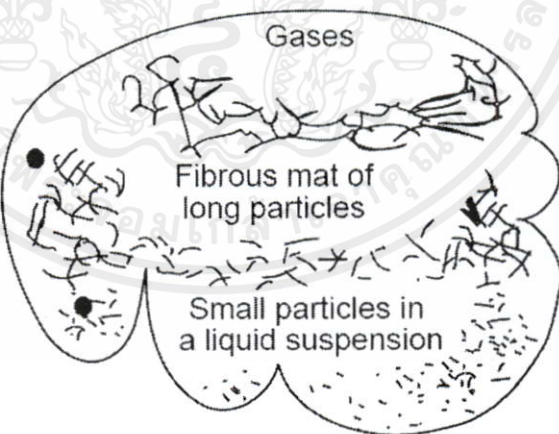
ที่มา: Church (1969)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าลูกสัตว์เกิดใหม่ กระเพาะ 2 ส่วนแรก คือ กระเพาะเรติคูลัมและกระเพาะรูเมนยังไม่พัฒนา โดยมีขนาดเพียง 35 เปอร์เซ็นต์ของกระเพาะทั้งหมด (ฉลอง วชิราภากร. 2541; อุทัย หนูแดง. 2543)

### 2.2.1 ลักษณะของกระเพาะรูเมน

กระเพาะรูเมนเป็นส่วนของกระเพาะแรกของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีขนาดใหญ่กว่ากระเพาะอื่น ๆ โดยส่วนหน้าเชื่อมติดกับหลอดอาหารและส่วนท้ายเชื่อมติดกับกระเพาะเรติคูลัม ซึ่งกระเพาะรูเมนนี้มีขอบเขตจากกระบังลมจนถึงส่วนเชิงกรานและอยู่ทางด้านซ้ายของช่องท้อง (วิโรจน์ จันทรัตน์. 2540) ภายในมีคุ่มขนอยู่ทั่วไปตามผนัง และผนังด้านในมีสันเป็นแถบ ๆ โดยมีความจุประมาณ 130 ถึง 202 ลิตร ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากอาศัยอยู่ ส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรีย นอกจากนั้นเป็น โปรโตซัวและเชื้อรา จุลินทรีย์จะอาศัยอยู่ในบริเวณนี้ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด กระเพาะรูเมนนี้มีสภาพเป็นถังหมักขนาดใหญ่ ด้านล่างบรรจุของเหลว มีอาหารละเอียดแขวนลอยอยู่ รวมทั้งโภชนาที่ละลายได้ มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในส่วนนี้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยอาศัยโภชนาที่ละลายได้เป็นอาหาร ส่วนด้านบนมีชั้นอาหารหยาบลอยอยู่ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมดจะติดกับชั้นอาหารเหล่านี้ เพื่อทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลาย อีก 5 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์จะเกาะอยู่กับผนังกระเพาะรูเมนหรืออยู่กับโปรโตซัว (ภาพที่ 2.3) (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)



ภาพที่ 2.3 สภาพภายในกระเพาะรูเมน

ที่มา: Wattiaux and Howard (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การย่อยอาหาร ในกระเพาะรูเมนเกิดจากการย่อยโดยวิธีกลและวิธีเคมี การย่อยโดยวิธีกลเป็นการย่อยที่เกิดจากการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะรูเมน ทำให้อาหารมีขนาดเล็กลงนอกจากนี้ ยังมีส่วนช่วยในการขยอกอาหารเพื่อกลับไปเคี้ยวเอื้องใหม่ในปากด้วย สำหรับการย่อยโดยวิธีเคมีที่

เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนเกิดจากผลของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน (ศรีสกุล วรจันทร์. 2539) จุลินทรีย์จะทำหน้าที่เปลี่ยนอาหารที่กินเข้าไปให้เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เหมาะสมกับการที่สัตว์จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเปลี่ยนเป็นเนื้อและนม เช่น อาหารคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยให้ได้ผลผลิตสุดท้าย ได้แก่ กรดไขมันระเหยได้ (Volatile fatty acid, VFA) และกรดแลคติก ส่วนอาหารโปรตีนจะถูกย่อยจนได้ผลผลิตสุดท้าย คือแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) และอื่น ๆ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์ หลังจากผ่านกระบวนการหมักย่อยโดยจุลินทรีย์แล้ว ของเหลวเหล่านี้จะไหลสู่กระเพาะและลำไส้เล็กตามลำดับ เซลล์ของ จุลินทรีย์ที่ถูกย่อยในทางเดินอาหารจะกลายเป็นแหล่งโปรตีน (Microbial protein) ดังนั้นจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจึงนับว่ามีความสำคัญมากในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล. 2541)

### 2.2.2 สภาพของสิ่งที่อยู่ในกระเพาะรูเมน

กระเพาะรูเมนมีขนาดใหญ่และเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยอาหาร ดังนั้น กระเพาะรูเมนจึงมีสภาพที่เหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ (ฉลอง วชิราภากร. 2541) ได้แก่

1) ปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter content) วัตถุแห้งที่อยู่ในกระเพาะรูเมนมักจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่กินว่าเป็นอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น หญ้าหมัก หรือหญ้าสด หรือเป็นอาหารแห้ง เช่น หญ้าแห้ง ฟาง แต่โดยปกติปริมาณวัตถุแห้งจะอยู่ในช่วง 10-15 เปอร์เซ็นต์

2) อุณหภูมิภายใน (Temperature) ภายในกระเพาะรูเมนมีอุณหภูมิประมาณ 38-42 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิของตัวสัตว์โดยทั่วไป

3) ความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน (Rumen pH) ความจริงแล้วกรดที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนมีปริมาณมากพอที่จะทำให้ pH ลดลงเหลือ 2.5 ถึง 3.0 ได้ แต่เนื่องจากฟอสเฟตและไบคาร์บอเนตในน้ำลายที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์คอยช่วยด้านความเป็นกรดนี้ไว้ ขณะเดียวกันกรดที่เกิดขึ้นนี้ก็จะถูกดูดซึมผ่านผนังกระเพาะรูเมนออกไปอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ pH ในกระเพาะไม่ลดลงมากนัก

4) Oxidation-reduction potential สภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) เนื่องจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่เป็นประเภทที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Obligate anaerobic condition) ถ้าขาดออกซิเจนจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

### 2.2.3 ระบบย่อยอาหารและเมแทบอลิซึมของกระบือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า มีอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดก็ตามโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์สงวนลิขสิทธิ์ไว้  
 ราชอาณาจักรไทย  
 ในกระบือปลักสูงกว่าในโคประมาณ 5-7 เปอร์เซ็นต์ (จรัญ จันทลักษณ์. 2527; Castillo. 1981; Wanapat *et al.* 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนมีสูง

กว่าในโค โดยกระบือปลักมีการเก็บกักไนโตรเจนได้มากกว่าโคซึ่งอาจเป็นผลมาจากไคมีประสิทธิภาพในการดูดกลับมากกว่าโค (Devendra. 1985) และพบว่าระดับแอมโมเนียในโตรเจนในกระเพาะรูเมนของกระบือมีมากกว่าในกระเพาะรูเมนของโคเมื่อได้รับอาหารหยาบคุณภาพต่ำเหมือนกัน เช่น ฟางข้าว ซึ่งปริมาณแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนที่มีมากกว่าทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักมีมากกว่าในโค (Suwanlee and Wanapat. 1994) และระดับแอมโมเนียในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ และการย่อยได้ของอาหารอยู่ระหว่าง 13-17 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (13-17 มิลลิกรัมในของเหลวในกระเพาะรูเมน 100 มิลลิลิตร) ความแตกต่างของระบบย่อยอาหารและเมแทบอลิซึมของกระบือเปรียบเทียบกับโค มีดังนี้คือ

#### 1) ความจุของกระเพาะ

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างโคกับกระบือปลัก โดยความจุของอาหารในกระเพาะรูเมน (Digesta) มีประมาณ 245-295 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่ากระบือปลักมีขนาดของกระเพาะรูเมนและระบบย่อยอาหารทั้งหมดมากกว่าโค (สุรชัย สุวรรณดี. 2546)

#### 2) การเคลื่อนไหวของกระเพาะรูเมนและอัตราการไหลผ่านของอาหาร

Kennedy *et al.* (1992) รายงานว่า อัตราการบีบตัวของกระเพาะรูเมน (Contractive rate) ของกระบือปลักต่ำกว่าของโคประมาณ 8-20 เปอร์เซ็นต์ แต่ขนาดของแรงบีบของกระเพาะรูเมนของกระบือปลักมากกว่าของโคประมาณ 79-136 เปอร์เซ็นต์ จึงส่งผลให้อัตราการไหลผ่านของของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักสูงกว่าของโคตั้งแต่ 10-80 เปอร์เซ็นต์

#### 3) ขนาดอาหาร

กระบือปลักมีการเคี้ยวเอื้องนานกว่าโคที่ได้รับอาหารชนิดเดียวกันและปริมาณเท่ากัน 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้อาหารไหลผ่านระบบย่อยอาหารเร็วกว่าโค (สุรชัย สุวรรณดี. 2546)

#### 4) การเจริญเติบโตของกระบือปลัก

Kantapanit *et al.* (1972) พบว่า กระบือมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 600 กรัม/วัน ซึ่งใกล้เคียงกับโคลูกผสมพื้นเมือง-บราห์มัน แต่ต่ำกว่าโคลูกผสมพื้นเมือง-สายเลือดยุโรป ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโต 900 กรัม/วัน

### 2.2.4 ประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

จุลินทรีย์ที่พบอยู่ในกระเพาะรูเมนมีหลายชนิด โดย Hungate (1996) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมนจะต้องมีชีวิตอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน จะต้องสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ชนิดใดชนิดหนึ่งที่พบในกระเพาะรูเมนเท่านั้นและจะต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 1 ล้านตัว/กรัมของปริมาณกระเพาะรูเมน โดยจุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมนนั้นมี 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

แบคทีเรีย โปรโตซัวและเชื้อรา แต่ชนิดและสัดส่วนของจุลินทรีย์อาจแปรผันไปได้ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโภชนาประเภทที่เกิดการหมักย่อยได้ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมด คือ  $10^9$ - $10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541; Woolcock. 1991)

#### 2.2.4.1 ปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ มีดังนี้ (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

##### 1) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย

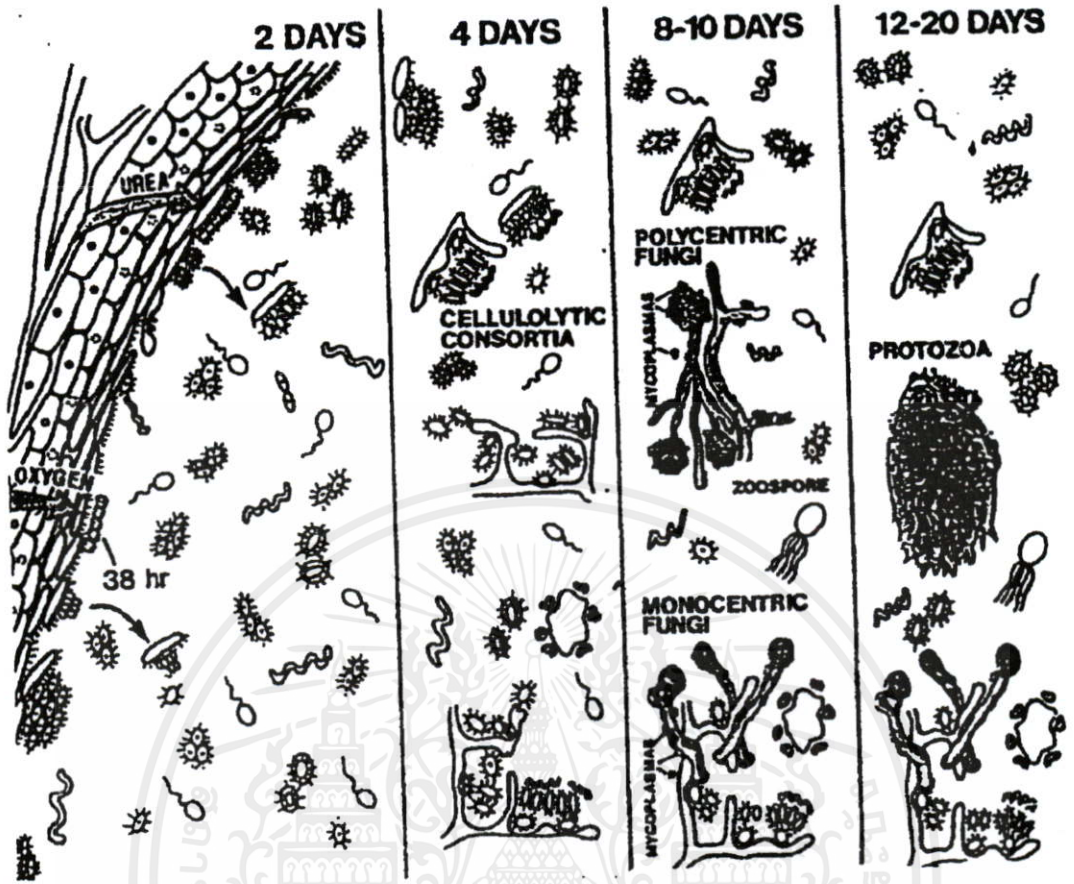
แบคทีเรียไม่ว่าจะอยู่บนชิ้นอาหารหรืออาศัยอยู่บนผนังกระเพาะรูเมนจะมีปฏิสัมพันธ์กันในแง่บวก คือ แบคทีเรียกลุ่มหนึ่งจะเจริญได้ดีต้องอาศัยผลผลิตสุดท้ายจากแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่ง กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในกระเพาะรูเมนของการเปลี่ยนจากเซลลูโลสเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนและกลุ่มที่ใช้ไฮโดรเจน ซึ่งในกระเพาะรูเมนนั้นมีแบคทีเรียหลายกลุ่มที่มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดในด้านส่ง เสริมกัน (Syntropic association)

##### 2) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย-โปรโตซัว-เชื้อรา

แบคทีเรียมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อราในด้านบวก แต่จะมีปฏิสัมพันธ์กับโปรโตซัวในด้านลบ คือ โปรโตซัวเป็นพวกที่กินและย่อยแบคทีเรียทำให้ชีวมวลของแบคทีเรียที่อยู่ในของเหลวในกระเพาะรูเมนลดลง ซึ่งจะมีผลกระทบต่ออัตราการย่อยเยื่อใย นอกจากนี้โปรโตซัวยังเป็นคู่แข่งของแบคทีเรียในการใช้แป้งและน้ำตาล

ประมาณครึ่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกระเพาะรูเมนเป็นแบคทีเรียโดยมีมากกว่า 200 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ (Hungate. 1996) การกระจายตัวของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนอยู่ในรูปลอยตัวอิสระในของเหลวในกระเพาะรูเมนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด และอีก 70 เปอร์เซ็นต์จะยึดติดกับอาหารและผนังของกระเพาะรูเมนหรือยึดติดกับโปรโตซัว (Qrskov and Ryle. 1990)

Fonty *et al.* (1991) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มแรกที่พบในสัตว์แรกเกิด คือแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) ซึ่งพบจากสัตว์ที่เกิดได้ 4 วัน โดยช่วง 2 วันแรกหลังสัตว์เกิดจะมีการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ยูเรียโดยเกาะยึดอยู่บริเวณผิวผนังกระเพาะรูเมนแต่มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในระยะ 3-4 วันหลังก็จะพบว่าการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่สามารถใช้ประโยชน์จากเยื่อใยหรือเซลลูโลสเกิดขึ้น โดยเกาะยึดอยู่ตามเศษอาหารในกระเพาะรูเมน ในช่วง 8-10 วันก็จะเริ่มมีการเจริญของกลุ่มเชื้อรา ได้แก่ Monocentric และ Polycentric เกิดบนชิ้นอาหาร เชื้อราจะเกาะบริเวณผิวของเศษอาหารและช่วยย่อยสลายพวกเซลลูโลส ส่วนโปรโตซัวจะพบหลังสัตว์เกิดในช่วง 12-20 วัน ซึ่งเป็นไปได้เพราะว่ามีกลุ่ม Cellulolytic bacteria และ Methanogenic bacteria ร่วมด้วย (ภาพที่ 2.4) (Cheng *et al.* 1991)



ภาพที่ 2.4 การเจริญของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องแรกเกิดถึง 20 วันแรก  
ที่มา: Cheng *et al.* (1991)

#### 2.2.4.2 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

แบคทีเรียสามารถจำแนกได้ตามประเภทอาหารที่ใช้และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สร้างขึ้น (ฉลอง วชิรภกร. 2541; Kamara. 2005)

1) แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะใช้เซลลูโลส โดยมีการผลิตเซลลูเลสเข้าย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้อาจย่อยเซลโลไบโอสซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีมากที่สุดในการเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก แบคทีเรียชนิดที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bacteroides succinogenes* ในบางขณะ *Cillobacterium cellulosolvens* และ *Clostridium spp.* ต่าง ๆ ก็มีส่วนช่วยในการย่อยเซลลูโลส โดย Hungate (1966) ทำการแยกเชื้อ *Clostridium lochhaedii* จากกระเพาะรูเมนของโคที่ได้รับอาหารหยาบที่ผ่านการปรุงแต่งด้วยเกลือ (Salt-Treated Roughages) *Clostridium lochhaedii* เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างสปอร์ แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น คือ มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายเท่า

2) แบคทีเรียที่ย่อยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulolytic bacteria) โดยปกติแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ก็จะสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย ได้แก่ *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospira multiparens* และ *Bacteroides rumenicola* เป็นต้น

3) แบคทีเรียที่ย่อยอะไมโลส (Amylolytic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้จะมีเป็นจำนวนมากในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารชั้นที่มีอะไมโลสอยู่สูง ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Bacteroides amylophilus*, *Succinimonas amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* และ *Bacteroides rumenicola* เป็นต้น จะเห็นว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสหลายสปีชีส์สามารถที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย

4) แบคทีเรียย่อยกรด (Acid-utilizing bacteria) มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้กรดต่าง ๆ ได้ เช่น กรด Formic, Acetic, Malic, Fumaric, Lactic และ Succinic แบคทีเรียจำพวกนี้ได้แก่ *Veillonella gazogenes*, *V. alcalescens*, *Propionic bacterian sp.*, *Selemonas ruminantium*, *Reptostreptococcus elsdenii* และ *Selemonas lactilytica* เป็นต้น

5) แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic bacteria) แบคทีเรียหลาย ๆ สปีชีส์จะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium sporogens* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

6) แบคทีเรียผลิตแอมโมเนีย (Ammonia-producing bacteria) ได้แก่ *Bacteroides rumenicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Reptostreptococcus elsdenii* และ *Butyrivibrio spp.*

7) แบคทีเรียที่สังเคราะห์มีเทน (Methanogenic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างแก๊สมีเทนจากการแตกตัวของ Formate เป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Methanobacterium ruminantium* และ *M. formicicum*

8) แบคทีเรียที่ย่อยไขมัน (Lipolytic bacteria) แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการใช้กลีเซอรอล แต่ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าสปีชีส์ใดที่มีความสามารถในการย่อยไขมันได้กลีเซอรอล

9) แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (Vitamin-synthesising bacteria) ถึงแม้จะทราบว่าแบคทีเรียหลายสปีชีส์มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบีคอมเพลกซ์ได้ แต่การศึกษายังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าเป็นสปีชีส์ใด

