

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายของแบคทีเรียใน บ่อน้ำร้อนเบตง

จังหวัดยะลา ประเทศไทย

Diversity of Bacteria in the Betong Hot Spring,

Yala Province, Thailand

โดย

ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนพัฒนานักวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปีงบประมาณ 2555

สารบัญเรื่อง

| เรื่อง | หน้า |
|--|------|
| รายการตาราง | i |
| รายการภาพประกอบ | ii |
| กิตติกรรมประกาศ | iii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iv |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | v |
| บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 2 |
| การตรวจเอกสาร | 3 |
| วิธีการทดลอง | 6 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ | 9 |
| สรุปผลการทดลอง | 23 |
| เอกสารอ้างอิง | 27 |
| ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป | 34 |
| ภาคผนวก | 35 |

รายการตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในดินตะกอนบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา | 10 |
| 2 | สรุปการจำแนกสายดีเอ็นเอยีนส์ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ในดินตะกอนบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา | 17 |
| 3. | เปรียบเทียบสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบในบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา และน้ำพุร้อนบ่อคลิ้ง จ.ราชบุรี | 24 |

รายการภาพประกอบ

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | แผนที่น้ำพุร้อนในประเทศไทย | 5 |
| 2 | เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของดินตะกอนจากบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา สกัดด้วยวิธี SDS - based DNA extraction | 11 |
| 3 | ผลผลิตพีซีอาร์ยีนส์ 16S rRNA ของแบคทีเรีย | 12 |
| 4 | RFLP ของพลาสมิดลูกผสมยีนส์ 16S rRNA ของแบคทีเรีย เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> | 13 |
| 5 | RFLP ของพลาสมิดลูกผสมยีนส์ 16S rRNA ของแบคทีเรีย เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Sau3AI</i> | 14 |
| 6 | Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีนี่ของสายดีเอ็นเอยีนส์ 16S rRNA ของ แบคทีเรียในบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา | 16 |
| 7 | แบคทีเรียที่พบในบ่อน้ำร้อนเบตง จ.ยะลา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) | 22 |

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี จาก ความช่วยเหลือของหน่วยงานหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่พยายามสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือเพื่อให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ที่สนับสนุนอุปกรณ์ เอนไซม์และชุดน้ำยา บางส่วนที่ใช้ในการทำการวิจัยตลอดจนคำแนะนำอันทรงคุณค่า

ขอขอบพระคุณ ดร.เจษฎา เต็นดวงบริพันธ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการสร้างไฟโลจีเนติกทรี

ท้ายที่สุดขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนและมอบทุน พัฒนานักวิจัย รวมทั้งผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำชี้แนะ ให้โครงการสำเร็จลงได้ด้วยดี

กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์

ธันวาคม 2556

บทคัดย่อภาษาไทย

เมตาจีโนมิกส์เป็นการศึกษาสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมที่สนใจ โดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ การวิจัยครั้งนี้ทำการ เก็บตัวอย่างดินตะกอนในบ่อน้ำร้อนเบตง ณ อำเภอเบตง จังหวัดยะลา ประเทศไทย วัดค่า pH ได้ 7.8 อุณหภูมิ 65 °C เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยการสกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์ตะกอนดังกล่าวพบสารประกอบและแร่ธาตุหลายชนิดโดยมี K_2O , SO_4^{2-} และ Mn เท่ากับ 233.91, 218.36 และ 169.36 mg/kg ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารที่เป็นโลหะหนักได้แก่ Mn, Pb และ Cd อย่างไรก็ตามโลหะหนักดังกล่าวมีอยู่ในปริมาณน้อยไม่เกินเกณฑ์ค่ามาตรฐานคุณภาพดิน ของกรมควบคุมมลพิษ เมื่อนำเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัด ได้ใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนส์ 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วโคลนเข้าไปใน pGEM-T Easy vector ได้พลาสมิด ลูกผสมที่มีชิ้นส่วนผลผลิตดีเอ็นเอดังกล่าวจำนวน 350 โคลน จากการสุ่มคัดเลือกโคลน 16S rRNA ของแบคทีเรียจำนวน 80 โคลน แล้วจำแนกเป็นกลุ่มด้วยเทคนิค RFLP โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *Sau3AI* สามารถจำแนกรูปแบบ RFLP ที่ต่างกันเป็น 30 รูปแบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอพบว่า ตัวอย่างดังกล่าวประกอบด้วย แบคทีเรียทั้งหมด 9 ไฟลัม ประกอบด้วย ไฟลัม Cyanobacteria (33%) และ Proteobacteria (21%) ทั้งนี้ไฟลัม Proteobacteria มี 4 คลาสคือ Alphaproteobacteria 2.6%, Betaproteobacteria 9.2%, Gammaproteobacteria 2.6% และ Deltaproteobacteria 6.6% ส่วนไฟลัมที่เหลือคือ Aquificae 21%, Planctomycetes 7.9%, Nitrospira 4%, Acidobacteria 2.6%, Deinococcus-Thermus 1.3%, Chloroflexi 1.3%, OP11 1.3% และแบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนก ไฟลัมได้ 4 ชนิด (unclassified phylum) คิดเป็น 6.6% นอกจากนี้การหาลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ 16S rRNA ของแบคทีเรียในบ่อน้ำร้อนแหล่งนี้พบว่ากว่า 70% จัดเป็นสายดีเอ็นเอของยีนส์ 16S rRNA ชนิดใหม่

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Metagenomics is a study of the genomic materials of microorganisms presented in the environmental samples by a culture-independent approaches. The aims of this study is to investigate the diversity of bacteria from sediment samples in the Betong hot spring, Yala province, Thailand. The sediment pH and temperature at the time of sampling was 7.8 and 65 °C respectively. Chemical analysis of the sediment was performed and found various compounds such as K_2O (233.91 mg/kg), SO_4^{2-} (218.36 mg/kg) and Mn (169.36 mg/kg). Some of the heavy metals i.e. Mn, Pb and Cd were also found in the sample but not exceed the standard of soil quality. Metagenomics DNA was extracted from the sediment samples, and then the primers specific for 16S rRNA genes of bacteria were used to amplify PCR products. The obtained PCR products were subsequently cloned into pGEM-T Easy vector. The white colony transformants, 80 out of 350 clones, were randomly selected for RFLP analysis using *RsaI* and *Sau3I* and finally grouped into 30 patterns. The sequences were analyzed and can be affiliated to nine different bacterial phyla. Cyanobacteria was the most abundant phylum (33%). The second most abundant was Proteobacteria 21% (Alphaproteobacteria 2.6%, Betaproteobacteria 9.2%, Gammaproteobacteria 2.6% and Deltaproteobacteria 6.6%). The others are phylum Aquificae 21%, Planctomycetes 7.9%, Nitrospira 4%, Acidobacteria 2.6%, Deinococcus-Thermus 1.3%, Chloroflexi 1.3%, OP11 1.3% and 4 clones of unclassified phylum (6.6%). The great majority about 70% of 16S rRNA sequences detected in Betong hot spring were novel.