

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ชุดโครงการวิจัย (Program)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

ส่วนที่ 1 สรุปภาพรวมผลการดำเนินงานชุดโครงการวิจัย (Program)

- 1.1 รหัส..... ก-ช(ช7.52)..... ชื่อชุดโครงการ..... ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตรและศักยภาพการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร.....
- 1.2 ชื่อผู้อำนวยการชุดโครงการ..... ศาสตราจารย์ ดร. สวัสดิ์ ภูมิทอง.....
- 1.3 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 1.4 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สังคมศาสตร์
- โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน
- 1.5 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ ...1...ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ ...2552...ถึงปีงบประมาณ 2552
- 1.6 จำนวนโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยประกอบด้วย3.....โครงการย่อย
- 1.7 งบประมาณรวมทั้งชุดโครงการวิจัย ...1,000,000.00.....บาท ประกอบด้วย
- ปีที่ 1 ได้รับ1,000,000.00.....บาท ปีที่ 2 ได้รับ.....-.....บาท
- 1.8 วัตถุประสงค์หลักของชุดโครงการวิจัย
1. ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ ประกอบด้วย สาหร่าย และแบคทีเรีย ในระบบนิเวศเกษตร บริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี สถาบันคีนคัวร์และพัฒนา ระบบนิเวศเกษตร รวมทั้งศึกษาความหลากหลายของรา *Termitomyces* ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี
 3. รวบรวมและคัดเลือกทรัพยากรจุลินทรีย์ ที่มีประโยชน์ต่อการเกษตร
 4. รวบรวมข้อมูลและจัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตร

1.9 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ (ภาพรวมทั้งชุดโครงการวิจัย)

ปีที่	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
1	1-6	<ol style="list-style-type: none"> 1. ได้รวบรวมและจำแนกสาหร่าย 20 สายพันธุ์ 2. สามารถสกัด DNA จากตัวอย่างดินได้โดยตรง และทำให้บริสุทธิ์ โดยเฉพาะการกำจัดสารที่เป็น inhibitor ต่อเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้ DNA ที่สกัดได้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการแยกและโคลนนิ่งเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดการสร้าง 16S rRNA โดยเทคนิค PCR ทำการโคลนนิ่ง 16S rRNA เพื่อสร้าง gene library และสุ่มเลือกจำนวน clone มาทั้งหมด 96 เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA โดยเทคนิค ARDRA

3. ได้สายพันธุ์เห็ดโคนที่รวบรวมเพิ่มเติม เพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคต อย่างน้อย 40 สายพันธุ์ และได้ดีเอ็นเอของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์

7-12

1. ได้สายหรือสายพันธุ์เดี่ยว 20 สายพันธุ์
2. ทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียจาก clone ที่สุ่มเลือกโดยใช้ลายพิมพ์ DNA เป็นเกณฑ์ วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากโคลนที่สุ่มเลือก วิเคราะห์ข้อมูลและและจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียโดยอาศัยความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic classification)
3. จัดกลุ่มของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์ที่ได้ ทราบถึงชนิดของเห็ดโคนที่เก็บรวบรวมได้ โดยการทำ phylogenetic analysis.

1.10 ผลการดำเนินงานแต่ละโครงการย่อยโดยสรุป

โครงการย่อย ลำดับที่	วัตถุประสงค์ / เป้าหมาย (เชิงปริมาณ) (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)	ร้อยละ การบรรลุ วัตถุประสงค์
<p>โครงการย่อยที่ 1 ชื่อโครงการ ความหลากหลายของสาหร่ายในพื้นที่เกษตรวิฤตติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี และการใช้ประโยชน์สาหร่ายในการปรับปรุงดิน ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. สำรวจและกำหนดพื้นที่ และทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง 2. จำแนกสาหร่ายได้ 40 สกุล 3. ได้สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยว 20 สายพันธุ์ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. สำรวจและกำหนดพื้นที่ และทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง 2. จำแนกสาหร่ายได้ 34 สกุล 3. ได้ <i>Botryococcus</i> สายพันธุ์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ : ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในการผลิต Biodiesel ได้ 	<p>80</p>
<p>โครงการย่อยที่ 2 ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบคทีเรียที่พบในดินต่างบริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี ชื่อหัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สวัสดิ์ ตระกูลนำเลื่อมใส</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA จากตัวอย่างดิน และทำให้บริสุทธิ์ 2. 16S rRNA gene library 3. ลายพิมพ์ DNA ของ gene library 4. ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จาก 96 โคลน 5. การจัดจำแนกแบคทีเรียจากข้อมูลของยีน 16S rRNA ที่สุ่มเลือกจาก library 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ได้ DNA จากตัวอย่างดินที่บริสุทธิ์ 2. ได้ 16S rRNA gene library ของแบคทีเรียในดินตัวอย่างจำนวน 96 โคลน 3. ลายพิมพ์ DNA ของ gene library 4. ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย 5. ข้อมูลของยีน 16S rRNA และข้อมูลการจัดกลุ่มของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียในดินตัวอย่าง 	<p>100</p>

โครงการย่อย ลำดับที่	วัตถุประสงค์ / เป้าหมาย (เชิงปริมาณ) (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)	ร้อยละ การบรรลุ วัตถุประสงค์
<p>โครงการย่อยที่ 3</p> <p><u>ชื่อโครงการ</u> ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา <i>Termitomyces</i> spp. (เห็ดโคน) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา บริเวณจังหวัดกาญจนบุรี</p> <p><u>ชื่อหัวหน้าโครงการ</u> ดร.เยาวภา ตาปราบ</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. ได้รวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน เพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคต อย่างน้อย 40 สายพันธุ์ 2. ได้ DNA ของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์ 3. เก็บรวบรวมโคลนที่ได้ไว้ศึกษาต่อ 4. จัดกลุ่มของเห็ดโคนทั้ง 31 สายพันธุ์ที่ได้ 5. ทราบถึงชนิดของเห็ดโคนที่เก็บรวบรวมได้ โดยการทำให้ phylogenetic analysis 	<ol style="list-style-type: none"> 1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน เพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคตได้ทั้งหมด 31 สายพันธุ์ 2. สกัด DNA ของเห็ดโคนได้แล้วทั้งสิ้น 31 สายพันธุ์ 3. ยังไม่สามารถโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจได้ 4. ทำการ direct sequence ในส่วนของ ITS1, ITS2 บางส่วนของ Large subunit 5. ทำ phylogenetic analysis เปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างเองและเปรียบเทียบกับข้อมูลใน database เพื่อการจัดจำแนก 	80

1.11 การบรรลุวัตถุประสงค์ โดยรวมของชุดโครงการวิจัย ประมาณ ร้อยละ 85

1.12 ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข

..... ทั้งแผนงาน ไม่มีรายงานการคัดเลือกทรัพยากรที่ดินที่มีประโยชน์ ซึ่งเป็นแผนงานที่จะดำเนินการในปีที่ 2 เพื่อให้บรรลุประสงค์ของการคัดเลือกทรัพยากรที่ดินที่มีประโยชน์ เนื่องจากโครงการไม่ได้เสนอของบประมาณในปีที่ 2

..... สำหรับปัญหาที่ทำให้โครงการย่อยที่ 1 ไม่บรรลุวัตถุประสงค์เพียงร้อยละ 80 นั้นเนื่องจากเมื่อสำรวจพื้นที่ ทำให้ทราบว่าพื้นที่ของสถานีวิจัยแห้งแล้งมาก แหล่งน้ำมีขนาดเล็ก ความหลากหลายของสายพันธุ์จึงค่อนข้างต่ำ อีกทั้งคุณภาพของน้ำมีสารอาหารต่ำมาก ไม่เอื้อต่อการเจริญของสายพันธุ์ แนวทางการแก้ไขไม่สามารถทำได้กับโครงการนี้ เนื่องจากโครงการนี้มีวัตถุประสงค์ที่จำในพื้นที่เกษตรวิฤตติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี นี้ แต่ในการทำวิจัยต่อไปอาจต้องทำการสำรวจพื้นที่ที่กำหนดก่อนจึงจะเสนอของบประมาณสนับสนุน ส่วนวัตถุประสงค์ข้อที่ 2 ไม่ได้ดำเนินการเพราะได้รับอนุมัติงบประมาณเพียง 1 ปี

..... ส่วนปัญหาที่ทำให้โครงการย่อยที่ 3 นั้น เนื่องจากเห็ดโคนเป็นเห็ดที่เจริญร่วมกับรังปลวกเลี้ยงราเท่านั้นและจะเจริญในระยะเวลาที่จำกัด ทำให้การเก็บตัวอย่างดอกเห็ดบริเวณรังปลวกทำได้ยากเนื่องจากชาวบ้านนิยมเก็บเห็ดเพื่อนำไปขาย เนื่องจากมีราคาแพง ทำให้การเก็บตัวอย่างสามารถเก็บได้แต่เม็ดราที่อยู่ในรังปลวก ไม่สามารถเก็บดอกเห็ดที่ขึ้นบริเวณรังปลวกได้ ทำให้ไม่สามารถระบุ species ของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ การแก้ไขอาจทำได้หากได้ไปติดต่อว่าจ้างชาวบ้านที่อยู่ในพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างให้

1.13 งานที่จะทำต่อไปโดยสังเขป ไม่มี เนื่องจากได้รับงบประมาณเพียงปีเดียว

1.14 คำชี้แจงเพิ่มเติม (ถ้ามี)

1.15 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย (Project)” ตามแบบฟอร์ม สพว-ว-5(ด) ของแต่ละโครงการย่อยมาด้วยแล้ว จำนวน 3 โครงการย่อย



ลงชื่อ.....ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย

(.....ศาสตราจารย์ ดร. สวาทรี ลิ่มทอง.....)

..29 / กันยายน / 2557 วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

รายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานโครงการวิจัย
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

ชุดโครงการ ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตร
และศักยภาพการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร
โครงการวิจัยรหัส ก-๒(ช) 7.52

โครงการย่อย ความหลากหลายของสาหร่ายในพื้นที่เกษตรวิกฤติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี
และการใช้ประโยชน์สาหร่ายในการปรับปรุงดิน
Biodiversity of Microalgae in Critical Agricultural Area at Kanchanaburi Research Station and
Their Applications as Soil Conditioner

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

- 1.1 รหัส ก-๒(ช) 7.52 ชื่อโครงการ ความหลากหลายของสาหร่ายในพื้นที่เกษตรวิกฤติ สถานีวิจัย
กาญจนบุรี และการใช้ประโยชน์สาหร่ายในการปรับปรุงดิน
- 1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย) ความ
หลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตรและศักยภาพการใช้
ประโยชน์ด้านการเกษตร
- 1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย
- 1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
- 1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สังคมศาสตร์ฯ
- โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขันฯ
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน
- 1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552 ถึงปีงบประมาณ 2552
- 1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล สถานีวิจัยกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี
- 1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 350,000 บาท ประกอบด้วย
ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 350,000 บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียว บริเวณพื้นที่ทำการเกษตร และแหล่งน้ำ ในเขตที่มีสภาพวิกฤติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี
2. เพื่อคัดเลือกสาหร่ายที่สามารถสังเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงดินในพื้นที่เกษตรวิกฤติ

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
1.	1-6	1. ศึกษาสายพันธุ์สาหร่าย 20 สายพันธุ์ 2. จำแนกสาหร่าย 20 สายพันธุ์
	7-12	1. สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยว 10 สายพันธุ์ 2. จำแนกสาหร่ายเพิ่มอีก 20 สายพันธุ์

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. การสำรวจและกำหนดพื้นที่ และทำการเก็บตัวอย่าง	1. สำรวจและกำหนดพื้นที่ และทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง	1. สำรวจและกำหนดพื้นที่ และทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง
2. การศึกษาชนิดของสาหร่ายและการจัดจำแนกสาหร่าย	2. จำแนกสาหร่ายได้ 40 สกุล	2. จำแนกสาหร่ายได้ 34 สกุล
3. การแยกให้ได้สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยว	3. ได้สาหร่ายสายพันธุ์เดี่ยว 10 สายพันธุ์	3. ได้ <i>Botryococcus</i> สายพันธุ์เดี่ยว 3 สายพันธุ์ : ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในการผลิต Biodiesel ได้

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ 80) เหตุผล พื้นที่ของสถานีวิจัยแห้งแล้งมาก แหล่งน้ำมีขนาดเล็ก ความหลากหลายของสาหร่ายจึงค่อนข้างต่ำ อีกทั้งคุณภาพของน้ำมีสารอาหารต่ำมาก ไม่เอื้อต่อการเจริญของสาหร่าย
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

- องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน.....
- สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์ สายพันธุ์สาหร่าย Botryococcus ที่อาจนำไปศึกษาความสามารถใน

การผลิต Biodiesel

- ผลิตภัณฑ์.....
- สิ่งประดิษฐ์.....
- เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....
- ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....
- คู่มือ.....
- วิดีทัศน์.....
- การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี.....คน ปริญญาโท.....คน ปริญญาเอก 1.คน
- สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ.....เรื่อง (ระบุ).....วิทยานิพนธ์.....เรื่อง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน.....
- ด้านการเกษตร.....
- ด้านอุตสาหกรรม.....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....
- ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....
- ด้านเศรษฐกิจ.....
- ด้านสังคม.....
- ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ.....
- นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป.....
- ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....
- อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดโครงการ (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็นภาคผนวกของรายงาน)

- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- นำเสนอทางนิตยสาร.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์).....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ยุทธศาสตร์การขจัดความยากจน
- ยุทธศาสตร์การพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ยุทธศาสตร์การพัฒนากฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี

ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม

ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ

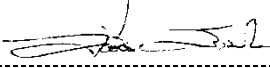
ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก

อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม นำสำหรัยที่ได้ไปทดลองเพาะเลี้ยงสำหรับการผลิต Biodiesel

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ  หัวหน้าโครงการ

(ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย)

..... 24 / กย. / 2557 วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

โครงการย่อย ความหลากหลายของสาหร่ายในพื้นที่เกษตรวิกฤติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี
และการใช้ประโยชน์สาหร่ายในการปรับปรุงดิน

Biodiversity of Microalgae in Critical Agricultural Area at Kanchanaburi Research Station and
Their Applications as Soil Conditioner

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย และ ดร. เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล¹

Wichien Yongmanitchai and Duenrut Chonudomkul

บทคัดย่อ

สมบัติทางกายภาพของน้ำในอ่างเก็บน้ำทั้ง 3 แห่งภายในสถานีวิจัยกาญจนบุรี ในช่วงที่เก็บตัวอย่าง พบว่ามีอุณหภูมิสูงปานกลาง ค่า pH เป็นกลางถึงด่างเล็กน้อย มีแร่ธาตุไม่มากนักเมื่อพิจารณาจากค่าการนำไฟฟ้า อ่างเก็บน้ำที่ 1 จะมีการปนเปื้อนของอินทรีย์สารสูงกว่า อ่างเก็บน้ำที่ 2 และ 3 แต่ปริมาณธาตุอาหารหลัก ได้แก่ไนโตรเจน และฟอสเฟต ไม่แตกต่างกันมากนัก

สำหรับความหลากหลายของสาหร่ายในแหล่งน้ำของสถานีวิจัยกาญจนบุรี พบสาหร่ายทั้งหมด 6 หมวด 34 สกุล โดยพบสาหร่ายใน หมวด Cyanophyta (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) 10 สกุล ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Merismopedia* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Pseudanabaena* sp. สำหรับ หมวด Chlorophyta (สาหร่ายสีเขียว) 14 สกุล ส่วนใหญ่ ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Pediastrum* sp. นอกนั้นอยู่ใน หมวด Euglenophyta (สาหร่ายยูกลีโนยด์) หมวด Bacillariophyta (ไดอะตอม) หมวด Chrysophyta (สาหร่ายคริสโซไฟต์) และ หมวด Pyrrophyta (สาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต) อีกเล็กน้อย เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่พบสาหร่ายในกลุ่ม *Nostoc* sp. ที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงดินเลย อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างน้ำในอ่างเก็บน้ำที่ 1 และอ่างเก็บน้ำที่ 2 พบ สาหร่ายสีเขียวในสกุล *Botryococcus* ที่มีรายงานว่าบางสายพันธุ์มีการสะสมปริมาณไฮโดรคาร์บอนถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสามารถคัดแยกได้สายพันธุ์เดี่ยวจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งจะเก็บไว้เพื่อทำการวิจัยต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: สถานีวิจัยกาญจนบุรี สารปรับปรุงดิน *Botryococcus* ไบโอดีเซล

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Physical properties of water in the three reservoirs of the research station were as followed, relatively high temperature, neutral to slightly alkaline pH, low conductivity indicating low dissolved minerals. Reservoir No. 1 had higher organic matters as compared to the other two. Concentration of major inorganic nutrients, namely nitrogen and phosphate among the three reservoirs were in the same ranges.

Diversity of microalgae in the water collected from the reservoirs distributed in 6 Divisions belonging to 34 Families. There were 10 genera in the Division Cyanophyta (blue green algae) and the dominant species were *Merismopedia* sp., *Oscillatoria* sp. and *Pseudanabaena* sp. In the Division Chlorophyta (green algae) 14 genera were recorded and mostly were *Chlorella* sp. and *Pediastrum* sp. The remaining genera were scattered in the Division Euglenophyta (euglenoids), Bacillariophyta (diatom), Chrysophyta (chrysophytes) and Pyrrophyta (dinoflagellates). It should be noted that *Nostoc* sp. which was the target species was not observed. However, in Reservoir No. 1 and 2 *Botryococcus*, a colonial green alga, which have been reported that certain strains contained as high as 70% of hydrocarbons. Three strains of the species were isolated as unialgal culture. They were maintained in the laboratory for further studies.

Key words: Kanchanaburi Research Station, soil conditioner, *Botryococcus*, biodiesel

บทนำ

สถานีวิจัยกาญจนบุรีตั้งอยู่ในเขตปฏิรูปที่ดิน เลขที่ 303 หมู่ที่ 9 ตำบลวังดั่ง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี อยู่ห่างจากจังหวัดกาญจนบุรีประมาณ 30 กิโลเมตร บนถนนสายกาญจนบุรี-ไทรโยค-ทองผาภูมิ ซึ่งเป็นจังหวัดหนึ่งในภาคตะวันตก มีเนื้อที่ทั้งสิ้นประมาณ 20,349 ตารางกิโลเมตร มีพื้นที่มากที่สุดในภาคตะวันตกและมีขนาดใหญ่เป็นอันดับ 3 ของประเทศรองจากจังหวัดเชียงใหม่และนครราชสีมา มีประชากรทั้งสิ้นกว่า 612,000 คน เป็นจังหวัดที่มีความสำคัญยิ่งทางภาคตะวันตก เนื่องจากมีชายแดนติดต่อกับประเทศสหภาพพม่า (Union of Myanmar) มีลักษณะของความแตกต่างทางด้านกายภาพหลายแบบ เช่น พื้นที่ป่าและเขาสูงสลับซับซ้อนทางด้านตะวันตกในเขตอำเภอไทรโยค ทองผาภูมิ สังขละบุรี และศรีสวัสดิ์ พื้นที่ราบลุ่มมีความอุดมสมบูรณ์ในเขตอำเภอกำมะงา ท่าม่วงและอำเภอเมืองบางส่วนและพื้นที่ราบสลับเนินเขาและป่าละเมาะ อันเป็นเขตแห้งแล้งและกันดารในเขตอำเภอพนมทวน เลาช่วญ บ่อพลอย และอำเภอเมืองบางส่วน กล่าวโดยสรุปแล้วสภาพดินและภูมิอากาศของพื้นที่ทางการเกษตรส่วนใหญ่ของจังหวัดกาญจนบุรีหลายบริเวณยังมีสภาวะวิกฤติ สมควรแก่การศึกษาวิจัยเพื่อหาระบบเกษตรที่เหมาะสม โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันมากของระดับอุณหภูมิตั้งแต่กลางวันและกลางคืน พื้นที่แห้งแล้ง ดินเลว หรือเขตฝนทิ้งช่วงเป็นประจำ (นิรนาม, ม.ป.ป.)

ต่อมามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้พิจารณาเห็นว่า พื้นที่โครงการปฏิรูปที่ดินเอกชน ตั้งอยู่ที่หมู่ 9 ตำบลวังดั่ง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นที่ดินของสำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรมมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งในการจัดตั้งสถานีวิจัยกาญจนบุรี เพื่อการศึกษาวิจัยและพัฒนาระบบเกษตรในเขตที่มีสภาวะวิกฤติ ดังนั้นมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จึงดำเนินการขอใช้พื้นที่บริเวณดังกล่าวจากสำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม จำนวน 447-1-53 ไร่ เพื่อการจัดตั้งสถานีวิจัยกาญจนบุรีและเริ่มดำเนินการจัดตั้งสถานีวิจัยกาญจนบุรี ภายใต้สังกัดของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ.2536 เป็นต้นมา (นิรนาม, ม.ป.ป.)

จากสภาพพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก มีทั้งพื้นที่ป่า มีเขาสูง พื้นที่ราบ พื้นที่ราบสลับกับเนินเขา และป่าละเมาะ จึงมีผลทำให้สภาพพื้นที่ดังกล่าวมีความแตกต่างกันมากของระดับอุณหภูมิตั้งแต่กลางวันและกลางคืน พื้นที่ที่มีความแห้งแล้ง ดินเลว หรือมีเขตฝนทิ้งช่วงเป็นประจำ จึงเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ขึ้น แต่งานวิจัยที่ผ่านมามุ่งเน้นทางด้านการพัฒนา ระบบการเกษตรและเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเป็นส่วนใหญ่ ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กยังมีการศึกษากันน้อยมาก โดยเฉพาะสาหร่ายและจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีบทบาทต่อระบบนิเวศเกษตรกรรม ดังนั้นจึงทำให้พื้นที่ในเขตสถานีวิจัยกาญจนบุรี ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของสาหร่ายและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอยู่อีกมาก (เครือข่ายข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพ ใน http://bdm.oepo.go.th/mab_site1.html)

สำหรับการวิจัยนี้จะศึกษาการกระจายของสาหร่ายขนาดเล็กในบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรในเขตที่มีสภาพวิกฤติ บริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสาหร่ายชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานทั้งในประเทศไทยและในโลก นอกจากนั้นสาหร่ายที่แยกและรวบรวมไว้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการศึกษา-วิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่สามารถสะสมโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณสูงเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดิน อีกทั้งเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์สาหร่ายซึ่งอาจพบเพียงในเขตเกษตรกรรมของประเทศไทยเท่านั้น

สาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำที่มีโครงสร้างอย่างง่าย ๆ มีขนาด รูปร่าง และแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน สาหร่ายสามารถมีชีวิตรอยู่ได้โดยอาศัยความชื้นจากอากาศ อาศัยอยู่ในน้ำ หรือมีชีวิตรอยู่ได้ในสภาพที่มืดธรรมชาติ จึงพบสาหร่ายได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ดิน หิน ต้นไม้ เปลือกไม้ หิมะ น้ำพุร้อน เป็นต้น (Smith, 1950) ซึ่งการแพร่กระจายของสาหร่ายแต่ละชนิดในธรรมชาติมีไม่เท่ากัน เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมเฉพาะตัว และมีการปรับตัวหรือทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ไม่เท่ากัน จึงทำให้พบสาหร่ายบางชนิดได้เฉพาะบางแหล่งหรือบางฤดูกาลเท่านั้น

สาหร่ายมีประโยชน์นานับประการ ทั้งทางด้านอาหาร โดยเป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์โดยตรง เป็นอาหารเสริมสุขภาพต่าง ๆ เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Round, 1973; Becker, 1989; Borowitzka, 1989; Pauw และ Persoone, 1989) ประโยชน์ด้านเกษตรกรรม สาหร่ายสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ใช้ปรับปรุงคุณภาพดิน (soil conditioners) และเป็นสารควบคุมการเจริญของพืช (plant growth regulators) (Metting, 1989) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการแพทย์ รวมถึงการใช้สาหร่ายในการวิเคราะห์สาร และผลิตสารที่มีคุณภาพสูงต่าง ๆ ด้วยเหตุที่สาหร่ายยังมีศักยภาพในการนำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์ได้อีกมาก และการพัฒนาที่ดีย่อมมีพื้นฐานมาจากความหลากหลายของสายพันธุ์

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ที่แพร่กระจายอยู่ในทุกระบบนิเวศทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม และพื้นผิวดิน โดยที่ประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายจึงมีชนิดพันธุ์ของสาหร่ายอย่างหลากหลายกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำและบนบก (Lewmanomont et al, 1995) ในแหล่งน้ำต่าง ๆ สาหร่ายเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่เป็นจุดกำเนิดของห่วงโซ่อาหาร ในขณะที่สาหร่ายบนพื้นดินและหินเป็นจุลินทรีย์เบิกนำที่ย่อยหินให้กลายเป็นดิน และเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

ประเทศไทยมีทรัพยากรดินที่อยู่ในสภาพเสื่อมโทรมถึงร้อยละ 53 ของพื้นที่ถือครองทางการเกษตร คือมีอินทรีย์วัตถุน้อยกว่าร้อยละ 1.5 และยังขาดธาตุอาหารหลักของพืช ได้แก่ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสค่อนข้างรุนแรง ส่วนโพแทสเซียมขาดในระดับปานกลาง จึงทำให้ประเทศไทยมีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมาก ทั้งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม และเนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตแม่ปุ๋ยเองได้ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศปีละนับหมื่นล้านบาท ในปี พ.ศ. 2542 ประเทศไทยมีการนำเข้าปุ๋ยทั้งสิ้น 3.5

ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 17,000 ล้านบาท และปี พ.ศ. 2547 การนำเข้าทั้งสิ้น 3.9 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 33,000 ล้านบาท

จากสภาพความเสื่อมโทรมของทรัพยากรการผลิตทางการเกษตรและสถานการณ์บีบคั้นทางวิกฤตพลังงาน การปรับเปลี่ยนเทคโนโลยีการเพาะปลูกด้วยการลดการใช้สารเคมีที่นำเข้าจากต่างประเทศ มาใช้ทรัพยากรชีวภาพสาหร่ายขนาดเล็กทดแทน จะเพิ่มขีดความสามารถในการพึ่งพาตนเอง รวมทั้งลดต้นทุนการผลิตเพื่อคงความเป็นผู้นำในการส่งออกสินค้าการเกษตรของโลกได้อย่างยั่งยืน การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการใช้สาหร่ายขนาดเล็กจะช่วยภาคการเกษตรของไทยในแง่การเพิ่มปริมาณ คุณภาพ และมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรทั้งเพื่อการส่งออกและบริโภคในประเทศ

การวิจัยเทคโนโลยีสาหร่ายขนาดเล็กจะนำไปสู่การผลิตปุ๋ยชีวภาพที่มีคุณภาพ ฟันฟูและอนุรักษ์ดินเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้อย่างอิสระ และบางสายพันธุ์สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงดิน

การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรด้วยการใช้ปุ๋ยเคมีได้รับการยอมรับจากเกษตรกรและมีมาอย่างกว้างขวางยาวนาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าวิธีการดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและคุณภาพของดินอย่างรุนแรง การสูญเสียสมดุลของระบบนิเวศการเกษตรเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมี ทำให้ประเทศไทยต้องเสียค่าใช้จ่ายทางอ้อมในการฟื้นฟูอย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป การใช้ปุ๋ยชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิตและใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อินเดีย จีน เวียดนาม และสหรัฐอเมริกา การใช้ปุ๋ยชีวภาพถึงแม้จะไม่เห็นผลในทันทีทันใดอย่างปุ๋ยเคมี แต่จะก่อให้เกิดการฟื้นฟูสภาพดินและความอุดมสมบูรณ์ของดินอย่างค่อยเป็นค่อยไป ต่อเนื่อง และยั่งยืน

ปุ๋ยชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียมอกจากจะสามารถตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ ยังอาจอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นแล้วทำการตรึงไนโตรเจน เช่น สาหร่ายกับแหนแดง ไลเคนส์ เป็นต้น กลไกการตรึงไนโตรเจนจะถูกกระตุ้นด้วยแสงและเกิดในสภาวะไร้ออกซิเจนภายในเซลล์พิเศษที่เรียกว่า “เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst)” ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในอันดับ Nostocales และ Stigonematales สาหร่ายบางชนิดในสองอันดับนี้จะมีความสามารถพิเศษในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เนื่องจากสามารถสร้างเซลล์พิเศษที่เรียกว่าสปอร์ (spore) หรือ ซิสต์ (cyst) ที่มีเปลือกหุ้มเซลล์หนา ทำให้ทนอยู่ได้ในสภาพแห้งแล้งจัด และงอกใหม่เมื่อได้รับความชุ่มชื้น

การศึกษาสาหร่ายน้ำจืดในประเทศไทยเริ่มขึ้นเมื่อศตวรรษที่ 20 โดยในระยะแรกผู้ที่ทำการจัดอนุกรมวิธานเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวต่างประเทศ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1977 มีนักวิทยาศาสตร์ชาวไทยจากสถาบันและมหาวิทยาลัยต่าง ๆ ได้เริ่มทำการศึกษาและรวบรวมชนิดของสาหร่ายน้ำจืด นอกจากนี้ยังมีหน่วยงานต่าง ๆ ของรัฐและรัฐวิสาหกิจ เช่น กรมชลประทาน การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย การปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแพลงก์ตอนน้ำจืดที่มีต่อสภาวะแวดล้อม จาก

การศึกษาสาหร่ายน้ำจืดในประเทศไทยที่รวบรวมออกเผยแพร่จำนวน 53 ผลงาน สัมภาษณ์สาหร่ายทั้งหมด 161 สกุล 1,001 ชนิด 287 วัไรตี้ (varieties) แบ่งเป็น หมวด Cyanophyta (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) 39 สกุล 209 ชนิด 2 วัไรตี้ มี 63 forms หมวด Chlorophyta (สาหร่ายสีเขียวและยูกลีโนยด์) 75 สกุล 406 ชนิด 141 วัไรตี้ มี 19 forms, หมวด Chromophyta 46 สกุล 385 ชนิด 144 วัไรตี้ มี 44 forms หมวด Rhodophyta 1 สกุล 1 ชนิด 1 วัไรตี้ (Lewmanomont และคณะ, 1995)

โสภณา (2521) ได้รายงานการวิเคราะห์แพลงก์ตอนพืชในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา ตั้งแต่เดือนเมษายน 2519 ถึงเดือนเมษายน 2520 ปรากฏว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพียง 3 สกุล ที่พบในปริมาณน้อยมาก คือ *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Spirulina* มีสาหร่ายสีเขียว 7 สกุล โดยพบ *Spirogyra* มีปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับแพลงก์ตอนพืชอื่น ๆ นอกจากนี้ โสภณา (2522) ได้วิเคราะห์ในช่วงเดือนธันวาคม 2519 ถึงเดือนสิงหาคม 2521 เป็นเวลา 20 เดือน พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 4 สกุล สาหร่ายสีเขียว 7 สกุล สาหร่ายที่พบในแต่ละสกุลมีปริมาณใกล้เคียงกัน และในเดือนตุลาคม 2521 ถึง เดือนกันยายน 2523 โสภณา (2525) ได้วิเคราะห์พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สกุล 4 ชนิด สาหร่ายสีเขียว 10 สกุล 15 ชนิด ในฤดูร้อนแพลงก์ตอนพืชจะมีปริมาณมาก แต่ฤดูหนาวจะมีปริมาณค่อนข้างน้อย

วรารภรณ์ (2526) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของแพลงก์ตอนพืช พบว่า ในบึงบอระเพ็ดมีสาหร่ายสีเขียวมากที่สุด จำนวน 39 สกุล และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล ซึ่งชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่พบได้บ่อยครั้งและมีปริมาณมากที่สุด คือ *Chlorella* sp. และ *Oscillatoria* sp.

ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่สำรวจพบในลุ่มน้ำภาคใต้ตอนบน ในเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียวมากที่สุด จำนวน 35 สกุล และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 15 สกุล (เฉลิมศรี, 2532) ส่วนการสำรวจในบริเวณลุ่มน้ำแม่กลอง ในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบ สาหร่ายสีเขียว 16 สกุล และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 12 สกุล (สุพิมาลย์, 2535) ซึ่งลัดดา (2530) ได้กล่าวถึงแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำไหลที่พบบริเวณแม่น้ำสะแกกรัง และห้วยทับเสลา จังหวัดอุทัยธานี

จากการศึกษาปริมาณและการแพร่กระจายของสาหร่ายที่สัมพันธ์กับคุณภาพน้ำบางประการนั้น กรรณิการ์ (2529) ได้วิเคราะห์ชนิดของสาหร่ายบริเวณลุ่มน้ำปิง - วัง ในพื้นที่ 3 แหล่ง คือ (1) ตามลำน้ำใหญ่ พบสาหร่ายสีเขียว 24 สกุล (2) ลำน้ำก่อนเข้าเมืองและออกจากเมือง ชนิดของสาหร่ายที่พบมีความคล้ายคลึงกันมากกับชนิดของสาหร่ายตามลำน้ำใหญ่ แต่ไม่พบสาหร่ายสกุล *Hydrodictyon*, *Coscinodiscus* และ *Rivularia* (3) ลำน้ำย่อย มีความคล้ายคลึงกับลำน้ำใหญ่เช่นกัน แต่ไม่พบสาหร่ายสกุล *Schizomeris*, *Golenkinia*, *Pectodictyon* ส่วน *Volvox*, *Gloeotrichia* และ *Nostoc* พบเฉพาะตามลำน้ำย่อยเท่านั้น ต่อมา กุศยา (2529) ได้ทำการศึกษาในลำน้ำแม่กลางและแม่กวัง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าบริเวณลำน้ำแม่กลางมีสาหร่ายสีเขียว 20 สกุล สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 14 สกุล unidentified filamentous green algae 2 สกุล บริเวณลำน้ำแม่กวัง สาหร่ายส่วนใหญ่เป็นสกุลที่พบในลำน้ำแม่กลาง

ยกเว้นสกุล *Eudorina*, *Cylindrocapsa*, *Protococcus*, *Zygnema*, *Polycystis*, *Symechocystis*, *Stichosiphon*, *Borzia*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema* และ *Rivularia* แต่มีบางสกุลที่พบเพิ่มจากลำน้ำแม่กลาง ได้แก่ *Golenkinia*, *Actinastrum*, *Crucigenia*, *Hydrocoleum*, unidentified filamentous green algae เพิ่มขึ้นอีก 1 สกุล และ unidentified filamentous blue - green algae อีก 1 สกุล นอกจากนี้ กาญจนนา (2537) ได้ศึกษาบริเวณลุ่มน้ำเมย จังหวัดตาก พบ สาหร่ายสีเขียว 26 สกุล และ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 7 สกุล

สำหรับการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า ดินนาในบริเวณภาคเหนือและภาคกลางมีการแพร่กระจายของสาหร่ายค่อนข้างสูง บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการแพร่กระจายน้อย และภาคใต้มีการแพร่กระจายน้อยที่สุด สกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (เฉพาะที่มีเฮเทอโรซิสต์) ที่ตรวจพบทั้งหมดมี 12 สกุล สกุลที่ตรวจพบที่มีการแพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติมากที่สุด คือ *Calothrix* รองลงมา ได้แก่ *Nostoc* และ *Anabaena* สกุลที่ตรวจพบว่า มีการแพร่กระจายอยู่น้อยมากในธรรมชาติ คือ *Gloeotrichia*, *Rivularia*, *Stigonema* และ *Fischerella* ตัวอย่างดินนาที่เก็บมีความเป็นกรดต่าง อยู่ที่ pH 6.0 - 6.9 มากที่สุด ที่ pH 7.0 - 7.9 จะมีการแพร่กระจายของสาหร่ายในปริมาณที่สูง ซึ่ง *Calothrix* และ *Nostoc* จะมีการแพร่กระจายสูงสุดที่ระดับ pH 7.0 - 7.9 ส่วน *Anabaena* จะมีการแพร่กระจายสูงสุดที่ pH 6.0 - 6.9 (สมถวิล, 2531)

ในปี พ.ศ. 2541 เดือนธันวาคม ได้สำรวจสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีเขียวในป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำ ดิน หิน และเปลือกไม้ ในฤดูฝน ฤดูหนาว ฤดูร้อน พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด 4 อันดับ 7 ครอบครัว และ 21 สกุล ส่วนสาหร่ายสีเขียวพบทั้งหมด 6 อันดับ 13 ครอบครัวและ 31 สกุล โดยในป่าเต็งรัง พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 4 อันดับ 7 ครอบครัว 18 สกุล และพบสาหร่ายสีเขียว 6 อันดับ 13 ครอบครัว 31 สกุล สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบมีการกระจายตัวมาก ได้แก่ *Oscillatoria* และ *Lyngbya* แต่ที่พบเป็นจำนวนมาก คือ *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* และ *Tolypothrix* ส่วนสาหร่ายสีเขียวที่พบมีการกระจายตัวมาก คือ *Chlorella* และ *Ulothrix* และโดยทั่วไปแล้วจะพบสาหร่ายสีเขียวเป็นจำนวนน้อย สำหรับป่าเบญจพรรณ พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 4 อันดับ 7 ครอบครัว 20 สกุล และพบสาหร่ายสีเขียว 5 อันดับ 9 ครอบครัว 17 สกุล สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบกระจายตัวมาก คือ *Lyngbya*, *Oscillatoria* สกุลที่พบเป็นจำนวนมาก คือ *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Cylindrospermum* สาหร่ายสีเขียวสกุลที่พบกระจายตัวมาก คือ *Protococcus* แต่จะพบในจำนวนน้อย และอิทธิพลของฤดูกาลในป่าทั้งสองชนิด โดยที่ในฤดูฝนจะพบสาหร่ายสีเขียวได้มากกว่าฤดูอื่น ๆ ในฤดูหนาวจะพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากกว่าฤดูอื่น ๆ ส่วนฤดูร้อนจะพบสาหร่ายได้น้อยชนิด จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถแยกสาหร่ายน้ำจืด *Haematococcus* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถสะสม astaxanthin ซึ่งเป็นสารสีธรรมชาติในกลุ่ม carotenoid ที่มีการนำไปใช้ในการแต่งสีของเนื้อปูเทียมให้คล้ายกับเนื้อปูจากธรรมชาติ โดยในขณะนี้

astaxanthin ที่ใช้อยู่เป็นสารสีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี จึงไม่ค่อยได้รับการยอมรับในเรื่องความปลอดภัย เนื่องจากมีสารประกอบโครงสร้างคล้ายกันเกิดขึ้นด้วยซึ่งอาจเป็นอันตราย ปัจจุบันนี้การผลิต astaxanthin ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เชิงพาณิชย์มีอยู่แห่งเดียวในโลกที่มลรัฐฮาวาย (ภายใต้การดำเนินงานของบริษัทจากญี่ปุ่น) แต่มีปัญหาด้านการเพาะเลี้ยงค่อนข้างมาก เนื่องจากต้องการอุณหภูมิต่ำและต้องการ acetate เป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอนทำให้เกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้ง่าย ในขณะที่สายพันธุ์ *Haematococcus* ที่แยกได้จากประเทศไทยเจริญได้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในสูตรอาหารที่มีสารอนินทรีย์ทั้งหมด และสามารถสะสม astaxanthin ได้ในระดับสูง (สุดสายชล, 2541)

ต่อมาในปีพ.ศ. 2548 วิเชียร และ เด็อนรัตน์ ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กในป่าดิบแล้ง บริเวณพื้นที่สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา ในฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว โดยทำการเก็บตัวอย่างจากผิวดิน ก้อนหิน และเปลือกไม้ จากการศึกษาพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด 14 สกุล สาหร่ายสีเขียว 13 สกุล และไดอะตอม 4 สกุล โดยในตัวอย่างดินพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 10 สกุล สาหร่ายสีเขียว 9 สกุล และไดอะตอม 4 สกุล ตัวอย่างจากก้อนหินพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล สาหร่ายสีเขียว 6 สกุล และไดอะตอม 1 สกุล ส่วนเปลือกไม้พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 13 สกุล สาหร่ายสีเขียว 13 สกุล และไดอะตอม 3 สกุล ในฤดูฝนพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอมมากที่สุด ส่วนสาหร่ายสีเขียวพบมากทั้งในฤดูฝนและฤดูหนาว ซึ่งสกุลที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *Oscillatoria* และ *Protococcus*

การใช้ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสาร extracellular polysaccharide ในการปรับปรุงดิน

ไซยาโนแบคทีเรียผลิต polysaccharide โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นสารห่อหุ้มเซลล์ แต่อาจเก็บไว้ในเซลล์หรือปล่อยออกนอกเซลล์ ที่เรียกว่า extracellular polysaccharide

การผลิตสาร extracellular polysaccharide จาก cyanobacteria ช่วยให้ดินมีความเสถียรสูง การเกาะกันของอนุภาคดินเพิ่มขึ้นและลดการพังทลายของดิน (Painter, 1983)

การสร้าง polysaccharide sheath หรือ capsule ทำให้เซลล์สามารถรักษาน้ำและทนต่อความแห้งแล้งได้ (Whitton, 1987)

สาหร่ายดินสร้าง extracellular polysaccharide ที่ประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์, เอไมด์ กรดอะมิโน, พอลิเปปไทด์, โปรตีน, วิตามิน ที่สามารถป้องกันเซลล์ของสาหร่ายจากสารพิษและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งแล้ง รังสีอัลตราไวโอเล็ต ยาปฏิชีวนะ (De Phillippis and Vincenzini, 1998; Stal, 2000)

Bu del (2002) ศึกษา cyanobacteria 2 สกุล ได้แก่ *Microcoleus* และ *Nostoc* ที่เจริญในดินทรายที่มีสารอาหารต่ำ พบว่า มีความสำคัญต่อดิน ดังนี้ extracellular polysaccharide ช่วยยึดเกาะเม็ด

ทราย เพิ่มความเสถียรให้กับดิน เมื่อได้รับน้ำ polysaccharide จะค้ำน้ำจึงช่วยลดขนาดและจำนวน ช่องว่างระหว่างอนุภาคดิน รักษาบน้ำในดิน นอกจากนี้สารคีเลตที่ปล่อยออกมาช่วยเพิ่มประจุลบและการใช้ สารอาหาร

Mazor *et al.* (1996) พบว่าการเติม extracellular polysaccharide ที่ได้จาก *Microcoleus* ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของดินลงในดินที่แห้งที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถรักษา น้ำในดินได้ถึงร้อยละ 30 เมื่อเทียบกับดินที่ไม่มีการเพาะเชื้อ

Acea *et al.* (2003) ศึกษาผลกระทบของ cyanobacterium ต่อกลุ่มของจุลินทรีย์ ปริมาณ คาร์บอน ไนโตรเจนและส่วนประกอบทางเคมีของผิวหน้าดิน โดยทำการเพาะเชื้อ cyanobacterium 4 กลุ่ม ได้แก่ *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Scytonema* และกลุ่มของเชื้อทั้งสามชนิดผสมกัน นำไปเพาะลงบนดิน 4 กลุ่ม ได้แก่ Orthic Podsol บน sandstone และ Humic Cambisol บน granite, schist หรือ limestone ซึ่ง ตัวอย่างดินดังกล่าวนำไปผ่านความร้อน 350°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ cyanobacterium เริ่มต้นที่ เพาะเท่ากับ 1.5 mg chlorophyll a g⁻¹ soil หรือ 3.0 mg chlorophyll a g⁻¹ soil ผลที่ได้พบว่า cyanobacterium ทำให้เกิดกลุ่ม microbiotic crust ที่มี NH₄ - producers ปริมาณ 7.4 x 10⁹ g⁻¹ crust, NO₂ producers ปริมาณ 6.9 x 10⁴ และ NO₃ producers 7.3 x 10³ g⁻¹ crust, starch-mineralizing microbes ปริมาณ 1.7 x 10⁸ g⁻¹ crust, cellulose-mineralizing microbes ปริมาณ 1.4 x 10⁶ g⁻¹ crust ใน กลุ่ม crust มีปริมาณคาร์บอน 293 g C kg⁻¹ crust ปริมาณไนโตรเจน 50 g N kg⁻¹ crust, P เท่ากับ 129 mg kg⁻¹ crust, Mg เท่ากับ 269 mg kg⁻¹ crust, K เท่ากับ 173 mg kg⁻¹ crust, ปริมาณ Ca เท่ากับ 804 mg kg⁻¹ crust Na เท่ากับ 164 mg kg⁻¹ crust การให้ cyanobacterium เป็นปุ๋ยอินทรีย์จะเพิ่มสารอินทรีย์ และสารอาหารบนผิวหน้าดินที่ผ่านความร้อน ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยเท่ากับ 275 g C kg⁻¹ soil และ 50 g N kg⁻¹ soil ตามลำดับ ปริมาณอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง 7 หน่วย ปริมาณ Ca เท่ากับ 315 mg kg⁻¹ soil Mg เท่ากับ 189 mg kg⁻¹ soil, K เท่ากับ 111 mg kg⁻¹ soil, Na เท่ากับ 109 mg kg⁻¹ soil และ P เท่ากับ 89 mg kg⁻¹ soil ประสิทธิภาพของการเพาะเชื้อขึ้นกับชนิดของดิน และกลุ่มเชื้อที่เพาะ จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพที่ดีที่สุด คือ กลุ่มเชื้อที่ผสมกันเพาะบนดิน Humic Cambisol บน limestone

Otero and Vincenzini (2003) ศึกษาผลของไนโตรเจนและความเข้มแสงต่อการสังเคราะห์ extracellular polysaccharide ใน *Nostoc* PCC 7413 *Nostoc* PCC 7936 *Nostoc* PCC 8113 เพาะเลี้ยง ในความเข้มแสงสูงและต่ำแบบ aerated batch พบว่า การเพาะเลี้ยงในความเข้มแสงสูงช่วยเพิ่มปริมาณ คาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมดในทุกสายพันธุ์ แต่การเจริญซึ่งวัดจากวงกวัดตุและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตที่ ละลายได้ พบในสายพันธุ์ที่ใช้ในเตรด เมื่อมีไนเตรดสายพันธุ์ที่มี capsule จะไม่สร้าง capsule และไม่ผลิต extracellular polysaccharide คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการสร้าง capsule และ diazotrophy และพบว่า *Nostoc* PCC 7413 เป็น สายพันธุ์เดียวที่มีการปล่อย releasing polysaccharide

ลงในอาหารทั้งในสภาวะ diazotrophic และ non-diazotrophic ซึ่งจะมีปริมาณสูงสุดเมื่อมีไนเตรด โดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูงสุดที่ 3.5 กรัมต่อลิตร คาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้เท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร

Hu *et al.* (2003) ศึกษา extracellular polymeric substances (EPS) จาก *Microcoleus vaginatus*, *Scytonema javanicum*, *Phormidium tenue*, *Nostoc sp.* และ *Desmococcus olivaceus* ซึ่งแยกได้จาก desert algal crusts ใน Tegger desert ประเทศจีน ผลการทดลองพบว่า EPS ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 7.5–50.3 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 16.2–40.5 monosaccharide 6–12 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย 2-O-methyl rhamnose, 2-O-methyl glucose และ N-acetyl glucosamine คาร์โบไฮเดรตที่พบใน *M. vaginatus* และ *S. javanicum* ประกอบด้วย Man, Gal และ Glc คาร์โบไฮเดรตที่พบใน *P. tenue* ประกอบด้วย arabinose, glucose และ rhamnose arabinose อยู่ในรูป pyranose form ที่เป็น α -L 1 \rightarrow 3 เชื่อมต่อกับ C 4 Glucose อยู่ terminal units เชื่อมต่อกับ β 1 \rightarrow 3 และแบบ β 1 \rightarrow 4 Rhamnose เชื่อมต่อกับ 1 \rightarrow 3 linked กับ C 2 คาร์โบไฮเดรตที่พบใน *D. olivaceus* เชื่อมต่อกับ β -1 \rightarrow 4 กับ xylose, galactose และ glucose galactose อยู่ในรูป β -pyranose และ β -furanose ส่วน Arabinose แบบ α -L-furanose เชื่อมต่อกับ 1 \rightarrow 2 และ 1 \rightarrow 2, 5 linked units, rhamnose เชื่อมต่อกับ α 1 \rightarrow 3 และ xylose เชื่อมต่อกับ β 1 \rightarrow 4 ส่วน polysaccharide ของ *Nostoc sp.* ประกอบด้วย β -1 \rightarrow 4 เชื่อมกับ xylose, galactose และ glucose โดย glucose แตกกิ่งที่ตำแหน่ง C 6 นอกจากนี้ยังมี terminal glucose และ 2-O-methyl glucose

Parikh and Madamwar (2006) ศึกษา extracellular polysaccharides จาก *Cyanotheca sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Nostoc sp.* และ *Nostoc carneum* ผลการทดลองพบว่า EPS ประกอบด้วย mannose, glucose, xylose และ ribose ส่วน Infrared spectra ของ EPS มี specific absorbance O–H ที่ 3448–3400 cm^{-1} , asymmetrical–symmetrical C–H stretching ที่ 2924 และ 2854 cm^{-1} และ bending vibration ของ C–H ที่ 1400–1380 cm^{-1} Absorbance ที่ 1259 และ 1140 cm^{-1} EPS ของ *Cyanotheca sp.* มี sulfur group นอกจากนี้พบว่าเป็น polysaccharide ที่มีความเสถียรที่ความร้อนสูงถึง 250°C

Malam Issa *et al.* (2001) ศึกษาผลของ cyanobacteria ต่อความเสถียรของดินทรายใน Sahelian ของ western Niger โดยนำ Microbiotic soil crusts ไปทดสอบความเสถียรของดิน ด้วยวิธี fast-wetting, slow-wetting และ mechanical breakdown ผลการทดลองที่ได้พบว่าดินมีการเกาะตัวกันอยู่ในช่วง 3 ถึง 5 มิลลิเมตร และมีค่า mean weight diameter (MWD) 1.82 ถึง 3.10 มิลลิเมตร ในขณะที่ดินที่ไม่มี cyanobacteria มีค่า MWD 0.25 ถึง 1.26 มิลลิเมตร การตรวจลักษณะพื้นฐานของดินพบว่าดินที่มี cyanobacteria พบเส้นสายของ cyanobacteria และ extracellular polymer ของ cyanobacteria ซึ่งจับกับเม็ดดินเกิดเป็น Organo-mineral aggregates ขนาด 0.10 ถึง 0.12 มิลลิเมตร จากการเกาะจับกันแบบนี้ก่อให้เกิดความเสถียรของดิน ลดการพังทลายของดินลงได้

Malam Issa *et al.* (2007) ศึกษาผลของ cyanobacteria ต่อลักษณะโครงสร้างขนาดเล็ก (microstructure) และความเสถียรของดินเขตร้อน จาก Guquka Eastern Cape, South Africa โดยนำสารละลาย *Nostoc* sp. ไปเพาะลงในดินที่มีการเกาะตัวกันต่ำ เมื่อดินขนาด 3–5 มิลลิเมตร ความหนาของดิน 10–20 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ความชื้น 80% ให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 6 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าดินที่มีการเพาะเชื้อ จะมี cyanobacteria ปกคลุมผิวดินบางส่วนในสัปดาห์แรกและเชื้อเจริญปกคลุมอย่างหนาแน่น ในเวลา 4 สัปดาห์และมี extracellular polymer secretions (EPS) ปกคลุมหลังจากเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ Organo-mineral aggregates ปรากฏขึ้นหลังจาก 6 สัปดาห์ นอกจากนี้พบว่าดินที่เพาะเชื้อจะมีความเสถียรของดินเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการมีเส้นสาย cyanobacteria และ extracellular polymer secretions (EPS) ที่จะไปยึดและเชื่อมระหว่างดินและแร่ธาตุ

Obana *et al.* (2007) ศึกษาผลของ *Nostoc* sp. ต่อลักษณะของดิน การได้รับสารอาหารและการเจริญของพืช ซึ่งทำการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง โดยนำ *Nostoc* sp. เพาะลงดินที่บรรจุในถาดพลาสติก บ่มเป็นเวลา 90 วันภายนอกห้องปฏิบัติการ และศึกษาผลของ *Nostoc* sp. ต่อการเจริญและการได้รับสารอาหารในผักโขม (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) ที่เพาะในจานเพาะเชื้อลงในอาหารที่ปราศจากดินบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน นอกจากนี้ยังศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเชื้อต่อความสามารถในการทนต่อความแห้งและความเค็ม ผลการทดลองพบว่า *Nostoc* sp. ช่วยเพิ่มสารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนให้กับดินและช่วยเพิ่มการเจริญของพืชโดยเพิ่มเหล็กให้กับพืช อีกทั้งยังรักษาความชื้นในดินและอุณหภูมิด้วย *Nostoc* sp. ที่มีรูปร่างกลมทนทานต่อความแห้งและความเค็มได้ ดีกว่าแบบ irregular-shaped

Hu *et al.* (2002) ศึกษาผลของสาหร่ายที่พบในดินทรายกับความเสถียรของดินทราย โดยศึกษาจาก *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium tenue*, *Scytonema javanicum* (Kutz.) *Nostoc* sp. และ *Desmococcus olivaceus* ซึ่งแยกได้จาก Shapotou ประเทศจีน แล้วนำไปเลี้ยงแบบ batch จากนั้นเพาะเชื้อลงในดินในเรือนกระจกและในแปลงทดลอง โดยทดสอบการพังทลายของดินจากลมในเรือนกระจก ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะของสาหร่าย ได้แก่ มวลชีวภาพ, species, species combinations, bioactivity, niche, ระยะการเจริญของสาหร่าย, ความชื้น, ความหนาของ crusts, dust accretion และ cryptogams อื่นๆ ซึ่งได้แก่ lichens, fungi และ mosses พบว่าเชื้อที่ดีที่สุดได้แก่ *M. vaginatus* และ *P. tenue* ในขณะที่เชื้อผสมที่ดีจะประกอบด้วย *M. vaginatus* 80% และ *P. tenue*, *S. javanicum*, *Nostoc* sp., *D. olivaceus* อย่างละ 5% ค่า threshold friction velocity เพิ่มขึ้นเมื่อมี cyanobacteria ทุกชนิด ในขณะที่ threshold impact velocity ไม่เพิ่มขึ้นถ้ามีเพียง filamentous species ความหนาของ crusts ที่มีความหนามากทำให้การกัดเซาะของดินลดลง ส่วนมวลชีวภาพมีผลมากกว่า

ความหนาของ crusts Dust รวมกลุ่มได้ดีกับ *Microcoleus* crust การเจริญของ cyanobacteria เพิ่มขึ้น แรงยึดเกาะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งมีผลต่อการเกาะกันของดินเมื่อเติมปริมาณเล็กน้อย

Maqubela *et al.* (2008) ศึกษาผล *Nostoc* ต่อโครงสร้างดิน การเป็นปุ๋ยและการเจริญของ ข้าวโพดในดินเพื่อการเกษตรของ Eastern Cape Province, South Africa โดยทำการเพาะ *Nostoc* ปริมาณ 6 กรัมน้ำหนักแห้งต่อตารางเมตรในดินที่เพาะเมล็ดข้าวโพดหลังจากเมล็ดงอกแล้ว พบว่า *Nostoc* ช่วยเพิ่มไนโตรเจนให้กับดินที่ Hertzog ร้อยละ 17 และดินที่ Guquka ร้อยละ 40 และมีความสัมพันธ์กับ ปริมาณคาร์บอนในดินอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ไนโตรเจนอนินทรีย์ และปริมาณ คาร์บอนในดินปริมาณสูงสุดพบในดินที่เพาะ *Nostoc* แต่ไม่ได้ปลูกพืช นอกจากนี้ *Nostoc* ช่วยเพิ่ม ผลผลิตข้าวโพดในดิน Hertzog ถึงร้อยละ 49 และในดิน Guquka ร้อยละ 40 อีกทั้งเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ให้กับเนื้อเยื่อข้าวโพดในดิน Hertzog ถึงร้อยละ 23 และในดิน Guquka ร้อยละ 14 เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าดินที่เพาะเชื้อเม็ดดินจะถูกปกคลุมด้วยเส้นสาย cyanobacteria และมี extracellular polymeric substances (EPS) เชื่อมระหว่างอนุภาคด้วย ในขณะที่ดินที่ไม่ได้เพาะ เชื้อและปลูกพืชจะไม่พบ EPS และเส้นสายของเชื้อ แสดงให้เห็นว่า *Nostoc* ช่วยเพิ่มปริมาณ EPS และ คาร์บอนในดินที่ไม่ได้ปลูกพืชและเพิ่มความเสถียรของดิน แต่ในดินที่เพาะเชื้อและมีการปลูกพืชพบว่ามี ความเสถียรของดินต่ำซึ่งเป็นผลมาจากคาร์บอนในดินและปริมาณ EPS ในดินต่ำ จากผลการทดลอง สามารถนำ *Nostoc* มาใช้เป็นปุ๋ยและเพิ่มความเสถียรให้กับดิน

Nisha *et al.* (2007) ศึกษาผลของปุ๋ยที่ประกอบด้วย *Nostoc calcicola* HH-201, *Anabaena doliolum* HH-209, *Cylindrospermum sphaerica* HH-202 ต่อโครงสร้างดินและผลผลิตของดิน clay-loam ที่มีสารอาหารต่ำกึ่งแห้งแล้ง โดยดินมีค่าการนำไฟฟ้า 0.8 dSm^{-1} , สารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) ร้อยละ 0.34 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 0.06 และ pH 7 ทำการศึกษาเป็นเวลา 240 วันภายใต้การควบคุมความชื้นในดินร้อยละ 6-12 พบว่า เชื้อดังกล่าวช่วยเพิ่มปริมาณ TOC, TKN และ $\text{PO}_4^{3-} \text{P}$ ในช่วงกลางของการทดลองและลดลงในช่วงปลายของการทดลอง ปุ๋ยอินทรีย์ (BF) ช่วยลดอัตรา C:N และความหนาแน่นของดินแต่เพิ่มความเสถียรของดิน ความสามารถในการเก็บรักษาน้ำในดิน ค่าการนำไฟฟ้า และค่า mean weight diameter ที่ได้หลังจากเพาะปลูก pearl millet และ wheat crop นอกจากนี้ผลผลิตของพืชเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเติม cyanobacterial biofertilizer

Tripathi *et al.* (2008) ศึกษาบทบาทของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ (biofertilizer) ต่อการเจริญและผลผลิตของข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยวิเคราะห์แร่ธาตุที่ใช้ในการเจริญของพืช ได้แก่ Fe, Si, Zn, Mn, Cu, Ni, Cd และ As และผลผลิตที่ได้ เมื่อปลูกภายใต้ปริมาณ fly-ash ที่แตกต่างกัน (FA ปริมาณ 10 และ 100 t ha^{-1} ให้สัญลักษณ์แทน FA10 และ FA100 ตามลำดับ) ผสมกับดินสวน (GS) และปุ๋ยไนโตรเจน (NF ปริมาณ 90 และ 120 kg ha^{-1} ให้สัญลักษณ์แทน NF90 และ NF120 ตามลำดับ) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ (BGA ปริมาณ 12.5 kg ha^{-1} ให้สัญลักษณ์

แทน BGA12.5) ผลการทดลองพบว่าส่วนผสมที่ดีที่สุดได้แก่ FA10 + NF90 + BGA12.5 ช่วยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุ Si, Fe, Zn และ Mn ให้สูงกว่า Cu, Cd, Ni และ As นอกจากนี้ยังพบ Arsenic ใน FA100 การเพาะ BGA12.5 จะช่วยลด Cd, Ni และ As ในพืชเมื่อเปรียบเทียบกับ NF120 และใน FA100 ลดระดับ cysteine และ non-protein thiols (NP-SH) โดยการเติม NF และ BGA ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า FA, BGA และ NF ใช้ปรับปรุงการเจริญ เพิ่มผลผลิตและส่วนประกอบของแร่ธาตุในข้าวเพื่อลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน

Pankratova *et al.* (2008) ศึกษาผลของ *Nostoc paludosum* Kütz strain 18 ร่วมกับ *Rhizobium* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Rhizobium leguminosarum* Frank 1897 strain 1022, *Rh. galegae* Lindström 1989 strain 0702, *Rh. trifolii* Dangeard 1926 strain 348a และ *Mesorhizobium loti* Jarvis *et al* 1982 strain 1801 ผลการทดลองพบว่า cyano- rhizobial consortia (CRC) มีผลต่อการเจริญของถั่วขึ้นโดยเพิ่มจำนวนปมที่รากถั่วจากจำนวนปม 24 ปมในถั่วที่เพาะเฉพาะไรโซเบียมเพิ่มจำนวนปมเป็น 31 ปมในถั่วที่เพาะ CRC อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความสูงน้ำหนักแห้งของถั่ว กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและคาร์บอกซีของการตรึงไนโตรเจนอีกด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในถั่วที่มี CRC เท่ากับ $9.18 \mu\text{M C}_2\text{H}_4$ ต่อกรัมของรากต่อชั่วโมง ในถั่วที่ไม่ได้เพาะเชื้อเท่ากับ $8.59 \mu\text{M C}_2\text{H}_4$ ต่อกรัมของรากต่อชั่วโมงและในถั่วที่เพาะไรโซเบียมเท่ากับ $8.62 \mu\text{M C}_2\text{H}_4$ ต่อกรัมของรากต่อชั่วโมง คาร์บอกซีของการตรึงไนโตรเจนในถั่วที่มี CRC เท่ากับร้อยละ 90.7 ในถั่วที่ไม่ได้เพาะเชื้อเท่ากับร้อยละ 81.7 และในถั่วที่เพาะไรโซเบียมเท่ากับร้อยละ 86.1 จากผลการทดลองพบว่า *Nostoc paludosum* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้มากยิ่งขึ้น

Yu *et al.* (2008) ศึกษาการสะสม exopolysaccharide ของ *Nostoc flagelliforme* ในอาหารเหลว พบว่าอัตราการเจริญและการสะสม exopolysaccharide ของ *Nostoc flagelliforme* เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม NaNO_3 และ KH_2PO_4 ในอาหารเหลว BG-11 โดยฟอสเฟตมีผลต่อปริมาณ EPS เล็กน้อย *N. flagelliforme* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25°C และ pH เป็นกลาง แต่การให้อุณหภูมิที่สูงกว่าหรือต่ำกว่านี้และมีความเป็นด่างเล็กน้อยจะช่วยเพิ่ม EPS นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มแสงช่วยเพิ่มอัตราการเจริญและการสะสม EPS เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BG-11 ที่มีการเติม NaNO_3 2.5 กรัมต่อลิตรและ KH_2PO_4 0.956 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ให้ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ใน flask จะได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตรและปริมาณ EPS เท่ากับ 89.9 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใน photobioreactor ขนาด 20 ลิตรเป็นเวลา 16 วันได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตรและคิดเป็น 17.6 เท่าของเชื้อเริ่มต้น และมี EPS เท่ากับ 228.56 มิลลิกรัมต่อลิตร และคิดเป็น 2.23 เท่า

Bhatnagar *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายของ cyanobacteria และสาหร่ายสีเขียวในดินที่ทะเลทราย Thar ประเทศอินเดีย โดยทำการคัดแยกจากตัวอย่างดิน 51 ตัวอย่าง จากดิน 27 แหล่งในทะเลทราย Thar ด้วยวิธี enrichment culture technique เพาะเลี้ยงในอาหาร BG 11 ที่มีและไม่มีไนเตรดไนโตรเจน พบว่ามี cyanobacteria 21 จินัส และสาหร่ายสีเขียวอีก 3 จินัส ซึ่ง unbranched

cyanobacteria ที่พบได้แก่ *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* จะพบมากในอาหารที่มีไนโตรเจน ในโตรเจน ในขณะที่ *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* พบมากในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ในโตรเจน และความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของดินนั้นไม่มีผลกับความหลากหลายของ cyanobacteria นอกจากนี้พบว่าโครงสร้างของ community composition จะมีความเป็น homogeneous ในดินที่ไม่ใช่ดินทราย crust และปลุกพืชมากกว่าพบในดินทราย non-crust และดินที่ไม่ปลุกพืช

Jia *et al.* (2007) ศึกษา extracellular polysaccharide จาก *Nostoc flagelliforme* พบว่า hydrolyzed EPS ประกอบด้วย glucose ร้อยละ 43.2 xylose ร้อยละ 20.6 galactose ร้อยละ 29.9 mannose ร้อยละ 6.3 และ glucuronic acid ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.79×10^5 เป็น non-sulfated polysaccharide ไม่มีกรดนิวคลีอิกและโปรตีน เมื่อนำไปวิเคราะห์ thermal analysis แสดงให้เห็นถึง decomposition peak ที่อุณหภูมิ 245°C เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าโครงสร้างของ EPS เป็นแบบ porous และมี polysaccharide ชนิด amorphous solid

Tamaru *et al.* (2005) ศึกษาความทนต่อความแห้งของ extracellular Polysaccharide จาก *Nostoc commune* ผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่มี EPS จะทนต่อความแห้งแล้งได้ดีและ แม้ว่า *Nostoc commune* จัดเป็น mesophilic cyanobacterium แต่สามารถทนต่อความร้อนได้ในสภาวะที่แห้ง การแยก EPS ออกจากเซลล์ทำได้โดยการ homogenize โคลนนี้ด้วย blender แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง การแยก EPS ออกจากเซลล์นั้นไม่ทำลายเซลล์และ O_2 evolution เนื่องจากเซลล์ยังคงมีเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ O_2 evolution ถูกทำลายด้วยความแห้งในเซลล์ที่ไม่มี EPS ในการทดลองนี้ ใช้สายพันธุ์ KU 002 ที่มีปริมาณ EPS เล็กน้อย มีความไวสูงต่อความแห้ง ในขณะที่ในเซลล์ที่ไม่มี EPS นั้น O_2 evolution มีความไวสูงต่อ freeze-thaw จากผลการทดลองพบว่า EPS ของ *N. commune* ช่วยให้ทนต่อความแห้งและ freeze-thaw