#### 2.2.4.3 จำนวนแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

Prasad and Pradhan (1990) ศึกษาเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในกระบือแพะและโคที่ได้รับอาหารเหมือนกัน พบว่ากระบือมีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $9.9 \times 10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมเศษอาหารแห้ง และต้องอ้างอิงถึงค่าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ มิลลิกรัมมากกว่าแพะ ( $3.37 \times 10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม) และในโค ( $2.73 \times 10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม)

Pradhan *et al.* (1991) รายงานว่าจำนวนแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือเท่ากับ  $1.62 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิกรัมมากกว่าในโค ซึ่งมีเท่ากับ  $1.32 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิกรัม

Wanapat *et al.* (1999) รายงานว่า จำนวนแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นที่พบในกระบือและโคที่ได้รับฟางข้าวและฟางหมักยูเรียเป็นอาหาร มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เช่น แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส, แบคทีเรียที่สร้าง โพรพิโอนิกและแบคทีเรียที่ย่อยอะไมโลสในกระบือสูงกว่าในโค (ตารางที่ 2.1)

**ตารางที่ 2.1** จำนวนแบคทีเรียในกระบือและโคที่ได้รับฟางข้าวและฟางข้าวหมักยูเรีย

ลักษณะที่ศึกษา	กระบือ		โค		SEM
	ฟางข้าว	ฟางหมักยูเรีย	ฟางข้าว	ฟางหมักยูเรีย	
แบคทีเรีย ( $\times 10^{11}$ cell/ml)	18.3	20.6	10.0	9.5	2.8
แบคทีเรียทั้งหมด ( $\times 10^{11}$ colony/ml)	2.86	3.09	1.64	2.57	0.31
Cellulolytic bacteria ( $\times 10^{10}$ colony/ml)	3.14	8.22	2.36	3.94	1.13
Proteolytic bacteria ( $\times 10^{10}$ colony/ml)	4.93	6.20	2.06	3.98	0.75
Amylolytic bacteria ( $\times 10^{10}$ colony/ml)	3.08	4.48	2.83	3.53	0.42

SEM: Standard error of the mean

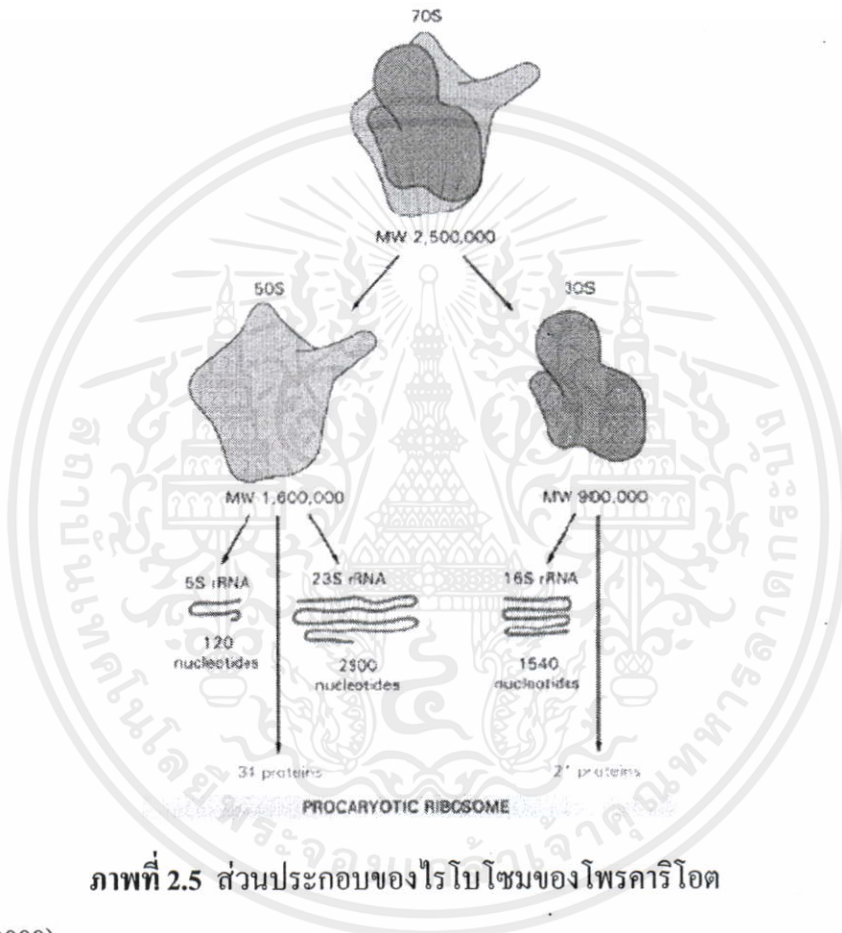
ที่มา: ดัดแปลงจาก Wanapat *et al.* (1999)

### 2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรีย

การตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture dependent method) เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลา ค่าใช้จ่าย และแรงงานมาก นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้จริง เช่น pH แหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้จริงทั้งหมด ในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา การวิเคราะห์ในระดับอนุชีววิทยา (Molecular biology หรือ Culture-independent method) ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากเนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกประเภท (Zhengdong *et al.* 2002; Kamara. 2005) และปัจจุบันวิธีเปรียบเทียบกับวิธีการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้อย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน โดย Ribosomal RNA gene ถูกเลือกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย (เจษฎา เคนดวงบริพันธ์. 2545)

### 2.3.1 ข้อมูล Ribosomal RNA (rRNA) และการใช้ 16S rRNA gene

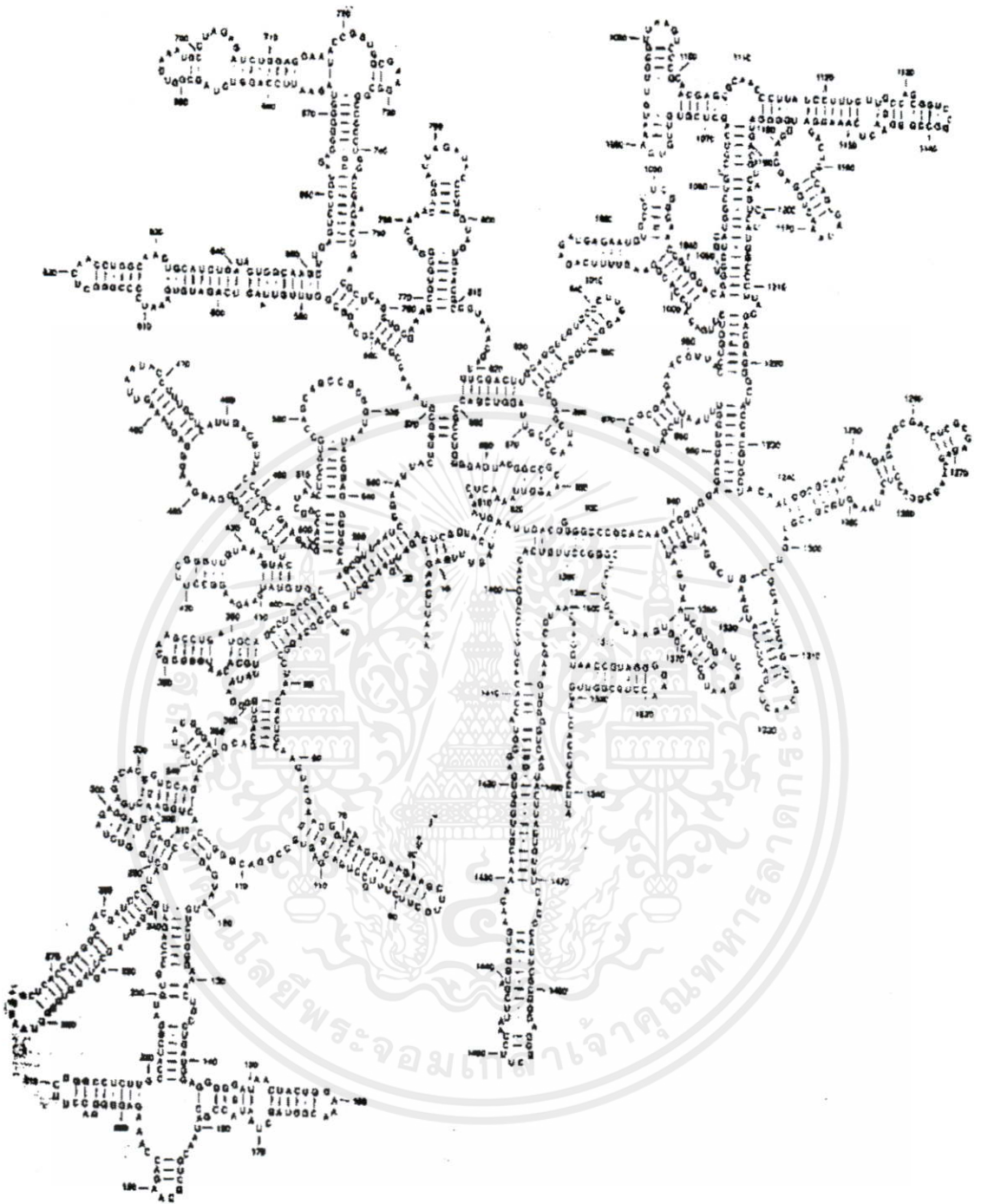
ไรโบโซมของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยใหญ่ขนาด 50S (Large subunit) และหน่วยเล็กขนาด 30S (Small subunit) โดยหน่วยใหญ่ประกอบด้วย 23S rRNA ขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน 34 ชนิด ส่วนหน่วยเล็กประกอบด้วย 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ส่วนประกอบของไรโบโซมของโพรคาริโอต

ที่มา: Karp (2000)

rRNA เหมาะสำหรับนำมาศึกษาวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต โดยมีการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีการอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างนี้มีหน้าที่แน่นอน และมีความสำคัญต่อเซลล์และ rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งงานนี้ให้ข้อมูลเปรียบเทียบ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีไปใช้แน่นอน จึงสามารถนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (Madigan and Martino. 2006)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทุติยภูมิของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: Madigan and Martino. (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ โดยไม่คิดค่าใช้จ่ายใด ๆ ทั้งสิ้น อย่างไรก็ตาม การใช้เอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์อาจก่อให้เกิดความเสียหายทางกฎหมาย ทั้งนี้เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุล 16S rRNA gene โดยที่ 5S rRNA gene มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น้อยเมื่อ

เทียบกับ 16S rRNA gene ที่มี 1,500 นิวคลีโอไทด์ ส่วน 23S rRNA มี 2,900 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มากและเป็นส่วนที่ดี แต่ในทางปฏิบัติและการวิเคราะห์นั้นทำได้ยากกว่า (Deng *et al.* 2007) รวมทั้ง 16S rRNA gene มีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอสำหรับจัดกลุ่มหรือบอกความสัมพันธ์ ซึ่งหากยีนมีความผันแปรสูง คือ มีมิวเทชันสูง จะทำให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สูญหายไปและไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alignment) ได้ เนื่องจากในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ การเทียบหาส่วนที่เหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Madigan and Martino, 2006)

### 2.3.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียจากข้อมูล 16S rRNA gene

อนุกรมวิธาน คือ การจำแนกประเภทด้วยการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่คล้ายกันให้อยู่กลุ่มเดียวกันและการจัดลำดับชั้นต่าง ๆ เหล่านี้จะต้องไม่ทับซ้อนกัน โดยในปี ค.ศ. 1923 David Bergey ศาสตราจารย์ทางวิทยาแบคทีเรียแห่งมหาวิทยาลัยเพนซิลวาเนียและเพื่อนร่วมงาน 4 คน ได้พิมพ์ผลงานการจัดจำแนกประเภทของแบคทีเรียที่สามารถใช้ในการตรวจสอบหาชนิดของแบคทีเรียได้ หนังสือดังกล่าวชื่อ “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” และต่อมามีการออกรูปแบบใหม่ที่ชื่อ “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” ซึ่งมีรายละเอียดคำบรรยายเกี่ยวกับโพรคาริโอตที่ผ่านการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้นและมีการนำข้อมูลจากการศึกษาหาลำดับ rRNA gene, ดีเอ็นเอและ โปรตีนมาช่วยให้การวิเคราะห์ห่วงศวานวิวัฒนาการของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น และในปัจจุบันมีการพิมพ์เป็นครั้งที่ 2 แล้ว มีชื่อว่า “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology – 2<sup>nd</sup> ed. emphasis on 16S rRNA sequence phylogenetic classification” ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียไฟลัมต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.7 โดยหนังสือได้แบ่งเป็น 5 เล่ม ดังนี้

เล่มที่ 1 อาร์คีแบคทีเรียและยูแบคทีเรียบางกลุ่ม (Archeae & Deeply Branching & Phototrophic Bacteria) ซึ่งมีความหลากหลายมากทางสัณฐานวิทยา การสืบพันธุ์ สรีรวิทยา และนิเวศวิทยา เจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจนในที่อยู่ที่เค็มจัดและอุณหภูมิสูงมาก

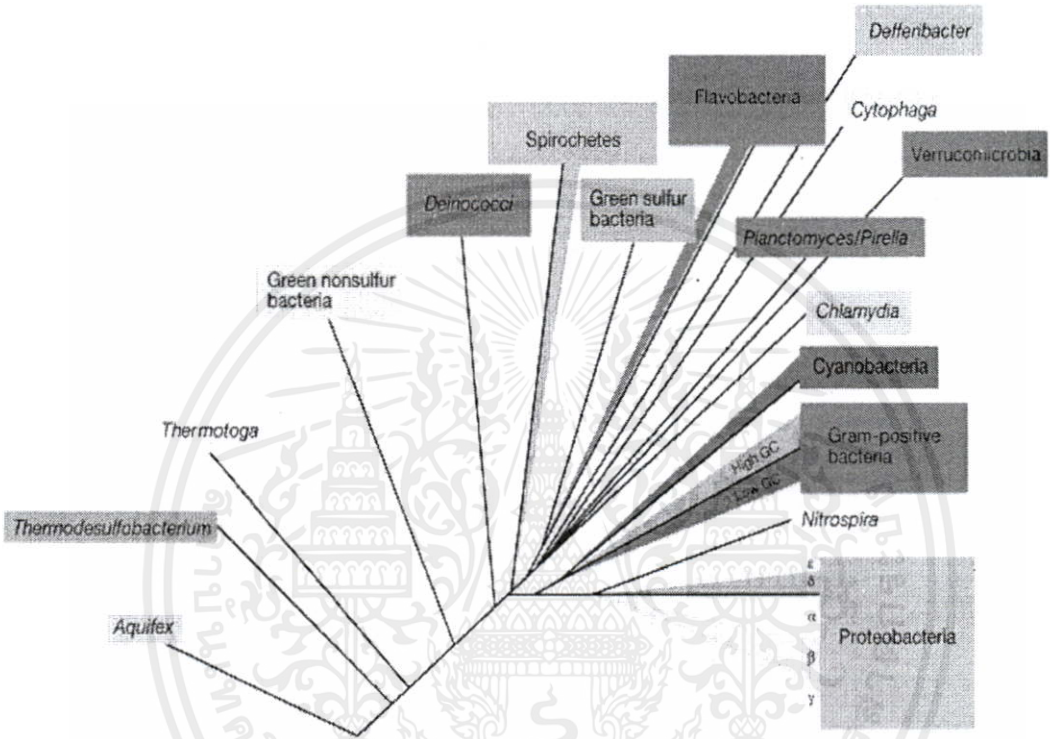
เล่มที่ 2 โพรทีโอแบคทีเรีย (*Proteobacteria*) บางครั้งเรียกว่า แบคทีเรียสีม่วง ซึ่งเป็นยูแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดและมีความหลากหลายมาก ประกอบด้วย 5 กลุ่มย่อย คือ แอลฟา-เบต้า-แกมมา-เดลต้า-และเอพซิลอน-โพรทีโอแบคทีเรีย รูปพรรณสัณฐานมีตั้งแต่รูปแท่งและกลมอย่างธรรมดาจนถึงโพสทีกา หน่อ และฟรุติจิงบอดี ส่วนทางสรีรวิทยามีความหลากหลายมาก เช่น โฟโตออโตโทรฟ เคโมลิโทโทรฟ และเคโมเฮเทอโรโทรฟ

เล่มที่ 3 แบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (The Low G+C Gram-positive Bacteria) แบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *Mycoplasma Clostridium* กับพวกที่ใกล้เคียงกัน และ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งพวกที่ไม่มีผนังเซลล์ พวกที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์

## สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เล่มที่ 4 แบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง (The High G+C Gram-positive Bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มี G+C สูง คือ มีปริมาณ G+C สูงกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกับรา

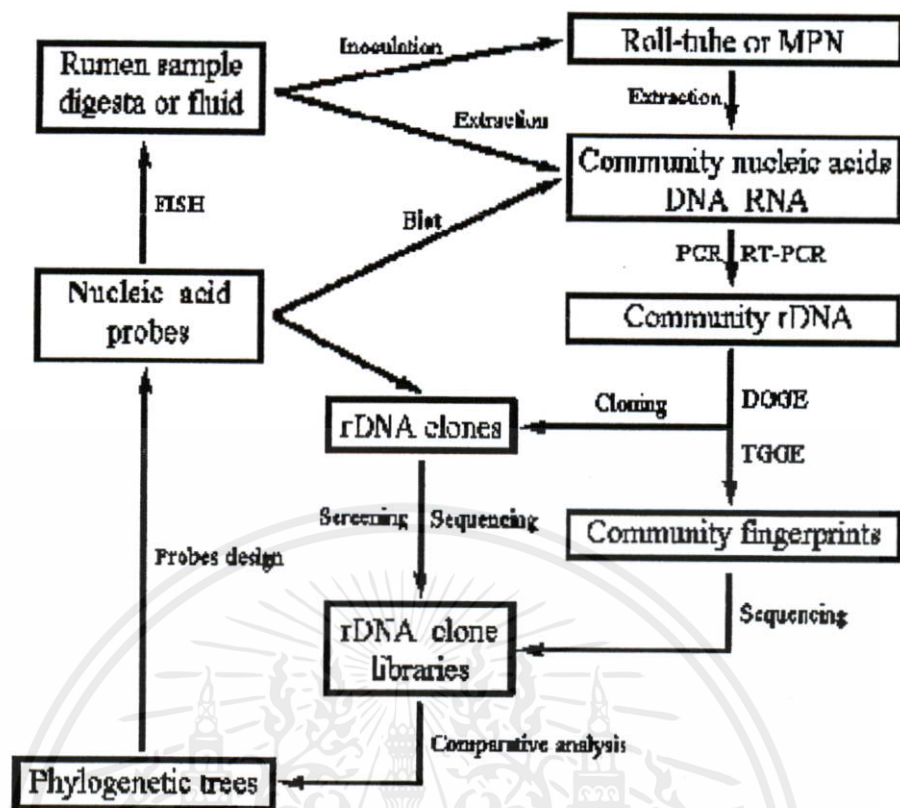
เล่มที่ 5 แพลงก์โทไมซีต สไปโรชีต ไฟโบรแบคเตอร์ แบคทีรอยด์ และฟูโซแบคทีเรีย (*Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteria, Bacteroidetes & Fusobacteria*)



ภาพที่ 2.7 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มหลักจากข้อมูล 16S rRNA gene ที่มา: Staley *et al.* (2007)

### 2.4 การใช้เทคนิค Culture-independent approach เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

เทคนิควิธี Culture-independent approach เป็นวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเข้ามาแทนที่ข้อจำกัดบางประการของวิธี Culture-dependent approach และประสิทธิภาพของวิธีนี้จะสามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อน โดยเฉพาะกลุ่มที่ไม่สามารถแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการพัฒนาเทคนิคของวิธีดังกล่าวอย่างมากมาย สามารถสรุปเป็นแผนภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 เทคนิค Culture-independent approach ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน  
ที่มา: Deng *et al.* (2007)

#### 2.4.1 การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene (16S rRNA gene libraries)

เทคนิคการสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene นำมาประยุกต์เพื่อหาจุลินทรีย์ในระบบนิเวศทำให้สามารถแยกประชากรแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Cultured) และประชากรแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Uncultured) โดยห้องสมุดโคลนจะประกอบด้วยโคลนที่มาจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด วิธีการที่สำคัญและจำเป็นสำหรับเทคนิคนี้คือ Gene cloning ซึ่งเป็นวิธีการที่จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (เสาวนีย์ธรรมสถิติ, 2547; McSweeney *et al.* 2007) โดยต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนี้ (อารีลักษณ์เกษมสันต์, 2533)

1) ยีน (Gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการที่ได้มาจากเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดออกจากเซลล์ (Total DNA) จากนั้นนำมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer)

2) ดีเอ็นเอพาหะหรือเวกเตอร์ (Vector) เนื่องจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นต้องมีการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวกเตอร์เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองในเซลล์ผู้รับได้

3) เซลล์ให้อาศัยหรือเซลล์ผู้รับ (Host) ในการเลือกเซลล์ให้อาศัยต้องมีการพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและไม่เป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดโรค

4) การถ่ายทอดดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (Host) การนำยีนที่มีอยู่เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย เพื่อทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ให้อาศัยนั้นๆ ได้ ทำโดยวิธีการที่เรียกว่า ทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation) ซึ่งเป็นวิธีการที่เกิดขึ้นเองได้ในธรรมชาติของแบคทีเรียบางชนิดอยู่แล้ว ซึ่งเมื่อถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะบางสภาวะ อาจทำให้ Cell envelope เกิดลักษณะที่จะรับดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้น เซลล์ที่เกิดลักษณะดังกล่าวนี้ เรียกว่า Competent cell เมื่อทำทรานส์ฟอร์มแล้วนำทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้ไปตรวจหา (Screen) เซลล์ที่ต้องการ

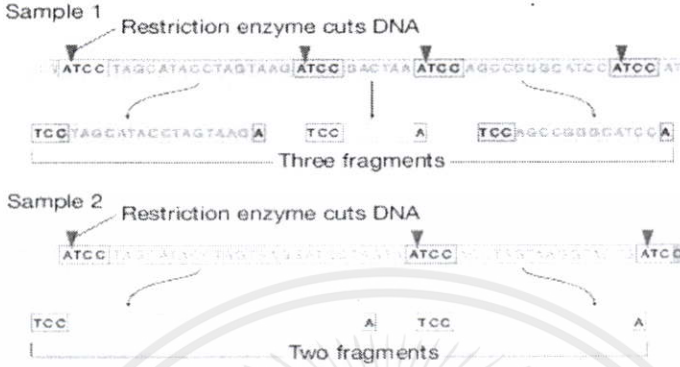
#### 2.4.2 อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ซึ่งดีเอ็นเอในออร์แกนลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกหลาน แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง เช่น การเกิดการกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยวิธีอาร์เอฟแอลพีได้ใช้หลักการนี้ คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ (Recognition site) โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ถึง 6 bp ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย โมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่า เกิดโพลิมอร์ฟิซึมหรืออาร์เอฟแอลพี ดังแสดงในภาพที่ 2.9 แล้วทำการเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ในทางปฏิบัติ การวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีที่เกิดขึ้นทำโดยคิดความแตกต่างของอาร์เอฟแอลพีระหว่างตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทีละคู่ และนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อแสดงแผนภาพความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

### 1. DNA Purified



### 2. DNA Fragmentation



### 3. Gel Electrophoresis



ภาพที่ 2.9 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

ที่มา: Mülhardt. (2007)

เทคนิคอาร์เอฟแอลพีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบประชากรของจุลินทรีย์เพื่อนำไปประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ในการสุ่มเลือกโคลนที่เป็นตัวแทนของประชากรไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลที่ได้นั้น ไปวิเคราะห์ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรม ที่ผ่านมามีการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่างต่างๆ ดังนี้ ชนิดของแบคทีเรียในดิน (Kanokratana *et al.* 2004), ชนิดของ *Streptococcus bovis* จากกระเพาะรูเมนของโค (Jarvis *et al.* 2001) และชนิดของ *Prevotella* . ในกระเพาะรูเมนของโค (Avgustin *et al.* 1994)

#### 2.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ มีความสำคัญและเป็นประโยชน์มาก เช่น ทำให้ทราบว่ายีนนั้นคือยีนใด หรือเพื่อที่จะเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายนั้นในสิ่งมีชีวิตเดียวกันและต่างชนิดกัน ซึ่งเทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธี

1) Maxam-Gilbert sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้น โดย Allan Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ กัน

2) Dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้น โดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้เอนไซม์มาต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้รับการพัฒนาโดยตลอด ปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายและไม่ยุ่งยากซับซ้อน คือ ใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า Automate machine ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้น โดยดัดแปลงมาจากวิธีการ Dideoxy sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่า Dideoxy chain terminating method คือ ใช้เอนไซม์ DNA polymerase I เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ โดยเริ่มจากแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน (Denature) และใช้ Sequencing primer ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบให้ด้าน 3' อยู่ใกล้กับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น Sequencing primer จะจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างเหมาะสม และเอนไซม์ DNA polymerase I จะทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จาก Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ที่เติมลงไปโดยในปริมาณที่เพียงพอ โดยจะทำการสังเคราะห์ทางปลาย 3' ต่อจาก Sequencing primer นอกจากนี้จะมีการเติมสาร Dideoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์จบการสังเคราะห์ (Chain terminator) ซึ่ง Dideoxyribonucleotide ทั้ง 4 ชนิดจะถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่างๆ กัน เนื่องจากปกติเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย 3'-OH ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ แต่ Dideoxyribonucleotide มีปลาย 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหาก DNA polymerase I ดึง Dideoxyribonucleotide เข้ามาแทน Deoxyribonucleotide การสังเคราะห์ก็จะหยุดเพราะขาดปลาย 3'-OH ซึ่งจะป้องกันการเกิด Phosphodiester bond กับ 5'-P ของ Deoxyribonucleotide ตัวที่จะเข้ามาใหม่ ปฏิกริยาการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดในหลอดเดียวกันและเมื่อจบปฏิกิริยาทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส เจลช่องเดียว ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับจะหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้น และดีเอ็นเอสายสายที่มีการหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวนี้จะมีสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อชิ้นดีเอ็นเอสายที่สั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมาเครื่องมืออ่านสีฟลูออเรสเซนต์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลจะบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบดีเอ็นเอแถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีนิวคลีโอไทด์ตัวใด และตรวจแถบถัดมาเรื่อยๆ ตามลำดับและแปลผลออกมาเป็น A หรือ T หรือ C หรือ G ตามสีที่ติดฉลากไว้ โดยข้อมูลที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Mülhardt, 2007)

## 2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic analysis) มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบัน โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในแง่ของวิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (ไบโอไอทีทิม. 2547)

### 2.5.1 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแบ่งได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของข้อมูลดังแสดงไว้ในภาพที่ 2.10

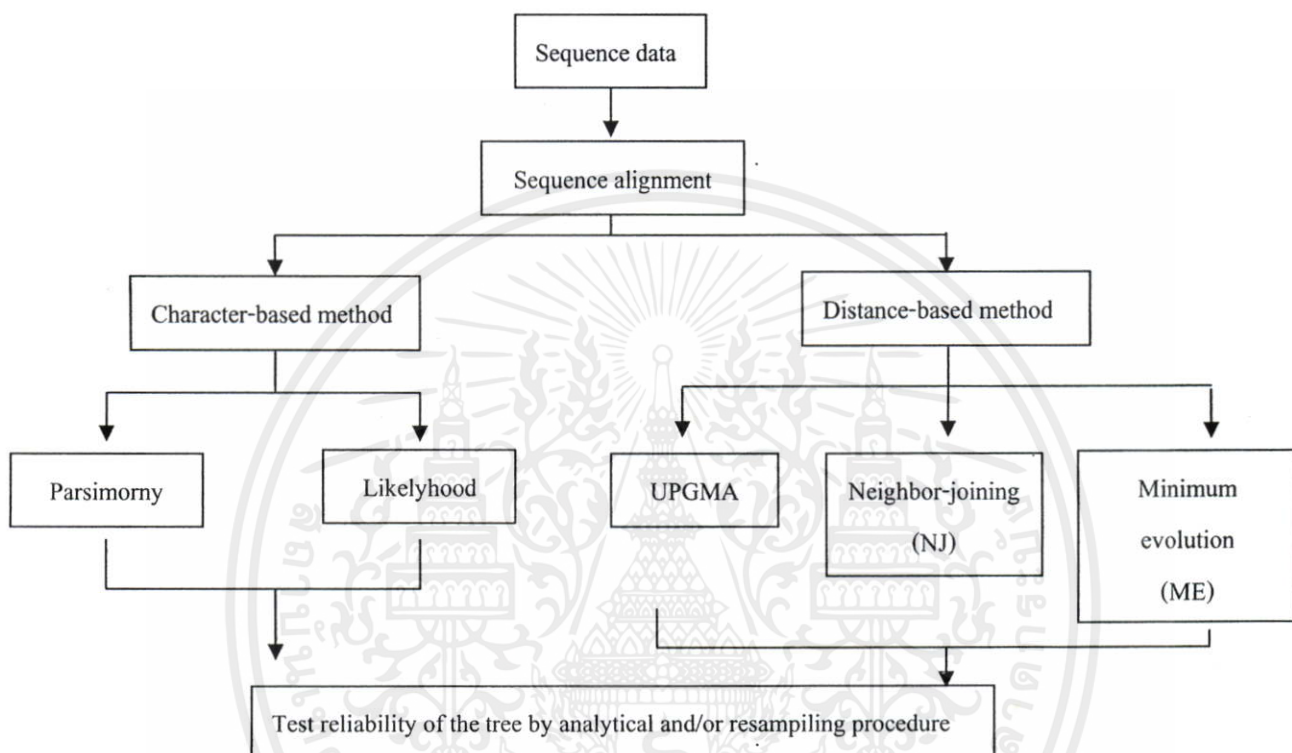
Nei and Kumar (2000) ได้อธิบายการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมไว้ดังนี้

- 1) การจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (Alignment of DNA sequence) ให้จัดเรียง (Align) ลำดับของข้อมูลทั้งหมดจนกระทั่งมีระดับของความเหมือนกัน (Homology) สูงสุด
- 2) การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Tree reconstruction) หลังจากจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างสายดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม
- 3) การตรึงรากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Rooting the tree) ในขั้นตอนการค้นหาแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการนั้นแผนภูมิที่คำนวณได้จะอยู่ในรูปของแผนภูมิที่ไม่ได้ถูกตรึงรากก่อน จากนั้นจึงค่อยถูกตรึงราก (Rooted) หลังจากแผนภูมิที่สั้นที่สุดที่เป็นไปได้ทั้งหมดถูกค้นพบแล้ว โหนด (Node) ของแผนภูมิที่ใกล้เคียงกับบรรพบุรุษร่วมของ Taxa ทั้งหมดที่ศึกษาจะถูกนำมาใช้เป็นจุดตรึงราก ขั้นตอนดังกล่าวจะทำให้ทิศทาง (Polarity) ของสมาชิกในกลุ่มที่ศึกษาซึ่งจะใช้สิ่งมีชีวิตอีกหนึ่ง Taxa หรือมากกว่านั้นที่เป็นกลุ่มพี่กลุ่มน้อง (Sister group) กันกับ Taxa ที่กำลังศึกษาอยู่มาใส่เพิ่มเข้าไปในชุดข้อมูลเพื่อให้เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (Outgroup) ที่บอก โปรแกรมคอมพิวเตอร์ให้ทราบถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในการตรึงราก จากนั้นจึงคำนวณหาแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมใหม่

4) Evolution distance ( $E_D$ ) เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Homologous โดยที่ความยาวของ Branches ที่แยกสิ่งมีชีวิตออกจากกัน เป็นสัดส่วนกับ  $E_D$  เช่น ถ้าสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันหรือมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงทำให้ระยะทาง (Distance) ในแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมสั้น

5) Bootstrap value เป็นค่าสนับสนุนทางสถิติในการทดสอบความน่าเชื่อถือของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการทดลองสับเปลี่ยนค่าข้อมูลโดยการแทนที่กล่าวคือ เริ่มจากการสุ่มดึงข้อมูลลักษณะบางอย่างออกจากตาราง Matrix แล้วทำให้ Matrix นั้นมี

ขนาดเท่าเดิม โดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลลักษณะอื่นขึ้นมาแทนที่ จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิใหม่ขึ้นมา หลังจากที่ทำกรทดลองดังกล่าวไปหลายๆ รอบ แผนภูมิทั้งหมดที่สร้างขึ้นมานี้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความน่าเชื่อถือที่ Branches ต่างๆ บนแผนภูมิ ซึ่งโดยทั่วไปค่าที่มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ วิธี Bootstrap test ออกแบบโดย Felsenstein และ เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการอ้างอิงในแผนภูมิของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนการสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

ที่มา: Nei and Kumar (2000)

### 2.5.2 ฐานข้อมูลชีวสารสนเทศและโปรแกรมคอมพิวเตอร์

มีโปรแกรมคอมพิวเตอร์อยู่หลายโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการหรือการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการเลือกใช้โปรแกรมใดขึ้นอยู่กับลักษณะข้อมูลดิบ ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นต้น ตัวอย่างโปรแกรมมีดังนี้ คือ

1) สำหรับการจัดการข้อมูลโดยทั่วไป ได้แก่ DNASIS, GENETYX

2) สำหรับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันอย่างง่าย (Homology search) จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต ได้แก่ BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)

3) สำหรับการทำ Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ CLUSTAL W, Clustal X, DNASIS, GENETYX

4) สำหรับวิธีการวิเคราะห์การคำนวณ Algorithms ได้แก่วิธี Distance matrix เช่น Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA), Minimum evolution (ME), Neighbor-joining (NJ) หรือวิธี Maximum parsimony (MP) หรือวิธี Maximum likelihood (ML) ตัวอย่างโปรแกรมคำนวณ ได้แก่ MEGA, DNASIS, GENETYX, PHYLIP, PAUP เป็นต้น

ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ ดังนี้

1) BLASTN หรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) ที่ใช้ในการศึกษาเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมด ซึ่งผลการตรวจสอบความเหมือนที่ได้รับจากโปรแกรม BLASTN ที่ถูกต้องนั้นจะถูกตัดสินผ่านการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยคิดจากค่าคะแนน (Scoring) ของ Random hits

2) Ribosomal Database Project II (RDP-II) เป็นเว็บไซต์ที่เก็บรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ rRNA gene ซึ่งได้รับมาจากฐานข้อมูล International Nucleotide Sequence Databases (ISDN: GenBank/EMBL/ DDBJ) โดยนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ (Align) กับข้อมูลที่ต้องการศึกษาเพื่อนำไปอ้างอิงในการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการหรือแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ ฐานข้อมูลของ RDP-II มีการทำให้ทันสมัยทุก ๆ เดือน สามารถใช้ฐานข้อมูลนี้ผ่านเว็บไซต์ของ RDP-II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) ผลการวิเคราะห์ของ RDP-II จะทำให้ผู้ใช้งานได้รับข้อมูลความจำเพาะของแต่ละกลุ่มในสิ่งมีชีวิตมีความเจาะจงมากยิ่งขึ้น (Cole *et al.* 2007)

3) โปรแกรม MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software V 4.0) เป็นลักษณะโปรแกรมที่ใช้งานได้โดยไม่เสียค่าบริการ ถูกพัฒนาขึ้นโดย Tamura และคณะในปี ค.ศ.1993 ซึ่งเวอร์ชันที่นำมาใช้ในวิทยานิพนธ์นี้คือ เวอร์ชัน 4 ที่มีการปรับปรุงในปี ค.ศ. 2007 สนับสนุนการทำงานในระบบปฏิบัติการ Windows และ Macintosh โปรแกรมนี้มีลักษณะของส่วนที่ติดต่อกับผู้ใช้แบบ Graphic interface ทำให้โปรแกรมง่ายต่อการใช้งาน โดยโปรแกรม MEGA 4 ยังได้รวบรวมเอาความสามารถและแอปพลิเคชันต่าง ๆ เช่น ClustalW ซึ่งช่วยในการศึกษาเปรียบเทียบสายลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนหลายสายในคราวเดียว (Computational sequence alignment) และวิธีในการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการหลายวิธี เช่น Distance matrix, Parsimony และ Likelihood โดยโปรแกรมอนุญาตให้ผู้ใช้สามารถกำหนดค่า พารามิเตอร์ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ (World Wide Web bookmark) ได้โดยผ่านทางอินเทอร์เน็ตเบราว์เซอร์ การติดตั้งโปรแกรม MEGA4 นั้นสามารถทำได้โดยเชื่อมต่ออินเทอร์เน็ตไปยังเว็บไซต์ <http://www.megasoftware.net/features.html> (Tamura *et al.* 2007)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการศึกษาประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักในประเทศไทยยังมีการศึกษาที่ค่อนข้างจำกัด แต่ในที่นี้จึงกล่าวถึงงานวิจัยเฉพาะในกระเพาะรูเมนของ โคนม และ สัตว์ป่า จามรี (Yak) และ Jinnan cattle

Whitford *et al.* (1998) ทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนม โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของโคลนที่ได้จากแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมนมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) พบว่า 55 เปอร์เซ็นต์ของโคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (Low G+C Gram-positive Bacteria) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสกุล *Clostridia* และอีกประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของโคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Prevotella-Bacteroides* ในการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียแกรมบวกในกระเพาะรูเมนกลุ่มใหม่ได้ถึง 20 ชนิด

Tajima *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากห้องสมุด 16S rRNA gene โดยประชากรแบคทีเรียที่ศึกษานำมาจากอนุภาคอาหารและของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคที่อดอาหารเป็นเวลา 16 ชั่วโมงสามารถโคลนได้ทั้งหมด 84 โคลน ซึ่ง 38 เปอร์เซ็นต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล 90-98 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์อีก 56 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลน้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของห้องสมุดที่มาจากของเหลวในกระเพาะรูเมนมีความสัมพันธ์กับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (52.4 เปอร์เซ็นต์), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (38.1 เปอร์เซ็นต์) *Proteobacteria* (4.7 เปอร์เซ็นต์) และ *Spirochaetes* (2.4 เปอร์เซ็นต์) ส่วนลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของห้องสมุดที่มาจากอนุภาคอาหารในกระเพาะรูเมนมีความสัมพันธ์กับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ และ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (26.2 เปอร์เซ็นต์) และ *Spirochaetes* (2.4 เปอร์เซ็นต์)

Tajima *et al.* (2001) วิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic) จากห้องสมุด 16S rRNA gene ของอาร์คีแบคทีเรีย (Archeobacteria) กลุ่มใหม่ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่มาจากแบคทีเรียในของเหลวของกระเพาะรูเมนของโค โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ออาร์คีแบคทีเรียต่างกัน 2 กลุ่ม โคลนกลุ่มที่ 1 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 กลุ่มมากเป็นพิเศษ กลุ่มแรกมีความสัมพันธ์กับ *Methanomicrobium mobile* (21 เปอร์เซ็นต์) และที่เหลือเป็นอาร์คีแบคทีเรียที่ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้จากการย่อยแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic digester) โดยมีความสัมพันธ์กับ