Su *et al.* (2008) ศึกษาลักษณะพื้นฐาน การเจริญและการสร้าง polysaccharide ของ *Nostoc flagelliforme* ในอาหารเหลวที่มีอัตราการเขย่าแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงใน photobioreactor ขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 16 วัน และให้อัตราการเขย่าที่ระดับความเร็ว 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ พบว่า ในระดับความเร็วที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ การสร้าง polysaccharide และลักษณะของเซลล์แตกต่างกัน โดยที่ระดับความเร็ว 0.8, 1.0 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงแต่ที่ระดับความเร็ว 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ น้ำหนักแห้งมีค่าใกล้เคียงกัน ปริมาณ EPS ที่สูงสุดพบที่ระดับความเร็ว 0.8, 1.0 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ในขณะที่ polysaccharide ได้แก่ capsule หรือ slime layer ปริมาณที่สูงสุดพบที่ระดับความเร็ว 0.5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ส่วนอัตราการเขย่าที่ระดับความเร็ว 1.5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้าง polysaccharide ของเซลล์

Trabelsi *et al.* (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นต่อการเจริญและการสร้าง extracellular polymeric substance (EPS) จาก *Arthrospira platensis* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ batch แล้วนำไปศึกษาด้วย three-level, full-factorial design และ response surface methodology ซึ่ง three-

level แบ่งเป็นบ่มที่อุณหภูมิ 30,35,40°C ให้ความเข้มแสง 50,115,180 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.414 ± 0.003 ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30°C ความเข้มแสง 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ สำหรับ EPS สูงสุดที่อุณหภูมิ 35°C ความเข้มแสงมากกว่า 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Meisen *et al.* (2008) ทำการวิเคราะห์ extracellular polysaccharide ใน biofilms ด้วย HPLC โดยใช้ stationary phases 2 ชนิด เป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของ monosaccharides, oligosaccharides และ uronic acids ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ EPS โดยใช้ detector เป็น refractive index (RI)/UV มี Porous graphitic carbon และ leadform cation-exchanger เป็น stationary phases ศึกษาผลของเกลือต่างๆ กรด ต่าง pH และอุณหภูมิของ mobile phase ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า lead-form cation-exchanger เหมาะสำหรับการใช้แยก neutral monosaccharides อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยตรง หลังจาก hydrolysis ด้วย H_2SO_4 , HCl หรือ trifluoroacetic acid แล้ว ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตกตะกอน (precipitation) หรือ lyophilization มีความจำเป็นเมื่อใช้ cation-exchanger ยกเว้น hydrolyze ด้วย HCl การใช้ porous graphitic carbon เป็น stationary phase ไม่ต้องมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และใช้แยก uronic acids และ γ -lactones

Yu *et al.* (2008) ศึกษาการเจริญของ *Nostoc flagelliforme* ในการเพาะเลี้ยงแบบ photoautotrophic, mixotrophic และ heterotrophic เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.67 กรัมต่อลิตรภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic ซึ่งมีปริมาณสูงเท่ากับ 4.98 และ 2.28 เท่าของ phototrophic และ heterotrophic ในช่วง 4 วันแรกการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic มีปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ต่ำกว่า photoautotrophic และ heterotrophic และในวันที่ 5 การเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic มีปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่าแบบ photoautotrophic และแบบ heterotrophic ถึงแม้ว่าจะมีสาร DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] ยับยั้งการเจริญของ *Nostoc flagelliforme* แต่ในสภาวะ แบบ mixotrophic ยังคงมีการเจริญได้เนื่องจากมีการใช้ glucose ในการเจริญและการเติม glucose มีผลต่อการตอบสนองของเชื้อต่อแสง พบว่าในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic จะมีอัตราการสังเคราะห์แสงและการหายใจสูงสุด

Fischer *et al.* (1997) ศึกษา exopolysaccharide จาก cyanobacteria ได้แก่ *Chroococcus minutus* และ *Nostoc insulare* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ batch ใน closed photobioreactor ขนาด 8, 12 และ 250 ลิตร ความเข้มแสง 25 และ 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ immobilized โดยใช้ white cotton toweling เจริญใน 470 มิลลิลิตรและ 17 ลิตร flat upright transparent chambers ที่ทำจาก polycarbonate ความเข้มแสง 0.5–1.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ EPS ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 540–1600 kD ประกอบด้วย acidic EPS ร้อยละ 4.2 และ uronic acid ร้อยละ 25.3

Swamalakshmi *et al.* (2007) ศึกษาการเพาะเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้แก่ *Anabaena variabilis*, *Aulosira fertilissima*, *Nostoc muscorum* และ *Tolypothrix tenuis* โดยทำการศึกษาที่ระดับ

ของปุ๋ยไนโตรเจนที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อ microbial populations, pH, EC, redox potential, chlorophyll, dehydrogenase และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของดินที่มีการปลูกข้าว ผลการทดลองพบว่า การเพาะเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลงในดิน ส่งผลให้มี microbial populations ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แบคทีเรีย เห็ดราและ actinomycetes มากขึ้น สัมพันธ์กับ redox potential และมีการเพิ่มของปริมาณ chlorophyll, dehydrogenase และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วย

Ozturk and Aslim (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ EPS กับความทนต่อ chromium (VI) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 10 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำจืดในประเทศตุรกี ได้แก่ *Chroococcus* sp. H4, H8, S2, S27, S81 *Synechocystis* sp. S63, H6 และ *Microcystis* sp. S17, S31, S80 พบว่า *Chroococcus* sp. สามารถทนต่อ chromium (VI) ได้สูงสุด ที่ EC₅₀ เท่ากับ 10.7 ppm ส่วน *Microcystis* sp. มีความไวต่อ chromium (VI) สูงสุดที่ EC₅₀ เท่ากับ 1.5 ppm เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใน BG 11 บ่มที่ 22-25°C ช่วงแสงมืด/สว่างเป็น 12/12 ชั่วโมง ใน incubator shaker 12 วัน ความเข้มแสง 12,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ผลการทดลองพบว่าปริมาณ EPS ของสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 427-108 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสาหร่ายที่ให้ปริมาณ EPS สูง ได้แก่ *Chroococcus* sp. H4. ให้ปริมาณ EPS สูงสุดถึง 427 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *Synechocystis* sp. S63 เท่ากับ 418 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสาหร่ายที่ให้ปริมาณ EPS ต่ำ คือ *Microcystis* sp. S80 เท่ากับ 108 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณ EPS ที่ได้สัมพันธ์กับความทนต่อ chromium (VI) ดังนี้ ปริมาณ EPS ของ *Chroococcus* sp. H4. ที่ไม่มีปริมาณ chromium (VI) และที่ระดับ chromium (VI) 15 และ 35 ppm มีปริมาณ EPS เท่ากับ 477 ± 2 , 482 ± 2 , 510 ± 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และใน *Synechocystis* sp. S63 มีปริมาณ EPS เท่ากับ 457 ± 6 , 497 ± 8 , 525 ± 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาองค์ประกอบของ EPS ที่มี chromium (VI) และไม่มี chromium (VI) EPS จาก *Chroococcus* sp. H4 ที่ chromium (VI) ปริมาณ 10 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า EPS ที่ไม่มี chromium (VI) ประกอบด้วย glucose ร้อยละ 99 และ galacturonic acid ร้อยละ 1 ส่วน EPS ที่มี chromium (VI) ประกอบด้วย glucose ร้อยละ 9 xylose ร้อยละ 75 rhamnose ร้อยละ 14 และ galacturonic acid ร้อยละ 2 และไม่พบ mannose galactose arabinose ribose และ glucuronic

Richert *et al.* (2005) ศึกษา exopolysaccharides จาก cyanobacteria ที่แยกได้จาก Polynesian Microbial Mats มี 6 ชนิด ได้แก่ *Geitlerinema* (*Oscillatoria*) sp. สายพันธุ์ FE, *Plectonema* (*Leptolyngbya*) cf. *golenkinianum* Gomont สายพันธุ์ FF, *Plectonema* (*Leptolyngbya*) cf. *battersii* Gomont สายพันธุ์ GF, *Chroococcus submarinus* (Hansgirg) Kovačik สายพันธุ์ BM, *Johannesbaptistia pellucida* (Dickie) Taylor and Drouet สายพันธุ์ GC, *Rhabdoderma* cf. *rubrum* (A Ivik) Komaček and Anagnostidis สายพันธุ์ CH ทำการเพาะเลี้ยงใน closed photobioreactors เป็นเวลา 25-35 วัน พบว่ามี Released และ capsular exopolysaccharides (EPS) จากนั้นนำไปศึกษา ลักษณะทางเคมีด้วยวิธี colorimetric และ elemental assays, infrared spectrometry และ gas

chromatography ทั้ง released และ capsular EPS ประกอบด้วย monosaccharide 7 ถึง 10 ชนิด และเป็น neutral sugars มี sulfate อยู่ระหว่างร้อยละ 6 ถึง 19

Moreno *et al.* (1998) ศึกษา exopolysaccharide ของ *Anabaena* sp. ATCC 33047 ที่ทนเค็มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ batch และ continuous culture จากผลการทดลองพบว่า ในระยะ stationary phase ใน batch culture และที่ dilution rate ต่ำใน continuous culture จะมี EPS และการมีไนโตรเจนหรือ NaCl ความเข้มข้นสูง จะลดปริมาณการสร้าง EPS แต่ไม่มีผลต่อการเจริญ ส่วนการเพิ่มปริมาณ EPS ทำได้โดยเพิ่มการให้อากาศให้แสง $460 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ และอุณหภูมิที่ $40-45^{\circ}\text{C}$ continuous culture เพิ่มปริมาณ EPS โดยการลด dilution rate ลง 0.03 h^{-1}

Sharma *et al.* (2008) ศึกษา exopolysaccharides (EPS) จาก *Gloeocapsa calcarea* และ *Nostoc punctiforme* โดยให้ชุดทดลองมีค่า pH 1 ถึง 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมียม 5 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโครเมียม การนำปริมาณโครเมียม (potassium dichromate) ไปใช้ในการสร้าง EPS พบว่าเมื่อปริมาณโครเมียมสูงจะเพิ่มปริมาณการสร้าง EPS และพบว่า *Gloeocapsa calcarea* สามารถใช้โครเมียมในการสร้าง EPS ได้ดีกว่า *Nostoc punctiforme* ส่วน pH มีผลต่อการกำจัดโครเมียมพบว่า pH สูงร้อยละการกำจัดโครเมียมลดลง ซึ่งในการทดลองนี้แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโครเมียมคือที่ pH 2 และความเข้มข้นเริ่มต้นของโครเมียมเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีวิจัย

1. การสำรวจและกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่เก็บตัวอย่างเป็นแปลงเกษตรในเขตวิฤติ บริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากอ่างเก็บน้ำขนาดเล็ก 3 อ่าง และในแปลง ที่สังเกตเห็นการเจริญของสาหร่าย ซึ่งอาจจะเป็นผิวดิน ผิวหน้าก้อนหิน เปลือกไม้ ขอนไม้และแอ่งน้ำขนาดเล็ก

2. การเก็บตัวอย่าง

2.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย แบ่งเป็น 3 ฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน โดยทำการเก็บตัวอย่างฤดูกัลละ 1 – 2 ครั้ง ถ้าเป็นตัวอย่างจากดิน หิน ต้นไม้ ขอนไม้ จะใช้วิธีการขูด แซะบริเวณที่มีสีเขียว ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำ จะใช้วิธีการตักน้ำหรือกรองด้วยถุงแพลงก์ตอนที่มีความตา 25 ไมโครเมตร ทำการลากตักตัวอย่างสาหร่าย เพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนก นอกจากนี้ในการนับจำนวนสาหร่ายจะทำการกรองตัวอย่างน้ำด้วยถุงแพลงก์ตอน จากปริมาตรน้ำทั้งหมด 20 ลิตร ให้เหลือเพียง 50 มิลลิลิตร

2.2 นำตัวอย่างที่เก็บมาใส่ในขวดเลี้ยงสาหร่าย แล้วเติมอาหาร NSIII (Payer, 1970-1971) หรืออาหาร BG11 ความเข้มข้นครึ่งสูตรลงไป แล้วนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้ได้รับแสงธรรมชาตินานประมาณ 1 เดือน นำไปศึกษาสกุลของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

3. การศึกษาชนิดของสาหร่าย

ทำการศึกษาสาหร่ายจากตัวอย่างในขวดเก็บตัวอย่างทุกจุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างจากขวดเก็บสาหร่าย นำมาเขย่าเพื่อให้สาหร่ายกระจายอยู่ในสภาพ homogenous ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ถ่ายภาพ และบันทึกผลเพื่อใช้ในการจัดจำแนกต่อไป

4. การแยกให้ได้สาหร่ายเพียงชนิดเดียว (unialgal culture)

ทำการคัดแยกเบื้องต้น โดยเทคนิค repeated pipetting and washing (Hoshaw and Rosowski, 1973) แล้ว enrich ในอาหาร NSIII medium (สำหรับสาหร่ายสีเขียว) หรือ BG11 medium (สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) หลังจากบ่มไว้ในตู้แสงควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000 lux และ dark: light period = 12: 12 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นการเจริญด้วยตาเปล่า จึงนำมาแยกชั้นที่ 2 repeated pipetting and washing

NS III Medium Composition for Isolation of Freshwater Algae

KNO ₃	1.0	g
KH ₂ PO ₄	0.24	g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.284	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.124	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	15.0	mg
NaCl	11.6	mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	mg
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	16.2	mg
KBr	0.24	mg
KI	0.17	mg
LiCl	34.8	μg
H ₃ BO ₃	30.8	μg
ZnSO ₄	5.76	μg
NiSO ₄ ·6H ₂ O	26.3	μg
CoSO ₄ ·7H ₂ O	2.8	μg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.0	μg
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O	6.68	μg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.76	μg
NH ₄ VO ₃	1.16	μg
EDTA	15.0	mg

5. การจัดจำแนกสาหร่าย

การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายจากตัวอย่างตามวิธีของ Smith (1950); Desikachary (1959); Randhawa (1959); Ramanathan (1964); Bold and Wynne (1978) และ Prescott (1978)

6. การคัดเลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงดิน

นำสาหร่ายที่คัดแยกได้จากข้อ 4 และผ่านการจำแนกในข้อ 5 มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสาหร่ายที่ผลิตสารปรับปรุงดิน โดยเน้นสาร extracellular polysaccharide (EPS) จากไซยาโนแบคทีเรียกลุ่ม *Nostoc* sp. ด้วยวิธีการดังนี้

6.1 การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย

เมื่อได้สายพันธุ์สาหร่ายที่อยู่ในสถานะ axenic culture แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยนำไปเพาะเลี้ยงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรใช้อาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร [ประกอบด้วย NaNO_3 15 กรัมต่อลิตร; K_2HPO_4 0.4 กรัมต่อลิตร; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัมต่อลิตร; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.36 กรัมต่อลิตร; citric acid 0.06 กรัมต่อลิตร; iron(III) ammonium citrate 0.06 กรัมต่อลิตร; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.01 กรัมต่อลิตร; Na_2CO_3 , 0.2 กรัมต่อลิตร และ trace elements solution 1 มิลลิลิตร (H_3BO_3 61 มิลลิกรัมต่อลิตร; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 169 มิลลิกรัมต่อลิตร; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 287 มิลลิกรัมต่อลิตร; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH 6.8; Rippka *et al.* 1979] บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ บนเครื่องเขย่า ที่ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์

6.2 การสกัดสาร extracellular polysaccharide จากไฮยาโนแบคทีเรีย

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งถึงระยะ stationary phase ประมาณ 25 วัน (Richert *et al.*, 2005) นำไปสกัดสาร extracellular polysaccharide มีขั้นตอน ดังนี้ ทำการแยกเซลล์สาหร่ายออกจากอาหารเพาะเลี้ยงโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไปซึ่งน้ำหนักสดและจัดบันทึกไว้ จากนั้นกรองอาหารเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษกรอง Whatman (GF/C) แล้วนำมาลดปริมาตรลงด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 40°C ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์สาหร่ายและอาหารเพาะเลี้ยงไประเหิดแห้งด้วยเครื่อง freeze drier ต่อจากนั้นนำไปสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100°C โดยใช้ความร้อน 100 มิลลิลิตร ต่อกรัมของเซลล์สาหร่ายแห้งและ อาหารเพาะเลี้ยงแห้ง ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เวลาในการสกัด 3 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ กวนตลอดเวลาที่สกัดแล้วกรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง GF/C นำสารละลายที่ได้จากทั้ง การสกัดจากเซลล์สาหร่ายแห้งและอาหารเพาะเลี้ยงแห้งมาหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน เพื่อแสดงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สาหร่ายผลิตขึ้น โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

6.3 การคัดเลือกไฮยาโนแบคทีเรีย

เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและปริมาณสาร extracellular polysaccharide ที่ได้จากไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แล้วนำสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญและให้ปริมาณ extracellular polysaccharide สูง เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

7. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

7.1 สมบัติทางกายภาพ

7.1.1 ค่า pH

การวัดค่า pH ของน้ำจะใช้วิธีการ Standard method 4500-H+ B (Clesleri et al., 1998) ดังนี้ ใช้ pH meter แบบพกพา (Yokogawa, PH81, Japan) ที่สามารถอ่านความละเอียดได้อย่างน้อย 0.1 และมีการปรับค่าตามอุณหภูมิของน้ำ การใช้เครื่องให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต ก่อนใช้ทำการ calibrate เครื่อง กับ สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานตามช่วง pH ที่ใช้งาน การอ่านค่า pH จะต้องรอจนตัวเลขนิ่ง บันทึกค่าที่อ่านได้ ณ จุดเก็บตัวอย่าง

7.1.2 อุณหภูมิ

ใช้เครื่องวัดอุณหภูมิแบบอิเล็กทรอนิกส์ที่เป็นส่วนประกอบของ Conductivity meter จุ่มลงในน้ำได้ที่ระดับความลึก 30 ซม. จากผิวน้ำ บันทึกอุณหภูมิ (± 0.1 องศาเซลเซียส) ด้วย ณ จุดเก็บตัวอย่าง

7.1.3 ค่าการนำไฟฟ้า

การค่าการนำไฟฟ้าจะใช้วิธีการ Standard method 2100 (Clesleri et al., 1998) ดังนี้ นำเครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Conductivity meter, Suntex, SC-120, Taiwan) มา calibrate ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิตเครื่อง (ปกติมักจะใช้สารละลายมาตรฐานของ KCl) ทำการวัดตามวิธีการที่กำหนดโดยผู้ผลิต พร้อมทั้งบันทึกค่าที่อ่านได้ ณ จุดเก็บตัวอย่าง

7.1.4 ความเค็มของน้ำ

การความเค็มของน้ำจะวัดด้วยเครื่อง Pocket refractometer (Atago, PAL-06S, Japan) ก่อนใช้ทำการมา calibrate ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิตเครื่อง (ปกติมักจะใช้น้ำกลั่น) ทำการวัดตามวิธีการที่กำหนดโดยผู้ผลิต พร้อมทั้งบันทึกค่าที่อ่านได้ ณ จุดเก็บตัวอย่าง

7.2 Total organic carbon (TOC)

การวิเคราะห์ TOC (total organic carbon) และ DOC (dissolved organic carbon) จะใช้วิธีการ Standard method 5310 B (Clesleri et al., 1998) ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า Total organic carbon analyzer (TOC-VCHP, Shimadzu, Kyoto, Japan) การใช้เครื่องให้ดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิต รวมทั้งทำการ calibrate กับสารมาตรฐาน (potassium hydrogen phthalate) น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารละลายจะต้องเป็น Milli-Q และเครื่องแก้วที่ใช้ต้องผ่านการอบด้วยความร้อนที่ 450 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

เก็บตัวอย่างน้ำแล้วใส่ลงในขวดแก้วที่ผ่านอบด้วยความร้อน 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เก็บขวดตัวอย่างไว้ในตู้แช่เย็นระหว่างเดินทางไปยังห้องปฏิบัติการ กรองตัวอย่างปริมาตร 10 – 20 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองใยแก้ว Whatman GF/C หรือ GF/F (ที่อบด้วยความร้อน 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ก่อนใช้) เก็บน้ำที่กรองแล้วไว้ในที่มืดและอุณหภูมิต่ำ (ตู้เย็น) ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันที (ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลาสั้นๆ แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส)

คาร์บอนที่อยู่ในน้ำมีอยู่ 2 กลุ่ม คือคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) และ คาร์บอนอนินทรีย์ (inorganic carbon) คาร์บอนอินทรีย์จะอยู่ในสารอินทรีย์ที่โครงสร้างจะมีไฮโดรเจนและออกซิเจนรวมอยู่ด้วย สำหรับคาร์บอนอนินทรีย์จะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ แกลือไบคาร์บอเนต และคาร์บอเนต การปรับสภาพตัวอย่างน้ำให้เป็นกรดด้วยการเติม 2M HCl ให้ pH 2 หรือต่ำกว่า พร้อมทั้งฟองอากาศลงในตัวอย่างจะไล่คาร์บอนอนินทรีย์ออกไปได้หมด ผลจากการวิเคราะห์คาร์บอนที่เหลืออยู่จะเรียกว่า non-purgeable organic carbon (NPOC) ซึ่งจะบ่งบอกถึงปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่มีอยู่ในรูปที่ไม่ระเหย การวิเคราะห์ตัวอย่างต้องทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยค่าที่ได้แตกต่างกันไม่เกิน 2%

7.3 ปริมาณสารอาหาร (Nutrients) ได้แก่ ไนเตรต (Nitrate), ไนไตรต์ (Nitrite), แอมโมเนียม (Ammonium), ไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic Nitrogen) และ ฟอสเฟต (Phosphate)

การวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในตัวอย่างจะใช้เครื่อง Auto-analyzer (AA II, Bran+Lubbe) ที่ได้รับการยอมรับในการศึกษาคุณภาพของน้ำมากกว่า 20 ปี วิธีนี้อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาเคมีอย่างต่อเนื่อง (continuous-flow analytical system) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะต่อสารแต่ละชนิด

เก็บตัวอย่างน้ำแล้วกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว Whatman GF/C หรือ GF/F (ที่อบด้วยความร้อน 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ก่อนใช้) ณ จุดเก็บตัวอย่างทันที เก็บน้ำที่กรองแล้วในขวดพลาสติกประมาณ 300 – 500 มิลลิลิตร แยกเก็บกระดาษกรองที่ใช้กรองตัวอย่างในถุงพลาสติกนำไปแช่เย็นร่วมกับขวดตัวอย่างระหว่างเดินทางกลับมายังห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างที่ต้องทำการย่อยให้เต็มสารเคมีทันที ภายหลังการเก็บตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทันทีที่สามารถกระทำได้ ระหว่างนั้นให้เก็บตัวอย่างทั้งหมดในตู้เย็น

รายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์ธาตุอาหารทั้งหมดสามารถดูได้จาก Nojiri (1987) และ Otsuki et al. (1993) ที่กล่าวถึงการวิเคราะห์ (1) nitrate+nitrite (NO_x-N); (2) nitrite (NO₂-N); (3) ammonium (NH₄-N); (4) total dissolved nitrogen (TDN); (5) total nitrogen (TN); (6) phosphate (PO₄-P); (7) total dissolved phosphorus (TDP) และ (8) total phosphorus (TP)

7.3.1 การวิเคราะห์ Total nitrogen (TN) และ Dissolved total nitrogen (DTN)

7.3.1.1 การย่อยตัวอย่าง

- เตรียม (1) สารละลายออกซิไดส์ที่ใช้ในการย่อยที่ประกอบด้วย potassium peroxosulfate, ($K_2S_2O_8$) 3 กรัม และ sodium hydroxide (NaOH) 3 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (2) สารละลายกรดเกลือ HCl 2.4 N (HCl 93 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร) (3) ammonium buffer solution โดยการละลาย แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 75 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.5 ด้วย สารละลายแอมโมเนีย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร

- นำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกโพลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารออกซิไดส์ 3 มิลลิลิตร

- ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไป autoclave ที่ 130 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

- ทิ้งไว้จนเย็นแล้วเติม 2.24N HCl 1 มิลลิลิตร และ ammonium buffer solution 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์

7.3.1.2 การวิเคราะห์ Ammonium nitrogen (NH_4-N)

ใช้วิธี automated phenate method (Standard methods 4500- NH_3 G) (Clesleri et al., 1998) ที่ใช้หลักการที่ alkaline phenol ร่วมกับ hypochlorite ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย ได้เป็นสาร indophenol blue ความเข้มของสีฟ้าจะเป็นสัดส่วนกับแอมโมเนียที่มีอยู่ สีฟ้าที่เกิดขึ้นจะเข้มมากขึ้นเมื่อเติม sodium nitroprusside

7.3.1.3 การวิเคราะห์ Nitrate nitrogen (NO_3-N)

ใช้วิธี automated cadmium reduction method (Standard methods 4500- NO_4^- F) (Clesleri et al., 1998) ที่ใช้หลักการรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์โดยมี cadmium เป็นตัวเร่ง ทำปฏิกิริยานไนไตรต์ที่เกิดขึ้นกับ sulfanilamide และจับกับ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride จะได้สี azo ที่สามารถวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ปกติแล้วปริมาณไนไตรต์ในตัวอย่างธรรมชาติจะมีอยู่น้อย แต่ถ้าต้องการวิเคราะห์ก็สามารถทำได้โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาโดยตรง (ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อย)

7.3.2 การวิเคราะห์ Total phosphorus (TP) และ Dissolved total phosphorus (DTP)

7.3.2.1 การย่อยตัวอย่าง

- เตรียมสารละลายออกซิไดส์ที่ใช้ในการย่อยที่ประกอบด้วย potassium peroxosulfate, ($K_2S_2O_8$) 4 กรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร

- นำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 20 x 200 มิลลิเมตร แล้วเติมสารออกซิไดส์ 5 มิลลิลิตร

- ปิดฝาเกลียวให้แน่นแล้วนำไป autoclave ที่ 130 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
- ทิ้งไว้จนเย็นแล้วนำไปวิเคราะห์

7.3.1.2 การวิเคราะห์ Orthophosphate ($\text{PO}_4\text{-P}$)

ใช้วิธี automated ascorbic acid method (Standard methods 4500-P F) (Clesleri et al., 1998) ที่ใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่าง ammonium molybdate และ potassium antimonyl tartrate ในสภาวะที่เป็นกรด กับ orthophosphate ได้สารประกอบเชิงซ้อน heteropoly acid – phosphomolybdic acid ที่จะถูกรีดิวส์ด้วย ascorbic acid ไปเป็นสารประกอบสีฟ้าเข้มที่สามารถวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การเก็บและชนิดของตัวอย่าง

สภาพภูมิประเทศโดยทั่วไปของสถานีวิจัยกาญจนบุรีมีความแตกต่างกันอย่างมาก มีทั้งพื้นที่ป่า มีเขาสูง พื้นที่ราบ พื้นที่ราบสลับกับเนินเขา และป่าละเมาะ และมีความแตกต่างกันมากของระดับอุณหภูมิ ในเวลากลางวันและกลางคืน รวมทั้งในแต่ละฤดูกาล โดยพื้นที่ที่มีความแห้งแล้ง ดินเลว มักมีสภาพเป็นต่าง หรือมีเขตฝนทิ้งช่วงเป็นประจำ จึงไม่เหมาะสำหรับเกษตรกรรมที่ต้องการน้ำสูง ปัจจุบันพืชที่นิยมปลูกในบริเวณนี้ได้แก่ อ้อย และมันสำปะหลัง แต่สำหรับที่สถานีจะมีการวิจัยการเพาะปลูกพืชที่มีมูลค่าสูงได้แก่ แคนตาลูป และเป็นสถานที่รวบรวมต้นพันธุ์และการวิจัยอื่น

จากข้อมูลกรมอุตุนิยมวิทยาปี พ.ศ. 2551 พบว่าอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาว (ตุลาคม – กุมภาพันธ์) อยู่ระหว่าง 30 – 33 องศาเซลเซียส ในขณะที่ต่ำสุดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 20 - 23 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1) ในขณะที่ในฤดูร้อน (มีนาคม – พฤษภาคม) อุณหภูมิจะสูงขึ้นจากฤดูหนาวประมาณ 3 – 5 องศาเซลเซียส และในช่วงฤดูฝน (มิถุนายน – กันยายน) จะมีอุณหภูมิเฉลี่ยใกล้เคียงกับฤดูร้อน สำหรับปริมาณฝนพบว่า ในระหว่างเดือน ธันวาคม และมกราคม ไม่มีฝนตกลงมาเลย ในขณะที่เดือนมิถุนายน – ตุลาคมจะมีปริมาณฝนเฉลี่ยค่อนข้างสูง (มากกว่า 100 มม.)