*Thermoplasma* โคลนกลุ่มที่ 2 พบความหลากหลายของแบคทีเรียมาก ซึ่งพบเพิ่มจากกลุ่มที่ได้จากการโคลนกลุ่มที่ 1 อีก 6 ชนิด จากแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม แสดงให้เห็นถึงแบคทีเรียกลุ่มใหม่ *Euryarchaeota* ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับอาร์คีแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตมีเทนซึ่งเคยมีรายงานมาก่อน

Koike *et al.* (2003) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มที่ยึดเกาะย่อยเยื่อใยโดยวิธีการใช้ถุงไนล่อนใส่ในกระเปาะที่ทำการเจาะกระเพาะรูเมน แล้วทำการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene พบว่า *Fibrobacter succinogenes* สามารถเข้าเกาะชิ้นอาหารได้เร็วกว่ากลุ่มอื่น ในขณะที่ *Ruminococcus flavefaciens* จะเข้าเกาะในอันดับต่อมาและ *Ruminococcus albus* จะเป็นกลุ่มย่อยเท่านั้น ซึ่งสามารถจำแนกพบ *Fibrobacter succinogenes* ได้ 3 สายพันธุ์ โดยกลุ่มที่มีประชากรมากที่สุดคือ *F. succinogenes* S85

Nelson *et al.* (2003) ทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของสัตว์ป่าที่กินพืชและในป่าแถบแอฟริกา โดยสัตว์ 3 ชนิดคือ Eland (*Taurotragus oryx*), Thompson's gazelle (*Gazella rufifrons*) และ Grant's gazelle (*Gazella granti*) รวมทั้งสัตว์เลี้ยงที่อยู่ในกลุ่มสัตว์เคี้ยวเอื้อง คือ Zebu cattle (*Bos indicus*) และทำการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบแบคทีเรีย 24 กลุ่มที่สามารถจัดจำแนกได้ ส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการจำแนกลักษณะมาก่อน (uncharacterized species) โดยทั่วไปลำดับนิวคลีโอไทด์มีความสัมพันธ์กัน โดยพบว่าเป็นแบคทีเรียพิเศษ 4 กลุ่มที่เป็นสมาชิกของ *Firmicutes* (Low G+C Gram-positive) และมีความสัมพันธ์กับ *Clostridium* และ *Ruminococcus*

Edwards *et al.* (2004) วิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียจากห้องสมุด 16S rRNA gene โดยรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลสากล Genbank ที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียของโคมาก่อนหน้านี้ (Whitford *et al.* 1998; Tajima *et al.* 1999, 2000) พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 2 ไฟลัมใหญ่ ๆ คือ แบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (54 เปอร์เซ็นต์) และ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (40 เปอร์เซ็นต์) จากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการและฐานข้อมูลแสดงให้เห็นว่า 89 เปอร์เซ็นต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

An *et al.* (2005) ทำการศึกษาความหลากหลายของกลุ่มโพรคาริโอตในกระเพาะรูเมนของ Yak (*Bos grunniens*) และ Jinnan cattle (*Bos taurus*) จากการวิเคราะห์ความเหมือนของ 16S rRNA gene พบว่า 194 โคลนจากห้องสมุดยีนของ Yak สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 2 กลุ่มคือแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (54.12 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนโคลนทั้งหมด) และ *Bacteroidetes* (30.93 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนโคลนทั้งหมด) โดยประชากรแบคทีเรียมากกว่าครึ่งที่ยังไม่ทราบด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ 197 โคลนจากห้องสมุดยีนของ Jinnan

cattle จำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ *Bacteroidetes* (39.59 เปอร์เซ็นต์)  $\gamma$ -*Proteobacteria* (26.90 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (22.34 เปอร์เซ็นต์)

Larue *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่เข้ายึดเกาะกับพื้นผิวของพืช ในกระเพาะรูเมนของแกะ จากการวิเคราะห์ 16S rRNA gene sequencing พบว่าแกะที่กินหญ้าสด เป็นอาหารมีกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำเป็นส่วนใหญ่และพบแบคทีเรียกลุ่มใหม่ ในสกุล *Clostridium* ขณะที่แกะซึ่งกินอาหารจำพวกแป้งจะมี *Selenomonas* และ *Ruminococcus* spp. เป็นกลุ่มหลักซึ่งทั้งสองชนิดนี้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ นอกจากนี้ แกะที่กินหญ้าแห้งมีแบคทีเรียส่วนใหญ่ในสกุล *Clostridium* และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำสกุลอื่นๆ ด้วย

Sundset *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของ *Svalbard Reindeer* ซึ่งเป็นกวางที่อยู่ในเขตอากาศหนาวของอาร์คติกโดยใช้วิธีพีซีอาร์และวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการโคลนห้องสมุด 16S rRNA gene พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ทั้งหมดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย แกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ 55 เปอร์เซ็นต์ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 42 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มอื่นๆ อีก 3 เปอร์เซ็นต์

Wang *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โอลสไตน์ โดยใช้วิธีพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการโคลนห้องสมุด 16S rRNA gene (16S rRNA gene libraries) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene มากกว่าครึ่งหนึ่งเป็น กลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแกรมบวกที่มี ปริมาณ G+C ต่ำ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นของแบคทีเรีย กลุ่มที่ยังไม่สามารถเพาะเชื้อได้ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ นี้ได้แสดงถึงกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มใหม่

Deng *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียจากข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ในกระเพาะรูเมนของ Gayals (*Bos frontalis*) ซึ่งกินใบและเปลือกไม้ สด (*Sinarumdinaria*) เป็นอาหาร จากทั้งหมด 147 โคลน โดยกำหนดค่าความเหมือนกับฐานข้อมูล อยู่ที่ 97 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูลมี 17 โคลน คือ *Ruminococcus albus*, *Butylvibrio fibrosolvans*, *Quinella ovalis*, *Clostridium symbiosium*, *Succiniclasticum ruminis*, *Selenomonas ruminatum* และ *Allisonella histaminiformans*. ตามลำดับ นอกจากนี้ 22 โคลน มีความเหมือนกับฐานข้อมูลอยู่ระหว่าง 90-97 เปอร์เซ็นต์ แต่โคลนส่วน ใหญ่ที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูลน้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ คือ 109 โคลน และจากการวิเคราะห์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าโคลนส่วนใหญ่ถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มี ปริมาณ G+C ต่ำ (57.1 เปอร์เซ็นต์) อีกจำนวนไม่น้อยอยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (42.2 เปอร์เซ็นต์) และอีก 1 โคลนอยู่ในกลุ่ม *Spirochaetes* แสดงให้เห็นว่า Gayals

(*Bos frontalis*) มีความหลากหลายของประชากรแบบที่เรียในกระเพาะรูเมนมากซึ่งต่างจากโคและสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือและการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

##### 3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (Swamp-type) ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัว โดยกรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้นใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตรรวม 3,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่ -80 องศาเซลเซียส

##### 3.1.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

การสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมน (คัดแปลงมาจาก An *et al.* 2005) โดยนำของเหลว 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Extraction buffer และแซ่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำตัวอย่างมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติม Lysozyme (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อมเติม 20 เปอร์เซ็นต์ SDS ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อมเติม ProteinaseK (ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นเก็บเฉพาะส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25: 24:1 โดยปริมาตร) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใสมาเติม Chloroform-Isoamyl alcohol (24:1 โดยปริมาตร) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol (1 เท่าของปริมาณชั้นส่วนใสที่เก็บได้) และทำการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใสด้านบนและเก็บตะกอนดีเอ็นเอ รอให้ตะกอนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.3 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาวิเคราะห์โดยการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TBE pH 8.0 ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเทเจลลงในถาดเจล (Gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X Loading buffer ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยใช้  $\lambda$  HindIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง Gel documentation (Syngene genius; Bio Imaging System)

### 3.1.4 การตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต

เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop ND1000) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) สำหรับดีเอ็นเอ 230 นาโนเมตร ( $A_{230}$ ) สำหรับกรดนิวคลีอิก และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) สำหรับโปรตีนตามลำดับ (Ray *et al.* 2006) คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า  $A_{260}/A_{280}$  และ  $A_{260}/A_{230}$  เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.8-1.9 และ  $A_{260}/A_{230}$  มากกว่า 1.2 (Sambrook *et al.* 1989)

### 3.1.5 การแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ทำการแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ตามวิธีในคู่มือของ Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System (Promega) ดังนี้ เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นติดไซริงค์ขนาด 3 มิลลิลิตร (ซึ่งดึง Plunger ออกจากตัวไซริงค์ก่อน) กับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up Resin ลงในไซริงค์ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ต่อมาใช้ Plunger ค่อยๆ ดันสายละลายดีเอ็นเอเกาะติดกับซิลิกาใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของเหลวที่ติดกับ Minicolumn แล้วเติม 80 เปอร์เซ็นต์ Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอ 2 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม Isopropanol ให้ถอดไซริงค์ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติดไซริงค์กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอดไซริงค์ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ติดค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด จากนั้นนำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ผ่านฆ่าเชื้อ ลงใน Minicolumn จำนวน 35 ไมโครลิตร ทิ้งไว้

ประมาณ 5-10 นาที คีเอ็นเอที่ติดกับซิลิกาจะละลาย หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้สารละลายคีเอ็นเอไหลออกจาก Minicolumn แล้วนำสารละลายคีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของคีเอ็นเอที่ได้ตามวิธีการในข้อ 3.1.3 แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อ

## 3.2 การสร้างห้องสมุด16S rRNA gene

### 3.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนคีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene จากคีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบคทีเรีย BSF8/20 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ REVB เป็น (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Kanokratana *et al.* 2004) เทคนิคพีซีอาร์ 1 ปฏิกริยา ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยคีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัม สารละลาย 1X Taq Buffer (75mM Tris-HCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20) with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dNTP ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ในส่วนของ Forward (BSF8/20) และ Reverse (REVB) ความเข้มข้นอย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 0.05 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทำปฏิกริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณคีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมคีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นคีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (คีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้สายคีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลาเป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันกับตัวอย่างอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และคีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

### 3.2.2 การสกัดแยกคีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วข้อมแถบคีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบคีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ผ่านเครื่อง Gel documentation จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบคีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกคีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดย

ตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด แล้วเติม Isopropanol (1เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่เก็บได้) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรใน Spin column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.1.3 โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.2.3 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.2.2 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาคผนวก ข) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C) พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร T4 DNA Ligase (Fermentas), ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

### 3.2.4 การเตรียมเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$ ให้เป็น Competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5 $\alpha$  บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจียโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SOB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเซ็นทริฟิวจ์แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลาย

ตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ภาคผนวก ข) 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง Competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2.5 การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$ ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook *et al.*1989)

นำ Competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นเปิดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ในข้อที่

3.2.3. ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน Competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายไปเกลี่ย (Spread) บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

### 3.2.6 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin X-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T (Fermentas) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase โดยจะทำการย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene ที่บริเวณ *lacZ* gene จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้และได้ตะกอนสีขาวแทน

### 3.2.7 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR)

สุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบโคลนว่ามีชิ้น 16S rRNA gene ถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวกเตอร์ ด้วยการทำเทคนิคพีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนี มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากทำเรพลิกา (Replica) โคโลนีที่ได้เก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ (Master plates) ให้หมายเลขประจำโคโลนี จากนั้นเตรียม Colony suspension โดยเขี่ย (Pick up) โคโลนีเหล่านี้เป็นต้นแบบ ผสมรวมกับส่วนผสมพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Taq Buffer (75mM Tris-HCl, 20mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20) with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์, MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, ไพรมเมอร์ในส่วนของ Forward คือ M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') และ

Reverse คือ M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 5 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา จำนวน 30 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลาเป็นเวลา 40 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 50 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวน ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันกับตัวอย่างอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 30 รอบก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.1.3 โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของ 16 S rRNA gene

หลังจากตรวจสอบโคลนว่ามีชิ้นส่วนของ 16 S rRNA gene แล้วจึงเก็บรักษาแต่ละโคลน นั้นด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ (V/V) Sterile glycerol ดังนี้ เตรียมอาหาร LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลอด เขี่ย โคลนลงในอาหารนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 30 เปอร์เซ็นต์ Sterile glycerol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บ ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2.8 วิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

#### *RsaI* และ *HhaI*

นำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 3.2.7 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HhaI* (Fermentas) โดยปฏิกิริยาของการตัดมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยตรง จากโคลน 3 ไมโครลิตร 1X Buffer Tango™ with BSA (Tris-acetate (pH 7.9 at 37° C) ความเข้มข้น 3.3 มิลลิโมลาร์, Magnesium acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, Potassium acetate ความเข้มข้น 6.6 มิลลิโมลาร์, BSA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HhaI* ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้นทำ

การตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล กับ Low melting point (Labscan, Thailand) อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ย้อมเจลด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้าง แผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดย เครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกภาพเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่จะถูกจัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นที่เหมือนกันด้วยโปรแกรม Gel ComparII<sup>®</sup> (Applied Maths BVBA, 2004; USA) วิธี Unweighted pair-group method using arithmetic averages as cluster algorithm. หากขนาดและจำนวนชิ้นของแต่ละแถบเหมือนกันที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็น Phylotype เดียวกัน

### 3.2.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ GeneJet<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit

เลือกโคลนของแต่ละ Phylotypes ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ในข้อ 3.2.8 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ GeneJet<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit ดังนี้ เติมน้ำสารละลาย Resuspension ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้ว ผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติมน้ำสารละลาย Lysis ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Neutralization ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมด ใส่ใน GeneJet<sup>™</sup> spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมน้ำสารละลาย Wash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Wash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีก ครั้ง แล้วทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10, 000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาย้าย Spin column ไปใส่หลอดไมโคร เซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบ ความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อม แถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้น เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานตามวิธี ในข้อ 3.1.3

### 3.2.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้ไพรเมอร์ M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ในด้าน Forward และใช้ไพรเมอร์ T7 (5'-AATACGACTACTATAG-3') ในด้าน Reverse เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ทำปฏิกิริยาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI3730XL (Applied Biosystem) โดยภายในเครื่องจะมีเครื่องมืออ่านสีฟลูออเรสเซนต์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลตามลำดับและแปลผลออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตามที่ติดฉลากไว้ และข้อมูลที่ได้อาจทำการวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen Service Center ประเทศเกาหลี หลังจากนั้นทำการต่อสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ด้าน Forward และ Reverse ด้วยโปรแกรม ContigExpress (InfoMax, Inc.200)

## 3.3 การวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

### 3.3.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นข้อมูลดิบที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้อ 3.2.10 ว่าเป็น Chimeric sequence โดยโปรแกรม Check\_Chimera ในอินเทอร์เน็ตที่ Ribosomal Database Project ([http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera\\_doc.html](http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera_doc.html); Cole *et al.* 2007)

จากนั้นวิเคราะห์โคลนที่ได้ว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN ต่อมาทำการจำแนกโคลนออกเป็น Division ต่างๆ โดยโปรแกรม Sequence Match ในอินเทอร์เน็ตที่ Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/doc.>; Cole *et al.* 2007) และนำข้อมูลแบคทีเรียที่ปรากฏในโปรแกรมมาเป็น Reference sequence เพื่อใช้ประกอบการทำแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมต่อไป

### 3.3.2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

นำผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Reference sequence มาทำการเปรียบเทียบความเหมือน (Multiple alignments) โดยโปรแกรม Clustal W (Higgins *et al.* 1994) และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.* 2007) โดยวิธี Distance matrix ด้วย Algorithm แบบ

Neighbor-joining (NJ) method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4 ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง Bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นไม้พันธุกรรม โดยให้ชื่อตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนว่า BF และตามด้วยหมายเลขโคลน และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQF16SRRN) เป็น Out group

### 3.3.3 การขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Database submission)

ทำการขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของประชากรแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษา (Accession number) กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin>.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

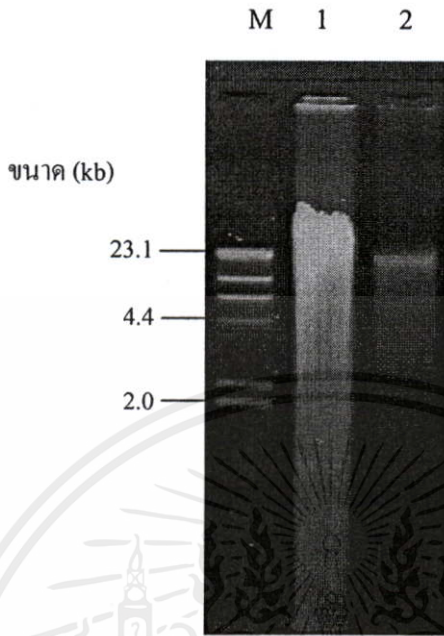
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เริ่มต้นโดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก หลังฆ่าและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ Competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างรูปแบบแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4 เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรแบคทีเรียรวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

#### 4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

เมื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างตามวิธีการของ An *et al.* (2005) ในข้อ 3.1.2 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่มีขนาด 23.1 kb (ภาพที่ 4.1 Lane ที่ 1) จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอใน Lane ที่ 1 ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้น 2.77 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แต่เมื่อพิจารณาประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ( $A_{230}$ ) สำหรับกรดนิวคลีอิก และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) สำหรับโปรตีน ซึ่งคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า  $A_{260}/A_{280}$  และ  $A_{260}/A_{230}$  ตามลำดับ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่าเท่ากับ 1.8-1.9 พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.80 และค่า  $A_{260}/A_{230}$  เท่ากับ 1.04 (ตารางที่ 4.1) โดยค่าที่ปรากฏทั้ง 2 ค่าแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่อาจจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Harry *et*

al. 1999; Miller et al. 1999) ดังนั้น จึงต้องกำจัดสิ่งปนเปื้อนก่อนด้วยชุดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Wizard® DNA Clean-up System, Promega)



**ภาพที่ 4.1** จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม Lambda Hind III) Lane ที่ 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดและแถบที่ 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

จากนั้นตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อ เซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าหลังการทำ ให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.1 Lane ที่ 2) จีโนมิกดีเอ็นเอมีรอยสิ่งปนเปื้อนน้อยลงและเมื่อพิจารณาประเมิน ความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับ โปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยก พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.91 และค่า  $A_{260}/A_{230}$  เท่ากับ 1.82 (ตารางที่ 4.1) โดยค่าที่ปรากฏทั้ง 2 ค่าแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** คุณภาพและปริมาณของจีโนมดีเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือ  
ปลักที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต

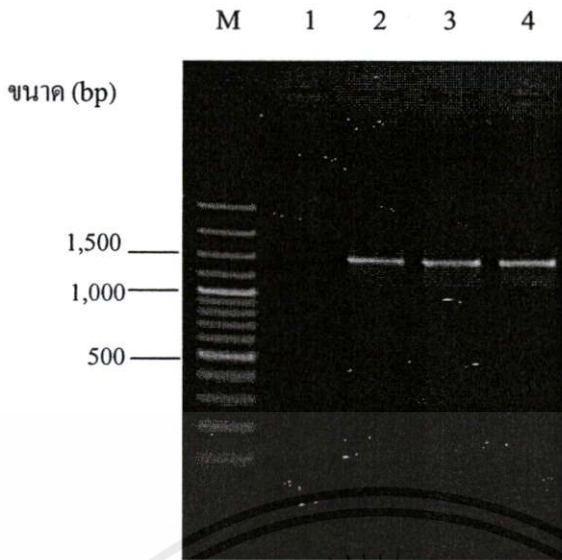
ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			คุณภาพดีเอ็นเอ		ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร)
	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
ดีเอ็นเอก่อน การทำให้ บริสุทธิ์	0.61	0.64	0.39	1.80	1.04	2.77
ดีเอ็นเอหลัง การทำให้ บริสุทธิ์	0.20	0.34	0.19	1.91	1.82	1.66