จากสภาวะของอุณหภูมิและปริมาณฝนทำให้สภาพพื้นที่แห้งแล้งมากในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างทั้ง 2 ครั้ง (พฤษภาคม และกันยายน) โดยอ่างเก็บน้ำขนาดเล็กทั้ง 3 แห่งภายในสถานีวิจัยมีปริมาณ น้ำน้อยมาก

ตารางที่ 1 อุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนของจังหวัดกาญจนบุรี ปี พ.ศ. 2551 ณ สถานีอุตุนิยมวิทยากาญจนบุรี (กรมอุตุนิยมวิทยา, http://www.tmd.go.th/agromet_report.php)

เดือน	อุณหภูมิ (°C)					ฝน		
	สูงสุดเฉลี่ย	สูงที่สุด	ต่ำสุดเฉลี่ย	ต่ำที่สุด	เฉลี่ย	ฝนรวม (มม.)	จำนวนวันที่มีฝนตก	ฝนรวมตั้งแต่ 1 มกราคม (มม.)
มกราคม	33.4	37.2	20.9	16.0	26.5	0.9	1	0.9
กุมภาพันธ์	32.4	35.8	23.1	18.8	27.2	161.3	4	162.2
มีนาคม	35.4	39.3	23.8	18.8	28.9	88.9	4	251.1
เมษายน	35.7	38.3	25.4	23.4	29.8	71.7	8	322.8
พฤษภาคม	34.5	37.3	24.9	23.7	29.0	53.1	15	375.9
มิถุนายน	34.5	36.5	24.8	23.5	28.9	192.8	19	568.7
กรกฎาคม	34.0	36.8	24.3	22.6	28.7	140.1	20	708.9
สิงหาคม	34.2	37.4	24.2	23.2	28.8	103.7	16	812.6
กันยายน	33.4	36.5	23.6	22.5	28.2	191.5	16	1004.1
ตุลาคม	32.6	35.0	23.4	22.0	28.0	231.5	16	1235.6
พฤศจิกายน	30.3	33.2	21.1	16.6	26.1	89.3	6	1324.9
ธันวาคม	30.2	32.6	17.5	14.5	24.4	0.0	-	1324.9

2. สมบัติทางกายภาพของน้ำ

ค่า pH ของน้ำเป็นค่าที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการประเมินคุณภาพของน้ำเบื้องต้น ตัวอย่างเช่น ค่า pH ของน้ำที่เป็นต่างจะเป็น buffer ที่ดี ในกรณีที่เกิดสภาวะฝนกรด นอกจากนี้สภาวะที่เป็นต่างเล็กน้อยจะหมายถึงมีปริมาณเกลือแร่ละลายอยู่สูง เกลือแร่เหล่านี้จะจำเป็นสำหรับแพลงค์ตอนพืชที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนินทรีย์คาร์บอนในน้ำที่สามารถเปลี่ยนรูประหว่างกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) bicarbonate ion (HCO_3^-) และ carbonate ion (CO_3^{2-}) จะขึ้นอยู่กับ pH ของน้ำ ถ้า

pH สูงอนินทรีย์คาร์บอนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป HCO_3^- ในทางตรงข้ามถ้า pH เป็นกรดอนินทรีย์คาร์บอนจะอยู่ในรูป H_2CO_3 แต่ถ้า pH สูงกว่า 8 อนินทรีย์คาร์บอนจะตกตะกอนเป็นเกลือคาร์บอเนต

สำหรับค่าการนำไฟฟ้าจะบ่งบอกถึงความสามารถของของเหลวในการนำกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและปริมาณไอออนที่มีอยู่

ตารางที่ 2 สมบัติทางกายภาพของน้ำในอ่างเก็บน้ำ สถานีวิจัยกาญจนบุรี

Parameter	ตัวอย่างน้ำ		
	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
อุณหภูมิ (°C)	33.4	31.6	30.8
pH	8.0	6.1	6.8
ความเค็ม (ppt)	0	0	0
Conductivity (mS/cm)	0.436	0.15	0.255

2. Total organic carbon (TOC) ของน้ำในอ่างเก็บน้ำ

จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าคุณภาพของน้ำในอ่างเก็บน้ำที่สถานีวิจัยกาญจนบุรี อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างดี (ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำ กรมโรงงานอุตสาหกรรม) โดยมีปริมาณคาร์บอนอินทรีย์น้อยกว่า 20 mg/L โดยที่อ่างเก็บน้ำที่ 1 จะมีค่า 13.92 mg/L ซึ่งสูงกว่าอีก 2 อ่าง (8.75 และ 10.37 mg/L) จากการสังเกตสภาพโดยรอบพบว่ามีมูลวัวกระจายอยู่บริเวณขอบอ่าง ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ปริมาณสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำและปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายน้ำเป็นดัชนีที่สำคัญในการประเมินคุณภาพน้ำในแหล่งธรรมชาติ เนื่องจากสารเหล่านี้จะเป็นแหล่งของสารมลพิษอินทรีย์ ซึ่งจะเป็นอาหารของจุลินทรีย์ต่างๆที่อยู่ในแหล่งน้ำนั้น ซึ่งเป็นตัวขับเคลื่อนวัฏจักรของธาตุต่างๆ และเป็นตัวกำหนดกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น แพลงค์ตอนพืชและแบคทีเรีย นอกจากนั้น DOC ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการผลิตน้ำประปา เพราะ DOC จะทำปฏิกิริยากับคลอรีนที่ใช้เป็นสารควบคุมจุลินทรีย์ในน้ำและได้เป็นสารพิษที่อาจก่อมะเร็งในกลุ่ม trihalomethanes

คาร์บอนที่อยู่ในน้ำมีอยู่ 2 กลุ่ม คือคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) และ คาร์บอนอนินทรีย์ (inorganic carbon) คาร์บอนอินทรีย์จะอยู่ในสารอินทรีย์ที่โครงสร้างจะมีไฮโดรเจนและออกซิเจนรวมอยู่ด้วย สำหรับคาร์บอนอนินทรีย์จะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ เกลือไบคาร์บอเนต และคาร์บอเนต การปรับสภาพตัวอย่างน้ำให้เป็นกรดด้วยการเติม 2M HCl ให้ pH 2 หรือต่ำกว่า พร้อมทั้งพ่นอากาศลงในตัวอย่างจะไล่คาร์บอนอนินทรีย์ออกไปได้หมด ผลจากการวิเคราะห์คาร์บอนที่เหลืออยู่จะเรียกว่า non-purgeable organic carbon (NPOC) ซึ่งจะบ่งบอกถึงปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ที่มีอยู่ในรูปที่ไม่ระเหย การวิเคราะห์ตัวอย่างต้องทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยค่าที่ได้แตกต่างกันไม่เกิน 2%

3. ปริมาณสารอาหาร (Nutrients) ได้แก่ ไนเตรต (Nitrate), ไนไตรต์ (Nitrite), แอมโมเนียม (Ammonium), ไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic Nitrogen) และ ฟอสเฟต (Phosphate)

สำหรับปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและในอ่างเก็บน้ำทั้ง 3 อ่าง อยู่ในระดับที่ต่ำมาก (ตารางที่ 3) ทำให้ไม่พบการเจริญของสาหร่ายมากนัก เนื่องจากธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความสำคัญมากที่สุดต่อระบบนิเวศ (นอกเหนือจากคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนรูปในสิ่งแวดล้อมผ่านวัฏจักร ทั้งสองธาตุเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อแพลงค์ตอนพืชที่เป็นผู้ผลิตปฐมภูมิ (primary producers) แล้วสร้างสารอินทรีย์ที่จะเป็นอาหารในสำหรับสิ่งมีชีวิตขั้นสูงต่อไปในห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำนิ่ง เช่นทะเลสาบน้ำลึก มักจะมีปริมาณธาตุทั้งสองต่ำและจำกัด (oligotrophic lakes) จึงมีการเจริญของแพลงค์ตอนพืชต่ำ น้ำในทะเลสาบจึงมักใส ในทางตรงกันข้ามทะเลสาบน้ำตื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่มีมนุษย์อาศัยอยู่อย่างหนาแน่น น้ำในทะเลสาบมักมีธาตุอาหารปนเปื้อนในปริมาณสูง (eutrophic lakes) จึงมักมีประชากรของสาหร่ายขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น ประกอบกับมีตะกอนดินแขวนลอยอยู่มาก ทำให้น้ำมีลักษณะขุ่น ในบางครั้งอาจพบปริมาณสาหร่ายเจริญอย่างหนาแน่น (algal bloom) จนทำให้เกิดปัญหาตามมา เช่นการเน่าเสียของน้ำ การปนเปื้อนของสารพิษจากสาหร่าย (microcystins, nodularins) ที่เป็นอันตรายต่อสัตว์รวมทั้งมนุษย์ ซึ่งวิธีการป้องกันที่ได้ผลคือลดปริมาณสารอาหารเหล่านี้ในแหล่งน้ำด้วยการควบคุมการปนเปื้อนโดยกิจกรรมของมนุษย์

ไนโตรเจนในแหล่งน้ำมีอยู่หลายรูป ได้แก่ ไนเตรตไนโตรเจน (nitrate nitrogen, $\text{NO}_3\text{-N}$) ไนไตรต์ไนโตรเจน (nitrite nitrogen, $\text{NO}_2\text{-N}$) แอมโมเนียมไนโตรเจน (ammonium nitrogen, $\text{NH}_4\text{-N}$) ไนโตรเจนอินทรีย์ละลายน้ำ (dissolved organic nitrogen, DON) และตะกอนไนโตรเจน (particulate nitrogen, PN)

ไนโตรเจนอินทรีย์ละลายน้ำ (dissolved inorganic nitrogen, DIN) หมายถึงผลรวมของ $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ และ $\text{NH}_4\text{-N}$ สำหรับไนโตรเจนอินทรีย์ละลายน้ำรวม (dissolved total nitrogen) หมายถึง ผลรวมของ $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ และ DON และไนโตรเจนรวม (total nitrogen) หมายถึง ผลรวมของ $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, DON และ PN

สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอมิโน กรดยูริก โปรตีน และอื่นๆ เป็นส่วนประกอบหลักของ DON เนื่องจากความหลากหลายของสารประกอบเหล่านี้ทำให้ยากแก่การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ DON ว่ามีอะไรอยู่บ้าง ในทางปฏิบัติจึงนิยมที่จะเปลี่ยนรูปสารเหล่านั้นด้วยกระบวนการออกซิเดชันไปเป็น ไนเตรตไนโตรเจนจากนั้นคำนวณกลับมาเป็น DON ด้วยการหักลบค่าไนเตรตไนโตรเจนทั้งหมดด้วย DIN

ตะกอนไนโตรเจน (PN) หมายถึงรวมถึงไนโตรเจนในตะกอนและเซลล์ของจุลินทรีย์ต่างๆที่แขวนลอยในน้ำ วิธีการวิเคราะห์จึงทำโดยการนำตะกอนที่ติดอยู่บนกระดาษกรองใยแก้วมาชั่งด้วยกระบวนการออกซิเดชันให้เป็นไนเตรตไนโตรเจนแล้ววิเคราะห์หาปริมาณไนเตรต

สำหรับฟอสฟอรัสก็เป็นธาตุที่มีอยู่หลายรูปในน้ำ ได้แก่ ฟอสเฟต ($PO_4\text{-P}$) ฟอสเฟตอินทรีย์ละลายน้ำ (dissolved organic phosphate, DOP) ตะกอนฟอสฟอรัส (particulate phosphorus, PP) ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำทั้งหมด (dissolved total phosphorus, DTP) เป็นผลรวมของ $PO_4\text{-P}$ กับ DOP ในขณะที่ฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus, TP) หมายถึงผลรวมของ $PO_4\text{-P}$, DOP และ PP ฟอสฟอรัสอินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ยากต่อการวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบ ดังนั้นการวิเคราะห์ DOP โดยตรงจึงไม่อาจกระทำได้ ในทางปฏิบัติจะอาศัยการคำนวณโดยการหักลบค่า $PO_4\text{-P}$ จาก DTP สำหรับ PP จะหมายรวมถึงปริมาณฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในแพลงก์ตอนและสารแขวนลอยอื่นๆ ในการวิเคราะห์จึงใช้ตัวอย่างตะกอนที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แบบนี้จะใช้เวลาในการย่อยตัวอย่างนานมากจึงไม่ค่อยนิยมทำกัน การประเมินปริมาณ PP จึงใช้การคำนวณโดยการหักลบค่า DTP จาก TP การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านกรองจะอาศัยการย่อยด้วยวิธีออกซิเดชันแบบเปียกเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสทั้งหมดไปเป็น $PO_4\text{-P}$ บางครั้งอาจพบฟอสฟอรัสในตัวอย่างน้ำในรูปโพลีฟอสเฟต (polyphosphate) ซึ่งแหล่งที่มาส่วนใหญ่จะมาจากผงซักฟอก อย่างไรก็ตามโพลีฟอสเฟตจะรวมอยู่ใน DOP ด้วย

ตารางที่ 3 ปริมาณ TOC และสารอาหารในน้ำของอ่างเก็บน้ำ สถานีวิจัยกาญจนบุรี

Parameter	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
TOC (mg/L)	13.92	7.78	4.36
$NH_4 - N$ (mg/L)	0.036	0	0.049
$NO_3 - N$ (mg/L)	0	0	0
$NO_2 - N$ (mg/L)	0	0	0
Total dissolved N (mg/L)	0.752	0.747	0.557
PO_4 (mg/L)	0.0093	0.0006	0.0006
Total dissolved P (mg/L)	0.012	0.009	0.018

4. ความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กในอ่างเก็บน้ำสถานีวิจัยกาญจนบุรี

จากการศึกษาสาหร่ายในแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่เกษตรในเขตที่มีสภาวะวิกฤติ สถานีวิจัยกาญจนบุรี ในฤดูฝน พบสาหร่ายทั้งหมด 6 หมวด 34 สกุล โดยพบสาหร่ายใน หมวด Cyanophyta (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) 10 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Cylindrospermopsis* sp. *Lyngbya* sp. *Merismopedia* sp. *Oscillatoria* sp. *Phormidium* sp. *Plectonema* sp. *Pseudanabaena* sp. *Spirulina* sp. (ภาพที่ 1) พบสาหร่ายใน หมวด Chlorophyta (สาหร่ายสีเขียว) 14 สกุล ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. *Botryococcus* sp. *Chlamydomonas* sp. *Chlorella* sp. *Closterium* sp. *Coelastrum* sp. *Cosmarium* sp. *Crucigenia* sp. *Crucigenella* sp. *Monoraphidium* sp. *Oedogonium* sp. *Pediastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Staurastrum* sp. (ภาพที่ 2) พบสาหร่ายใน หมวด Euglenophyta (สาหร่ายยูกลีโนยด์) 2 สกุล ได้แก่ *Euglena* sp. *Phacus* sp. (ภาพที่ 3) พบสาหร่ายใน หมวด Bacillariophyta (ไดอะตอม) 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. *Nitzschia* sp. *Pinnularia* sp. (ภาพที่ 4) พบสาหร่ายใน หมวด Chrysophyta (สาหร่ายคริสโซไฟต์) 3 สกุล ได้แก่ *Centritractus* sp. *Dinobryon* sp. *Isthmochloron* sp. (ภาพที่ 5) และ พบสาหร่ายใน หมวด Pyrrophyta (สาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต) 1 สกุล ได้แก่ *Peridiniopsis* sp. (ตารางที่ 4)

โดยตัวอย่างน้ำในจุดที่ 1 พบสาหร่ายทั้งหมด 24 สกุล ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล สาหร่ายสีเขียว 11 สกุล สาหร่ายยูกลีโนยด์ 1 สกุล ไดอะตอม 2 สกุล และสาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต 1 สกุล ตัวอย่างน้ำในจุดที่ 2 พบสาหร่ายทั้งหมด 25 สกุล ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 8 สกุล สาหร่ายสีเขียว 9 สกุล สาหร่ายยูกลีโนยด์ 2 สกุล ไดอะตอม 3 สกุล สาหร่ายคริสโซไฟต์ 3 สกุล และสาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต 1 สกุล ตัวอย่างน้ำในจุดที่ 3 พบสาหร่ายทั้งหมด 21 สกุล ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 8 สกุล สาหร่ายสีเขียว 7 สกุล สาหร่ายยูกลีโนยด์ 1 สกุล ไดอะตอม 4 สกุล และ สาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต 1 สกุล โดยในจุดที่ 1 พบ ชนิดของสาหร่ายสีเขียวมากกว่าจุดอื่น ในจุดที่ 2 พบชนิดของสาหร่ายคริสโซไฟต์มากกว่าจุดอื่น ส่วนในจุดที่ 3 พบชนิดของไดอะตอมมากกว่าจุดอื่น (ตารางที่ 4)

สาหร่ายที่พบจำนวนมากที่สุดในจุดที่ 1 เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในสกุล *Pseudanabaena* sp. รองมา คือ *Oscillatoria* sp. สาหร่ายที่พบจำนวนมากที่สุดในจุดที่ 2 คือ สาหร่ายสีเขียว ในสกุล *Pediastrum* sp. ส่วนสาหร่ายที่พบจำนวนมากที่สุดในจุดที่ 3 เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในสกุล *Merismopedia* sp. (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของสาหร่ายที่สำรวจพบ ในพื้นที่เกษตรเขตวิฤติ บริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี
(+ = พบ, - = ไม่พบ)

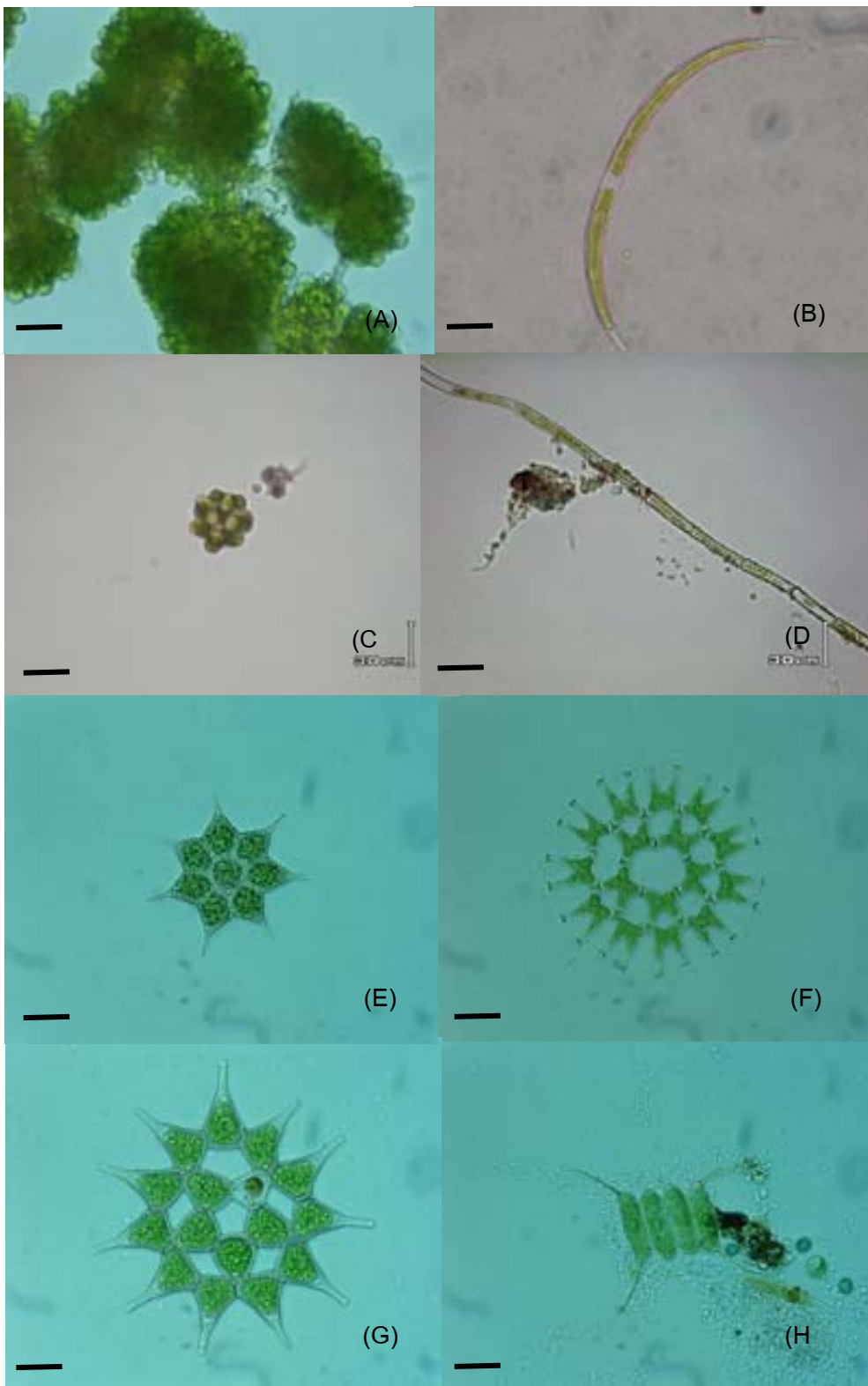
ชนิดของสาหร่าย	ตัวอย่างน้ำ		
	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
Division Cyanophyta			
<i>Anabaena</i> sp.	-	+	+
<i>Chroococcus</i> sp.	+	+	+
<i>Cylindrospermopsis</i> sp.	-	+	-
<i>Lyngbya</i> sp.	+	+	+
<i>Merismopedia</i> sp.	+	+	+
<i>Oscillatoria</i> sp.	+	+	+
<i>Phormidium</i> sp.	+	+	+
<i>Plectonema</i> sp.	+	-	-
<i>Pseudanabaena</i> sp.	+	+	+
<i>Spirulina</i> sp.	+	+	+
Division Chlorophyta			
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	+	+	+
<i>Botryococcus</i> sp.	+	+	-
<i>Chlamydomonas</i> sp.	+	-	-
<i>Chlorella</i> sp.	+	+	+
<i>Closterium</i> sp.	+	+	-
<i>Coelastrum</i> sp.	-	+	+
<i>Cosmarium</i> sp.	-	+	+
<i>Crucigenia</i> sp.	-	-	+
<i>Crucigenella</i> sp.	-	-	+
<i>Monoraphidium</i> sp.	-	+	-
<i>Oedogonium</i> sp.	-	+	-
<i>Pediastrum</i> sp.	+	+	+
<i>Scenedesmus</i> sp.	+	+	+
<i>Staurastrum</i> sp.	-	+	+

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของสาหร่าย	ตัวอย่างน้ำ		
	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
Division Euglenophyta			
<i>Euglena sp.</i>	+	+	+
<i>Phacus sp.</i>	-	-	+
Division Bacillariophyta			
<i>Amphora sp.</i>	+	-	+
<i>Navicula sp.</i>	+	+	+
<i>Nitzschia sp.</i>	+	+	+
<i>Pinnularia sp.</i>	+	-	-
Division Chrysophyta			
<i>Centrtractus sp.</i>	-	-	+
<i>Dinobryon sp.</i>	-	-	+
<i>Isthmochloron sp.</i>	-	-	+
Division Pyrrophyta			
<i>Peridiniopsis sp.</i>	+	+	+



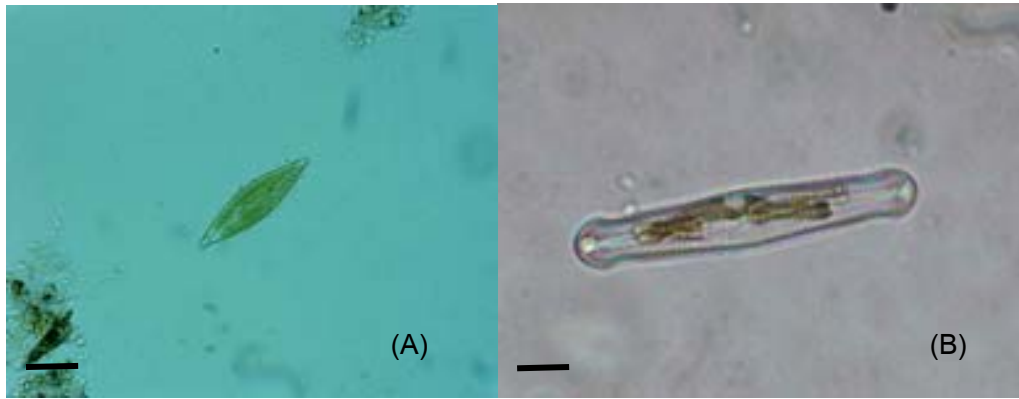
ภาพที่ 1 สาหร่ายใน หมวด Cyanophyta (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) สกุล (A) *Anabaena* sp. (B) *Chroococcus* sp. (C) *Merismopedia* sp. (D) *Oscillatoria* sp. (Bar = 30 μm)



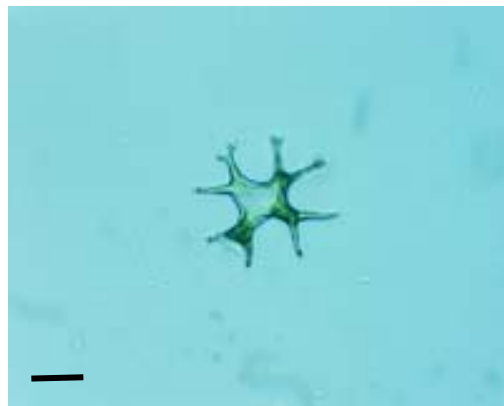
ภาพที่ 2 สาหร่ายใน หมวด Chlorophyta (สาหร่ายสีเขียว) สกุด (A) *Botryococcus* sp. (B) *Closterium* sp. (C) *Coelastrum* sp. (D) *Oedogonium* sp. (E – G) *Pediastrum* sp. (H) *Scenedesmus* sp. (Bar = 30 μ m)



ภาพที่ 3 สาหร่ายใน หมวด Euglenophyta (สาหร่ายยูกลีโนยด์) สกุล (A – B) *Euglena* sp.
(C) *Phacus* sp. (Bar = 30 μ m)



ภาพที่ 4 สาหร่ายใน หมวด Bacillariophyta (ไดอะตอม) สกุล (A) *Navicula* sp. (B) *Pinnularia* sp.
(Bar = 30 μ m)



ภาพที่ 5 สาหร่ายใน Division Chrysophyta (สาหร่ายคริสโซไฟต์) สกุล *Isthmochloron* sp. (Bar = 30 μ m)

ตารางที่ 5 จำนวนของสาหร่ายแยกตาม genera ที่สำรวจพบ ในบริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี

ชนิดของสาหร่าย	จำนวนของสาหร่าย (หน่วย/มล.)		
	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
Division Cyanophyta			
<i>Anabaena</i> sp.	-	0.1	0.05
<i>Chroococcus</i> sp.	7.6	5.0	3.9
<i>Cylindrospermopsis</i> sp.	-	1.9	-
<i>Lyngbya</i> sp.	2.35	0.05	0.9
<i>Merismopedia</i> sp.	22.9	26.5	3.8
<i>Oscillatoria</i> sp.	16.8	216.3	9.2
<i>Phormidium</i> sp.	3.65	9.85	2.75
<i>Plectonema</i> sp.	0.25	-	-
<i>Pseudanabaena</i> sp.	2.4	502.35	3.35
<i>Spirulina</i> sp.	0.1	0.4	0.1
Division Chlorophyta			
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	2.75	2.95	0.1
<i>Botryococcus</i> sp.	0.45	0.2	-
<i>Chlamydomonas</i> sp.	0.1	-	-
<i>Chlorella</i> sp.	10.05	5.85	7.45
<i>Closterium</i> sp.	0.05	0.1	-
<i>Coelastrum</i> sp.	-	-	0.3
<i>Cosmarium</i> sp.	-	0.05	0.1
<i>Crucigenia</i>	-	-	0.85
<i>Crucigenella</i>	-	-	0.6
<i>Monoraphidium</i> sp.	-	0.6	-
<i>Pediastrum</i> sp.	3.9	4.75	33.9
<i>Scenedesmus</i> sp.	1.95	1.65	2.95
<i>Staurastrum</i> sp.	-	0.65	0.15

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของสาหร่าย	จำนวนของสาหร่าย (หน่วย/มล.)		
	อ่างเก็บน้ำ 1	อ่างเก็บน้ำ 2	อ่างเก็บน้ำ 3
Division Euglenophyta			
<i>Euglena</i> sp.	0.25	0.05	0.3
<i>Phacus</i> sp.	-	-	0.05
Division Bacillariophyta			
<i>Amphora</i> sp.	0.05	-	0.05
<i>Navicula</i> sp.	0.5	1.4	3.2
<i>Nitzschia</i> sp.	0.2	0.1	2.15
<i>Pinnularia</i> sp.	0.05	-	-
Division Chrysophyta			
<i>Centritractus</i> sp.	-	-	0.2
<i>Dinobryon</i> sp.	-	-	0.25
Division Pyrrophyta			
<i>Peridiniopsis</i> sp.	1.05	3.75	0.35

5. การคัดเลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงดิน

จากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากสถานีวิจัยกาญจนบุรี ไม่พบสาหร่ายในกลุ่ม *Nostoc* sp. เลย ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ไปเก็บตัวอย่างสาหร่ายในนาข้าว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และสุพรรณบุรี โดยสามารถสังเกตเห็นโคโลนีได้อย่างชัดเจน แล้วนำมาคัดแยกให้ได้สายพันธุ์เดี่ยว (*uni-algal species*) ซึ่งได้ *Nostoc* sp. จำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งจะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์หาปริมาณ extracellular polysaccharide ต่อไป

อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างน้ำในอ่างเก็บน้ำที่ 1 และอ่างเก็บน้ำที่ 2 พบ สาหร่ายสีเขียวในสกุล *Botryococcus* (ตารางที่ 4 ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 2 A) ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ขณะนี้มีการทำวิจัยอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากเป็นบางสายพันธุ์ของสาหร่ายนี้ที่มีการสะสมปริมาณไฮโดรคาร์บอนถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยไฮโดรคาร์บอนนี้สามารถนำไปใช้เป็น bio-diesel ได้โดยตรง (ไม่ต้องผ่านกระบวนการ transmethylation เหมือนน้ำมันพืช) และเมื่อทำการคัดแยกแล้ว ได้สายพันธุ์เดี่ยวจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งจะเก็บไว้เพื่อทำการวิจัยต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ พุทธาธร. 2529. ปริมาณการแพร่กระจายของสาหร่ายที่สัมพันธ์กับคุณภาพน้ำบางประการ บริเวณลุ่มน้ำปิง-วัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กาญจนา เกิดมีมูล. 2537. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและการแพร่กระจายของสาหร่ายกับคุณภาพน้ำบางประการตามชั้นคุณภาพลุ่มน้ำเมย จังหวัดตาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กศยา สุวรรณวิหค. 2529. ปริมาณการแพร่กระจายของสาหร่ายและความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำบางประการของลำน้ำแม่กลางและแม่กงจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เฉลิมศรี พละพล. 2532. องค์ประกอบของชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชในลุ่มน้ำภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2541. การศึกษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียวในป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิรนาม. ม.ป.ป. สถานีวิจัยกาญจนบุรี. <http://www.aerdi.ku.ac.th/department/khanchanaburi/> 26 พฤษภาคม 2551.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2530. แพลงก์ตอน. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 289 น.
- วราภรณ์ พรหมพจน์. 2526. การศึกษาชนิดปริมาณของแพลงก์ตอนและคุณสมบัติของน้ำในบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิเชียร ยงมานิตชัย และ เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2548. การศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายขนาดเล็กในป่าดิบแล้ง บริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกกราช. น. A-01. ในการประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 2, 23-25 มีนาคม 2548. โรงแรมฮอติเดย์การ์เดน, เชียงใหม่
- วิสุทธิ ไบไม้. 2532. ความหลากหลายทางชีวภาพ, น. 1-13. ใน เอกสารการสัมมนาชีววิทยาครั้งที่ 7 เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย, 16-17 ตุลาคม 2532. โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ, จังหวัดเชียงใหม่.
- สมถวิล วัลลิสุต. 2531. การศึกษาการแพร่กระจายและการคัดเลือกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ตรึงไนโตรเจนได้เพื่อนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- สุดสายชล หอมทอง 2541. การผลิตแอสตาแซนทีนจากสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- สุพิมาลย์ นาคสุวรรณ. 2535. องค์ประกอบชนิดและปริมาณของแพลงก์ตอนพืชตามชั้นคุณภาพลุ่มน้ำบริเวณลุ่มน้ำแม่กลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2521. การศึกษาดัชนีความแตกต่างและความชุกชุมของไมโครแพลงก์ตอนในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา. เอกสารวิชาการ. กองสำรวจแหล่งประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 67 น.
- โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2522. ความชุกชุมของแพลงก์ตอนพืชในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา. เอกสารวิชาการ. กองสำรวจแหล่งประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 44 น.
- โสภณา บุญญาภิวัฒน์. 2525. การศึกษาทางนิเวศวิทยาของแพลงก์ตอนพืชในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา. กองสำรวจแหล่งประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 30 น.
- Becker, E.W. 1989. Micro-algae for human and animal consumption, pp. 222-256. *In* M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Bold, H.C. and M.J. Wynne. 1978. Introduction to the Algae. Prentice-Hall of India, New Delhi. 70 p.
- Borowitzka, M.A. 1989. Vitamins and fine chemicals from micro-algae, pp. 153-196. *In* M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Broady, P.A. 1984. Taxonomic and ecological investigations of algae on steam-warmed soil on Mt Erebus, Ross Island, Antarctica. *Phycologia* 23 (3): 257-271.
- Buffle, J., Delandoety, P., Zumstein, J. and Haerdi, W. 1982. Analysis and characterization of natural organic matters in freshwaters. I. Study of analytical techniques. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 44: 325-362.
- Chapman, V.J. and D.J. Chapman. 1973. The Algae. 2nd ed., Macmillan, New York. 497 p.
- Cleseri, L.S., Greenberg, A.E. and Eaton, A.D. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. American Public Health Association, Washington DC.
- Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agriculture Research, New Delhi. 686 p.
- Gupta, J.S. 1981. Textbook of Algae. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi. 328 p.
- Hoshaw, R. and J.R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. *In* Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, pp. 53-68. Edited by J.R.Stein. London: Cambridge University Press.

- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K. and Kim Y.H. 2001. Fractional and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources. *Wat. Res.*, 35: 4019-4028.
- Lewmanomont, K., L. Wongrat and C. Supanwanid. 1995. *Algae in Thailand*. DEPP Biodiversity Series. 334 p.
- Makovinska, J. 1994. Planktonic green algae of the River Dunabe from Bratislava (Slovakia) to Szob (Hungary). *Biologia* 49 (4): 539-545.
- Marker, A.F.H., Crowther, C.A. and Gunn, R.J.M. 1980. Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometer. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 14: 52-69.
- Metting, B. 1989. Micro-algae in agriculture, pp. 288-304. *In* M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Nojiri Y. 1987. Progress in water-quality analysis. *J. Japanese Soc. Ground Water*, 29: 107-111. (in Japanese)
- Otsuki, A., Goma, H., Aizaki, M. and Nojiri, Y. 1993. Seasonal and spatial variations of dissolved nitrogenous nutrient concentrations in hypertrophic shallow lake, special reference to dissolved organic nitrogen. *Verh. Internat. Verein Limnol.*, 25: 187-192.
- Pantastico, J.B. 1977. *Taxonomy of the Fresh-Water Algae of Laguna De Bay and Vicinity*. National Research Council of the Philippines. 251 p.
- Pauw, N.D. and G. Persoone. 1989. Micro-algae for aquaculture, pp. 197-221. *In* M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Payer, H.D. 1970-1971. *Algae Project*. Institute of Food Research and Product Development (IFRPD). Kasetsart University, Bangkok. 55 p.
- Prescott, G.W. 1978. *How to Know the Freshwater Algae*. Wm. C. Brown Co., Publishers, Duluque Iowa. 293 p.
- Ramanathan, K.R. 1964. *Ulotrichales*. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 188 p.
- Randhawa, M.S. 1959. *Zygnemaceae*. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 478 p.
- Round, F.E. 1973. *The Biology of the Algae*. 2nd ed., Edward Arnold, London. 278 p.

- Singh, RPR. and U.D. Bongak. 1990. Algal Flora of Paddy Fields form Sirsi, Karnataka State. Perspectives in Phycology. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi. 434 p.
- Sly, L.I. and V. Arunpairojana. 1987. Isolation of manganese-oxidizing *Pedomicrobium* cultures from water by micromanipulation. J. of Microbiol. Methods 6: 177-182.
- Smith, G.M. 1950. The Fresh-Water Algae of the United States. McGraw-Hill Book Company, London. 719 p.
- Tambo, N. and Kamei, T. 1989. Evaluation of extent of humic substance removal by coagulation. In, Aquatic Humic Subsatnces: Influence on Fate and Treatment of Pollutants, Suffet, I.H. and MacCarthy, P., Eds. P. 453-472. American Chemical Society, Washington DC.
- Acea, M.J., A. Prieto-Ferna´ndez, N. Diz-Cid. 2003. Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. Soil Biology & Biochemistry 35: 513-524.
- Bhatnagar, A., M.B. Makandar, M.K. Garg and M. Bhatnagar. 2008. Community structure and diversity of cyanobacteria and green algae in the soils of Thar Desert (India). Journal of Arid Environments 72: 73-83.
- Bu del, B. 2002. Diversity and ecology of biological crusts. Progress in Botany 63: 387-404.
- De Philippis, R. and M. Vincenzini. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. Fems Microbiology Reviews 22: 151-175.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28: 350-356.
- Fischer, D., U.G. Schlösser and P. Pohl. 1997. Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton toweling. J Appl Phycol 9: 205-213.
- Hu, C., Y. Liu, L. Song and D. Zhang. 2002. Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. J Appl Phycol 14: 281-292.
- Hu, C., Y. Liu, B.S. Paulsen, D. Petersen and D. Klaveness. 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. Carbohydrate Polymers 54: 33-42.