## 4.2 การสร้าง 16S rRNA gene library

### 4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทั้งหมด 3 ปฏิกริยา (25 ไมโครลิตรต่อปฏิกริยา) โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB (Kanokratana *et al.* 2004) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



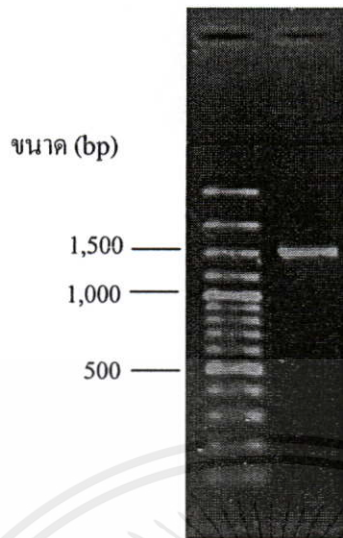
**ภาพที่ 4.2** ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Lane ที่ 2-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

#### 4.2.2 ผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

สกัดชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการ (~1,500 bp) ออกจากเจล แล้วนำมาสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะออกจากแถบดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แล้วทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M 1



ภาพที่ 4.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์และตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์

#### 4.2.3 ผลการโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 16S rRNA gene เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T และทรานส์ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$

จากการนำชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB ที่มีขนาด 1,500 kb และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas) โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้านปลายมีการเติม A เนื่องมาจากการทำงานของ *Taq* polymerase ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับปลาย T ของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ได้ และการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์อาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็น โมลลาร์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 $\alpha$  และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin, X-Gal และ IPTG เนื่องจากในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T นั้นมียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin และมี *LacZ* gene ที่ทำหน้าที่เป็น Selective gene สำหรับการทำงานของ *lacZ* gene นั้นจะถูกชักนำด้วยสารละลาย IPTG ให้ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase เพื่อย่อย Substrate X-gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าโคโลนีที่มีการเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์จะไปหยุดการแสดงออกของ *LacZ* gene ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว ดังนั้นจึงใช้ Blue white screening เป็นวิธีในการตรวจสอบยืนยันเป้าหมาย จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการมาเก็บไว้เป็นเพลทต้นแบบ

(Master plates) และให้หมายเลขประจำโคโลนีเพื่อตรวจสอบปริมาณโคโลนีด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไป

### 4.3 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม

#### 4.3.1 ผลการวิเคราะห์โคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์

จากการวิเคราะห์โคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนีโดยเขี่ย (Pick up) โคโลนีเหล่านี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ M13F และ M13R เป็นคู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าโคโลนีที่มีชิ้น 16S rRNA gene จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.4 Lane ที่ 1-11) แต่โคโลนีที่ไม่มีชิ้น 16S rRNA gene จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.4 Lane ที่ 12)



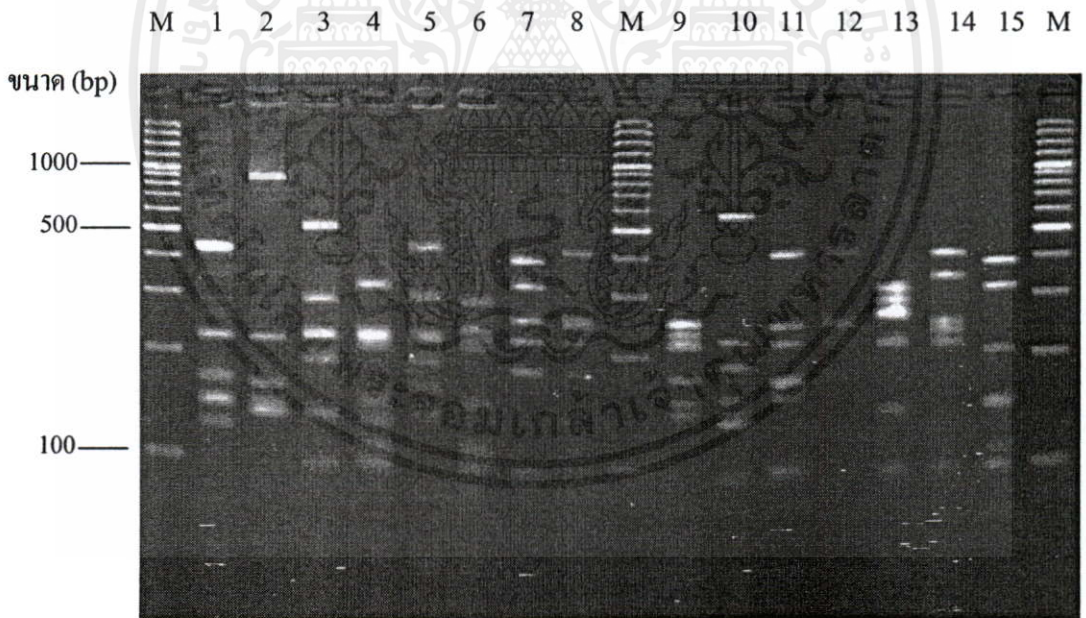
**ภาพที่ 4.4** ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1-11 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคโลนีที่มีชิ้น 16S rRNA gene และ Lane ที่ 12 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคโลนีที่ไม่มีชิ้น 16S rRNA gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

#### จำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 4.3.1 มาวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HhaI* ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กับ Low melting point อะกาโรสเจล เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ภาพที่ 4.5) จากนั้นบันทึกภาพเจลแต่ละเจลไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์และจัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันด้วยโปรแกรม Gel ComparII® (Applied Maths BVBA.2004) วิธี Unweighted pair-group method หากขนาดและจำนวนชิ้นของแต่ละแถบเหมือนกันที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็น Phylotype เดียวกันซึ่งแสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 222 โคลน ได้ทั้งหมด 179 Patterns ดังนั้นคิดเป็น 179 Phylotypes จากนั้นสุ่มเลือกโคลนของแต่ละกลุ่ม Phylotype ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์มาสกัดพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



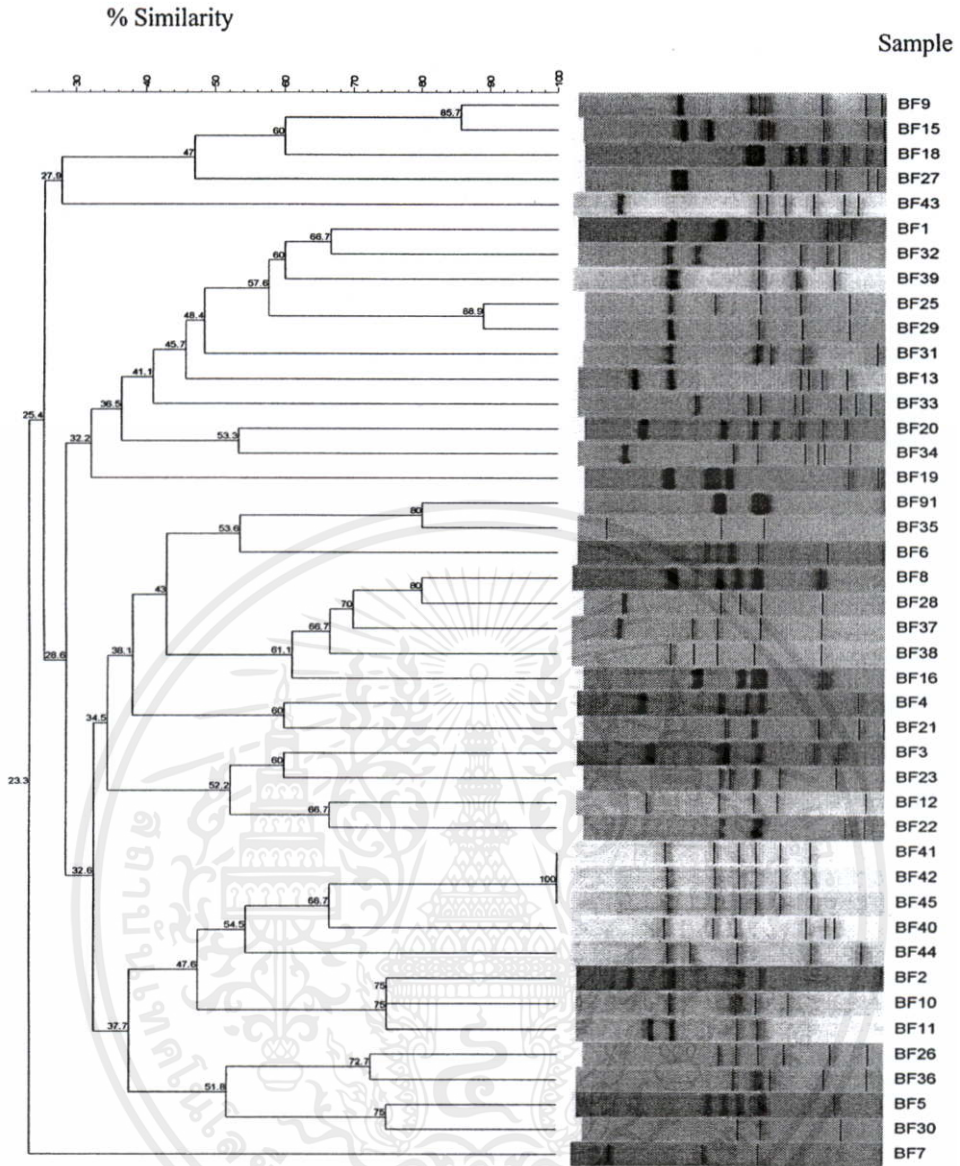
ภาพที่ 4.5 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HhaI* ที่ทำการตรวจสอบ

โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล กับ 1 เปอร์เซ็นต์ Low

melting point อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp

DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-15 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*

และ *HhaI*

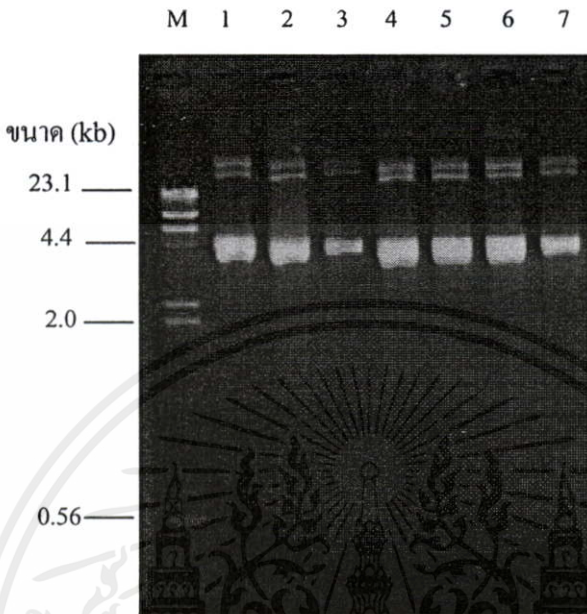


ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงตัวอย่างความหลากหลายของดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *RsaI* ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Gel ComparII<sup>®</sup> (Applied Maths BVBA.2004) โดยวิธี UPGMA

#### 4.3.3 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำโคโลนีสีขาวของแต่ละกลุ่มที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ในข้อที่ 4.3.2 มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ทำการเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (GeneJet<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และ

เปรียบเทียบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda Hind III ได้ผลดัง ภาพที่ 4.7 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Service Center ประเทศเกาหลี



ภาพที่ 4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูปที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม Lambda Hind III) และ Lane ที่ 1-7 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัด

#### 4.4 ผลวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

##### 4.4.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Similarity with database sequence)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ข้อที่ 4.3.3) ทั้งหมด 179 Phylotypes ที่เป็นตัวแทนจาก 222 โคลน และตรวจสอบ Chimeric sequence ด้วยโปรแกรม Check\_Chimera ในอินเทอร์เน็ตที่ RDP-II ([http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera\\_doc.html](http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera_doc.html); Cole *et al.* 2007) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Chimeric sequence จำนวน 6 โคลน คือ BF 13, BF 14, BF 34, BF 37, BF 299, BF 262 ดังนั้น จึงเหลือจำนวนโคลนทั้งหมด 216 โคลน 173 Phylotypes ต่อมาวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละโคลน โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) กับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งใช้ค่าความเหมือนที่ 97 เปอร์เซ็นต์ เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจว่าโคลนนั้นๆ เป็นแบคทีเรียที่เหมือนกันกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank

ดังแสดงรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ ค 1 และสรุปข้อมูลทั้งหมดดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่า มี 97 Phylotypes (56.07 เปอร์เซ็นต์) มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น โคลนเหล่านี้จึงเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่ยังไม่มีการจำแนกมาก่อน และอีก 76 Phylotypes (43.93 เปอร์เซ็นต์) มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank มากกว่าหรือเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการจำแนกแล้ว (Identified bacteria) และพบว่าจาก 173 Phylotypes เป็นแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Cultured bacteria) 6 สปีชีส์ คือ *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Selenomonas ruminantium*, *Desulfovibrio sp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Ruminobacter amylophilus* และอีก 167 Phylotypes ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Uncultured bacteria)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 173 Phylotypes มาจำแนกตามกลุ่มไฟลัมโดยโปรแกรม Sequence Match ในอินเทอร์เน็ตที่ RDP-II ([http://rdp.cme.msu.edu/doc.](http://rdp.cme.msu.edu/doc.;); Cole et al.2003) ได้ 8 ไฟลัม คือ Low G+C gram-positive bacteria (122 โคลน, 100 Phylotypes), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (67 โคลน, 54 Phylotypes), *Spirocheates* (2 โคลน, 1 Phylotype), *Proteobacteria* (16 โคลน, 11 Phylotypes), TM 7 (3 โคลน, 1 Phylotype), *Verrucomicrobia* (1 โคลน, 1 Phylotype), *Lentisphaerae* (2 โคลน, 2 Phylotypes), Planctomycetes (1 โคลน, 1 Phylotype) และไม่สามารถจำแนกไฟลัมได้ (2 โคลน, 2 Phylotypes) ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.8 นอกจากนี้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับแหล่งที่อาศัยของแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยโปรแกรม BLASTN ในอินเทอร์เน็ตที่ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 173 Phylotypes ว่าสามารถพบได้ในแหล่งที่มาใดในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.9 โดยพบว่ามีความหลากหลายของแหล่งที่มาของแบคทีเรีย โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรียที่มาจากกระเพาะรูเมนของวัวนม (Cow rumen) มากที่สุด รองลงมา คือ กระบือแม่น้ำ (Water buffalo) และ จามรี (Yak)

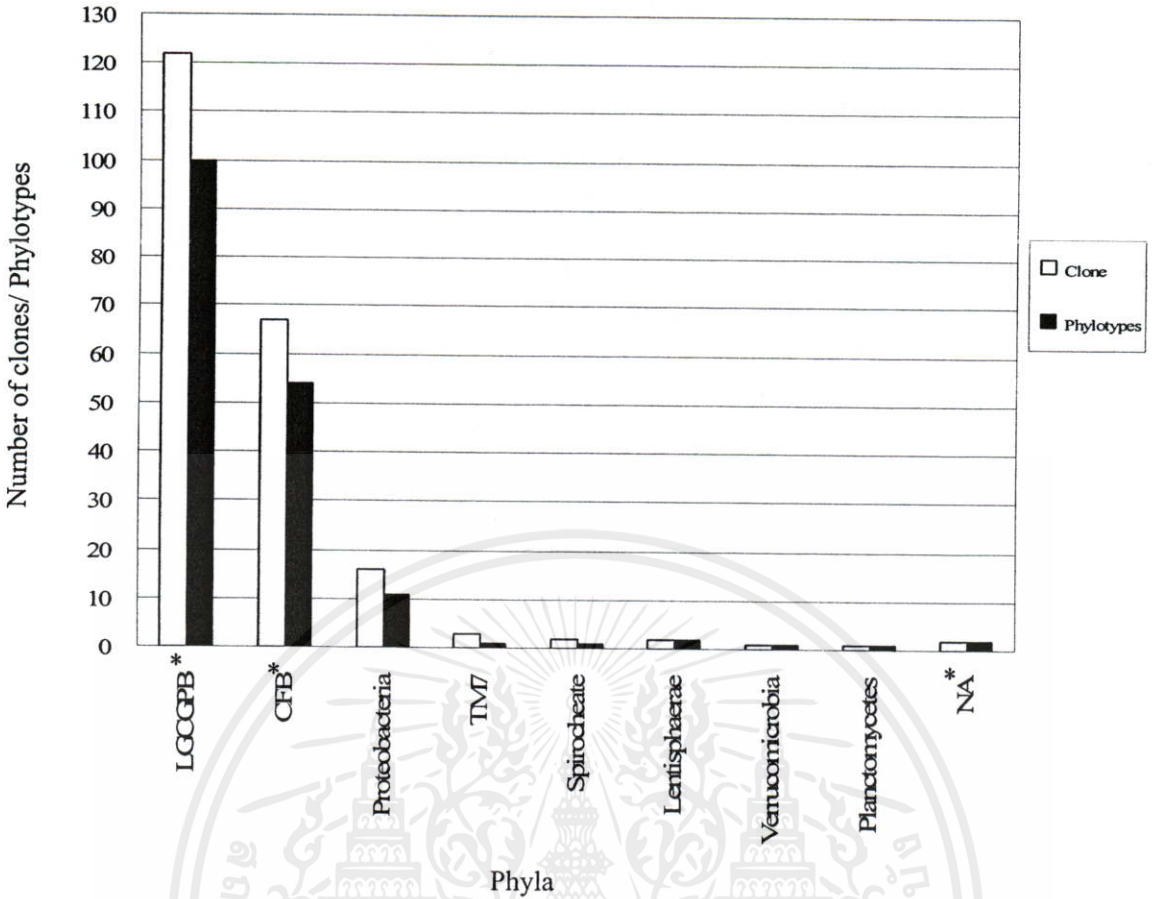
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การจัดประเภทของโคลนและ Phylotype ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่มาจาก Swamp buffalo rumen fluid library

Items	Clone		Phylotype	
	No. of clone	% total clone	No. of Phylotype	% total Phylotype
<b>Similarity</b>				
≥ 97%	97	44.9	76	43.93
< 97%	119	55.09	97	56.07
<b>Phylum</b>				
<b>Low G+C gram-positive bacteria</b>	122	56.48	100	57.8
<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	1		1	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	1		1	
Uncultured bacteria	120		98	
<b>Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids</b>	67	31.01	54	31.21
Uncultured bacteria	67		54	
<b>Spirocheates</b>	2	0.93	1	0.58
Uncultured bacteria	2		1	
<b>Proteobacteria</b>	16	7.41	11	6.36
<i>Desulfovibrio sp</i>	2		1	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1		1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1		1	
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	2		1	
Uncultured bacteria	10		7	
<b>TM 7</b>	3	1.39	1	0.58
Uncultured bacteria	3		1	
<b>Verrucomicrobia</b>	1	0.46	1	0.58
Uncultured bacteria	1		1	
<b>Lentisphaerae</b>	2	0.93	2	1.16
Uncultured bacteria	2		2	
<b>Planctomycetes</b>	1	0.46	1	0.58
Uncultured bacteria	1		1	
<b>NA<sup>a</sup></b>	2	0.93	2	1.16
Uncultured bacteria	2		2	
<b>total</b>	216		173	