- Jia, S., H. Yu, Y. Lin and Y. Dai. 2007. Characterization of Extracellular Polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* Cells in Liquid Suspension Culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12: 271-275.
- Malam Issa, O., Y. Le Bissonnais, C. De´farge and J. Trichet. 2001. Role of a cyanobacterial cover on structural stability of sandy soils in the Sahelian part of western Niger. *Geoderma* 101:15-30.
- Malam Issa, O., C. Défarge, Y. Le Bissonnais, B. Marin, O. Duval, A. Bruand , L.P D’Acqui, S. Nordenberg and M. Annerman. 2007. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant Soil* 290: 209-219.
- Maqubela, M.P., P.N.S. Mnkeni, O. M. Issa, M.T. Pardo and L.P. D’Acqui., 2008. *Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-008-9734-x.
- Mazor, G., Kidron, G.J. Vonshak and A. Abeliovich. 1996. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *Fems Microbiology Ecology* 21: 121-130.
- Meisen, S., J. Wingender and U. Telgheder. 2008. Analysis of microbial extracellular polysaccharides in biofilms by HPLC. Part I: development of the analytical method using two complementary stationary phases. *Anal Bioanal Chem* 391: 993-1002.
- Moreno, J., M.A. Vargas, H. Olivares, J. Rivas, and M.G. Guerrero. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J Biotechnol* 60: 175-182.
- Nisha .R., A. Kaushik and C.P. Kaushik. 2007. Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil. *Geoderma* 138: 49-56.
- Obana, S., K. Miyamoto, S. Morita, M. Ohmori and K. Inubush. 2007. Effect of *Nostoc* sp. on soil characteristics, plant growth and nutrient uptake. *J Appl Phycol* 19: 641–646.
- Otero, A. and M. Vincenzini. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *J Biotechnol* 102: 143-152.
- Ozturk, S. and B. Aslim. 2008. Relationship between chromium (VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates. *Environ Sci Pollut Res* 15: 478-480.

- Painter, T. J. 1983. Algal polysaccharides, pp. 195-285. In: The polysaccharides (Aspinall, G.O., Ed), Vol.2 Academic Press New York.
- Pankratova, E.M., L.V. Trefilova, R.Yu. Zyablykh and I.A. Ustyuzhanin. 2008. Cyanobacterium *Nostoc paludosum* Kütz as a Basis for Creation of Agriculturally Useful Microbial Associations by the Example of Bacteria of the Genus *Rhizobium*. *Microbiology* 77: 228-234.
- Parikh, A. and D. Madamwar. 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresour Technol* 97: 1822-1827.
- Richert, L., S. Golubic, R. Le Guédès, J. Ratiskol, C. Payri and J. Guezenec. 2005. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. *Current Microbiology* 51: 379-384.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdmann, and R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- Sharma, M., A. Kaushik, Somvir, Kiran Bala and Anjana Kamra. 2008. Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gloeocapsa* from dilute aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 157: 315-318.
- Stal, L.J. 2000. Cyanobacterial mat and stromatolites, pp. 88-90. In B.A. Whitton, M. Potts (Eds.), *The Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Wiley, New York.
- Su, J., S. Jia, X. Chen and H. Yu. 2008. Morphology, cell growth, and polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* in liquid suspension culture at different agitation rates. *J Appl Phycol* 20: 213-217.
- Swarnalakshmi, K., D.W. Dhar and P.K. Singh. 2007. Evaluation of Blue-Green Algae inoculation on specific soil parameters. *Acta Agronomica Hungarica* 55(3): 307-313.
- Tamaru, Y., Y. Takani, T. Yoshida and T. Sakamoto. 2005. Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol* 71: 7327-7333.
- Trabelsi, L., H. Ben Ouada, H. Bacha and M. Ghoul. 2008. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-008-9383-8.
- Tripathi, R.D., S. Dwivedi, M.K. Shukla, S. Mishra, S. Srivastava, R. Singh,

- U.N. Rai. and D.K Gupta. 2008. Role of blue green algae biofertilizer in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Chemosphere* 70: 1919-1929.
- Whitton BA., 1987. Survival and dormancy of blue-green algae, pp. 109-167. In: Henis Y (ed) *Survival, dormancy of microorganisms*. Wiley, New York.
- Yu, H., S. Jia and Y. Dai. 2008. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-008-9341-5.
- Yu, H., S. Jia and Y. Dai. 2008. Accumulation of Exopolysaccharides in Liquid Suspension Culture of *Nostoc flagelliforme* Cells. *Appl Biochem Biotechnol* DOI 10.1007/s12010-008-8428-4.

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ก-ช (ช)7.52 ชื่อ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่พบในดินด่างบริเวณสถานีวิจัย
กาญจนบุรี

Phylogenetic Diversity of Bacteria in Alkaline Soil at Kanchanaburi
Research Station

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย) ความหลากหลาย
ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตรและศักยภาพการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร.....

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ นางสาว สาวิตร์ ตระกูลนำเลื่อมใส.....

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สังคมศาสตร์
 โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ ..1....ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552 ถึงปีงบประมาณ 2553.....

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล ภ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ.....350000.....บาท ประกอบด้วย

ปีงบประมาณ 2552.....ได้รับ 350,000.....บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1.9.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและประชากรของแบคทีเรียที่พบในดินด่าง สถานีวิจัย
กาญจนบุรีโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล

1.9.2 เพื่อรวบรวมข้อมูลพันธุกรรมและจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับแบคทีเรียที่พบในดินด่าง สถานีวิจัย
กาญจนบุรี

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
1.	1-6	1. สามารถสกัด DNA จากตัวอย่างดินได้โดยตรง และทำให้บริสุทธิ์ โดยเฉพาะการกำจัดสารที่เป็น inhibitor ต่อเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้ DNA ที่สกัดได้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการแยกและโคลนขยาย เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดการสร้าง 16S rRNA โดยเทคนิค PCR 2. การโคลนยีน 16S rRNA เพื่อสร้าง gene library และสุ่มเลือกจำนวน clone มาทั้งหมด 96 เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA โดยเทคนิค ARDRA
	7-12 เดือน	1. ทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียจาก clone ที่สุ่มเลือกโดยใช้ลายพิมพ์ DNA เป็นเกณฑ์ 2. วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากโคลนที่สุ่มเลือก 3. วิเคราะห์ข้อมูลและจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรียโดยอาศัยความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic classification)

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. สกัด DNA จากตัวอย่างดิน	1. DNA จากตัวอย่างดิน และทำให้บริสุทธิ์	1. ได้ DNA จากตัวอย่างดินที่บริสุทธิ์
2. ทำการเพิ่มขยายยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR และการโคลนยีน 16S rRNA	2. 16S rRNA gene library	2. ได้ 16S rRNA gene library ของแบคทีเรียในดินตัวอย่าง จำนวน 96 โคลน
3. ศึกษาลายพิมพ์ DNA ของ gene library	3. ลายพิมพ์ DNA ของ gene library	3. ลายพิมพ์ DNA ของ gene library
4. วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	4. ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จาก 96 โคลน	4. ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย
5. วิเคราะห์ข้อมูลของยีน 16S rRNA และจัดกลุ่มโดย reconstruct phylogenetic tree	5. การจัดจำแนกแบคทีเรียจากข้อมูลของยีน 16S rRNA ที่สุ่มเลือกจาก library	5. ข้อมูลของยีน 16S rRNA และข้อมูลการจัดกลุ่มของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียในดินตัวอย่าง

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน เกี่ยวกับวิธีการสกัด DNA โดยตรงจากตัวอย่างธรรมชาติ (ดิน) และการทำให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ซึ่งตัวอย่างดินจากธรรมชาติก็มีสารปนเปื้อนที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase

- ผลิตภัณฑ์.....
- สิ่งประดิษฐ์.....
- เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....
- ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....
- คู่มือ.....
- วิดีทัศน์.....
- การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี.....คน ปริญญาโท 1 คน ปริญญาเอกคน
- สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ..... - เรื่อง (ระบุ).....
 1. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท:..... ความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในดินต่างสถานที่วิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยาและศักยภาพในการนำไปใช้กำจัดสารประกอบประเภท aromatic hydrocarbon
 2. อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอนวิชา Intensive Microbiology (01419501)ในหัวข้อการ
- จัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีการทางพันธุศาสตร์ และวิทยานิพนธ์ (01419599).....
- ด้านการเกษตร.....
- ด้านอุตสาหกรรม.....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....
- ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....
- ด้านเศรษฐกิจ.....
- ด้านสังคม.....
- ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ

นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับกลุ่มแบคทีเรียที่พบในดินตัวอย่าง เพื่อวางแผนการทดลองในการแยกแบคทีเรียกลุ่มที่สนใจในการนำมาใช้ประโยชน์และเพื่อการค้นหาแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่

ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....

อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด **ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ** (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น

ภาคผนวกของรายงาน)

ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....

ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....

นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....

นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....

นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

นำเสนอทางนิทรรศการ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์).....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....

มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....

อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าจะก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....

ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).. เทคโนโลยีการผลิตกรดอะมิโน.....

ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....

ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริหารจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ

อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ยุทธศาสตร์การขจัดความยากจน
- ยุทธศาสตร์การพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ยุทธศาสตร์การพัฒนานาฏหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
- ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม
- ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ
- ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก
- อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข..... -.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม..... -.....

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(...นางสาว สาวิตร์ ตระกูลนำเลี่ยมใส...)

23 / กันยายน / 2557 วัน/เดือน/ปีที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ

โครงการวิจัยรหัส รหัส ก-ษ (ช)7.52

ชื่อโครงการภาษาไทย: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่พบในดินต่างบริเวณสถานีวิจัย
กาญจนบุรี

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ: Phylogenetic Diversity of Bacteria in Alkaline Soil at Kanchanaburi
Research Station

บทคัดย่อ

สกัดดีเอ็นเอจากดินต่าง 2 ตัวอย่างที่เก็บในบริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเพิ่ม
เพิ่มขยายยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียและโคลนเข้าสู่พาหะ
พลาสมิด โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน 96 โคลนที่สุ่มเลือกมีรูปแบบดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่
ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I แตกต่างกัน ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S
rRNA และการจัดกลุ่มโดยอาศัยความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นว่า
สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วย uncultured bacterium (65.6%) uncultured
Acidobacteria (6.3%) uncultured soil bacterium (6.3%) และ uncultured Gemmatimonadetes (4.2 %) และ
กลุ่มย่อยอีกหลายกลุ่ม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโคลนที่ได้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและชุมชน
ชีพของแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ยังไม่เคยมีการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม ชุมชีพของแบคทีเรียในดิน ยีน 16S rRNA

สาวิตร ตระกูลนำเลื่อมใส⁽¹⁾ จันทน์แรม รูปข้า⁽²⁾

⁽¹⁾ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ⁽²⁾ ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Genomic DNA of two alkaline soil samples collecting from Kanchanaburi research station were extracted and purified. The 16S rRNA genes were amplified with eubacterial primers by PCR and cloned into plasmid vector using *E. coli* DH5 α as host cells. Ninety six clones were random chosen, and all of them had different RFLP patterns. Phylogenetic analysis based on partial sequences established with Neighbour-Joining method revealed the presence of four major and several minor groups. Most of the clones belonged to the uncultured bacterium (65.6%); uncultured acidobacteria (6.3%); uncultured soil bacterium (6.3%) and uncultured Gemmatimonadetes (4.2 %). The results indicate that the clones are diverse in phylogeny. Most of the bacterial community has never been isolated.

Key words: Phylogenetic diversity; soil bacterial community; 16S rRNA gene

Savitr Trakulnaleamsai⁽¹⁾ Chanram Roopkham⁽²⁾

⁽¹⁾ Department of Microbiology Faculty of Science ⁽²⁾ Central Laboratory Kasetsart University Research and Development Institute

บทนำ

ดินจัดเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีโครงสร้างของดินแตกต่างกันรวมทั้งยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ที่หลากหลายชนิด จากสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พบในดินนั้นๆ รวมทั้งมีอิทธิพลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน เช่น แบคทีเรียมักพบมากในดินที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง ส่วนรามักพบมากในดินที่มีค่าพีเอชเป็นกรด เป็นต้น ความเป็นกรดเป็นด่างของดินไม่มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่จะมีผลทางอ้อม คือเป็นตัวควบคุมการละลายของธาตุอาหารพืช ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดไปใช้ได้ รวมทั้งควบคุมการละลายของสารอื่นที่อาจเป็นพิษต่อพืชด้วย กล่าวคือ ถ้าดินเป็นกรดมาก ธาตุอาหารบางชนิด เช่น เหล็ก แมงกานีส สังกะสี จะละลายออกมามาก ถ้าดินเป็นด่าง ธาตุโบรอนและโมลิบดีนัมจะละลายมาก อย่างไรก็ตามการที่ดินเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป จะมีผลกระทบต่อการปลูกพืชทั่วไป เพราะธาตุอาหารบางตัวจะละลายมากจนเป็นพิษต่อพืช และธาตุอาหารบางตัวอาจไม่ละลายจนพืชแสดงอาการขาดธาตุเหล่านั้น

ดินด่าง โดยทั่วไปหมายถึง ดินที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 7.3 ดินชนิดนี้มักพบในบริเวณที่แห้งแล้งและพบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) สะสม ซึ่งโซเดียมคาร์บอเนตเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งทำให้ค่าพีเอชของดินสูงขึ้น มีการแลกเปลี่ยนธาตุโซเดียมในดินสูง มีสภาพการชะล้างต่ำกว่าทำให้ธาตุที่เป็นด่างยังคงเหลืออยู่มากในหน้าตัดดินโดยเฉพาะในชั้นดินล่าง และมีความอิ่มตัวเบสมากกว่าร้อยละ 35 โดยทั่วไปดินที่มีสภาพเป็นด่างนั้นพืชเจริญเติบโตได้ไม่ดี นอกจากนี้สภาพความเป็นด่างที่

พบในดินยังเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์จากกระบวนการ ammonification และกระบวนการ sulfate reduction ค่าพีเอชของดินมีอิทธิพลต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารพืชหลายชนิดในดิน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ทั้งในด้านปริมาณและชนิดจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะเข้าใจถึงบทบาทของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศนั้นซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อแก้ปัญหาดินต่างในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน เพื่อเพิ่มการเพาะปลูกต่อไปหรือเพื่อการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบนิเวศนั้น นอกจากนี้ความหลากหลาย

ความหลากหลายและความซับซ้อนของโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในธรรมชาตินับเป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพที่มีคุณค่ายิ่ง ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่าจุลินทรีย์ที่ถูกแยกได้และนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเพียงส่วนน้อย เทคนิคการเพาะเลี้ยงได้ถูกนำมาใช้ในการประเมินจุลินทรีย์ในดิน พบว่ามีแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเทคนิคดังกล่าวเพียง 0.1-1% เท่านั้น ยังมีแบคทีเรียในดินอีกมากมายที่รอการศึกษาค้นคว้าซึ่งรวมถึงแบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีการเพาะเลี้ยงมาก่อนและแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultured bacteria) ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีระดับโมเลกุลทำให้การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากตัวอย่างธรรมชาติทำได้โดยตรงโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture-independent technique) ซึ่งทำให้อลดข้อจำกัดในเรื่องของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เช่นอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถครอบคลุมจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แล้ว การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยเทคนิคระดับโมเลกุลจะทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายที่สูงกว่า นอกจากนี้ในกรณีของจุลินทรีย์เทคนิคดังกล่าวยังสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ (closely related phylotypes) อย่างไรก็ตามเทคนิคระดับโมเลกุลยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการสกัด DNA จากตัวอย่างธรรมชาติและการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นได้มีการใช้วิธีการสกัด DNA รวมถึงการทำให้บริสุทธิ์หลายวิธีร่วมกัน

Ohkuma และ Kudo (1996) Hongo และ คณะ (2003a) ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลวกกินไม้ชนิด *Reticulitermes speratus* พบว่าโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในลำไส้ปลวกกินไม้ชนิดนี้ประกอบด้วย Proteobacteria, Bacteroides, spirochete และ low GC Gram positive bacteria โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม spirochete เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด และยังพบ symbiotic spirochete ที่อยู่ร่วมกับโปรโตซัวในลำไส้ปลวก นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในลำไส้ปลวกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนรวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และแบคทีเรียบางชนิดในลำไส้ปลวกชนิดนี้พบในปลวกชนิดอื่นด้วยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในลำไส้ปลวกมีวิวัฒนาการร่วมกันกับปลวกและมีสายวิวัฒนาการแบบ monophyletic cluster จากนั้นในปี 2006 Hongo และคณะ ใช้เทคนิค FISH hybridization ร่วมกับการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบแบคทีเรียชนิดใหม่ในปลวกกินไม้ชนิด *Reticulitermes speratus* และเสนอให้เป็น Phylum ใหม่ ชื่อว่า Phylum TG3 และแบคทีเรียชนิดใหม่ที่พบในลำไส้ปลวกกินไม้ชั้นสูง *Microcerotermes* sp. และ *Nasutitermes takasagoensis* และเสนอให้เป็น subphylum ใน phylum Fibrobacteres

Peter และคณะ (2002) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจาก Tufa ที่เก็บจากบริเวณที่เป็นค้างและมีอากาศเย็นพบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย alkaliphilic cyclobacterium

Taksawan และคณะ (2003) ได้ใช้เทคนิค T-RFLP ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ในลำไส้ปลวกส่วน proctodeal (P1) ซึ่งมีค่าพีเอช เป็นด่างและมี K^+ สูง จากปลวกชั้นสูงกินดิน 4 ชนิด พบว่าในลำไส้ปลวกส่วน P1 นั้นมีแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia และ Bacilli เป็นส่วนใหญ่ซึ่งประกอบด้วย phylotype ที่หลากหลายและส่วนใหญ่เป็น phylotype ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน แสดงให้เห็นว่าลำไส้ปลวกส่วนที่เป็น alkaline segment นั้นเป็นแหล่งของ alkaliphilic bacteria ที่มีความหลากหลาย จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia และ Bacilli โดยเทคนิค enrichment สามารถแยกแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ออกมาได้จากปลวกกินดิน *Sinocapritermes mushae* ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม alkaliphilic bacilli เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับ *Paenibacillus* sp. SM-XY60 และจากการศึกษาทางสรีรวิทยาพบว่า *Paenibacillus* sp. ที่แยกได้สามารถเจริญได้ตั้งแต่ pH 6.5-10.5 โดยมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 9 และมีกิจกรรมของเอนไซม์ xylanase นอกจากนี้บางสายพันธุ์พบว่า sensitive ต่อ NaCl

Chang-Chai และคณะ (2005) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินตะกอนที่มีการสะสมของคาร์บอนเนตในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ Taroko ประเทศไต้หวัน โดยใช้เทคนิคการโคลนยีน 16S rRNA ร่วมกับ FISH hybridization พบว่าจากจำนวน 381 โคลนที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ทั้งหมด 11 phylotype ใน 37 genus เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม proteobacteria ประมาณ 25-30% และ cyanobacteria มีประมาณ 16-28% โดยที่พบ acidobacteria, agricultural soil bacterium, Verrucomicrobia และ Firmicutes ทั่วไปในทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

สาวิตรและคณะ (2547) ใช้เทคนิค T-RFLP ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่แยกได้จากแบคทีเรียในลำไส้ปลวกชั้นสูงกินไม้ *Microcerotermes* spp. ซึ่งเป็นปลวกกินไม้ที่พบมากในประเทศไทย พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในปลวกกินไม้ชนิดนี้เหมือนกับโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบในปลวกกินไม้ชนิดต่ำ *Reticulitermes speratus* โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม free-living spirochete เป็นประชากรหลัก และ phylotype ที่พบส่วนใหญ่เป็น phylotype ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่ใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียที่พบในดินต่างสถานีวิจัยกาญจนบุรี โดยการโคลนยีน 16S rRNA และสร้าง gene library จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน และจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโดยวิธี Phylogenetic classification ข้อมูลของ microbiota ที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่พบในดินต่างนำไปสู่ความเข้าใจถึงบทบาทของแบคทีเรียและการอนุรักษ์แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบนิเวศนั้น สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อค้นหาแบคทีเรียชนิดใหม่หรือเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพืชที่ตกค้างในดิน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ต่างๆ แบคทีเรียที่สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศ เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและประชากรของแบคทีเรียที่พบในดินต่าง สถานีวิจัยกาญจนบุรีโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล
2. เพื่อรวบรวมข้อมูลพันธุกรรมและจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับแบคทีเรียที่พบในดินต่าง สถานีวิจัยกาญจนบุรี

วิธีวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างดินต่างจากบริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี 2 บริเวณที่ต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างดินต่างปริมาณ 200 กรัม /บริเวณ เก็บตัวอย่างดินในช่วงฤดูแล้ง ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิของดิน
2. สกัด DNA จากตัวอย่างดินต่างโดยใช้สารสกัด DNA ที่มี 0.1% Triton-X 100 เป็นส่วนประกอบใน lysis buffer ทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดจาก agarose gel ด้วย QIAquick (gel extraction kit)
3. เพิ่มขยายยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer 27F (5'-AgAgTTTgATC(A/C)TggCTCAg-3') หรือ 63F (5'-cag gcc taa cac atg caa gtc-3') และ 1389R (5'-ACgggCggTgTgTACAAG-3') หรือ 1492R (5'-ggg tac ctt gtt acg act t -3') (Hongoh *et. al.*, 2003b) ใช้สภาวะของ PCR ดังนี้ 95°C 2 นาที ตามด้วยรอบของ PCR 30 รอบ (ประกอบด้วย 95°C 20วินาที 50°C 60 วินาที และ 72°C 2 นาที) และ 72°C 10 นาที
4. นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3 มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy vector (Promega) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำในคู่มือ
5. นำพลาสมิดผสมที่ได้เข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5 α โดยการใช้นิเทศ heat shock transformation จากนั้น plate บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 ug/ml, X-gal 2% และ IPTG 0.1M บ่มที่ 37°C overnight
6. คัดเลือก colony ที่มีสีขาวที่เจริญบน plate ทำการ pick colony ที่มีสีขาวด้วยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อเพื่อทำเป็น replica plate
7. ตรวจสอบ insert DNA ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ colony บน replica plate โดยใช้ primer M13F (5'-gTAAACgAcggCCAg-3') และ M13R (5'-CAggAAACAgCTATgAC-3') ด้วยสภาวะดังนี้ 95°C 2 นาที ตามด้วยรอบของ PCR 30 รอบ (ประกอบด้วย 95°C 30 วินาที 50°C 30 วินาที และ 72°C 2 นาที) และ 72°C 10 นาที
8. สุ่มโคลนที่มี insert มาจำนวน 96 โคลนในแต่ละ library เพื่อศึกษาลายพิมพ์ DNA โดยการเพิ่มขยายยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer และสภาวะเดียวกันกับข้อ 3 จากนั้นตัดยีน 16S rRNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *Hha*I, *Hae* III หรือ *Msp*I ตรวจสอบชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ agarose gel electrophoresis ที่มี agarose 2.5 % ถ่ายภาพ DNA fingerprinting ที่ได้เพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรีย
9. ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม

10. วิเคราะห์ข้อมูลของยีน 16S rRNA โดยการ search หา homology ด้วยโปรแกรม BLAST และจัดให้อยู่ใน phylogroup เดียวกันถ้าหากมี homology เท่ากับ 97 % ขึ้นไป

วิเคราะห์บริเวณส่วน variable ที่มีความยาวประมาณ 550 เบส ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในช่วง ทางด้าน 5' และลำดับเบสที่มีความยาวในช่วงดังกล่าวเป็นข้อมูลเพียงพอสามารถใช้ในการ classify กลุ่มของแบคทีเรียได้

สำหรับการวิเคราะห์โคลนที่ได้มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใด ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล DDBJ (DNA data Bank of Japan), Genbank ในอินเทอร์เน็ต (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/html>)

11. ทำการ alignment ข้อมูลที่ได้และจัดกลุ่ม phylogroup ที่ได้โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วย Neighbour-joining method โดยวิธี distance matrix ของ Kimura's two-parameter model with gamma distribution โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2001)

การทำ alignment โดยโปรแกรม CLUSTAL X version 1.8 สร้าง Phylogenetic trees และด้วยโปรแกรม MEGA 4 โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้าง tree ด้วย bootstrap test จำนวน 1000 รอบ ซึ่งโดยทั่วไปค่าที่มากกว่า 95% ถือว่ามีความน่าเชื่อถืออย่างมีนัยสำคัญ

ผลและวิจารณ์

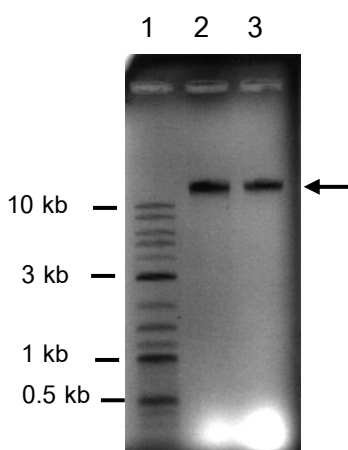
1. สมบัติทางเคมีของดินในสถานีวิจัยกาญจนบุรี

ทำการเก็บตัวอย่างดินต่าง บริเวณสถานีวิจัยกาญจนบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินหมายเลข 5 และ 7 โดยตัวอย่างดินหมายเลข 5 เก็บจากบริเวณที่ไม่เคยผ่านการปรับปรุงดินเพื่อการเพาะปลูก (อยู่ใกล้พื้นที่ปลูกองุ่น) และตัวอย่างดินหมายเลข 7 เป็นดินเชิงเขา (อยู่ใกล้พื้นที่ปลูกข้าวโพดหวาน) เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า pH พบว่าดินทั้งสองตัวอย่างมีค่าพีเอช ประมาณ 7.7-7.8 ซึ่งจัดเป็นดินด่างปานกลาง และมีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.08-0.10 dS/m ซึ่งจัดว่ามีระดับความเค็มเล็กน้อย (วิเคราะห์โดย กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) จากคุณสมบัติของค่าการนำกระแสไฟฟ้าและค่าพีเอช ดินในสถานีวิจัยกาญจนบุรีน่าจะจัดเป็นดินประเภทดินโซดิก ซึ่งเป็นดินที่ไม่เค็ม แต่มีค่าโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ (ESP) มากเกินไป ดินโซดิกมักมีค่าพีเอช สูงประมาณ 7.8-8.5 มีค่าการนำไฟฟ้าของดินต่ำกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร (อรุณี <http://www.fooktiengroup.co.th/forum/viewtopic.php?f=11&t=430>)

2. Genomic DNA จากดินต่าง

DNA ที่สกัดได้จากดินตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบปริมาณ DNA ที่สกัดได้ พบว่า DNA ที่สกัดได้นั้นมีปริมาณความเข้มข้น 150-200 ng/ul โดยคำนวณจากการเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ที่ปรากฏบน gel กับความเข้มของแถบ DNA มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของ DNA (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ ที่จะนำไปเป็น DNA ต้นแบบสำหรับเทคนิค PCR จึง

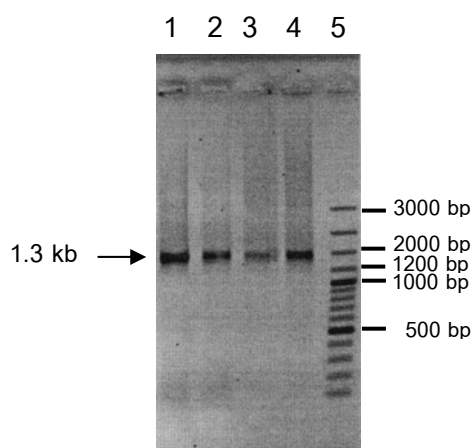
นำ DNA ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน gel electrophoresis จากนั้นตัดแถบ genomic DNA และนำไปสกัดออกจาก agarose gel พบว่า DNA ที่สกัดจาก gel มีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ ยีน 16S rRNA โดยเทคนิค PCR ได้



ภาพที่ 1 Genomic DNA ที่สกัดจากตัวอย่างดินต่างหมายเลข 5 และ 7 บน agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1 % เลน 1: 1 kb DNA ladder marker เลน 2: DNA จากตัวอย่างดิน หมายเลข 5 เลน 3: DNA จากตัวอย่างดินหมายเลข 7 ลูกศรแสดงแถบ DNA ที่สกัดได้จากดิน

3. โคลนยีน 16S rRNA จากแบคทีเรีย

ทำการโคลนยีน 16S rRNA ขนาด 1.3 kb ที่ได้จากตัวอย่างดินหมายเลข 5 และ หมายเลข 7 (ภาพที่ 2) เข้าสู่ *E. coli* DH5 α โดยใช้ พลาสมิด pGEM-T Easy และประสิทธิภาพของการ transformation ประมาณ 2×10^6 transformants/1 μ g DNA ทำการคัดเลือก transformant สีขาวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และ X-gal จากทั้ง 2 libraries จำนวน 230 โคลน ทำการตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ขนาด 1.3 kb แทรกอยู่ พบว่ามี 182 โคลนที่มียีน 16S rRNA ขนาดที่ถูกต้อง

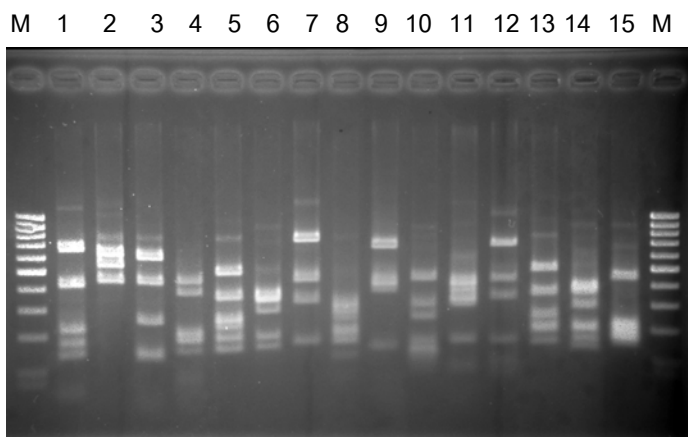


ภาพที่ 2 PCR ของยีน 16S rRNA บางส่วน ขนาด 1.3 kb บน agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5% เลน 1-2: 16S rDNA จากตัวอย่างดินต่างหมายเลข 5 เลน 3-4: 16S rDNA จากตัวอย่างดินต่างหมายเลข 7 เลน 5: 100 bp Plus DNA ladders marker

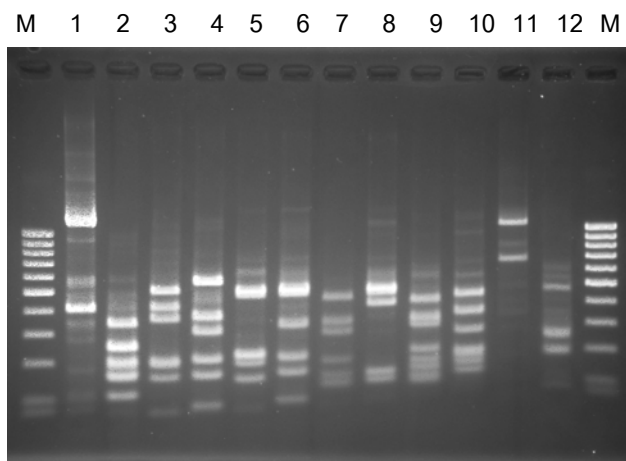
4. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในดินต่าง

สุ่มเลือกโคลน จำนวน 96 โคลน มาทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของยีน 16S rRNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I ผลจากการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) พบว่าโคลนที่สุ่มเลือกมานั้นมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินตัวอย่างมีความหลากหลาย ชี้น DNA ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hha* I มีขนาดและจำนวนที่เพียงพอ (polymorphism) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้ชัดเจน ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างของรูปแบบ RFLP จากเอนไซม์ *Hha* I ของ 16S rRNA library จากดินตัวอย่าง

(A)



(B)



ภาพที่ 3 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* บน agarose

gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% เลน M: 100 bp Plus DNA ladders marker

เลน 1-15: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA จากตัวอย่างดินต่าง 5 (A)

เลน 1-12: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 16S rDNA จากตัวอย่างดินต่าง 7 (B)

5. โครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียในดินต่าง

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วน โดยใช้ไพรเมอร์ 520F จากโคลนที่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน จำนวนทั้งหมด 96 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ความยาวประมาณ 450-570 bp กับข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ปรากฏบนฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ผลแสดงในตารางที่ 1 ผลจากการวิเคราะห์ชนิดของ phylotype จาก 96 โคลนพบว่าสามารถจัดกลุ่มของ phylotype กลุ่มใหญ่ได้ 4 กลุ่มและกลุ่มอื่นๆ อีก 11 กลุ่ม