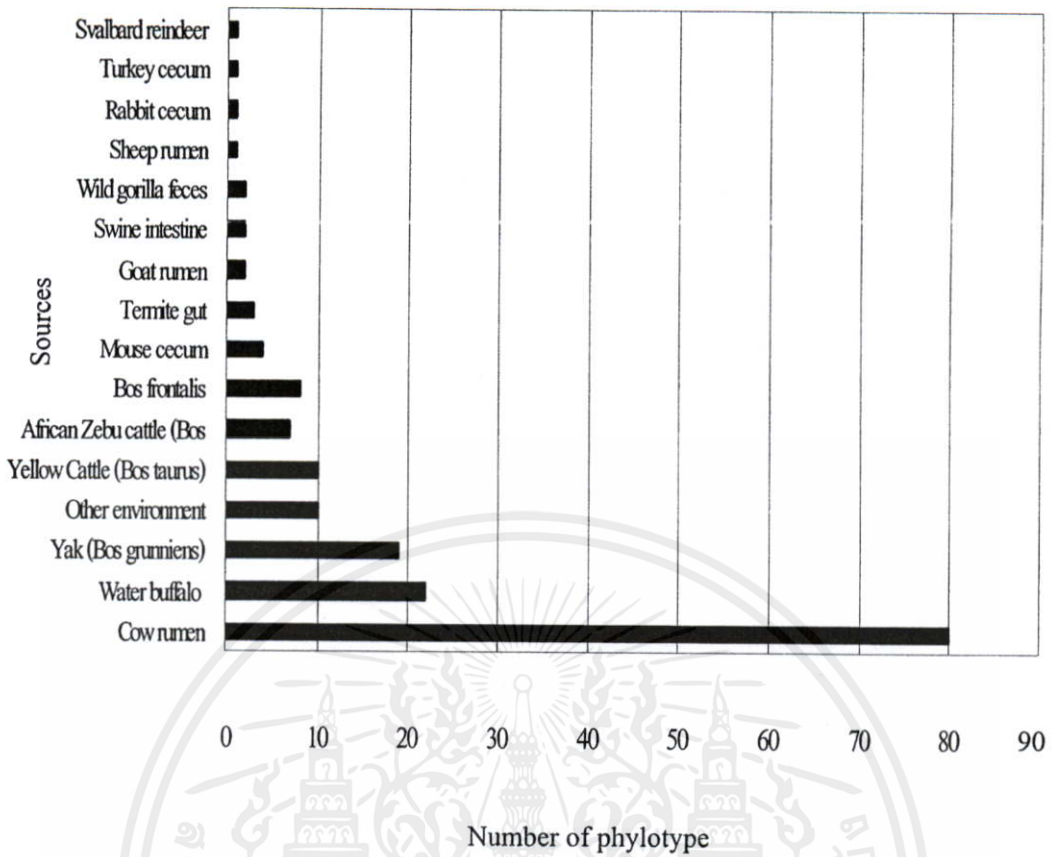
<sup>a</sup>NA: Not available

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงไฟลัมต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง (173 Phylotypes) กับฐานข้อมูล RDP-II โดย \*: LGCGPB; Low G+C gram-positive Bacteria, CFB; *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, NA: Not available

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงแหล่งที่มาของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง (173 Phylotypes) กับฐานข้อมูล GenBank

#### 4.4.2 ผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมด 173 Phylotypes มาทำการจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (Alignment) โดยโปรแกรม CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994) และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.* 2007) โดยวิธี Distance matrix และใช้ Algorithm แบบ Neighbor-joining (NJ) method กำหนดพารามิเตอร์แบบจำลองการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model ซึ่งเป็นแบบจำลองคู่ของ Kimura ที่ให้อัตราการเกิด Transition ที่เป็นการเปลี่ยนระหว่างหมู่ Purines กับหมู่ Pyrimidines และอัตราการเกิด Transversion ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงภายในหมู่ Purines หรือภายในหมู่ Pyrimidines เองนั้นเป็นอิสระต่อกัน เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4 และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง Bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นไม้พันธุกรรม โดยให้ชื่อตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนว่า BF

และตามด้วยหมายเลขโคลน และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQF16SRRN) เป็น Out group ซึ่ง Reference sequence นำมาจากฐานข้อมูล RDP-II (<http://rdp.cme.msu.edu/doc.>; Cole *et al.* 2007) และ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรีย 173 Phylotypes ดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักแบ่งได้ 8 ไฟลัม คือ Low G+C gram-positive bacteria (100 Phylotypes, 57.80 เปอร์เซ็นต์), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (54 Phylotypes, 31.21 เปอร์เซ็นต์), *Proteobacteria* (11 Phylotypes, 6.36 เปอร์เซ็นต์), *Lentisphaerae* (2 Phylotypes, 1.16 เปอร์เซ็นต์), *Spirocheates* (1 Phylotypes, 0.58 เปอร์เซ็นต์), TM 7 (1 Phylotypes, 0.58 เปอร์เซ็นต์), *Verrucomicrobia* (1 Phylotypes, 0.58 เปอร์เซ็นต์) และ *Planctomycetes* (1 Phylotypes, 0.58 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีมากที่สุด คือ Low G+C gram-positive bacteria รองลงมา คือ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ในสัตว์เลี้ยงได้แก่ วัวนม (Tajima *et al.* 1999, 2000) แกะ (Koike *et al.* 2003) และสัตว์ป่า ได้แก่ จามรี (An *et al.* 2005) และสัตว์ในแถบแอฟริกา (Nelson *et al.* 2003)

จากภาพที่ 4.11 ซึ่งแสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria พบว่าส่วนมากมีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *Clostridia* รองลงมาคือ กลุ่ม *Mollicutes* และเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Edward *et al.* (2004) ที่ทำการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนจากฐานข้อมูลที่ Whitford *et al.* (1998) และ Tajima *et al.* (1999, 2000) ได้ศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria และส่วนใหญ่มาจากโคที่กินอาหารหยาบในปริมาณมากและมีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *Clostridia* เช่นเดียวกัน รวมทั้ง Koike *et al.* (2003) ที่รายงานเกี่ยวกับประชากรแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับการบดเคาะและย่อยเยื่อใยของหญ้าแห้งในกระเพาะรูเมนของแกะ พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Low G+C Gram positive bacteria และมีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *Clostridia* เช่นกัน อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจมีความสัมพันธ์กับการบดเคาะและช่วยย่อยเยื่อใยในอาหารประเภทอาหารหยาบที่เป็นหญ้าแห้งได้ดี และพบโคลนที่สอดคล้องกับแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถบดเคาะชีวมวลของพืชภายในทางเดินอาหารของสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหารจากการศึกษาของ Larue *et al.* (2005) คือ *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* (BF 90, BF 92), *Clostridium leptum* (BF 95), *Clostridium cellobiopalum*, *Acetivibrio cellulolyticum* (BF 18, BF 288, BF 289) แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลส คือ *Eubacterium ruminantium* (BF 315), *Coprococcus eutactus* (BF 351), *Pseudobutylvibrio ruminis*, *Pseudobutylvibrio xylanivorans* (BF 57, BF 296, BF 314, BF 374, BF

448), *Succiniclasticum ruminis* (BF 416, BF 440) และแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยอะไมโลสและใช้กรดได้ *Seimonas ruminantium* (BF 265) แบคทีเรียที่ใช้โปรตีน *Clostridium proteolyticum*, *Clostridium aminophilum* (BF 286, BF 437) นอกจากนี้พบว่าโคลนที่ BF 386 (97% Identity) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Sporobacter termidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในทางเดินอาหารของปลวกกินไม้ *Nasutitermes lujae* (Wood-Feeding Termite) (Grech *et al.* 1996) ที่มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลสที่มีสารประกอบลิกนินได้

นอกจากนี้แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C Gram positive bacteria ยังมี Uncultured group อีก 5 กลุ่มใหญ่ ซึ่งในกลุ่ม Uncultured group I (BF 22, BF 278, BF 280, BF 310, BF 332) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 98 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก African zebu cattle (AY854277), Water buffalo (EF436306) และ Holstein heifer (EU381461) ส่วนกลุ่ม Uncultured group II (BF 66, BF 80, BF 97, BF 276, BF 285, BF 294, BF 321, BF 331, BF 337, BF 385, BF 398, BF 450, BF 408) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 95-98 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก African zebu cattle (AY854279) และกลุ่ม Uncultured group III (BF 26, 56, 69, 282, 361, 367, 368, 369, 444, 446) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 96-97 เปอร์เซ็นต์และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก Cattle (AB185777) ส่วนกลุ่ม Uncultured group IV (BF 259, 300, 376, 384, 431) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 96-97 เปอร์เซ็นต์และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก Yunnan yellow cattle (EF686632), Holstein heifer (EU381931) และ Yak (AF001692) และในกลุ่ม Uncultured group V (BF31, BF 295, BF 336, BF 417, BF 427, BF 447) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 97 เปอร์เซ็นต์และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก Holstein heifer (EU381478, EU382038) และ *Bos frontalis* (DQ325546) โดยในกลุ่ม Uncultured group ทั้ง 5 กลุ่ม พบว่ามีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium ที่มาจากสัตว์เคี้ยวเอื้องหลายชนิดได้แก่ African zebu cattle, Water buffalo, Horse, Holstein heifer, Yak, Yunnan yellow cattle และ *Bos frontaris* โดยเฉพาะ African zebu cattle (Nelson *et al.* 2003), Yak (An *et al.* 2005) และ *Bos frontaris* (Deng *et al.* 2007) ซึ่งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องกลุ่มสัตว์ป่าที่ได้รับอาหารโปรตีนต่ำ มีเยื่อใยสูงและสารมีพิษบางอย่างเช่น Tannin ทำให้สัตว์กลุ่มนี้ต้องปรับสภาพภายในกระเพาะรูเมนให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมเพื่อการดำรงชีวิต โดยกลุ่ม Uncultured bacteria ที่ I, II, IV และ V นั้น มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ Uncultured rumen bacterium ของสัตว์กลุ่มนี้ 97-98 เปอร์เซ็นต์ จึงน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันกับแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมนของสัตว์กลุ่มเหล่านี้

จากภาพที่ 4.12 ซึ่งแสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบรองลงมาจากกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *Prevotella* เป็นส่วนใหญ่ โดยมี Uncultured group 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งในกลุ่ม Uncultured group VI (BF 24, BF 251, BF 255, BF 273, BF 318, BF 335, BF 349, BF 350, BF 375, BF 380, BF 383, BF 403, BF 404, BF 410, BF 415, BF 420, BF 438) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 91-97 เปอร์เซ็นต์และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก Yunnan yellow cattle (EF686533), Holstein heifer (AB270080), Water buffalo (EF436423) และ Cattle (AB185513) ส่วนกลุ่ม Uncultured group VII (BF 2, BF 5, BF 32, BF 11, BF 47, BF 254, BF 268, BF 271, BF 272, BF 275, BF 283, BF 324, BF 303, BF 312, BF 339, BF 372, BF 381, BF 395, BF 406, BF 423, BF 434, BF 433) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล GenBank ที่ 91-99 เปอร์เซ็นต์ และมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium จาก Yak (EU259473, EF686518, EU259440), *Bos frontaris* (DQ673577) และ Cattle (AB185660) พบว่ากลุ่ม Uncultured group VI มีความสัมพันธ์กับ *Prevotella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโอลิโกแซ็กคาไรด์และไซลาลินอส รวมทั้งสามารถใช้โปรตีนได้ และจากการศึกษาของ Tajima *et al.* (2000) พบว่ากลุ่มประชากรของ *Prevotella sp.* จะมีปริมาณมากในโคที่ได้รับอาหารประเภทเมล็ดธัญพืช นอกจากนี้พบโคลนที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย *Prevotella ruminicola* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ Amyolytic bacteria คือ โคลน BF 403

จากภาพที่ 4.10 พบแบคทีเรีย *Proteobacteria* ในกลุ่ม Alphaproteobacteria (BF 270, BF 371, BF 373, BF 397), Betaproteobacteria (BF 21, BF 65), Deltaproteobacteria (BF 252, BF 94) และที่น่าสนใจ คือ ตัวอย่างโคลนในกลุ่ม Deltaproteobacteria ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Desulfovibrio piger* ซึ่งจากรายงานของ Eschenlauer *et al.* (2002) ที่ทำการศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ Amino acid เพื่อผลิตแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนของแกะพบว่า *Desulfovibrio piger* สามารถผลิตแอมโมเนียได้มากที่สุด ดังนั้นการที่กระบือปลักมีแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงทำให้มีแอมโมเนียปริมาณมากในกระเพาะรูเมนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suwanlee and Wanapat. (1994) ที่กล่าวว่าระดับแอมโมเนียไนโตรเจน ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) ในกระเพาะรูเมนของกระบือมีมากกว่าในกระเพาะรูเมนของโคเมื่อได้รับอาหารหยาบคุณภาพต่ำเหมือนกัน เช่น ฟางข้าว ซึ่งผลจากการที่มีปริมาณแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนที่มากกว่าทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักมีมากกว่าในโค และยังพบโคลน BF 397 มีความสัมพันธ์กับ *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amyolytica* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ Amyolytic

ไมวากรณได้ฯทั้งสน ออกทงห้ามมิให้คดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

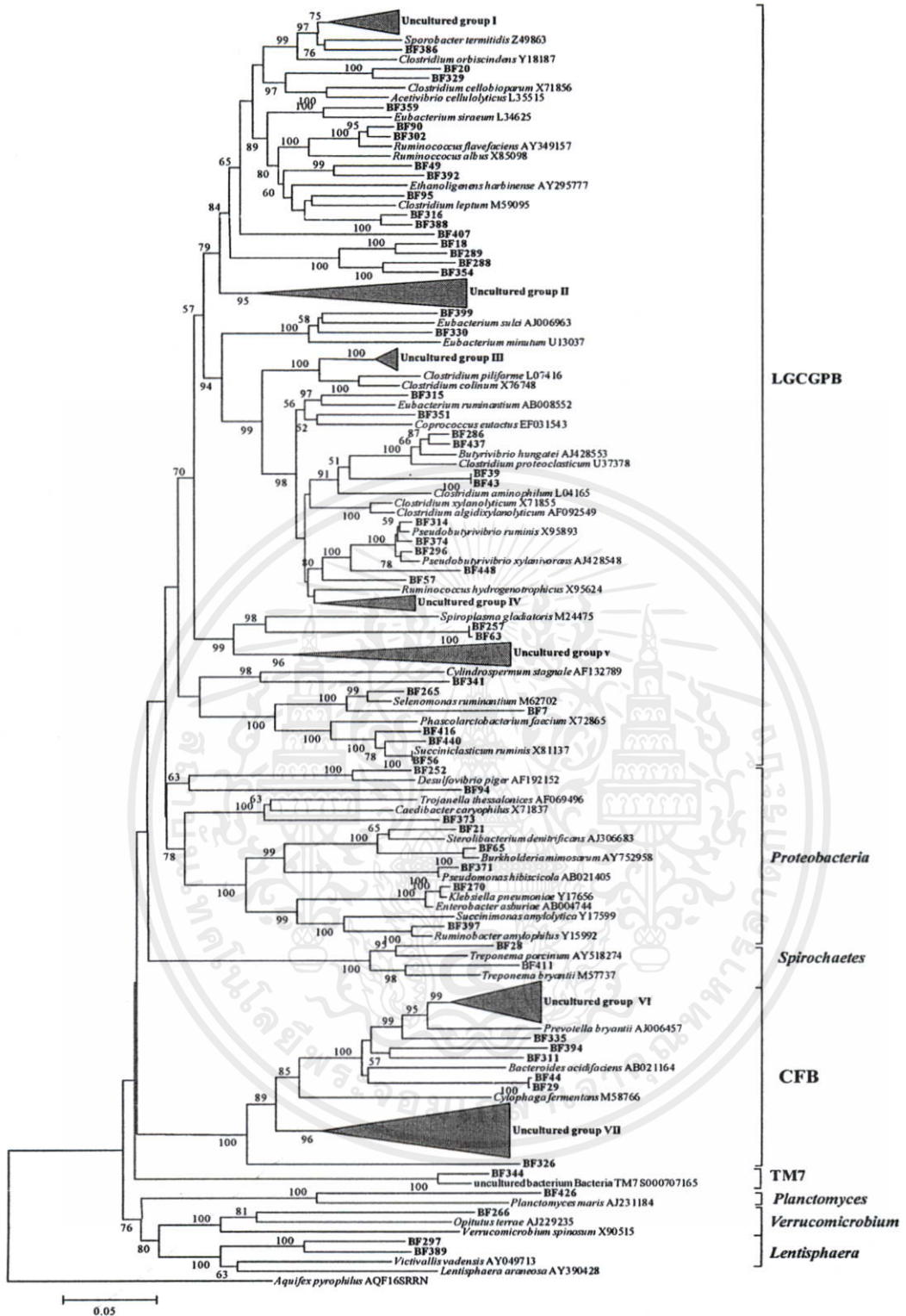
ส่วนกลุ่ม *Spirocheates* พบว่า BF411 มีความสัมพันธ์กับ *Treponema bryantii* เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Tajima *et al.* (1999) และ BF 28 มีความสัมพันธ์กับ *Treponema porcinum* ซึ่งพบได้ เช่นเดียวกันในทางเดินอาหารสุกร (Nordhoff *et al.* 2005) โดยแบคทีเรียพวก *Treponema sp.* เป็น แบคทีเรียที่สามารถย่อยเพคตินได้ดี (Kamara *et al.* 2005)

นอกจากนี้กลุ่ม TM 7 พบว่ามีความสัมพันธ์กับ Unculture bacterium TM7 (S000707165) จากทางเดินอาหารของ *Mus musculus* (BF344) และกลุ่ม *Verrucomicrobia* ที่เป็นแบคทีเรียที่พบ ในดินเป็นส่วนใหญ่ (Hedlund *et al.* 1997) พบว่าโคลนที่ BF 266 มีความสัมพันธ์กับ *Opitutus terrae* ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตโพรพิโอเนตจากดินร่วนในนาข้าวได้ (Chin *et al.* 2002) ส่วนกลุ่ม *Lentisphaera* พบว่ามีความสัมพันธ์กับ *Victivallis vadenis* (BF 297,389) และกลุ่ม *Planctomyces* พบว่ามีความสัมพันธ์กับ *Planctomyces maris* (BF426)