Phylotype กลุ่มที่มีขนาดใหญ่มีดังนี้

5.1 Uncultured bacterium ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วยโคลนจำนวน 63 โคลนคิดเป็น 65.6%

5.2 Uncultured soil bacterium ประกอบด้วยโคลนจำนวน 6 โคลนคิดเป็น 6.3%

5.3 Uncultured Acidobacteria bacterium ประกอบด้วยโคลนจำนวน 6 โคลนคิดเป็น 6.3%

5.4 Uncultured Gemmatimonadetes bacterium ประกอบด้วยโคลนจำนวน 4 โคลนคิดเป็น 4.2 %

ส่วนกลุ่ม phylotype ที่มีขนาดเล็ก 11 กลุ่ม ประกอบด้วยโคลนจำนวน 1-3 โคลน รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2 และแผนภาพแสดงการจัดกลุ่มของ phylotype ทั้งหมดจากยีน 16S rRNA library ที่ได้จากดินตัวอย่าง 5 และ 7 แสดงดังภาพที่ 4 และภาพที่ 5

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรีย (bacterial community structure) ที่พบในดินต่างจากสถานีวิจัยกาญจนบุรีนั้นประกอบด้วยแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มหลักคือกลุ่มที่เป็น uncultured bacterium รองลงมาคือแบคทีเรียในกลุ่ม soil bacterium และ Acidobacteria bacterium สมาชิกในกลุ่มเหล่านี้ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มี phylotype ที่หลากหลายและยังไม่เคยมีการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน (soil-borne bacteria) และในการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA (culture-independent) phylotype ที่รายงานส่วนใหญ่จะเป็น phylotype ในกลุ่มหลักดังกล่าว โดยเฉพาะกลุ่ม Acidobacteria bacterium มักจะไม่ค่อยพบในการศึกษาที่ใช้การเพาะเลี้ยง (Anna *et. al*, 2009) นอกจากนี้ phylotype ที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่มีความเหมือนกับ phylotype ที่มีรายงานในฐานข้อมูลต่ำ (92-96%) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงโอกาสที่ phylotype เหล่านี้อาจเป็น phylotype ใหม่ในระดับ species หรือ taxonomic group ที่สูงขึ้นได้

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วนของแบคทีเรียในดินต่างและการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA กับข้อมูลในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST

No**	clone	Partial 16S rRNA sequence	BLAST search	
			Accession number	Closet sequences
1	1S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCT AGCGGCAGGCTTAATACATGCAAGTCGTGG GGCAGCAGGTCCCGCAGCAATGCGGGATGC TGGCGACCCGGCAAACGGGTGCGGAACACGT ACACAACCTTCCTTAAGTGGGGGATAGCC CAGGGAAACTTGGATTAATACCCCGTAACA TTGTGAGGCGGCATCGTCTTATAATTATAG TCTTCGGGCGCTTAATGATGGGTGTGCGGC TGATTAGGTAGTTGGCGGGTAACGGCCCA CCAAGCCTGCGATCAGTAACTGGTGTGAGA GCACGACCAGTCACACGGGCACTGAGACAC GGGCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAA GGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAA CCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAAGGTCC TCTGGATTGTAAACTTCTTTTATCTGGGAA GAAATCCAAGATTTCTATTTTGGTTGACGG	GQ128045	Uncultured bacterium clone BACu-B6E2 Sphingo (Flavitalea populi)
2	2S	GTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGC GGCAGGCCAACAACATGCAAGTCGAACGGG CCCCTTCGGGGGTGAGTGTGCAACGGGTGC GTAACACGTGAACAATCTACCTCCGAGTGG GGAATAGCTCGCCGAAAGGCGAATTAATAC CGCATGTGGTGGTTTCTCGCATGAGAGATT AACTAAAGTCAGGGACCGCAAGGCCTGACG CTAGGAGAGGAGTTTCGGCGCTATCAGCTA GTTGGCGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTAA GACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG CCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACA CCTACGGGTGGCAGCAGTTTCAATCATT ACAAATGGGCGAAAGCCTGATGGTGCACGC CGCGTGAGGGATGAAGGTCTTCGGATTGTA AACCTCTGTACCCGGGAAGAAACGCTTTG AGCTAATAGTTCAAAGCCTGACTTAACCCG GAGAGGAAGCAGTGGCTAAC	EU135549	Uncultured bacterium clone FFCH3103 (<i>Opitutus</i> sp.)
3	3S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGG GCGGGGAGCAATCCCGACCTGGCGAACGG GTGCGTAACACGTGAGCGATCTACCTGGT GTGGGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGGTA ATACCGCATGCGCTCGTCTGGGGCATCCC TGGACGAGCAAAGTCTTCGACGCACTGGG AGGGGCTCGGGCCTATCAGCTCGTTGGCG GGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGACGGGT AGCTGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATT GGGACTGAGAGACGGCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGAATCTTGCGCAATGG GCCAAAGCCTGACGACGCGACGCCGCGTGC GGGAGGACGGTCTTCGGATCGTAAACCGCT GTTGCCCGGGACGAATGCCTGTTTCGACAG GATTGACGGTACCGGTTGAGGAAGCACCGG	AY596151	Uncultured bacterium clone ISCB-56 (Gemmatimonadetes bacterium KBS708)

		CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC GGAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTG GGCGTAAAGGGCGCGTA		
4	4S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGCGGTGCCTAATGCATGCAAGTCGCAC GCAGGAGCTTCGGCTCCTGAGTGGCGCACG GCTGAGGAACACGTGGGAACCACCCCTCCA GTGGGGGATAACGGCGCGAAAGCGCCGCTA ATCCCGCATAACGTTCAACCCAAACGGGGTG AAGAAAAGCTTTTCAAGCGCTGGAGGCTGGG CCCGCGGCCATCAGGTCGTTGGTGGGGTA ATGGCCTACCAAGCCACTGACGGGTAGCTG GTCTGTGAGGACAACCAGCCAGACTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGCAAGGAATTTTCGGCAATGGGCGCA AGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGCAGGAC GACGGCCTTCGGGTGTAAACTGCTTTTGG GGGAAGAACAAGACGGTACCCCCGAATA AGCCACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC GGTTATACCAAAGGGGCTAG	EU134110	Uncultured bacterium clone FFCH13533 <i>(Roseiflexus castenholzii</i> green, nonsulfur bacteria)
5	5S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCT GGCGCGGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGGGTAGCAATACCCGAGTAGAGTG GCGAACGGGTGAGTAAAGTGTGGGTAATCT GCCTTGCTGAGTGGGATAACCCGGCGAAAG CTGGGCTAATACCGCATGACATTTGTTTTGA TGAATTCAGACGATCAAAGGATGGCCTCT ATTTATAAGCTATCGCAGTAAGATGAGCCC ACATCCTATCACGCTTGTGGTGGGGTAAAC GGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGC CTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGAATG AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGCAAG CCTGACGAAGCAACGCCGCGTGGAGGATGA AGGCCCTAGCGGTCTGTAACCTCCTGTCTAG CGGGACGAAACTCTGTTGTGTGAATAACAC AGCAGATTGACTGTACCCTGGGGGAAGCT CCGGCCAAT	EF492913	Uncultured bacterium clone JH- WH39 <i>(Desulfovibrio piger</i> strain ATCC 29098)
6	6S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGGTGCCTCAGACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGCCCCCTTCGGGGGGCAAGTAGAG TGCGGCACGGGTGAGTAAACACGTAGGTAAT CTACCTTTGGATGGGGAATAACAACCGGAA ACGGTTGCTAATACCGCATAATGCAGCGGC ACCTAATGGTGACAGTTGTTAAAGCGGGGG ATCGCAAGACCTCGCGTCTGAAGAGGAGCC TGCGGCAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAC GGCTTACCAAGGCGATGATCTGTAGCCGCGC CTGAGAGGGCGGTCCGCCACACTGACACTG ACATACGGGTGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTCGGGAATTTTGGGCAATGGGCGAAAG CCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGA AATCCTTCCGGATGTAAACTTCGCAAGAAC GGGAAGAATAAGCCGGTGTCAACACCACCG CGGATGACGGTACCCTTGT	EF417761	Uncultured Acidobacteria bacterium clone LF072
7	7S	AGTTTGATCATGGCTCAGAGCGAACGCTGG CGGCAGGCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGC CCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTA ACACGTGGGAACGTGCCCTTCAGTTTCGGAA CAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGGA TACGTCCGTAAGGAGAAAGATTTATCGCTG AAGGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTT GGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCTACGAT CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA CATTGGGACTGGGACACGGCCAAACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC GTGAGTGATGAAGCCCTAGGGTTGTAAAG CTCTTTTAGCGGGGAAGATAATGACCGTAC CCGCAGAAAAGCCCCGGCTAACTTCGTGC CAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAG CGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGC ACGTAGGCGGCTTCTTAAGT	DQ643687	Uncultured soil bacterium clone W4Ba21 <i>(Rhodoplanes sp. TUT3523</i> Proteobacteria)

8	8S	<p>AGTTTGATCATGGCTCAGAATCAACGCTGG CGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGC GAAAGCCCCGCAAGGGGCAAGTAGAGTGGC AAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGC CTTCGAGTGGGGGATAACGTCCCCGAAAGGG ACGTAATACCGCATGACATCCTGCCTTTG AAGAGGCGGAGATCAAAGCTGGGGATCGCA AGACCTAGCGCTTGAAGAGGGGCCCGCGTC CGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA CCAAGGCAACGATCGGTAGCCGGCCTGAGA GGGCGGACGGCCACACTGGGACTGAGACAC GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GGAATTGTTCCGAATGGGCGCAAGCCTGAC GACGCAACGCCCGCTGGAGGATGAAGATCT TCGGTTCGTAAACTCCTGTGCAATGGGACG AACGCATCGCGCTGAACAACGCGCGGTGG TGACGGTACTGTTAAAGGAAACCCCGGCTA ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA</p>	FJ175046	<p>Uncultured bacterium clone sbrh_82 (Acidobacteria bacterium KF4- 28/2)</p>
9	10S	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCT GGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGGGGGGCAACCCCTGAGTAGAGTG GCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTA CCCAGTAGCGGGGATAACCTCTCGAAAGA GAGGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTG AAAGAGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTAT TGGAGCGGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTG GCGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATC CGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCAC ACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAA TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGC CCTTTCGGCTGGGACGAAAAGGCCCGTGT AACACCAGGGTCCATGACGGTACCAGCAG AAGAAGCACCGGCTAACTAC</p>	FJ478902	<p>Uncultured bacterium clone p22l11ok (Acidobacteria bacterium KF4- 28/2)</p>
10	15S	<p>CGGGCGGTGTGTACAAGGCTCAGGAACACA TTCACCGCGGTGTTGCTGACCCGCGATTAC TAGCGATTCCAACCTCATGCAGGCGAGTTG CAGCCTGCAATCTGAACTGGGGCGTGTFTT TTGGGATTTGCTCCCTCTCGCGAGTTTGCG TCCCTTTGTTTACGCAATTGTAGCAGTGT GCAGCCCCGGGCATAAAGGCCATGAGGACT TGACGTCATCCCCACCTTCCCGGTTTAA CACCGGCAGTCTTCCAGAGTCCCCGACAT TACTCGCTGGCAACTGGAAACAAGGTTTC GCTCGTTATGGGACTTAACCCGACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC CTGTGGCAGGTTCCGGATTGGATAACCGTTC GGGTGGCGTTTCCGCTCCCTACTTCTCGCC CCTTTCGGACATGTCAAGCCCGGGATAAGG TTCTTCGCGTAGCCTCGAATTGAGCCACAT GCTCCACCGCTTGTGTGAGC</p>	FJ479137	<p>Uncultured bacterium clone p8m11ok (Planctomycetacia bacterium WSF3-27) unclassified Planctomycetia</p>
11	17S	<p>AGTTTGATCATGGCTCAGAGCGAACGCTGG CGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGG GCGTAGCAATACGTCAAGTGGCAGACGGGAG AGTAACACGTGGGAACGTGCCCTTTGGTTC GGAACAACCCAGGGAACTTGGGCTAATAC CGGATAAGCCCTCACGGGAAAGATTATC GCCAAAGGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCT AGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGA CGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA GCCTCACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG CCGCGTGGGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGT AAAGCCCTTTTCGGCGGGGAAGATAATGACG GTACCCGACAGAAGAAGCCCGGCTAACTTC GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAAGGGG CTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAA GCGCACGTAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGGG TGAAATCCTGGAGCTCAACT</p>	EU335194	<p>Uncultured bacterium clone BacC-s_070 (Alpha proteobacterium)</p>
12	18S	<p>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT GGCGCAGGCTTAAACACATGCAAAATCGAGC</p>	EU637926	<p><i>Sinorhizobium fredii</i> strain YcS2</p>

		GCCCCGAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAG TAACCGGTGGGAATCTACCCTTTCTACGG AATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCG TATGAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGG GAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAG TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC CACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTC CTACGGGAGGCAGCAGGGGGGAATATTGGA CAATGGGCGCAAGCCCGATCCAGCCATGCC GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAA AGCTCTTTACCCGGTGAAGATAATGACGGT AACCGGAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGT GCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCT AGCGTTGTTTCGGAATTACTG		
13	20S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGCGGCGTTCTGATCCGCGATTAC TAGCGATTCCAGCTTCATGCACCCGAGTTG CAGAGTGCAATCCGAACTGAGAACGGCTTT CCGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTCGCG ACTCTCTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGACATAAAGGCCATGAGGACT TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTGTGT CACCGGCGGTCTCTCAGAGTGCCCGGCTT GACCCGATGGCAACAGAAGACAAGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC CTCCACAGCGGCCCTCCGAAGAGGGGACTC ATCTCTGAGCCTTGCCACTGCAGTTCAAAC CCAGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAAT TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC CCCCGTC AATTCTTTGAGTTTCA	EU589269	Uncultured soil bacterium clone 1_F7 <i>(Pseudoalteromonas</i> sp. Gp-4- 15.2.1)
14	21S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGCGGCATGGCTGATCCGCGATTA CTAGCGATTCTGGCTTCATGTGGGCGAGTT TCAGCCACAATCCGAACTTAGACGAGGTT TCTGGGATTGCTTCACCTTGCGGCTTCGC AGCCCTCTGTCCCGCATTGTAGCACGTG TGTCGCCCTAGGCGTAAGGGCCATGATGAC TTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGCTTG ACGCCGCGAGTCCCCGAGAGTCCCTCAGCT TTACCTGTTAGTAACACGGGGCAAGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTGTAAATGTTCCGAAGAAGGGCCCT GTTTCCAGAAGCTTTTCATCTACATGTCAAA CCTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGCCTT GCGGCCGTA TCCCCAGGCGGGGCACTTAT CGCGTTAGCTGCGGCACCGAAGGGTTCGCT CCCCCGGCA	DQ129378	Uncultured bacterium clone AKIW607 <i>(Gemmatimonas aurantiaca</i> strain T-27)
15	22S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTAC TAGCGATTCCAACCTTCATGCAGGCGAGTTG CAGCCTACAATCCGAACTGAGACCGGCTTT CTCCGATTAGCTCCCTCTTGCGAGATCGCG ACGGTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGT GTGGCCCCAGACATAAAGGCCATGCTGACT TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGT CACCGGCGAGTCTCTCAGAGTGCCCGGCTT GACCCGATGGCAACAGAAGACAAGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC CTCTACAGATGCCCTTGCGGGAGCCTACTT TCGTAGGATGTCATCTGCAGTCCAGGCCTG GGTAAGGTTCTTCACGTTGCGTTCGAATTA ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC CGTCAATTCTTTGAGTTTCA	FJ479453	Uncultured bacterium clone p36g09ok <i>(Acidobacteria bacterium</i> WX90)
16	24S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACAT ATTACCGCGGCGTTGCTGATCCGCGATTA CTAGCAACTCCGCTTCATGGAGGCGAGTT TCAGCCTCCAATCCGAACCGGGACCGGCTT TTTGGGATTGCTCCCCCTCGCGGTTTGC	FJ479001	Uncultured bacterium clone p27107ok <i>(Bacterium</i> Ellin7507)

		AGCCCTTTGTACCGGCCAATGTAACACGTG TGTAGCCCTAGACATAAGGGGCATGATGAC TTGGCATCATCCCCACCTTCTCCGATTTG TCACCGGCAGTCCCCTATGAGTCCCCGTCT TTCACGCTGGCAACATAGGGCAGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCA CGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCACCAC CTGTGCACAGGCCCCGAAGGGCTGCCGTAT TTCTACGACATTCCTGTGCATGTCAAGCCT AGGTAAGGTTCTTCGCGTCGCGTCAATTA AACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCC CCGTCAATTCCTTTGAGTTT		
17	25S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGCGGCATTGTGTATCCGCGATTA CTAGCAACTCCACCTTCATGGAGGCGAGTT TCAGCCTCCAATCCGAACCGAGACGCGTTT TGTGGGATTTGCTCCACCTCGCGGTATTGC TTCCCTCTGTACGCGCCAATGTAGCACGTG TGTAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGAC TTGACGTCATCCCCACCTTCCACCGGTTTG TCACCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCAAT AAATGCTGGCAACATAGGACAGGGTTGCG CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACC TGTGATGGTGTCCCGAAGGAAGGGTGTGTT TCCACACCGGTCACCAACATGTCAAACCA GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATTA ACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCC CGTCAATTCCTTTGAGTTT	AB288585	Uncultured actinobacterium
18	26S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGTGGCGTAGCTGATCCACGATTA CTAGCGATTCCAGCTTCATGCCGTCGGGTT GCAGACGACAATCCGCACTGAGGTCCGCTT TCCGGGATTGGCTCCCTGTTGCCAGTTCCG AACCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTG TGTAGCCCTAGACGTAAGGACCATGATGAC TTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGTTTG GCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTCCCCGCA TGACCCGCTGGTAACTAAGGGCAAGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTGCTGGAGTCCCGAAGGAGGCCCTC GTTTCGGAGGGGTTTCCCAGCATGTCAAG CCTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAAG TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCGTCATTCCTTTGAG	EF492938	Uncultured bacterium clone JH- WHS49 (<i>Gemmatimonas</i> sp. AP64)
19	27S	AGTTTGATCATGGCTCAGCTTGTACACACC GCCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACC AACGTTGGCGGCGTGGATTAGGCATGCAAG TCGAACGAATCCCGGCCCGCAAGGGGCCG GGGGAAGTGGCGAAAGGGCAGTAAGGCGT GGGTAACCTCCCCGGGGACCGGGATAGCC GCCCTAACGGGCGGGTAATACCGGGCGATC TGACGGAGGGGCATCCTTCCGGCAGGAAAC GAATCTCGCCTCGGGAGGGGCTCACGTGGT ATTACCTGGTTGGCGGGTAACGGCCCACC AAGGGGAAGATGCCAGCGGTGTGAGAGC ACGACCCGCGCCACTGGCACTGCGACTG GCCAGACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAG GATCTTCGGCAATGGGCGAAGCCTGACCG AGCGACGCCGCGTGCAGATGAAGGCCTTC GGTTGTAAAGCGCTGTCGAGGGGGAGGAA	DQ136123	Uncultured bacterium clone CC14 (Planctomycetacia bacterium WSF3-27)
20	28S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GGGACCGGGGGCAACTCCGGTTCAAGTGGCG GACGGGTGCGTAACACGTGAGGAACATGAC CTTCGGCGGGGATAGCCGGCCCAACGGCC GGGTAATACCGCGTACGACCATTGGGGAC ATCCCCGAAGGTGAAAGCAGCAATGCGCC GATGGAGTGCCTCGCGGCTATCAGCTAGT TGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGA CGGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCCAGCC ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGC	GQ127762	Uncultured bacterium clone BACd-NG2 (<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> clone H9-0AF4E_11038)

		AATGGACGAAAGTCTGACGCAGCGACGCCG CGTGTGGGATGACGGTCTTCGGATTGTA CCACTGTCTGGGAGGGACGAATACGCCG GGCGGGTGACGGTATCTCAAAGGAAGCAC CGGCTAACTCCGTGCCAGCA		
21	29S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGCTTGTACACA CCGCCGTAGAGTTTGTATCACGGCTCAGCT TGTACACACCGCCGTAGAGTTTGTATCCTG GCTCAGCTTGTACACACCGCCGTAGAGTT TGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC ATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGACC TTCGGGTCTAGTGGCGCACGGGTGCGTAAC GCGTGGGAATCTGCCCTTCGGTTCGGAATA ACTCAGGAAAACCTGAGCTAATACCGGATG ATGTCTTCGGACCAAGATTTATCGCCGAA GGATGAGCCCGCTCGGATTAGCTAGTTGG TGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCC GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT GGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGCT GAGTGATGAAGGCCCTTAAGG	AY632445	Uncultured alpha proteobacterium clone E2G2
22	31S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGTGGCGTTCTGATCCACGATTAC TAGCGATTCCGCCCTCATGCACTCGAGTTG CAGAGTGCAATCTGAACTGAGACGGCTTTT TGGGATTAGCGCACCTCGCGGTTGGCTG CCCATTTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTT GACGTCATCCCCACCTTCTCGCGGCTTAT CACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACCT AATGATGGCAACTAGGGGCGAGGGTTGCGC TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT GTGTTCCCGCCAGCCGAACTGAAGGAGCCT GTCTCCAGGATCCATACGGGACATGTCAAA GGCTGGTAAGGTTCTGCGGTTGCTTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCGTCAATTCTTTGAG	EU029133	<i>Deinococcus</i> sp. 5A4
23	32S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGGGGCTTCGCCCTGAGTAGAGTG GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCT ACCTTCGAATGGGGGATAACGTCCCAGAAAG GGACGTAATACCGCATAACATCCTGCTCT TGAACGAGTGGAGATCAAAGCTGGGGATCG CAAGACCTGGCGTTTGAAGAGGGGCCCGCG TCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT CACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGA GAGGGCGGACGGCCACACTGGGACTGAGAC ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATTGTTGCAATGGGCGCAAGCCTG ACGACGCAACGCCGCGTGGAGGATGAAGGT CTTCGGATTGTAACTCCTGTTGCCCGGGA CGAATGCTCTCGACCTAACACGTCGGGAGG TGACGGTACCGGGTGAGGAA	EU680429	Uncultured bacterium clone S10- 132 (Acidobacteria bacterium KF4- 27/2)
24	33S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGCGGCGTGGCTGATCCGCGATTA CTAGCGATTCCGGCTTCATGTGAGCGAGTT GCAGCCACAATCCGAACTTAGACGAGGTT TCTGGGATTGCTCCACCTCGCGGCTTTGC TGCCCTCTGCTCCTCGCCATTGTAGCACGTG TGTGCCCCTAGGCGTAAGGGCCATGATGAC TTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGCTTG ACGCCGGCAGTCCCCGAGAGTCCCTAGCA TGACCTGTTAGTAACACGGGGCAAGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTGCTGGTGTTCGGAAGAAGGCCTCCT GTTTCCAGAAGGTTTACCAGCATGTCAAA CCTAGGTAAGGTTCTTCGGTTCGCTTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCGTCAATTCTTTGAG	FR675952	. Uncultured bacterium (Sulfitobacter sp. Gp-4-5.2.1-voll)

25	36S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTAC TAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG CAGACTGCGATCCGAACTGAGGCCGTTTT TTGGGATTAGCTCCTTCTCGCGAGATCGCA TCCCTTTGTGCCGGCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGATATAAAGGCCATGATGACT TGACGTCGTCCCCACCTTCTCCCGTTTAA CACGGGCGGTCTCCGTAGAGTGCCACAGCC TTACCTGGGGCAACTATGGATAGGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTTGCATCCTGCCTGGTTTTACCCAGGAG ACCCATCTCTGGGGCTGTGAGGAGCATTTC TAGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTC GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC GGGTCCCCGTC AATTCCTTT</p>	FJ479393	<p>Uncultured bacterium clone p27n07ok (Acidobacteriaceae bacterium K22)</p>
26	38S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTA CTAGCGACTCCGACTTACGGGGTCGAGTT GCAGACCCCGATCCGAACTGAGACCGGCTT TGAAGGATTTCGCTCCACCTCACGGCATCG CAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGT GTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGA CTTGACGTCATCCACCTTCTCCGAGTT GACCCCGGCAGTCTCTCACGAGTCCCGGC ATTACCCGCTGGCAACATGAGACAAGGGTT GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACC ACCTGCACACAGGCCACAAGGGAACCGACA TCTCTGCCGGCGTCTGTGCATGTCAAACC CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATT AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC CCCGTCAATTCTTTGAGTT</p>	FJ652846	<p><i>Mycobacterium</i> sp. GN-11124</p>
27	40S	<p>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGGCGTGCCTCAGACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGTCCCTTTCGGGGACAAGTAGAG TGGCGCACGGGTGAGTAACACGTAGGTAAT CTACCTTCGGGTGGGAATAACAACCGGAA ACGGTTGCTAATACCGCATAATGCAGCGGC ACCTAATGGTGACAGTTGTTAAAGCGGGG ATCGCAAGACCTCGCGCCTGAAGAGGAGCC TGCGGCGGATTAGCTAGTTGGCAGGGTAAC GGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCCGGC CTGAGAGGGCGGTCCGCCACACTGACTG ACATACGGGTGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTCGGGAATTTGGGCAATGGGCGAAAG CCTGACCCAGCAACCGCGGTGAAGGATGA AATCCTTCGGGATGTAACTTCGCAAGAAC GGGGAGAATAAGCCGATGTTAACACCACCG GCGATGACGGTACCCTTTGT</p>	GU375075	<p>Uncultured soil bacterium clone Bact.wet.ECATB10 (Acidobacteria bacterium Ac_11_E3)</p>
28	41S	<p>CCGCGGAATTCGATTAGAGTTTGATCATG GCTCAGAATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA CACATGCAAGTCGTGCGGAAGGTGGCTTC GGCCACCGGAGAGCGCGGAACGGGTGAGTA ACACGTGGGTGATCTGCCTGGGAGCGGGG ATAACCTGGGGAACTCGGGCTAATACCGC ATACGTTGTTTTGGTTGCGGCCAAGACAAG AAAGCTGGCCTCTGTTTACAAGCTAGCACT CCCAGAGGAGCCCGCGGCTGATTAGCTAGT TGGTGGGTTAAAGGCCACCAAGGCGACGA TCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCC AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC AATGGGCGCGAGCCTGATCCAGCAACCCG CGTGGAGGACGAAGGTCTTCGGATCGTAAA CTCTGTGTCAGGCGGGACGAAGGATCCCGGG CAAAATAGTCCGGGATCTTGACGGTACTGCC AGAGGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGC AGCCCGGTAATACGGAGGGG</p>	FJ175102	<p>Uncultured bacterium clone sbrh_146 (Acidobacteria bacterium WY67)</p>
29	42S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTCACCCCGCGTCTGATCCGGGATTAC TAGCAACTCCGGCTTCATGGAGTCGAGTTG CAGACTCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTT</p>	EF142000	<p>Uncultured actinobacterium clone KF022</p>

		<p>GCGGGATTGCTCACCTCGCGGGATTGCA GCCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCGTGT GCAGCCCTGGGCATAAGGGGCATGATGACT TGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGA CCCCAGCAGTCTCCTGCGAGTCCCCAACTA AATGCTGGCAACACAGGATAAGGGTTGCGC TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAG ACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCT GTATCCGGCCCCGAAGGACACCTTATCTCT AGAGCTTTTCCGGACATGTCAAACCCAGGT AAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAGCA ACACGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCGT CAATTCCTTTGAGTTTGTAGTCTTGCAGCCG TACTCCCCAGGCGGGCACTTAATGCGTTA</p>		
30	43S	<p>AGAGTTTGATCTTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGTGCCTCAGACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGCTCCCTTCGGGGAGCAAGTAGAG TGGCGCACGGGTGAGTAACACGTAGGTAAT CTACCTTTGGATGGGAATAACAACCGGAA ACGGTTGCTAATACCGCATAATGCAGCGGC ACCTAATGGTGACAGTTGTTAAAGCGGGG ATCGCAAGACCTCGCGTCTGAAGAGGAGCC TGCGGCAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC GGCTTACCAAGGCGATGATCTGTAGCCGGC CTGAGAGGGCGGTTCGGCCACACTGACTG ACATACGGGTGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTCGGGAATTTTGGGCAATGGGCGAAAG CCTGACCCAGCAACGCTGCGTGAAGGATGA AATCCCTCGGGATGTAACTTCGCAAGAAC GGGAGAATAAGTCGGTGTAAATACCACCG ACGATGACGGTACTGTTGTAAAGCTCCGGC TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA</p>	HM131976	<p>Uncultured soil bacterium clone D1B28 (Acidobacteria bacterium Ac_11_E3)</p>
31	44S	<p>AGAGTTTGATCTTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGTGCCTCAGACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGCTCCCTTCGGGGAGCAAGTAGAG TGGCGCACGGGTGAGTAACACGTAGGTAAT CTACCTTGGATGGGAATAACAACCGGAA ACGGTTGCTAATACCGCATAATGCAGCGGC ACCTAATGGTGACAGTTGTTAAAGCGGGG ATCGTAAGACCTCGCGTCTGAAGAGGAGCC TGCGGCAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC GGCTTACCAAGGCGATGATCTGTAGCCGGC CTGAGAGGGCGGTTCGGCCACACTGACTG ACATACGGGTGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTCGGGAATTTTGGGCAATGGGCGAAAG CCTGACCCAGCAACGCGCGTGAAGGATGA AATCCCTCGGGATGTAACTTCGCAAGAAC GGGAGAATAAGTGAGAGTTAATATCTCTC GCGATGACGGTACCCTTTGTAAAGCTCCGGC TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA</p>	EU132114	<p>Uncultured bacterium clone FFCH5511 (Acidobacteria bacterium Ac_11_E3)</p>
32	45S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTCACCGCAGCGTGTGATCTGCGATTAC TAGCGATTCCGCCTTCATGCACCCGAGTTG CAGAGTGCAATCCGAAGTGAAGCGGTTTTT CGGGATTTGCTCCAGGTTCGCCCCCTCGCGT CCCTCTGTACCGCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCATCCCGTAAGGGCCATGAGGACTT GACGTCATCCACACCTTCCCTCGCGGCTTAT CACCGGCAGTCTCCCCAGAGTGCCCAACTG AATGATGGCAACTGAGGACGTGGGTTGCGC TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAG ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT GTGTGCGCGCCCCGAAGGGGACCCCGGAT CTCTCCAGGTAACACGCCATGTCAAGGGAT GGTAAAGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAA ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC CGTCAATTCCTTTGAGTTTAAATCTTGCGA CCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCG TTGGC</p>	AB302931	<i>Methylobacterium variabile</i>
33	46S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTCACCGCAGCGTGTGATCTGCGATTAC CTAGCGACTCCGACTTACGGGGTTCGAGTT GCAGACCCGATCCGAAGTGAAGCCGCTT TGAAAGGATTGCTCCACCTCACGGCATCG</p>	AF513815	<i>Mycobacterium goodii</i> strain X7B

		CAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGT GTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGA CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTT GACCCCGGCAGTCTCTCAGAGTCCCGCC ATAACGCGCTGGCAACATGAGACAAGGGTT GCGTCTGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACC ACCTGCACACAGGCCACAAGGAACCCATA TCTCTACGGGCGTCTGTGCATGTCAAACC CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATT AATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCC CCCTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGGTACTTAATG		
34	48S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGCCCCGCAAGGGGTAAGTAGAGTG GCAAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCT GCCTTCGAGTGGGGATAACGTCCCGAAAG GGACGCTAATACCGCATGACATCCTGCTCT TGGACGAGCGGAGATCAAAGCCGGGGATCG CAAGACCTGGCGCTTGAAGAGGGGCCCGCG CCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCT CACCAAGGCAACGATCAGTATCCGGCCTGA GAGGGCGGACGGACACACTGGGACTGAGAC ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATTGTTCCGAATGGGCGCAAGCCTG ACGACGCAACGCCGCTGGAGGACGAAGAT CTTCGGGTCGTAAACTCCTGTGAGCGGGA CGAACACCCACCAGGTGAACAATCTGGAGG GCTGACGGTACGCCCAAGGAAGCCCCGGC TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA	EU122873	Uncultured Acidobacteria bacterium clone REF-103
35	49S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCTCAGGAACAC ATTACCGCGGTGTGTGCTGACCCGCGATTA CTAGCGATTCCGGCTTCGCGCAGGCGGGTT GCAGCCTGCGGTCCGAACGGGGCGCGCTT TTTGGGGTTGGCTCCCGCTCGCGGTTTCGC GTCCCTCTGTCCGCGCCATTGTAGCACGTG TGCAGCCCCGGGCATCAAGCCATGAGGAC TTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGTTTG ACACCGGCAGTCCCCCAGAGTCCCGTAAG TGGCAACTGAGGGCAGGGGTTTCGCTCGTT ATGGGACTTAACCCGACATCTCACGACACG AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCC AGGTTCCGGACTGGTTACCGTTGGCCGGCC GTTTCCGGCGGCTACTTCCTGGCGCTTTCG CACATGTCAAGCCCCGGGATAAGGTTCTTCG CGTAGCCTCGAATTAAGCCACATGCTCCAC CGCTTGTGTGAGCCCCGTCAATTCTTTG AGTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCCCA	AB473908	Uncultured endolithic bacterium
36	50S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCT GGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAAC GGCAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCGAGT GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGT GCCAGTCTGTGGGGATAACTACGCGAAAG CGTAGCTAATAACCGCATAACGAACCTTGTT GAAAGCGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGA TTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTT GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGAT CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACA ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATTCCGC GTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAC TGCTTTTGTACGGAACGAAAAGGCCTGAGT TAATACCTCGGGCTCATGACGGTACCCTAA GAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTA ATCGGAATTA	FM178814	Uncultured bacterium (<i>Variovorax</i> sp. S24561)
37	52S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAGCGAACGCT GGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAAC GCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAG TAACCGGTGGGAATATGCCCTTTGGTACGG AACAACTGAGGGAACTTACGCTAATACCG TATGTGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGC	AY921824	Uncultured alpha proteobacterium clone AKYG696