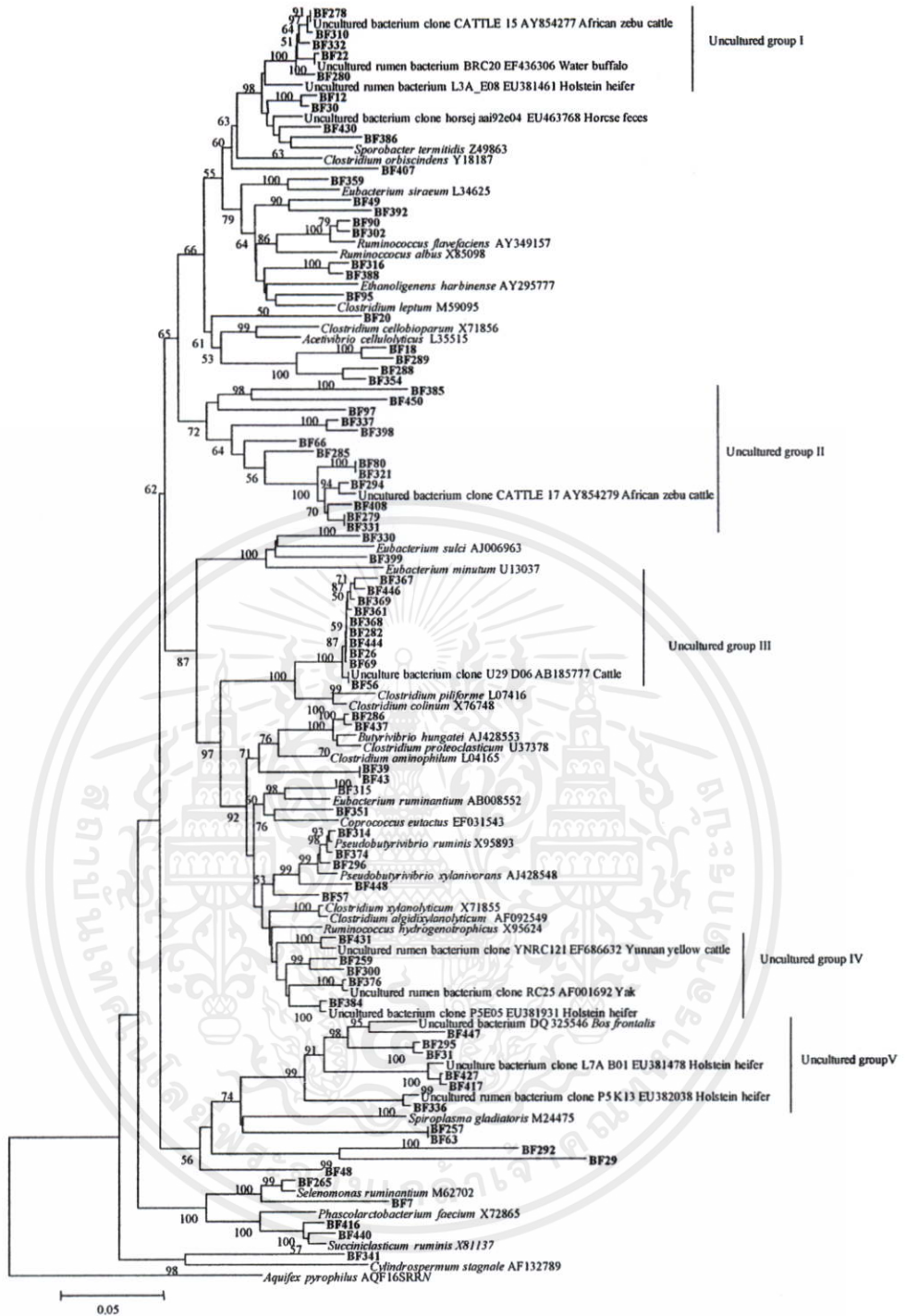
จากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียใน กระเพาะรูเมนของกระบือปลักมีความหลากหลายสูงและส่วนมากเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยเยื่อใย นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้กระบือสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารที่มีสารประกอบ ที่เป็นพิษบางชนิดได้ โดยสอดคล้องกับจรรยา จันทลักขณา. (2527) ที่กล่าวว่ากระบือปลักสามารถใช้ ประโยชน์จากอาหารคุณภาพต่ำที่ขึ้นตามธรรมชาติหรือที่เป็นวัชพืชได้มากกว่าโค

จากการขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Accession number) ของประชากรแบคทีเรีย 173 Phylotypes กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin>. ซึ่งได้ เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ EU850442-EU850613

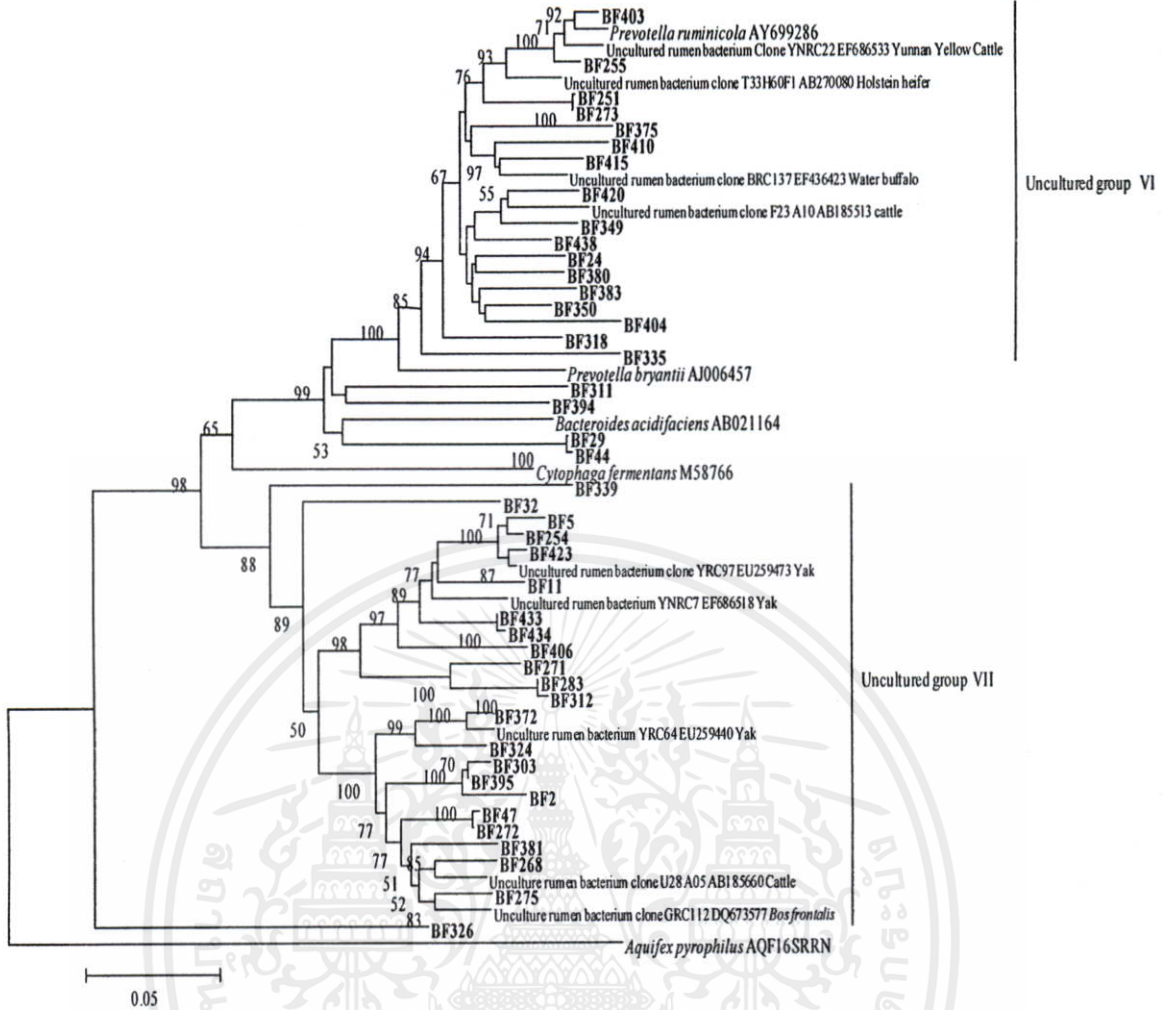
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก และ Reference sequence โดยโปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model สเกล 0.05 แทน Evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (Node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งแสดงเฉพาะค่า Bootstrap Value ที่มากกว่า 50% และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQF16SRRN) เป็น Out group



ภาพที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria (LGCPB) ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก โดยโปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) method และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model สเกล 0.05 แทน Evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (Node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งแสดงเฉพาะค่า Bootstrap Value ที่มากกว่า 50% และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQF16SRRN) เป็น Out group



ภาพที่ 4.12 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัดัง โดยโปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model สเกล 0.05 แทน Evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (Node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งแสดงเฉพาะค่า Bootstrap Value ที่มากกว่า 50% และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQP16SRRN) เป็น Out group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียจากโมเลกุลของ 16S rDNA ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*; Swamp-type) ด้วยการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งจากโคลนทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ 216 โคลน ได้ 173 Phylotypes จากนั้นเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 173 Phylotypes กับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งใช้ค่าความเหมือนที่ 97 เปอร์เซ็นต์ (Deng *et al.* 2007) เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจ โดยพบว่ามี 97 Phylotypes (56.07 เปอร์เซ็นต์) มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น คาดว่าโคลนเหล่านี้จะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่ได้รับการจำแนกมาก่อน (Unidentified bacteria) และจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียของกระบือปลักที่สร้างขึ้นโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) ด้วย Kimura-2-parameter model ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4 ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยใช้และใช้ *Aquifex pyrophilus* (AQF16SRRN) เป็น Out group พบว่า ประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักแบ่งได้ 8 ไฟลัม คือ Low G+C gram-positive bacteria (57.8 เปอร์เซ็นต์), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* (31.21 เปอร์เซ็นต์), *Proteobacteria* (6.36 เปอร์เซ็นต์), *Lentisphaerae* (1.16 เปอร์เซ็นต์), *Spirocheates* (0.58 เปอร์เซ็นต์), , TM 7 (0.58 เปอร์เซ็นต์), *Verrucomicrobia* (0.58 เปอร์เซ็นต์), และ *Planctomycetes* (0.58 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีมากที่สุด คือ Low G+C gram-positive bacteria รองลงมา คือ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids* และพบว่ามี ความหลากหลายของแบคทีเรียที่ย่อยเยื่อใยอยู่ในกลุ่ม *Clostridia* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้กระบือสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารที่มีสารประกอบที่เป็นพิษบางชนิดได้ ผลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักพบว่ามี ความหลากหลายสูงซึ่งอาจจะพบแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานปศุสัตว์และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์.โอกาสและข้อได้เปรียบของการเลี้ยงกระบือ. [Online]. Available: <http://www.dld.go.th/service/buffalo/buff03.html>.
- กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2546. พันธุ์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชุมชนการเกษตร.
- จรัญ จันทลักขณา. 2527. ควายในระบบไร่นาไทย. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนา.
- เจษฎา เค่นดวงบริพันธ์. 2545. “ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (Systematic and phylogeny) เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา.”วารสารวิทยาศาสตร์.56 (3):168-175.
- ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น.ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 6. เชียงใหม่: ชนบรรณการพิมพ์.
- ไบโอไอทีทีม. 2547. เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ขอนแก่น. ฟันนี้พลับลิชชิง.
- ถัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- วิวัฒน์ ชวนะนิกุล. 2531. กระบือ. [Online]. Available: [http:// www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db\\_directory/ruminant/lg\\_rum/buffalo/buffalo\\_brd.htm](http://www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db_directory/ruminant/lg_rum/buffalo/buffalo_brd.htm)
- วิโรจน์ จันทรัตน์. 2540. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล. 2541. “จุดยืนที่ยั่งยืนในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.” วารสารโคนม.17 (4):60-62.
- ศิริพร สิริประณีต. 2543. “การสร้างสิ่งมีชีวิตตัดแปลงพันธุกรรม.” หน้า 1-20. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการจีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศรีสกุล วรจันทรา และ รณชัย สิริไกรพงษ์. 2539. โภชนศาสตร์สัตว์. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- สุรชัย สุวรรณดี. 2546. เอกสารประกอบการสอน cattle & buffalo production. [Online]. Available: [http://www.agri.ubu.ac.th/suralee/buffalo45-8\(edit\).pdf](http://www.agri.ubu.ac.th/suralee/buffalo45-8(edit).pdf).
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. แบททีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม: สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.
- อัญชลี ณ เชียงใหม่. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. เรื่องของควายใครว่าไม่สำคัญ. [Online]. Available: <http://www.kwithai.com> .

- อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533. “ดีเอ็นเอพาหะ.” หน้า 3-5 ใน สุมาลี ตั้งประดับกุล. **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 โครงการอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อุทัย หนูแดง. 2543. **ปศุสัตว์.** กรุงเทพฯ. อักษรไทย.
- An ,D., Dong, X. and Z, Dong. 2005. “ Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses.” **Anaerobe.** 4:207–215.
- Avgustin, G., Wright, F. and Flint, H.J. (1994) “Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen.” **Int J Syst Bact** 44:246–255.
- Castillo, L. S. 1981.**The Nutrition of Water Buffaloes in Recent Advances Buffalo Research and Development.** FFTC book series. no.22.
- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato,H. and Costerton, J.W. 1991. “Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen.” pp. 595-624. In: **Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants** (Tsuda, T., Sasaki, Y. and Kawashima, R. ends.).Toronto: Academic Press.
- Chin, K-J. and Janssen, P. H. 2002. “Propionate Formation by *Opiritus terrae* in pure culture and in Mixed Culture with a Hydrogenotrophic Methanogen and Implications for Carbon Fluxes in Anoxic Rice Paddy Soil.” **App. Environ. Microbiol.**68 (4): 2089–2092.
- Church, D. C. 1969. **Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants.** Volume I. Oregon State University.
- Cockrill, W.R. 1974. **The Husbandry and Health of Domestic Buffalo.** Rome: FAO.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Mohideen, K-S., McGarrell, A.S., Bandelal, D.M., Cardenas, A.M., Garrity, E. and Tiedje J.M. 2007. “The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data.” **Nucleic Acids. Research.**35.:D169–D172.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H. and Wanapat, M. 2007. “The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review.” **Mol Biol Rep.** [Online]. Available :<http://www.ias.ac/ MolBiolRep /jul102005/124.pdf>.

- Devendra, C. 1985. "Comparative nitrogen utilization in Malasian swamp buffaloes and Kedah-Kelanton cattle." *In Proc 3<sup>th</sup> AAAP. Animal Science Congress*, Seoul, South Korea.
- Edward, J.E., MacEwan, N.R., Travis, A.J. and Wallace, R.J. 2004. "16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity." *Antonie Van Leeuwenhoek*. 86: 263–281.
- Eschenlauer, S.C., McKain, P.N., Walker, N. D., McEwan, N. R., Newbold, C. J. and Wallace, R. J. 2002. "Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen." *Environ. Microbiol.* 68 (10):4925–4931
- Fonty, G. and Joblin, K.N. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganism in relation to fiber digestion. pp. 665-680. In Tsudee, T., Sasada, Y. and Kawashima, C. "Digestion and Metabolism in Ruminants." Sandiego. Academic Press.,
- Gel Compar II. 2004. *User's Guide: a Manual for the BioNumerics and GelCompar*. Madison: Applied Maths BVBA.
- Gerald C. Kalp. 2002. *Cell and Molecular Biology Concept and Experiments*. New York: John Wiley & Sonns, Inc.
- Grech-Mora, I., Fardeau, M.-L., Patel, B. K., Ollivier, B., Rimbault, A., Prensier, G., Garcia, J.-L. and Garnier-Sillam E. 1996. "Isolation and characterization of *Sporobacter termitidis* gen. nov., sp. nov., from the digestive tract of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 512–518.
- Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y. and Garnier-Sillam, E. 1999. "Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances." *Analisis* 27: 439–442.
- Higgins, D., Thompson, J. and Gibson, T. 1994. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. New York: Academic Press.
- Jarvis, G.N., Kurtovic, A., Hay, A.G. and Russell, J.B. 2001. "The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains." *FEMS Microbiol Ecol* 35:49–56
- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwililaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand." *J. Basic Microbiol.* 44:430-444.

- Kantapanit, C., Pisone, U. and Pinkorton, F. 1972. "Study on roughage to concentrate ratio in cattle and buffaloes fattening." **Annu.Rep.** Khon Kaen, The Northeast Agric.Res.Sta.
- Kamara, D.N. 2005. "Rumen microbial ecosystem." **Curr. Sci.** 89(1): 124-135.
- Karp, G. 2000. **Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments.** 3<sup>th</sup>. New York: John wiley and sons Inc.
- Kennedy, P.M., Beniface, A.N., Liang, Z.J., Muller, D. and Murray, R.M. 1992. "Intake and digestion in swamp buffaloes and cattle.II.The comparative response to use supplement in animal fed tropical grasses." **J.agric.Sci.**119:243-254.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. "Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria." **FEMS. Microbiol. Lett.** 229: 23–30.
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R. and Morrison, M. 2005. "Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing". **Environ. Microbiol.** 7: 530–543.
- McSweeney, C.S., Denman, S.E., Wright, A-D. G. and Yu, Z. 2007. "Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology." **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 20(2): 283-294.
- Madigan, M. T. and Martinco, J.M. 2006. **Brock Biology of Microorganism.** 11<sup>ed</sup>. New Jersey: Pearson Education Inc.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L. and Ghiorse, W.C. 1999 "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples".**Appl Environ Microbiol** 65: 4715–4724
- Mülhardt, C. 2007. **Molecular Biology and Genomics.**4<sup>th</sup> ed. London.: Oxford Elsevier Inc.
- Nelson, K.E., Zinder, S.H., Hance, I., Burr, P., Odongo, D., Wasawo, D., Odenyo, A. and Bishop, R. 2003. "Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche." **Environ.Microbiol** 5:1212–1220.
- Nei, M. and Kumer, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** New York: Oxford University Press,Inc.

- Nordhoff, M., Taras, D., Macha, M., Tedin, K., Bussergen, H-J. and Wieler, L. H. 2005. "*Treponema berlinense* sp. nov. and *Treponema porcinum* sp. nov., novel spirochaetes isolated from porcine faeces. **Inter. J. of Syst and Evol Microb** . 55: 1675–1680.
- Pradhan, K. 1991. Rumen ecosystem in relation to cattle and buffalo nutrition. pp 221-243. In Wanapat, M. and Sommart, K (eds). **In Proc 1<sup>st</sup> Asian Buffalo Association Congress**. Khon Kaen.
- Prasad, D. and Pradhan, K. 1990. "Relative concentration of protozoa, bacteria and some enzyme in the rumen of cattle, buffalo and sheep fed various straw-concentrate diets." **J.Anima.Sci**. 60(5): 576-581.
- Orskov, E.R. and Ryle, M. 1990. **Energy Nutrition in Ruminants**. London: Oxford. Elsevier.
- Ray, C. S., Kundu, S., and Thakur, A. R. 2006. "Microbial DNA extraction from samples of varied origin." **Curr. Sci**. 91(12): 1697-1700.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring Harbor**. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Staley, J. T., Gunsalus, R P., Lory, S. and Perry, J. J. 2007. **Microbial Life**. 2<sup>nd</sup>. New York: Sinauer Associates.
- Sundset, M.A., Cann, I.K.O., Mathiesen, S.D. and Mackie, R.I. 2005. "Phylogenetic analysis of rumen bacterial populations in reindeer." **In Proc. Conference on Gastrointestinal Function**, Chicago .
- Suwanlee, S. and Wanapat, M. 1994. "Effect of ruminal ammonia nitrogen on total volatile fatty acids, bacterial population and digestibility in swamp buffaloes" **In Proc. 1<sup>st</sup> Asian buffalo association congress**. Khon Kaen.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M. and Benno, Y. 1999. "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." **FEMS. Microbiol. Ecol**. 29: 159–169.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I. and Benno Y. 2000. "Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet." **Anaerobe** 6:273–284.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

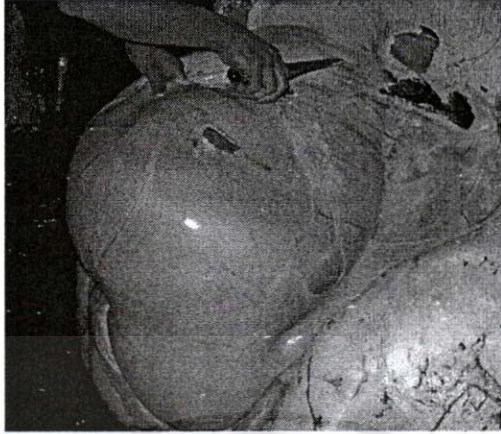
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Aminov, A.I. 2001. "Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of novel group of archaea not associated with known methanogen." **FEMS.Microbiol.Lett.** 200:67-72.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and K. S. 2007. "MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis." **Mol.Bio.Evol.** 24(8): 1596-1599.
- Wanapat, M., Sommart, K., Wachirapakorn, Uriyapongson, C.S. and Wattanachaint, C. 1994. "Recent advances in swamp buffalo nutrition and feeding." **In Proc. 1<sup>st</sup> Asian buffalo association congress.** Khon Kaen: Khonkhen.pub.co.
- Wanapat, M. and Pimpa, O. 1999. "Effect of ruminal NH<sub>3</sub>-N level on ruminal bacteria fermentation purine derivative digestibility and rice straw intake in swamp buffalo." **Asian-Aus.J.Anim.Sci.**12:904-907.
- Wanapat, M. 2001. **Swam Buffalo Rumen Ecology and Its Manipulation.** [Online]. Available: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul102005/124.pdf>.
- Wang, Y.L., Yang, R.H., Mao, A.J., Wang, J. Q., and Dong, Z. Y. 2005. "Phylogenetic diversity analysis of bacteria using independent method." **J Chinese Sci.**6:915-919.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J. and Teather, R.M. 1998. "Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes." **Anaerobes.** 4: 153-163.
- Woolcock, J.B. 1991. **Microbiology of Animal and Animal Products.** New York: Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Zhengdong, Z., Richard, C. W. and George, E.F. 2002. "Identification of characteristic oligonucleotides in bacterial 16S ribosomal RNA sequence dataset." **.Bioinformatic.**18: 244-250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก



ภาพผนวกที่ ก1 แสดงการเก็บของเหลวในกระเพาะหมักของกระบือปลักหลังจาก  
จากโรงฆ่าสัตว์เขตหนองจอก กรุงเทพฯ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาคผนวก ข**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ An *et al.* (2005)

### 1) Extraction buffer

100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 8.0)

100 มิลลิโมลาร์ EDTA (pH 8.0)

100 มิลลิโมลาร์ Sodium phosphate buffer (pH 8.0)

1.5 โมลาร์ NaCl

1 เปอร์เซ็นต์ Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

### 2) 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Proteinase K

### 3) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Lysozyme

### 4) 20 เปอร์เซ็นต์ SDS

### 5) สารละลาย Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1 โดยปริมาตร)

### 6) สารละลาย Chloroform-Isoamyl alcohol (24:1 โดยปริมาตร)

### 7) Isopropanol

### 8) 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol

### 9) น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

## 2. สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ของบริษัท Fermentas

1) 1X Taq Buffer (75 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 20 มิลลิโมลาร์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01 เปอร์เซ็นต์ Tween 20) with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2) 10 มิลลิโมลาร์ dNTP

3) 400 ไมโครโมลาร์ dNTP mix

4) 2 มิลลิโมลาร์  $\text{MgCl}_2$

5) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร Taq DNA Polymerase

## 3. สารเคมีที่ใช้ในตรวจวิเคราะห์แยกขนาดดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

### 1) สารละลาย 5X TBE (Tris-borate)

ผสม Tris-borate 54 กรัม Boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8) 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เมื่อใช้งานให้เจือจางความเข้มข้นของ 5X TBE เป็น 1X TBE

### 2) 6X loading buffer

ผสม 0.25 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue และ 30 เปอร์เซ็นต์ Glycerol ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3) สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร  
ละลายเอธิเดียมโบรไมด์จำนวน 0.5 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล  
(เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือเวลาเตรียมสารละลาย)

4) Lambda *Hind*III (Fermantas)

5) 100 bp DNA Ladder (Fermantas)

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

Bacto-tryptone 10.0 กรัม

Yeast-extract 5.0 กรัม

NaCl 5.0 กรัม

เตรียมในน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani agar)

Bacto-tryptone 10.0 กรัม

Yeast-extract 5.0 กรัม

NaCl 5.0 กรัม

Agar 15.0 กรัม

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น Agar จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Agar แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto-tryptone 20.0 กรัม

Yeast-extract 5.0 กรัม

NaCl 0.5 กรัม

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. สารเคมีสำหรับการเตรียม Competent cell

- 1) สารละลาย TB buffer ประกอบด้วย
  - 10 มิลลิโมลาร์ PIPES
  - 55 มิลลิโมลาร์  $MnCl_2$
  - 15 มิลลิโมลาร์  $CaCl_2$
  - 250 มิลลิโมลาร์ KCl

## 6. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการมีผลผลิตพีซีอาร์ของพลาสมิด

- 1) ยาปฏิชีวนะ Ampicillin เตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
- 2) Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG)
  - เตรียม Stock ที่ความเข้มข้น 1M โดยละลาย 2 กรัมต่อน้ำ 8 มิลลิลิตร หลังจากละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วย 0.22 ไมโครมิลลิฟิลเตอร์ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
- 3) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)
  - ละลาย 20 มิลลิกรัม ใน Dimethylformamide 400 ไมโครลิตรแล้วเก็บในหลอดที่กันแสงที่อุณหภูมิ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

## 7. ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Kit)

- 1) ชุดแยกจีโนมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Purified DNA) Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System (Promega)
  - Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up Resin
  - Isopropanol
  - น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - Minicolumn
- 2) ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
  - บัฟเฟอร์ QG (Solubilization buffer)
  - บัฟเฟอร์ PE (Wash buffer)
  - Isopropanol
  - น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - Spin column
- 3) ชุดโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ InsTAclone<sup>™</sup> PCR Cloning Kit โดยใช้เวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermantas)
  - 10X Ligation Buffer





ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค 1 ผลการจำแนกโคลนจาก Rumen fluid library ของกระบือปลักโดยใช้โปรแกรม BLASTN จากฐานข้อมูล GenBank และ Similarity Classifier จากฐานข้อมูล RDPII

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
1	LGCGPB <sup>a</sup>	URB <sup>d</sup> 4C0d-9 /AB034022	1502	91%
2	CFB <sup>b</sup>	URB YRC100 /EU259476	1486	93%
4, 73	Proteobacteria	URB P5_I03 /EU381934	1513	97%
5, 70	CFB	URB YRC97 /EU259473	1502	91%
6, 88	LGCGPB	URB SJTU_B_01_32 /EF401915	1416	88%
7	LGCGPB	URB YRC80 /EU259456	1524	94%
9	CFB	URB BE5 /AY244922	1487	97%
11,402	CFB	URB YNRC31 /EF686542	1487	96%
12	LGCGPB	URB C14_f01_3 /EF614895	1477	94%
18	LGCGPB	URB BRC68 /EF436354	1487	95%
20	LGCGPB	URB A14 /DQ085088	1505	99%
21	Proteobacteria	URB HOCiCi25 /AY328574	1520	99%
22	LGCGPB	URB BRC20 /EF436306	1494	98%
24, 52,116	CFB	URB clone BE5 /AY244922	1497	95%
26	LGCGPB	URB U29-C03 /AB185763	1511	97%
28	Spirochaetes	URB F24-C07 /AB185596	1475	98%
29,234,235	CFB	URB NED4D1 /EF445255	1488	90%
30	LGCGPB	URB L3A_E08 /EU381461	1493	94%
31	LGCGPB	URB P5_C02 /EU381813	1520	91%
32,336	CFB	URB YRC75 /EU259451	1488	98%
36	Proteobacteria	URB clone c1 /AY850288	1505	91%
39,43	LGCGPB	URB GRC97 /DQ673562	1495	94%
40	CFB	URB BRC119 /EF436405	1486	98%
44	CFB	URB clone BE5 /AY244922	1497	95%
46	Verrucomicrobia	URB RsaP110/AJ229235	1497	95%
47	CFB	URB GRC112 /DQ673577	1489	95%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
48	<sup>a</sup> LGCGPB	<sup>d</sup> URB YNRC97 /EF686608	1493	89%
49, 309	LGCGPB	URB YNRC97 /EF686609	1493	98%
56	LGCGPB	URB BRC119 /EF436394	1569	97%
57,197	LGCGPB	URB clone A11 /DQ085085	1513	95%
61	LGCGPB	URB CATTLE_17 /AY854279	1516	90%
62	LGCGPB	<i>S. ruminantium</i> /AB017195	1475	91%
63	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EF686597	1484	97%
64	<sup>b</sup> CFB	URB T33H60F1 /AY244922	1497	95%
65	Proteobacteria	URB clone BIsii8 /AJ318182	1489	98%
66	LGCGPB	URB T28H60F38 /AB270047	1540	91%
69	LGCGPB	URB cloneU29-C03 /AB185763	1511	97%
79	CFB	URB NED6C4 /EF445247	1487	97%
80	LGCGPB	NA /EF686567	1489	97%
90,110	LGCGPB	URB F23-A05 /AB185508	1509	98%
94	NA	NA/AY570581	1520	91%
95	LGCGPB	URB L7A_B09 /EU381487	1439	96%
97	LGCGPB	URB p-2513-18B5 /AF371834	1407	96%
251,189	CFB	URB BRC29 / EF436315	1493	94%
252,313	Proteobacteria	<i>Desulfovibrio sp.</i> /AF056090	1472	94%
254,119,209,425	CFB	URB cloneU28-G11 /AB185729	1522	98%
255	CFB	URB YNRC22 /EF686533	1493	97%
257	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EF686597	1494	92%
259	LGCGPB	URB L3A_G07 /EU381740	1485	96%
260,334,152,308,305	LGCGPB	URB L7B_E08 /EU381650	1443	97%
261	Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> /AJ293470	1535	99%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	Phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
263	<sup>a</sup> LGCGPB	<sup>d</sup> URB 3C3d-14 /AB034068	1520	99%
264,267	LGCGPB	URB CATTLE_15 /AY854277	1521	89%
265	LGCGPB	URB GRC107 /DQ673572	1524	97%
266	Verrucomicrobia	URB RsaP110 /AY571501	1501	89%
268	<sup>b</sup> CFB	URB cloneU28-A05 /AB185660	1525	96%
269	CFB	URB YRC70 /EU259446	1491	96%
270	Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i> /DQ444287	1532	99%
271	CFB	URB BRC96 /EF436382	1486	99%
272, 256	CFB	URB GRC112 /DQ673577	1455	95%
273	CFB	URB BRC29 /EF436315	1450	95%
274, 278,277	LGCGPB	URB CATTLE_15 /AY854277	1521	98%
275	CFB	URB GRC33 /DQ673498	1489	95%
279	LGCGPB	URB YRC95 /EU259471	1488	96%
280	LGCGPB	URB L7B_B03 /EU381569	1447	98%
282	LGCGPB	URB U29-C03 /AB185763	1511	97%
283	CFB	URB BRC96 /EF436382	1486	96%
285	LGCGPB	URB T28H60F38 /AB270047	1540	98%
286	LGCGPB	URB F24-F04 /AB185626	1542	97%
287	LGCGPB	URB SR5 /DQ394639	1519	93%
288	LGCGPB	URB YNRC19 /EF686530	1533	94%
289	LGCGPB	URB BRC68 /EF436354	1484	95%
292	CFB	URB YRC22 /EU259398	1487	95%
293	LGCGPB	URB F23-A05 /AB185508	1509	97%
294	LGCGPB	URB CATTLE_17 /AY854279	1516	96%
295	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EU381813	1520	91%
296	LGCGPB	URB GRC111 /DQ673576	1495	98%

<sup>a</sup>LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup>CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup>NA: Not available

<sup>d</sup>URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
287	<sup>a</sup> LGCGPB	<sup>d</sup> URB SR5 /DQ394639	1519	93%
297	Lentisphaerae	URB RFN4 /AB009195	1407	97%
288	LGCGPB	URB YNRC19 /EF686530	1533	94%
289	LGCGPB	URB BRC68 /EF436354	1484	95%
292	<sup>b</sup> CFB	URB YRC22 /EU259398	1487	95%
293	LGCGPB	URB F23-A05 /AB185508	1509	97%
294	LGCGPB	URB CATTLE_17 /AY854279	1516	96%
295	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EU381813	1520	91%
296	LGCGPB	URB GRC111 /DQ673576	1495	98%
297	Lentisphaerae	URB RFN4 /AB009195	1407	97%
300, 301	LGCGPB	URB YRC27 /EU259403	1492	99%
302	LGCGPB	URB L3A_F04 /EU381454	1472	97%
303	CFB	URB YRC100 /EU259476	1486	93%
306,336	LGCGPB	NA/EU382038	1551	98%
309	LGCGPB	URB YNRC97 /EF686608	1493	98%
310	LGCGPB	URB CATTLE_15 /AY854277	1521	98%
311	CFB	URB P5_H23 /EU381764	1477	96%
312	CFB	URB BRC96 /EF436382	1486	96%
314	LGCGPB	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> /AF202262	1525	98%
315	LGCGPB	URB BRC103 / EF436389	1507	99%
316	LGCGPB	URB U29-E09 / AB185787	1530	97%
318	CFB	URB T20H60F37 /AB269972	1494	94%
321	LGCGPB	URB YNRC56 / EF686567	1489	97%
322	CFB	URB NED4A11 /EF445222	1490	95%
323	<sup>a</sup> LGCGPB	URB CATTLE_15 /AY854277	1521	98%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
324	<sup>b</sup> CFB	<sup>d</sup> URB BRC119 /EF436405	1486	98%
326	CFB	URB F23-E02 /AB185544	1514	92%
327	<sup>a</sup> LGCGPB	URB F24-B10 /AB185589	1472	97%
329	LGCGPB	URB L7A_F07/EU381597	1452	96%
330	LGCGPB	L7B_E08 /EU381650	1443	97%
331	LGCGPB	URB P5_K13 / EU38203	1551	98%
332	LGCGPB	URB clone 3 /EU126851	1493	98%
335	CFB	URB T33H60F15/AB270090	1488	96%
337	LGCGPB	URB F24-H02/AB185646	1535	97%
339	CFB	URB YRC70 /EU259446	1491	95%
340	LGCGPB	URB L7B_B04/ EU381571	1449	99%
341	LGCGPB	URB L3A_B12	1477	94%
342,343,344	TM7	<sup>c</sup> NA /DQ815554	1455	95%
347	CFB	URB BRC94 /EF436380	1492	97%
349	CFB	URB P5_J13 /EU381791	1491	97%
350	CFB	URB NED4B7 /EF445223	1489	97%
351	LGCGPB	URB A13 /AF349416	1513	92%
354	LGCGPB	URB NED3B6 /EF445144	1481	95%
355	LGCGPB	NA /EU381997	1531	91%
356	LGCGPB	URB F24-G05 /AB185637	1545	98%
359	LGCGPB	URB BE33 /AY244949	1477	97%
361	LGCGPB	URB U29-D06 /AB185777	1510	97%
362,113	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EU381997	1531	91%
365	CFB	URB YRC70 /EU259446	1491	95%
367, 238	LGCGPB	URB U29-D06 /AB185777	1510	96%
368	LGCGPB	URB U29-D06 /AB185777	1510	97%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
369	<sup>a</sup> LGCGPB	<sup>d</sup> URB U29-D06 /AB185777	1510	96%
371	Proteobacteria	URB EHFS1_S04b /EU071481	1507	98%
372	<sup>b</sup> CFB	URB YRC64 /EU259440	1490	97%
373	Proteobacteria	URB YRC67 /EU259443	1461	98%
374	LGCGPB	URB T28H60F71 /AB270069	1482	99%
375	CFB	URB BRC86 /EF436372	1493	93%
376	LGCGPB	URB BRC114 /EF436400	1511	97%
378	Proteobacteria	URB RsC01-017 /AB198590	1320	98%
379	LGCGPB	URB 3C3d-14/ AB034068	1520	99%
380	CFB	URB PE17 /AY838473	1498	95%
381	CFB	URB BE36 /AY244952	1495	96%
383	CFB	URB BE6 /AY244923	1497	94%
384	LGCGPB	URB P5_E05 /EU381931	1496	97%
385	LGCGPB	URB CFT214E5 /DQ456434	1440	89%
386	LGCGPB	URB U28-G07 /AB185726	1507	97%
388	LGCGPB	URB R-21 /AB239487	1487	98%
389	Lentisphaerae	URB F23-D04 /AB185535	1502	97%
392	LGCGPB	URB YRC98 /EU259474	1495	98%
394	CFB	URB 12-129 /AF018497	1449	90%
395	CFB	URB YRC100 /EU259476	1486	95%
396	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /DQ673492	1535	96%
397,424	Proteobacteria	<i>Ruminobacter amylophilus</i> /Y15992	1539	96%
398	LGCGPB	URB U29-B06 /AB185755	1532	95%
399,219,244	LGCGPB	URB P5_D17 /EU382016	1478	92%
403	CFB	URB NED4H7 /EF445224	1490	97%
404	CFB	URB NED4A11 /EF445222	1490	91%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับราชการ ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
406	<sup>b</sup> CFB	<sup>d</sup> URB YRC97 /EU259473	1489	92%
407	<sup>a</sup> LGCGPB	URB dgC-42 /AB218341	1424	91%
408	LGCGPB	URB YNRC95 /EU259471	1488	96%
410	CFB	URB P5_M01 /EU381757	1491	94%
411	LGCGPB	URB L7A_B01/ EU381478	1393	97%
415	CFB	URB BRC137 /EF436423	1493	94%
416, 149	LGCGPB	URB BS13 /AY244967	1521	96%
417	LGCGPB	URB NA/EU381478	1393	97%
420	CFB	URB F23-A10 /AB185513	1528	94%
423	CFB	URB YRC97 /EU259473		98%
426	Planctomycetes	URB Z36/DQ353917	1490	93%
427,135	LGCGPB	<sup>c</sup> NA /EU381478	1393	97%
430	LGCGPB	URB F23-B02/AB185517	1534	97%
431,409,220,439,249	LGCGPB	URB YNRC121 /EF686632	1450	97%
432	LGCGPB	URB BRC89 /EF436375	1490	98%
433	CFB	URB YNRC7 /EF686518	1487	93%
434	CFB	URB YNRC7 /EF686518	1487	93%
435	CFB	URB YRC97 /EU259473	1489	98%
436	LGCGPB	URB SJTU_D_07_85 /EF401251	1491	94%
437	LGCGPB	URB F24-F04 /AB185626	1452	97%
438	CFB	URB BRC29 /EF436315	1493	94%
440	LGCGPB	URB BRC108 /EF436394	1569	98%
442	LGCGPB	URB P5_J15 /EU381786	1474	99%
444	LGCGPB	URB U29-D06 /AB185777	1510	97%
445	LGCGPB	URB L7A_B01/ EU381478	1393	97%
446	LGCGPB	URB U29-C03 /AB185763	1511	96%

<sup>a</sup> LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup> CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup> NA: Not available

<sup>d</sup> URB: Uncultured rumen bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

Clone no	phylum	Nearest relation (GenBank accession No)	Length	% identity
447	<sup>a</sup> LGCGPB	<sup>d</sup> URB clone Z7 /DQ353904	1547	97%
448	LGCGPB	URB p-2205-s959-3 /AF371627	1461	93%
450	LGCGPB	URB 290cost002P31650 /EF454110	1428	90%

<sup>a</sup>LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria

<sup>b</sup>CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

<sup>c</sup>NA: Not available

<sup>d</sup>URB: Uncultured rumen bacterium



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวศรัณยา สติชัยมันวิวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม พ.ศ.2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2549 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2551



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้