		CATTGGAGTAGCCCCGCTTGGATTAGCTAG TTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACG ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTGCG CAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCC GCGTGAATGATGAAGTCTTAGGATTGTAA AATTCTTTACCCGGGAAGATAATGACGGT ACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGT GCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCT AGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGG GCGCGTAGGCGGACAGTTTAGTCAGAGGTG AAAGCCAGGGCTCAACCTTGAATTGCCT TTGATACTGGCTGTCTTGAGTTCGGGAGAG GTGAGTGGAATGCCAGTGT		
38	54S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC GATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCG AACGGGTGAGTAACAGTGGGCAATCTGCC CTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGG GTCTAATACCGGATACCACTACCGCAGGCA TCTGTGGTGGTTGAAAGCTCCGGCGTGAA GGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGG TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGG GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGAATATCGACAAT GGCGAAAGCCTGATGCAGCAGCGCCGCGT GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCT CTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGG TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGC AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG	FJ883740	<i>Streptomyces canus</i> strain cfcc3059
39	55S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACGT ATTCACCGCGCGTGTGATCCCGGATTAC TAGCGATTCCAACCTCATGCACCTCGAGTTG CAGAGTGCAATCCGAACTGAGAACGGCTTT TTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTCGCG ACTCTCTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGACATAAAGGCCATGAGGACT TGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTAT CACCGCAGTCTCCACAGATCCTCGCTT TACCCGTTAGTAACTGTGAACAAGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCA CGACACGAGCTGATGACAGCCATGCAGCAC CTCTACACGGACCTCCGAAGAGGGGGACTC ATCTCTGAGCCTTTCCCGTGCAGTTCAAAC CCAGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAAT TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC CCCCGTCAATTCCCTTTGAGT	AY921718	Uncultured Acidobacteria bacterium clone AKYH1525
40	56S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCACGG GGGGCCAGCAATGGTCAACCGGCGGACGGG TGCGTAACACGTGAGCGACCTGCCGAGGTG CGGGGATAGCCGGCCAAACGGCCGGGTAA TACCGCATAACGCTCTCTTCGGGGCATTCG GGGAGAGGAAACCTCTGGGGCACTTCGAGG GGCTCGCGCCTATCAGCTCGTTGGCGGTG TAACGGACCACCAAGGCGACGACGGGTAGC TGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTGGG ACTGAGAGACGGCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGAATCTTGCGCAATGCGCG AAAGGCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTGGG AGGACGCCCTTCGGGGTGTAAACCACTGTC GCCCCGGACGAATGTCTTCTTCTGAGGGA TTGACGGTACCGGGCGAGGAAGCGCCGGCT AACTCCGTGCCAGCAGCCG	FM252923	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium
41	93S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGTGCTCAGACATGCAAGTCGAAC GCGAAAGCCCCTTCGGGGCAAGTAGAGTG GCGCACGGGTGAGTAACACGTAGGTAATCT ACCTTTGGATGGGGAATAACAACCGGAAAC GGTTGCTAATACCGCATAATGCAGCGGCAC CTAATGGTGACAGTTGTTAAAGCGGGGAT	EU160371	Uncultured bacterium clone 2G4- 74 (<i>Acidobacteria</i> bacterium <i>Ac_11_E3</i>)

		CGCAAGACCTCGCGTCTGAAGAGGAGCCTG CGGCAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGG CTTACCAAGGCGATGATCTGTAGCCGGCCT GAGAGGGCGGTCCGCCACACTAACACTGAC ATACGGGTACAGACTCCTACGGGAGGAGCA GTCCGGAAATTTGGGCAATGGGCGAAAGCC TGACCCAGCAACGCCCGTGAAGGATGAAA TCCCTCGGGATGCAAACCTTCGCAAGAACGG GAAGAATAAGTAAGGGTTAATATCTCTTAC GATGACGGTACTGTTTGTAAAGCTCCGGCTA ACTCCGTGGCAGCAGCCGGTAATAC		
42	94S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATGAACGTT GGCGCGTGGATTAGGCATGCAAGTCGAGC GAGAACCCCGCAAGGGGGACAGCGGCAAA CGGGTAGTAATGTTCGGAACGTGCCTG AGGTCCGGGATAGCGCGGGAAACTGCCGG TAATACCCGATGATCTGGAAACAGCAAAGG TGTGATCCGCCCTTGGAGCGGCCGACATG GTATTAGCTAGTTGGCGGGTAACGGCCCA CCAAGGCTGTGATGCCTAGGGGATGTGAGA GCATGATCCCCACCATGGGACTGAGACAC TGCCAGACACCTACGGGTGGCTGCAGTCG AGAATCTTCGTCAATGGGCGAAAGCCTGAA CGAGCGACGCCCGTGCGGGATGAAGCCT TTGGTTGTAAACCGCTGTTCGAGGGGGATG AAGGCTGAAGGGTTATCTCTTCACTTTGAC AGAGCCCTGGAGGAAGCACGGGCTAAGTTC	FJ478560	Uncultured bacterium clone p26m12ok <i>(Planctomyces sp)</i>
43	97S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGACGCT GGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GGGCACCTTCGGGTGTCAGTGGCAGACGGG TGAGTAACGCGTGGGAACGTACCCCTTCGGT TCGGAATAACCCGGGAAACTCGGGCTAAT ACCGGATACGTCCGCAAGGAGAAAGATTTA TCGCCGAAGGATCGCCCGCTCCGATTAG CTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC GACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA TGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCCTAGGGTT GTAAAGCTCTTTCAGCGGGGAAGATAATGA CGGTACCCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACT TCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGG GGCTAGCGTTGTTCCGATTTACTGGGCGTA AAGCCGCGTAGGCGGCCACTAAGTCAGA CGTGAATCC	HM277682	Uncultured bacterium clone ncd543d11c1 <i>(Rhizobiales bacterium YIM 77505)</i>
44	124S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAATCAACGCT GGCGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GCGGTTACCCCGCAAGGGGTAACGTAGTGG CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTA CCTTCGAGTGGGGGATAACGTCCCGAAAGG GACGCTAATACCGCATAACATCCCGCCTTT GAACAGGTGGAGATCAAAGCTGGGGATCGC AAGACCTGGCGCTCAAAGAGGGGCCCGCT CCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACCGCTC ACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAG AGGGCGACGGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG GGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGA TCCAGCCATGCCCGTGCGGGAAGAAGGCC TTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGCCGGAAA GAAAAGGGCGAGGCTAATACCCTCGTCTCT TGACGGTACCGGCGGAATAA	FM175718	Uncultured Acidobacteriaceae bacterium
45	126S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCT GGCGCGTGTCTTAACACATGCAAGTCAGGG GGCCCGCAAGGGTCAACGGCGAACGGGTGC GTAACACGTGAACAACCTGCCCGAGCGAGG GGGATAGTCGGCCTAACGGCCGGTAATAC CGCATATGCTCACAGCGTCATAAGGCGCAG TGAGGAAACCTTCGGGGCGCTCGGAGGGGT TCGCGACCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAA CGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCTGG TCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTTGGGACT GCGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA	FJ479207	Uncultured bacterium clone p22k09ok <i>(Gemmatimonas aurantiaca strain T-27)</i>

		GCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGTCGAAA GACTGACGCAGCGACGCCGCGGGGAGGATG ACGCCCTTCGGGGGTGTAAACTCCTGTGCT CGGGAC		
46	127S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATCAACGCT GGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGTGC GCCAAAGGGGCTTCGGCCCCGAGTAGAGCG GCAAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCT GCCTTCGAGTGGGGGATAACGTCCCCGAAAG GGGCGCTAATACCGCATGACATCCCCGCTT TGAAGACGTGGAGATCAAAGCCGGGGTCCG AAGACTGGCGCTGGAAGAGGGGCCCGCGC CCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCT ACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAG AGGGCGGACGGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG GGGAATTGTTGCAATGGGCGCAAGCCTGA CGACGCAACGCCGCTGGAGGATGAAGATC TTCGGGTGCTAAACTCCTGTGACCCGGGAC GAATGCCTCGCGGGTGAATAATCCGCGAGG GTGACGGTACCGGTGGAGGA	EF392988	Uncultured bacterium clone ORS25C_d04 (Acidobacteria bacterium UCL- 085)
47	129S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGAATCAACGCT GGCGGCGTGCCTCAGACATGCAAGTCGAAC GATTAAGACTCCCTTCGGGGAGTGTATAAA GTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTAAGTAA TCTACCTTCGAGTGGGGAATAACATCGGGA AACCGATGCTAATACCGCATAACGCAGCGG CACCGCAAGGTGACAGTTGTTAAAGGAGCA ATTGCTTGAAGAGGAGCTTGCGGCAGATT AGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAG GCTACGATCTGTATCCGGTCTAAGAGGACG GTCCGACACACTGACACTGAATAACGGGT AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAAT TTTGGGCAATGGGGGAAACCCTGACCCAGC AACGCCGCGTGAAGGATGAAGTCTTTCGGG ATGTAAACTTCGAAAGAATGGGAAG	FJ444656	Uncultured bacterium clone 2h- 28 (Acidobacteria bacterium Ac_28_D10)
48	131S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTCAGCGCAGCCTGCTGATCTGCGCTTAC TAGCGATTCTACTTCATGTAGGCGAGTTG CAGCCTACAATCCGAACTGAGATCGGCTTT GTGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCA ACCCCTGTACCAGCATTGTAGCATGTGT GTAGCCCTGGGCATAAGGGGCATACGGACT TGACGTCATCCCCCTTCTCCAGCTCTT CGCCGGCAGTTCCCTAAGAGTGCCCGCCG AACCGATGGCAACATAGGGTGAGGGTTGCG CTCGTTGCGGGACTTAACCAACACCTCAC GGCAGAGCTGACGACAGCCATGCACCACC TGTGTAGGTTCCCTGACTTAACAGGTCGTCC CCCTTTCGGGTTTCTACTTCTACATGTCA AACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG AATTGAACCACATGTCCACCCTTGTGCG GGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCC TTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTT AATGCGTTA	FJ479422	Uncultured bacterium clone p7c14ok (Bacterium WX65)
49	132S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCT AGCGGCAGGCTTAATACATGCAAGTCGAGG GGCAGCAGGCCGGTAGCAATACCGCTGCTG GCGACCGGCAAACGGGTGCGGAACACGTAC GCAACTTACCCTGAACTGGGGGATAGCCCG GGGAAACCCGGATTAATACCCCGTAGTATA ATAAGGAGGCATCTTCTGTTATTAAGCA GCAATGTGGTTTAGGATGGGCGTGCGGCTG ATTAGGTAGTTGGCGGGTAACGGCCACC AAGCCTGCGATCAGTAACTGGTGTGAGAGC ACGACCAGTCACACGGGCACTGAGACACGG GCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGG AATATGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACC AGCCATGCCGCGTGAAGGATGAAGTCTC TGGATTGTAAACTTCTTTTATCTGGGACGA AACCCCGAAATCTTTCGGGACTGACGGTA CCAGGGGAATCAGCACCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAA GCGTTATCCGGATTCCTGG	EU280677	Uncultured bacterium clone J10_A07 (Flavisolibacter sp. SR2-4-2)

50	149S	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCACGACGAACGCT GGCGCGTGTCTTAACACATGCAAGTCACGG GGGCCCGCAAGGGCAACCGGCGAACGGGTG CGTAACACGTGAGCAATCTGCCGTGTTCTG GGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGTAATA CCGCATACGCTCATTGGGAGGAGTCTCCTG ATGAGGAAACCTCCGGGGGAACACGAGGAG CTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGCGGGTA ATGGCCACCAAGGCTCTGACGGGTAGCTG GTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTGGGAC TGAGAGACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATCTTGCGAATGGCCGAA AGGCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTGGGAG GAAGCCCTTCGGGGTGTAAACCACTGTTGC CCGGACGAATGCCCTTTCGAGGGGAGTG ACGGTACCGGGTGTAGGAAGCACCGGCTAAC TCCCTGCCAGCAGCCGCGGT</p>	DQ829402	<p>Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone DOK_NOFERT_clone466</p>
51	152S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTCACCGCGGCGTAGCTGATCCGCGATTA CTAGCGATTCCGGCTTCATGCCGGCAGTTC GCAGCCGGCAATCCGAAGTGGAGCCGCTT TTAGGATTGGCTCCAGCTTGCCTCTTGC AACCCCTTGTCCGGCCATTGTAGCACGTG TGTAGCCCTGGACGTAGGGCCATGATGAC TTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGTTTG GCACCGGCAGTCCCCCAGAGTCTCACCA TAACGTGGTAGCAACTGGGAGCGGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTCCTGGAGTCCCGAAGGAGGGCCATG GTTTCTCATGGCTTTCCTCAAGATGTCAAG CCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAA TTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCCGTCATTCCTTGTAGTTTCAGCCTT GCGGCGTACTCCCC</p>	EF612383	<p>Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone OS-C17</p>
52	154S	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGCGTGTCTTAACACATGCAAGCCACGG GGGCCCGCAAGGGCAACCGGCGAACGGGTG CGTAACACGTGAGCAACCTGCCTTCGTGTG GGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGTAATA CCGCATACGTTCTCTTTGAGGAGTCTCAGG GAGAGGAAACCTCCGGGGCACGAAGAGGGG CTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGCGGGTA ACGGCCACCAAGGCGACGAGGGTAGCTG GTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTGGGAC TGAGAGACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATCTTGCGAATGGCCGGA AGGCTGACGCAGCGACGCCGCGTGTGGGAG GACGCCCTTCGGGGTGTAAACCACTGTTGC CCGGACGAATCTCTCTTTAGAGGAGACT GACGTTACCGGGTGTAGGAAGCACCGGCTAA CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG GGTGCGAGCGTTGTCCGAATCACTGGG</p>	EF392910	<p>Uncultured bacterium clone ORS10C_c03 (Gemmatimonadetes bacterium Ellin7146)</p>
53	155S	<p>AGAGTTTGATCATGGCTCAGAGCGAACGTT AGCGCGGGCCCTAACACATGCAAGTCGCAC GAGAATGAGGGGGCAACTCCTCTAGTAAAG TGGCGGACGGGTGCGTAACACGTGGGTAAT CTACCTACCGGCGGGGACAACCTTCCGAA AGGAGGGTAATACCGCATACGTCCGGCAG GACCCCGGTCCTTGTCCGGAAAGATGGCCT CTTCTTGAAGCTGTCACCGGTAGATGAAC TCGCGGCCATCAGCTAGTTGGTGAGGTAA CGGCTACCAAGGCTAAGACGGGTAGCTGG TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT GCGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGAAA GCCTGACCCAGCCACGCCGCGTGTAGTATG AAGCCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGC AGGGACGAAGCCGCAAGGTGACGGTACTTG CAGAAGAAGCCCCGGCAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGT</p>	FJ479050	<p>Uncultured bacterium clone p7a04ok (Bacterium Ellin6502)</p>
54	156S	<p>ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTAC TAGCGATTCCGCCTTCATGCTCTCGAGTTG</p>	EU160424	<p>Uncultured bacterium clone 2G4- 103</p>

		CAGAGAACAATCCGAACTGAGACGGCTTTT GGAGATTAGCTCACCTCGCGGGTTGCAG CCCCTGTACCCGCATTGTAGCACGTGTG TAGCCAGCGCGTAAGGGCCATGAGGACTT GACGTCATCCCCACCTTCTCCGGCTTATC ACCGGCGGTTTCCATAGAGTGCCCACTAA ATGGTAGCAACTAAGGACGAGGGTTGCGCT CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG TCACCGGTCCAGCCGAACTGAAGGAAACCA TCTCTGGAATCCGCGACCGGGATGTCAAAC GCTGGTAAGGTTCTGCGGTTGCTTGAAT TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCAGGC CCCCGTCATTTCTTTGAGTTTTAACCTTG CGCCGTACTCCCAGCGGATAACTTAAT GCGTTAGCTG		(Sphingomonadaceae bacterium CBFR-1)
55	165S	AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGG CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGC GGGGAGCAATCCCCGACCGGCGAACGGGTG CGTAACACGTGAGCGACCTGCCTGGAATG GGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGGTAATA CCGCATACGCTCTTTGGGGGCAATCCCTG GAGAGGAACTTTTCGAGGTTTTTCAGAGGGG CTCGCGCCTATCAGCTGGTTGGCGGGGTA ATGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCTG GTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA AGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAT GAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGT GCGGGAAGATAATGACTGTACCGCAAGAAT AAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCG GAATCACTGGGCGTAAGCGCACGTATGCG	EF018399	Uncultured bacterium clone Amb_16S_1012 (Alpha proteobacterium KC-IT- W1)
56	172S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGT ATTACCGCGGCGTAGCTGATCCGCGATTA CTAGCGATTCCGGCTTCATGCCGCGAGTT GCAGCCGGCAATCCGAACTGAGGACCGCTT TTAGGGATTGGCTCCAGCTTGCCTCTTGC AACCTTTGTCCGGCCATTGTAGCACGTG TGTAGCCCTGGACGCAAGGCCATGATGAC TTGACGTGCTCCCCACTTCTCCGTTTG GCACCGGCAGTCCCCCAGAGTCTCACCA TAACGTGGTAGCAACTGGGAGCGGGGTTG CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTCCAAGAGTCCCGAAGGAGGGTCTTC GTTTCTGAAGACTTTCCCTTGGATGTCAAG CCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCGTCATTCCTTTGAG	EU365228	Uncultured soil bacterium clone BJ-55 (Gemmatimonadetes bacterium KBS708)
57	174S	AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGG CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGC ACCCAGCAATGGGTGACCGGCGAACGGGTG CGTAACACGTGAGCGATCTGCCCTGGTGTG GGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGGTAATA CCGCATACGCTCGTCGGGAGGCATCTCCTG GCGAACAAAGCCTTCGGGCGCATTGGGAGG GGCTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGTG TCATGGACCACCAAGGCGACGACGGGTAGC TGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTGGG ACTGAGAGACGGCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGGG AAACCCTGACGCAGCGACGCCGCTGCGGG AGGACGGCCTTCGGGTGTAAACCGCTGTT GCCCCGAGACGAATGAGTCTTTTCGAGACCGT TGACGGTATCGGGTGAGGAAGCACCGGCTA ACTCC	DQ093893	Uncultured bacterium clone ga22 (Gemmatimonadetes bacterium KBS708)
58	176S	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCT GGCGGCGTGCTTAACACATGTAAGTCGAAC GGGGCTCGGGGGGCAACTCTCGAGTTCAGT GGCAGACGGGTGCGTAACACGTGAGAAACC TGTCATCGGTGGGGGATAGCCGGCCCAAC GGCCGGTTAATACCGGTACGATCATTCGG	EU335271	Uncultured bacterium clone BacA_022 (Gemmatimonadetes bacterium)

		GGGCATCCTTGGATGATGAAAGCAACGCAA GTTGCGCCGGCGGAGGTCTCGCGCCTAT CAGCTAGTTGGCGGGTAACGGCCCACCAA GGCGACGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGAT GGCCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TCTTGCGCAATGGCCGCAAGGCTGACGCAG CGACGCCGCGTGTGGGATGACGGCCTTCGG GTTGTAAACCACCTGTCGGGAGGAACGAATA CTCGGCTTGCCGAGGGTGACGGTACCTCCA AAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA GCCCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTG TCCGGAATCACTGGGCGT		KBS708)
59	177S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT GGCGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAAC GAGACCTTCGGGTCTAGTGGCGCACGGGTG CGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTCGGTTC GGAAATAACTCAGGAACTTGAGCTAATAC CGGATAATGACTTCGGACCAAGATTATC GCCGAAGGATGAGCCCGCTCGGATTAGCT AGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGCGCA CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATG CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGT AAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACA GTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCC GTGCCAGCAGCCGCGTAAT	EU440439	Uncultured bacterium isolate LH2-39 (Rhizosphere soil bacterium isolate RSI-21)
60	178S	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTACCGTGGCGTGTGATCCACGATTAC TAGCGATTCCAACCTCATGGGCTCGAGTTG CAGAGCCCAATCCGAACTGAGACGGCTTTT TGAGATTTGCGAAGGGTCGCCCCCTTAGCAT CCCATTGTACCGCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTT GACGTCATCCCCACCTTCTCGCGGCTTAT CACCGCAGTCTCCTTAGAGTGCCTAACTA AATGGTAGCAACTAAGGACGGGGTTGCGC TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT GTCTCCGGTCCAGCCGAACTGAAGGACTCC GTCTCTGGAGTCCGCGACCGGGATGTCAAG GGCTGGTAAGGTTCTGCGGTTGCGTCGAA TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTT GCGACCGTACTCCCAGGCGGAATGCTTAA AGCGTTAGCTGCGCCACTAG	HM151913	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DG
61	179S	ACAGGCGGTGTGTACAAGCTGAGCCATGAT CAAACCTACGGGCGGTGTGTACAAGAAGC TGAGCCATGATCAAACCTACGGGCGGTGT GTACAAGCTGAGCCATGATCAAACCTACG GGCGGTGTGTACAAGCTGAGCCAGGATCAA ACTCTACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG AACGTATTACCGCAGCGTGCTGATCTGCG ATTACTAGCGATTCCGCCTTCATGGAGTCG AGTTGCAGACTCCAATCTGAACTGAGACCG GTTTTATGCGATTGGCTCCCTCTCGCGAGT TGGCAGCGCTTTGTACCGGCCATTGTAGCA CGTGTGTAGCCCTGGTCATAAAGGCCATGA GGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGA TTTGTACCGGCGATATCCCTAGAGTCCCC GACATAACTCGCTGGCAACTAGGGACAGGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA CCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGC ACCACCTGTGCACAGGCCCGAAGGGCTGC	AJ438185	Uncultured bacterium (<i>Cystobacter fuscus</i> strain Cbf8)
62	41S.1	CGGCTCAACTGAGGAACTGCCTTTGAAACT GTCCGGCTTGAGGCCGGGAGGGGGTAGCGG AATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG CATCCTGGACCGCATGACGCTGATGAGC GAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATA CCCCGGTAGTCTGGCCCTAAACGATGAAT GCTTGGTGTGACGGGTATCGATCCCTGTCTG	EU132428	Uncultured bacterium clone FFCH572 (Acidobacteria bacterium

		TGCCGAAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCC TGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT GGAGCATGTGGTTCAATTTCGACGCAACGCG AAGAACCTTACCTGGGCTAGACAACGGCGG ACCGTCCTGGAAGCAGGATTTTCCTTTCGG GGACTGCCGGTTCAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTA AGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGTCCTT AGTTGCCACCATTGAGTTGGGCACCTTAGG		LWQ117)
63	45S.1	CTTAACCCGGAACGGTCAGCCGATACTGCA GGGCTAGAGTGCAGAAGGGGCAACTGGAAT TCTCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT CGAGAGGAACACCTGCGGCGAAGGCGGGTT GCTGGGCTGACACTGACGCTGAGGCGCGAA AGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCC CGGTAGTCTAGCCTTAAACGATGAATGCT TGGTGCTGGGGTTTATAGTCCCAGGGTG CCGTCGCTAACGCTTAAAGCATTCCGCCTG GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAAATTCGACGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGGCTAGAATGCCTCTGAC CGGCTAGAGATACGCCTTCTGGGTAAAA CCAGGCAGAGTGCAAGGTGCTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCAA TAGTTGCCAGCG	FJ479502	Uncultured bacterium clone p26e24ok (Acidobacteria bacterium Ac_11_E3)
64	46S.1	GCTTAACCTTGGGCGTGCGGGCGATAACGGG CAGACTGGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAA TTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATA TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGT CTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGA AAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTAC TAGGTGTGGGTTTCTTCTTGGGATCCGT GCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCT GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCG GAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA AGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGG ACGCCCGTAGAGATATGGGTTCCCTTGTGG CCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTT GCCAG	AF513815	<i>Mycobacterium goodii</i> strain X7B
65	47S.1	GAGGCTCAACCTCGGAACCTGCCTTCGATAC TGCGGGTCTCGAGTCCGGGAGAGGTGAGTG GAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAG ATATTAGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCG GCTCACTGGCCCGTACTGACGCTGAGGCG CGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACTATGGG TGCTAGCCGTCGGTCGGCATGCCGTCGGT GGCGCAGCCAACGCATTAAGCACCCCGCCT GGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAA AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGAATGTGGTTCAATTCGACGCAACGCGA AGAACCTTACCAGGGCTTGCATGCACGGG AATGTCGTAGAAATACGGCAGCCCTTCGGG GCTCGTGCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGAGGATGTTGGGTTAAGT	EU133333	Uncultured bacterium clone FFCH10918 (Methylobacteria solikamskensis strain SK12)

		CCCACAACGAGCGCAACCCCTATCCTATGT TGCCAGCGAG		
66	48S.1	CAGGCTCAACTTGGGAACTGCATCCGATAC TGATTGGCTTGAATCCGGGAGAGGGATGCG GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCCTAG ATATCTGGAGGAACACCGGTGGCGTAGGCG GCATCTGGACCGGCATTGACGCTGATGAG CGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGAT ACCCCGGTAGTCCTGGCCCTAAACGATGAA TGCTTGGTGTGACGGGTATCGATCCCTGTC GTGCCGAAGCTAACGCATTAAGCATTCCGC CTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG TGGAGCATGTGGTTCAATTCGACGCAACGC GAAGAACCCTTACCCAGGCTCGAACGGCACC TGACATCCGGCGAAAGCCGGCTCCCGCAAG GGCAGGTGTCGAGGTGCTGCATGGCTGTCG TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCGCTG TTGCCATCAGGTTATGCTGGGCACTCTGCG G	GQ214122	Uncultured bacterium clone P939 (Beta proteobacterium WD112)
67	49S.1	CAACCGGGGAAGGGCCGCGGGACCGCACG CCTGGAGTCGGGTAGGGGCGCGGAACTG TGGTGGAGCGGTGAAATGCGTTGAGATCC ACAGGAACTCCGGTGGCGAAGGCGGCGCG TGGACCCGCACTGACGCTGAGGCGGAAAG CCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCG GTAGTCCTGGCCCTAAACGCTGGGGACTGG GTAGCAGGCCGGCATGGCTTGCCTGCCGGA GCCAAGGTGTTAAGTCCCCCGCTGGGGAG TATGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCTCACACAAGCGGTGGAGCAT GTGGCTTAATTCGAGGCTACGCGAAGAACC TTATCCCGGGCTTGACATGTGCGAAAGCGC CAGGAAGTAGCCCGCGAAACGGCCGGCCA ACGTAACAGTCCGGAACCTGGCACAGGT GCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTG AGATGTCGGGTTAAGTCCCA	AB473908	Uncultured endolithic bacterium
68	50S.1	GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACT GCACGGCTGGAGTGCGGCAGAGGGGGATGG AATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGA TATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGCAA TCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCAC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA ACTGGTTGTTGGTCTTCGCTGGATCAGTA ACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAGCTCAA GGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGG ATGATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAA AAACCTTACCTACCTTGACATGCCTGGAA TCCTGCAGAGATGTGGGAGTCCCGAAAGG GAGCCAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTC GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCATTA GTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGGGACT	DQ327691	Uncultured bacterium clone BF98 (Beta proteobacterium WD112)
69	52S.1	CTCAACCTTGGGAATTGCCTTTGATACTGGC TGTCTTGAGTTCCGGGAGAGGTGAGTGAAT GCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAT TCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGACTT ACTGGACGATTGTTGACGCTGAGGTGCGAA AGCTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATGACT AGCTGTCGGGGCGCTTGGCGTTTCGGTGGC GCAGCTAACGCGTTAAGTCATCCGCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGA AATTGACGGGGCCGTCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGA ACCTTACCAGCGTTTGACATGCCAGGACGG TTTCCAGAGATGGATTCTCCCTTACGGG GCCTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT	EF612398	Uncultured alpha proteobacterium clone OS-C02

		CCCCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTTAGT TGCTACCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGAA ACTGCCGGTGATAAGCCGGA		
70	54S.1	AACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAG CTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCC TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT GGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTGCTAGG TGTAGGCGGTATTCCACGCCGTCTGTGCCG CAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCTGGGG AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGC ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA CCTTACCAAGGCTTGACATGCAGAGAAATC CGGCAGAGATGTCGGGTCCGCAAGGGCTCT GCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCCTCGTCTT	FJ595571	Uncultured bacterium clone NV60_9e9 (<i>Streptomyces griseoruber</i> strain CSSP068)
71	56S.1	AACCCCGGGTCCGGCCGTCGGGACTGCCGGG CTCGGAGCACGGTAGGGCAGGCCGAATTC CGGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCC GGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCGCTGC TGGGCCGGAGAGTGTTTAACCACTCGTG CTGACGCTGAGGCGGACAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAACGATGGGCACTAGGTGCCCGGGG GAGCGACCCCCGGGTGCCGGCGTAACGC ATTAAGTCCCCCGCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG GCTTGACATGCTGAGGAAACCCCTGGGAAA CCAGGGCCTCCTTCGGGACCTCAGCACAG GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCCGCCCCAGTTGCCAGCG	EU134827	Uncultured bacterium clone FFCH5852 (Bacterium Ellin5220)
72	68S.1	GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAGACT GGCCGGCTAGAGTTCGGGAGAGGATGGTGG AATTCACAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA TATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCCG CCATCTGGACCGAGACTGACGCTGAGGCGC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGT GCTAGTTGTCGGGCGCATGCCGTTCCGGTG ACGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG GGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACCTCAAA GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCA GAACCTTACCAGCCCTTGACATGCCCTTG CGGGCCGGAGAGATCCGGTCCATCGGTTTCG GCCGGGGGGACACAGGTGCTGCATGGCTG TCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCATCGAGCGCAACCCCTCACCTT CAGTTGCCATCGGGTGAAGCCGGGCACTCT GGAGGAACTG	EU133349	Uncultured bacterium clone FFCH11237 (Alpha proteobacterium)
73	69S.1	CTTAACGGGTCGAGGCCACGGCAGACTGCT CGACTGGAGGTCGTGAGAGGTCGGTGAAT TGCCGGTGTAGTGGTATATGCGTAGAGAT CGGCAGGAACACCCAAAGGGGAAGCCAGCGG ACTGGCACGATGCTGACACTGAGGTGCGAC AGCGTGGGGAGCGAACTGGATTAGATACCC AGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGCACT CGTCCTGTGGCGGTTCAATGCCGTTGCGGG GCCAAGCCAACGCGGAAGTGTCCCGCTGG GAACTACGAGCGCAAGCTTAAAACCTCAAAG GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGA GCGTGTGGTTAACTCGACGCAACGCGCAG AACCTTACCAGACTTGACATGCGACTGCA AGCCGCTCAAAGGCGGTGCGCTTCGAGGGT GTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG CTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTACGGCCAGTTAC	EU134073	Uncultured bacterium clone FFCH6055 (<i>Kouleothrix aurantiaca</i>)

		TCGTGTCTGGCCGACTGCCCTTCGGGGAG GAAGCGGGGATGACGTCAAGTCCGCATGG CCCTTACGTCTGGGGCGACACACACGCTAC		
74	94S.1	AACCGGGGAATTGCGCTTGAAGTGAAGGG CTCAGTACAGCTAGAGGTGCACGGAACCTC CAGTGGAGCGGTGAAATGTGTTGATATTGG AAGGAACACCGGAGGCGAAAGCGGTGCACT GGGGCTGGTCTGACGCTGAGGCACGAAAGC CAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGG TAGTCTGGCCGTAACGATGAGTGTGGA CGGGAGGAGGTTCCGCTTCTCCGGTCCGAG CGAAAGCGGGAAGCACTCCGCCTGGGGAGT ATGGTCCGAAGGCTGAAACTCAATGGAATT GACGGGGGCTCACACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTAATTTCGAAGCAACGCGCAGAACCCT TACCAGCCCTTGACATCCCGGTCCGGGATT ACAGAGATGTTTTCTTTCAGTTCGGCTGGA CCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTG CTACCATTTAGTTGGGCACTCTAAGAAAC TGCCGGTGAT	GU194192	Uncultured bacterium clone SL12/40 (<i>Planctomyces</i> sp.) Marine bacteria
75	100S.1	ACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGT ATTACCGCAGCATGCTGATCTGCGATTAC TAGCGATTCCAGCTTCATGGAGTCGAGTTG CAGACTCCAATCCGAACTGAGACGAGCTTT TTGGGATTGGCTCCCCCTTGCAGGTTTGCA GCGCTTTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGACATAAAGGCCATGAGGACT TGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTTGT CAACGGCAGTCTCAATAGAGTGCCCGGCCG AACCGCTGGCAACTATTGATAAGGGTTGCG CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC TTGCACTCTGCCGTGTTTTACCCAGGAAGG CGTATCTCTACGCCGGTCAGAGGCATTCTA GCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCTGA ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTCCGG GTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCT TGCGACCGTAC	HM062484	Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS_T1_R4_149267_b1
76	101S.1	AACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAAA CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCC AAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCT GGTCTGTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGG TAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCTAAG TGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGA AGTTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGA GTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTAATTTCGACGCAACCGCATGAAC CTTACCTGGGCTAGAATGCCTCTGACAGCC CCAGAGATGGGGTCTCCAGGGTAAAACCTG GCAGAGTGCAAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCAATAGT TGCCAGCGGTTCCGGCCGGCACTCTATTGA GACTGCCGTT	EU134636	Uncultured bacterium clone FFCH12214 (<i>Bacillus acidiceler</i> strain NIOT- Cu-56)
77	102S.1	CCGGGGAACCTGCGTCTGATACTGGTGGGCT CGAATCCGGGAGAGGGATGCGGAATTCCAG GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGA GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCATCCTGG ACCGGCATTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCA GGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTA GTCTGGCCCTAAACGATGAATGCTTGGTG TGGCGGGTATCGATCCCTGCCGTGCCGAAG CTAACGCAGTAAGCATTCGCCTGGGGAGT ACGGTTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG TGGTTCAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCT TACCAGGCTTGAAGTGCAGTGACCATCG GCGAAAGCCGACTTCCGCAAGGACACTCGT AGAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGT	EU132389	Uncultured bacterium clone FFCH1693 (Acidobacteria bacterium LWQ117)

		GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGCCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTGTCTGCTGTTGCCATCA GGTAATGCTGGGCACTCTGC		
78	128S.1	TTAACCGGGGAACCGCGTGTGAGACTGGAT GGCTTGAATCCAAGAGAGGGATGCGGAATT CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC TGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCATC CTGGATTGGTATTGACGCTGAGGAGCGAAA GCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCC GGTAGTCCTGGCCCTAAACGATGAGTGCTT GGTGTGACGGGTATCGATCCCTGTCGTGCC GAAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGG GAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTCAATTTCGACGCAACGCGTAGA ACCTTACCCAGGCTCGAACGGCGAATGACA TCCTACGAAAGTAGGCTTCCGCAAGGACAG TCGCCGAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCTGTTGCC ATCACGTGATGGTGGCACTCTGAGGAGAC TGCCGGTGATAAACCGGAAG	EU132412	Uncultured bacterium clone FFCH3129 Acidobacteria bacterium LP6
79	129S.1	TTAACTCGGAACGGCCAAGTGATACTGTGCG TGCTAGAGTGCAGAAGGGGCAATCGGAATT CTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC AAGAGGAACACCTGAGGCGAAGGCGGATTG CTGGGCTGACACTGACGCTGAGGCGCGAAA GCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCC GGTAGTCCTGGCCCTAAACGATGAATACTT GGTGTCTGGAGTTTTAATACTCCGGGTGCC GTCGCTAACGTTTTTAGTATTCCGCCTGGG GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACCCAAAGG AATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAG CATGTGGTTTAATTTCGACGCAACGCGAAGA ACCTTACCTGGACTAGAATGCGCGGAAGC TTGGGTAACGCCAAGCGTCCGGGCAACCGG ACCCAAAGCAAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGACAGT TGCCAAATTAAGTTGGGAACCTCTGTCAAG ACTGCTGTTGATAAAAACGGAGGAAGGTGGG GATGATGTCA	FJ350944	Uncultured bacterium clone 060329_T2S1_S_T_SDP_ (Acidobacteria bacterium IGE- 018)
80	130S.1	TCAACCTCGAGATGTCGGCCGAAACCATCT GGCTAGAGTCCGGAAGAGGAGTGGAAATT CCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC GGGAAGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCT CTGGGACGGTACTGACGCTGAGACGCGAAA GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCT GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGGTGCTA GGTGTGGGCGGTGTCGACTCCGTCCGTGCC GAAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAG CATGTGGTTTAATTTCGACGCGACGCGAAGA ACCTTACCAAGGCTTGACATGCACTGGAAT GTCGCAGAAATGCGGCAGCCCTTCGGGGCT AGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG CTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGC CAGCGGATAATGCCGGGACTCTGGGGAGA CTGCCGGTGACAAATCGGAGGAAGGTGGGG	EU881126	Uncultured bacterium clone KPF200711-221 (Bacterium Ellin6510)
81	131S.1	CAACCCAGAGCCTGCATCCGAAACTGGCGG GCTAGAGTTCTGGAGGGGATAGCGGAATTC CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATATCA GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTATC TGGACAGAAACTGACGCTGAGGCGCGAAAAG CTAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG GTAGTCTTAGCCCTAAACGATGGATACTTG CTGTGACTGGGATTGAGTCCAGTCCGTGGCG AAGCTAACGCATTAAGTATCCCGCCTGGGG AGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGAGC ATGTGGTTCAATTTCGAAGCAACGCGAAGAA CCTTACCTGGGTTTGACATGTAGGAAGTAG	EU132300	Uncultured bacterium clone FFCH5322 (Acidobacteria bacterium IGE- 010)

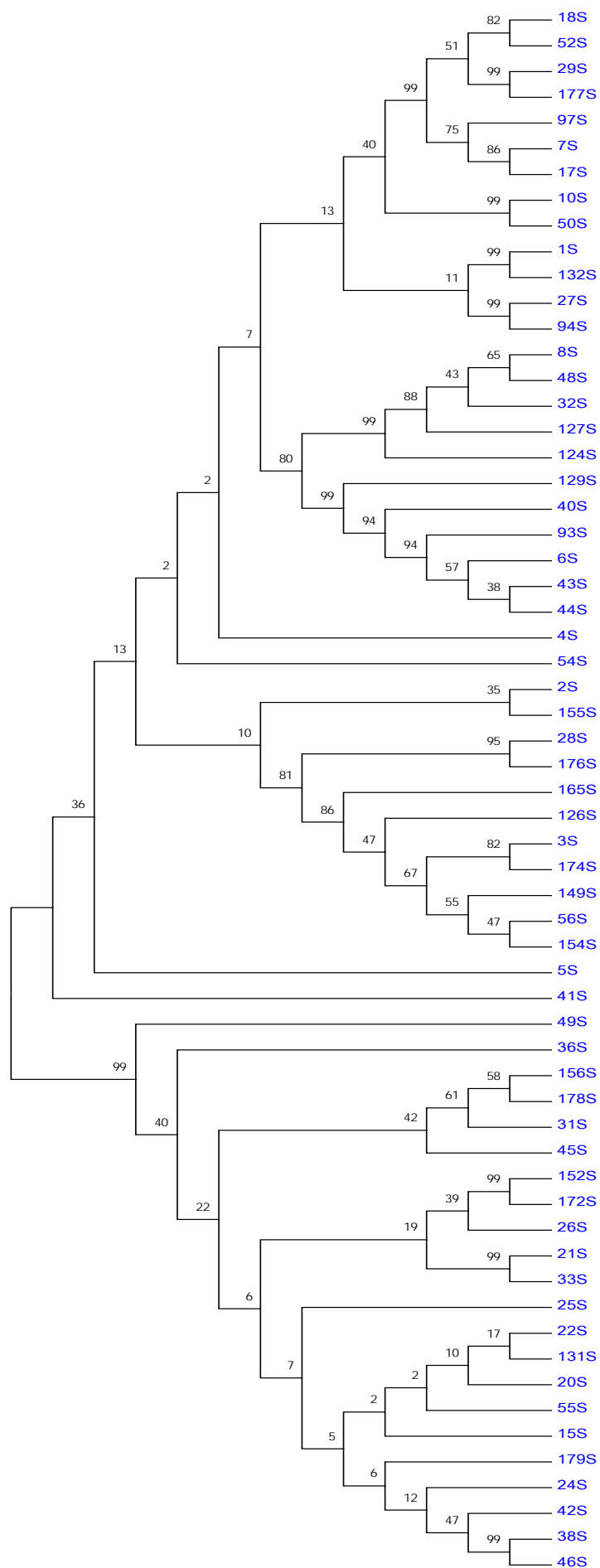
		AAACCCGAAAGGGGGACGACCTGTTAAGTC AGGAACCTACACAGGTGGTGCATGGCTGTC GTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAA GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCACCTAT GTTGCCATCGGTTCCGGCCGGGCACTCTTAG GGAACCTGCC		
82	132S.1	AACCCAGAACTGCCGTTGATACTATCGGT CTTGAATGTTGTGGAGGTGAGCGGAATATG TCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGAGATGAC ATAGAACACCAATTGCGAAGGCAGCTCGCT ACGCAAATATTGACGCTGAGGCACGAAAGC GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCCTAAACGATGGATACTCGA CATACTGATATGACAATGTGTGTCTGAGC GAAAGCATTAAAGTATCCACCTGGGAAGTA CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG GCGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTTCGATGATACGCGAGGAACCTT ACCTGGGCTAGAATGCCAGAGGACCGTGGG TGAAAGCTCACTTCCCCGCAAGGGGCTCT GGTAAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC GTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCCATCACTAGTTGCCAT CAGGTAACGCTGGGAACTCTAGTAAACTG CCGTGTAAGACGCGAGGAAGGAGGGGATG ATGTCAAGTC	EF522379	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone OCLS017 (<i>Flavisolibacter</i> sp. GCR0105)
83	134S.1	CTTAACTTTCAGCTTGGGTTGGATACGGGC AGACTTGAGTTCCGTAGGGGAGACTGGAAT TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTC TCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAA AGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCTGTAACCGTTGGGCGCT AGGTGTGGGGAGCATTCCACGTTCTCCGTG CCGTAGCTAACGCATTAAGTCCCCCGCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGG AGCATGTTGCTTAATTTCGAGGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGGTTTGACATGTAGGGAA AAGCCGTAGAGATACGGTGTCTTCCGGGC CCTACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG CTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAGGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCATGTTGC CAGCGGTAATGCCGGGACTCTTGGGAGA	EU132883	Uncultured bacterium clone FFCH14885 (<i>Thermasporomyces composti</i> strain JCM 16421)
84	135S.1	TTAACTGGGAACTGCGTCTGATACTGGAA GGCTCGAGTTTGGGAGAGGGATGTGGAATT CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC TGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCATC CTGGACCAACACTGACGCTGAGGCGCGGAA GCTAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCC GGTAGTCTTAGCCCTAAACGATGAATGCTT GGTGTGGCGGGTATCGATCCCTGCCGTGCC GAAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGG GAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTCAATTGACGCAACGCGAAGA ACCTTACCTGGGCTCGAAATGCAGATGACA TCCGGCGAAAGCCGGCTCCCGCAAGGGCGT CTGTATAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGC TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTGCTCCTCTGTTGCC ATCAGGTCAAGCTGGGCACTCTGAGGAGAC TGCCGGTGATAAACCGGAAG	FJ479477	Uncultured bacterium clone p7f20ok (Acidobacteria bacterium IGE- 010)
85	137S.1	GGCTCAACTGAGGAACTGCCTTTCAGACTG CTTTGCTTGAGGCCGGGAGTGGCGAGTGGA ATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATTGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGC TCGCTGGACCGGTTCTGACGCTGAGGCGCG AAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATAC CCCGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTG CTTGGTGTAGCGGTATCGACCCCTGCTGT GCCGAAGTCAACACATTAAGCACTCCGCCT	EU589299	Uncultured soil bacterium clone 2_D4 (Acidobacteria bacterium WY67)

		GGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCTGGGTTTGAATGTACTGG TAAGCCTCAGAGATGAGGTCCCCCTCTCGG AGGCCGGTACATAGGTGCTGCATGGCTGTC GTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGCAACGAGCGCGACCCTTGCCATA GTTGCTAACGCGTAATGGCGAGAACTCTAT GGAGACTGCCGGTGATAAAC		
86	138S.1	TCAACCTGGATCGGCTTACGAGACGCGT GGGCTTGGAGCACAGTAGAGGCGGGTGGAA TTCCGGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGA TCCGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCC CGCTGCGCTGTGGCTGACGCTGAGGCGCGA CAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGGCAC TAGGTGCCTGGGGGAGCGACCCCGTGGGTG CCGGCGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAAATTCGACGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGGCTTGACATCCAAGGGA AAGTCTTCAGAAACGAAGACCCCTCCTTCGG GACTCTTGGACAGGTGCTGCATGGCTGTCG TCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCGCTCCCAG TTGCTACCACGTTATGGTGAGGACTCTGGG GGGACTGCCG	EU134819	Uncultured bacterium clone FFCH5065 (Bacterium Ellin5220)
87	139S.1	CAACCTCGGG CTTGCGGTGGATACTGTCCGGCTAGAGGAT GGTAGAGGGGAGTGGAATTC CCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCG GGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTCCC TGGGCCATTCTGACGCTGAGACGCGAAAG CTAGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTG GTAGTCCTAGCCGTAACGATGAACACTAG GTGTGGGGAGAGTGAATCTCTCTGTGCCG CAGCCAACGCGATAAGTGTTCGCGCTGGGG AGTACGGCCGCAAGACTAAAACCTCAAAGGA ATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGC ATGTTCTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA CCTTACCTGGGCTTGACATGGCGCTGCAAG CGCACGAAACGTGTGACCTTCGAGGGTGC GCCACAGATGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCT CGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAG AACGAGCGCAACCCCGTGGCGTGTGCCA GCATTGAGTTGGGACTCACGCCAGACTGC CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGA	GQ425332	Uncultured bacterium clone Ovdat-101 (<i>Rubrobacter bracaraensis</i>)
88	140S.1	GCTCAACGGCGAAGCTGCTCTGGATAACGGC AAATCTGGGGACCGGTAGAGGCTGGTAGAA TTGCAGATGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGA TCTGCAAGAATACCCGTGGCGAAGGCGGCC AGCTGGGCCGGATCCGACGCTGAGGCGCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGGCAC TAGGTGCCGGGGGAGCGACCCCTGGGTG CCGGCGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAAATTCGACGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGGCTTGACATCTTGGGGA AACGCTCGAGAAACCGGGCGCCCTCCTTCGG AGTCCAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCG TCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCGCTCCCAG TTGCTACCGGTCATGCCGAGGACTCTGGG AGGACTGCCG	EU134891	Uncultured bacterium clone FFCH2947 (Bacterium Ellin5220)
89	141S.1	CTTAACCGAGGAAGTGCCTGCCAGACTGGA TGGCTTGAGACCGGGAGAGGTGAGTGAAT TCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTC ACTGGACCGGAAGTGCCTGAGGCGCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC	HM330850	Uncultured bacterium clone ncd957g08c1 (Acidobacteria bacterium WY67)

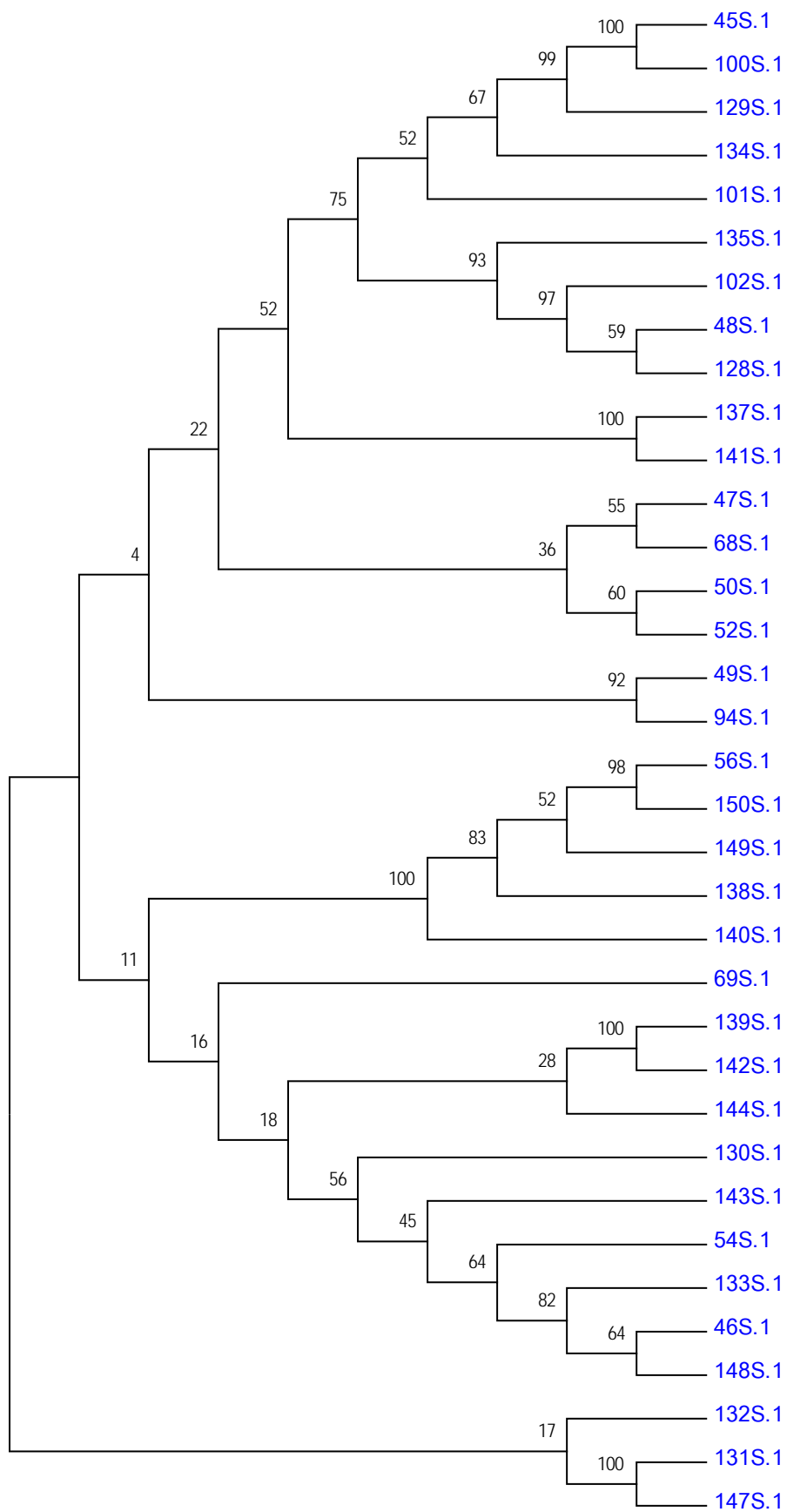
		TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TGGTGTAGCGGGTATCGACCCCTGCTGTGC CGACGTCAACACATTAAGCACTCCGCCTGG GGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAG AACCTTACCTGGGTTTGAAGTGTACAGGCA ACGCTCAGAGATGAGTGCCTCTTTCGGAG GTCTGTATAGAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCTTGTTCACAGT TACTATCTCTGCGAGAGCAGGGAGCACTCT GGACGGACTG		
90	142S.1	CAACCCGGGGCGTGGTGGATACTGCCGG GCTAGAGGATGGTAGAGGCGAGTGGAAATTC CCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCG GGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTCGC TGGGCCATTCTGACGCTGAGACGCGAAAG CTAGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTG GTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAG GTGTGGGGGAGTGAATCCCCCTGTGCCG CAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCCTGGGG AGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAAAGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGC ATGTTCTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA CCTTACCTGGGCTTGACATGGCGCTGCAAG CGCACGAAACGTGTGACCTTCGAGGGTGC GCCACAGGTGCTGCATGGCTATCGTCAGCT CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCG AACGAGCGCAACCCCGTGGCGTGTGGC	GQ425841	Uncultured bacterium clone Adulam-87 (<i>Rubrobacter bracarensis</i>)
91	143S.1	GGCTCAACCCGGAGACGCCACCCGATACTG CTGTGGCTGGAGTCCGGTAGGGGAGCGTGG AATTCGCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA TATCGGGAGGAGCACCAGCGGCGAAGCGG CGCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTGAGGAGC GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGC ACTAGGTGTGGGGTCTACCAACCGACTCT GTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGC CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG CGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTAGG GAAAAGCCGTAGAGATACGGTGTCTTCCG GGCCCTACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCTTCGCCCTTAGT TGCCATCATTAGTTGGGCACTTAAGGGG ACTGCCGGTGATAAGCCGGAAGAAGGTGGG GATGATGTCAAGTCATCATG	EU133001	Uncultured bacterium clone FFCH17985 (<i>Aciditerrimonas</i> sp. CH22-21)
92	144S.1	CTCAACTGTGGAACCTGCGTCGGATACTGCA TTGGCTAGAGGACGGTAGAGGCTGGTGGAA CTAGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA TCGCTAGGAACGCCGGTGGCGAAGGCGGCC GGCTGGGCCGATCCTGACGCTGAGGCGCGA AAGCTAGGGGAGCGAACCGGATTAGATACC CGGGTAGTCTTAGCCGTAACGGTGGGTGC TAGGTGTGGGGTTCGCAAGACTTCCGTGCC GCAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAG CGCGTGGCTTAATTCGATGCAAAGCGAAGA ACCTTACCAGGGCTTGACATGCTGGTAGTA GTGCCCCGAAAGGTCGGCGACCCGTAGAG TCGGTACTAGCACAGGTGCTGCATGGCTG TCGTGAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCTCT TTGTTGCCAGCGGTTATGCCGGGCACTC	EU132453	Uncultured bacterium clone FFCH9905 (Firmicutes bacterium Kam1851)
93	147S.1	CTCAACCCAGAGCCTGCATCCGAACTGGC GGGCTAGAGTTCGGAGGGGATAGCGGAAT TCCTGGTGTAGCGGCCAAATGCGTAAATAT CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTA TCTGGACAGAACTGACGCTGAGGCGCGAA AGCTAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC	EF019940	Uncultured Acidobacteria bacterium clone Elev_16S_1315

		TGGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGGATACT TGCTGTGACTGGGATTGAGTCCAGTCGTGG CGAAGCTAACGCATTAAGTATCCCGCCTGG GGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTCAATTGCAAGCAACCGGAAG AACCTTACCTGGGTTTGACATGTAGGAAGT AGAAACCCGAAAGGGGACGACCTGTTAAG TCAGGAACCTACACAGGTGGTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCACCT ATGTTGCCATCGGTTTCGGCCGGGCACTCTT AGGGAACCTGCCGGCAAGAGCTGGAGGAAG		
94	148S.1	CTTAACCCCTGGGCCTGCTTCCGATACGGGC AGACTAGAGGTATGCAAGGGGAGAACCGAAT TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTT TCTGGGCATTACCTGACGCTGAGGAGCGAA AGTGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACACCGTAAACGTTGGGCGCT AGGTGTGGGACTCATTCCACGAGTTCGCTG CCGACGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA GGAAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGG AGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGGTTTGACATATAGGGAA ATCTCCAGAGATGGGAGGTCCGTAAAGGC TCTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG CTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTATGTTGC CAGCACGTAATGGTGGGACTCATAAGAGA CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG ATGACGTCCAGTCATCATGCCCTTATGTC	FJ711217	<i>Nocardioides</i> sp. KC-EP-S1
95	149S.1	CTCAACCCCGAGTCGGCCGTCGATACTCCA GAGCTGGAGCACTGTAGAGCGAGGTGGAAT TCCGGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGAT CCGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCT GCTGGGCAGTAGCTGACGCTGGGGCGCGAC AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACCGCTAAACGATGGGCACT AGATGCTTGGGGGAGCGACCCCTCTGAGTGT CGGCCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGG GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAATTCGACGCAACCGGAAG AACCTTACCTAGGCTTGACATGCACGGGAA ACCCCTGAGAAACCAGGGGCCCTCTTCGGA GTCCGTGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAGGT CCCGCAACGAGCGCAACCCCGTTCACAGT TGCCAGCGAGTAACGTCCGGGACTCTGGGA AGACTGCCCG	EF125943	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone A8
96	150S.1	CTCAACCCCGGATCGGCGTGGGCGACTGTT GGGCTGGAGCACGGTAGGGGACAGCGAAT TCCGGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGAT CCGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTCT GCTGGGCCGGAAGGGGGCAGAGCAATCTGT CCCCGTGCTGACGCTGAGGCGCGACAGCGT GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTA GTCCACGCCGTAACGATGGGCACTAGGTG CCCGGGGAGCGACCCCTCCGGGTGCCGCG CTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGAGT ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG TGGTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCT TACCTGGGCTTGACATGCTTCTGAAACCTC TGGGAAACCAGGGCCCTCCTTCGGGACAGA AGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCG AACGAGCGCAACCCCGCCCCAGTTGCCA GCGACGGTGT	EU134827	Uncultured bacterium clone FFCH5852 (Unclassified Gemmatimonadetes)

** clone หมายเลข 1-61 จากดินตัวอย่าง 5 และ clone หมายเลข 62-96 จากดินตัวอย่าง 7



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-Joining ของยีน 16S rRNA จากดินตัวอย่าง 5



ภาพที่ 5 Phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-Joining ของยีน 16S rRNA จากดินตัวอย่าง 7

ตารางที่ 2 Phylotype และจำนวนโคลนแบคทีเรียที่พบในดินต่าง สถานีวิจัยกาญจนบุรี

No.	Phylotype group	Clones number	%
1	Uncultured bacterium	63	65.6
2	Uncultured soil bacterium	6	6.3
3	Uncultured Acidobacteria bacterium	6	6.3
4	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium	4	4.2
5	Uncultured alpha proteobacterium	3	3.1
6	<i>Mycobacterium</i> sp.	3	3.1
7	Uncultured actinobacterium	2	2.1
8	Uncultured endolithic bacterium	2	2.1
9	Uncultured Bacteroidetes bacterium	1	1
10	<i>Streptomyces canus</i> strain cfcc3059	1	1
11	<i>Sinorhizobium fredii</i> strain YcS2	1	1
12	<i>Nocardioides</i> sp.	1	1
13	<i>Methylobacterium variabile</i>	1	1
14	<i>Deinococcus</i> sp. 5A4	1	1
15	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DG	1	1
	Total	96	

สรุปและข้อเสนอแนะ

ดินจากสถานีวิจัยกาญจนบุรีจัดเป็นดินประเภทดินเซดิมที่เป็นดินต่างปานกลาง มีค่าพีเอชประมาณ 7.8 เป็นดินที่ไม่เค็ม แต่มีค่าโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้มากเกินไป มีผลทำให้สมบัติทางกายภาพต่ำ ผลการศึกษา ชุมชีพของแบคทีเรียในดินตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วน และ Phylogenetic analysis จาก 96 โคลนที่นำมาศึกษาพบว่าชุมชีพของแบคทีเรียในดินต่างจากสถานีวิจัยกาญจนบุรีมีความ หลากหลาย ชุมชีพประกอบด้วย phylotype ของแบคทีเรียกลุ่มหลักซึ่งได้แก่กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็น Uncultured bacterium ที่มาจากฐานข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ DNA ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามในกลุ่มนี้หาก เปรียบเทียบยีน 16S rRNA กับแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูลพบว่าโคลนที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียจาก ดิน (soil bacteria) Acidobacteria, Proteobacteria และ Gemmatimonadetes bacterium ซึ่งมีลำดับเบส ของยีน 16S rRNA เมื่อเทียบกับความเหมือนกับข้อมูล 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีรายงานพบว่ามีความ เหมือนของลำดับเบส 90-97% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน 16S rRNA ที่วิเคราะห์ได้อาจมาจากแบคทีเรียที่ยังไม่มี รายงานการแยกได้หรือนำมาเพาะเลี้ยง ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดินตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นเป็น

แหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย มีแบคทีเรียอีกจำนวนมากที่ยังไม่เป็นที่รู้จัก ข้อมูลของแบคทีเรียที่พบในดินตัวอย่างนี้นี้อาจนำไปสู่การคัดแยกเพื่อค้นหาแบคทีเรียชนิดใหม่ นอกจากนี้การวิเคราะห์ Phylogenetic relationship เทียบกับข้อมูลของแบคทีเรียที่มีรายงาน ทำให้ทราบว่ายีนเหล่านั้นมาจากแบคทีเรียกลุ่มใด ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปประยุกต์ใช้เพื่อแยกแบคทีเรียและเพาะเลี้ยง รวมถึงศึกษาสรีรวิทยาและบทบาท เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. อรุณี ยูวะนิยม “การจัดการแก้ไขปัญหาดินเค็ม”
<http://www.fooktiengroup.co.th/forum/viewtopic.php?f=11&t=430>
2. Anna Kielak, Agata S Pijl, Johannes A van Veen and George A Kowalchuk. 2009. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME Journal* 3:378–382.
3. Chang-Chai Ng, Wen-Chin Huang, Chen-Chin Chang, Wen-Zheng Tzeng, Tseng-Wei Chen, Yu-Shan Liu and Yuan-Tay Shyu. 2006. Tufa microbial diversity revealed by 16S rRNA cloning in Taroko National Park, Taiwan. *Soil Biology and Biochemistry* 38:342-348.
4. Peter S.P.J., G.J. Flemming, G.J. Mads and Ole C.H. 2002. Microbial diversity in Ikaite tufa columns: an alkaline, cold ecological niche in Greenland, *Environmental Microbiology* 4:487–493
5. Hongo Y., M. Ohkuma and T. Kudo. 2003a. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS. Microl. Ecol.* 44:231-242.
6. Hongoh Y., H. Yuzawa, M. Ohkuma and T. Kudo. 2003b. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS. Microbiol. Lett.* 221:299-304.
7. Hongo Y., P. Deevong, S. Hattori, T. Inoue, S. Noda, N. Noparatnaraporn, T. Kudo and M. Ohkuma. 2006. Phylogenetic diversity, localization and cell morphologies of members of the candidate Phylum TG3 and a subphylum in the Phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in Termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6780-6788.
8. Kumar S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17:1244-1245.
9. Ohkuma M. and T. Kudo. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:461-468.
10. Thongaram T., S. Kosono, M. Ohkuma, Y. Hongoh, M. Kitada, T. Yoshinaka, S. Trakulnaleamsai,

N. Noparatnaraporn and T. Kudo. 2003. Gut of higher termites as a niche for alkaliphiles as shown by culture-based and culture-independent studies. *Microbes Environ.* 18:152-159.

11. Trakulnaleamsai S., Y. Hongoh, P. Deevong and N. Noparatnaraporn. 2004. Phylogenetic diversity of bacterial symbionts in the guts of wood-feeding termites. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 38 :45-51.
-

หมายเหตุ : ให้ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับร่าง) จำนวน 3 ชุด ก่อน โดยสถาบันวิจัยและพัฒนาจะส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ ประเมิน / วิจัย หากไม่มีการแก้ไข จะแจ้งให้ส่งเพิ่ม แต่หากมีความเห็นข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิให้ปรับแก้ไข จะแจ้งให้ดำเนินการแก้ไข และให้ส่งรายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 12 ชุด พร้อม Diskette ต่อไป

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย (Project)

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552.....

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ก-ช(ช)7.52..... ชื่อโครงการ ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ เชื้อรา *Termitomyces spp.* (เห็ดโคน) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา บริเวณจังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย) ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศเกษตร และศักยภาพการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร.....

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร. เยาวภา อร่ามศิริวิทย์.....

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภาควิชาจุลชีววิทยา.....

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สังคมศาสตร์
 โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552...ถึงปีงบประมาณ 2552

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ จ. กาญจนบุรี.....

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ.....300,000.....บาท ประกอบด้วย

ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 300,000 บาท ปีงบประมาณ.....ได้รับ.....บาท

ปีงบประมาณ.....ได้รับ.....บาท ปีงบประมาณ.....ได้รับ.....บาท

ปีงบประมาณ.....ได้รับ.....บาท ปีงบประมาณ.....ได้รับ.....บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของรา *Termitomyces* ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของรา *Termitomyces* ในบริเวณจังหวัดกาญจนบุรี

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่ เดือนที่ ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้

1. 1-6 ได้รวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน เพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคต อย่างน้อย 40 สายพันธุ์ และได้ดีเอ็นเอของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์

7-12 เก็บรวบรวมโคลนที่ได้ไว้ศึกษาต่อ จัดกลุ่มของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์ที่ได้ ทราบถึงชนิดของเห็ดโคนที่เก็บรวบรวมได้ โดยการทำให้ phylogenetic analysis

- 2. 1-6
- 7-12
- 3. 1-6
- 7-12

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาด (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดโคนในรังปลวกเลี้ยงราในจังหวัดกาญจนบุรีและแยกเชื้อบริสุทธิ์	1. ได้รวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนเพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคตอย่างน้อย 40 สายพันธุ์	1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนเพื่อนำไปศึกษาต่อในอนาคตได้ทั้งหมด 31 สายพันธุ์
2. สกัดดีเอ็นเอของเห็ดโคนในทุกสายพันธุ์ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้	2. ได้ดีเอ็นเอของเห็ดโคนทั้ง 40 สายพันธุ์	2. สกัดดีเอ็นเอของเห็ดโคนได้แล้วทั้งสิ้น 31 สายพันธุ์
3. โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ	3. เก็บรวบรวมโคลนที่ได้ไว้ศึกษาต่อ	3. ยังไม่สามารถโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจได้
4. จัดกลุ่มสายพันธุ์เห็ดโคนที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้	4. จัดกลุ่มของเห็ดโคนทั้ง 31 สายพันธุ์ที่ได้	4. ทำการ direct sequence ในส่วนของ ITS1, ITS2 บางส่วนของ Large subunit
5. ศึกษาชนิดของเห็ดโคนที่เก็บรวบรวมได้ โดยการทำให้ phylogenetic analysis	5. ทราบถึงชนิดของเห็ดโคนที่เก็บรวบรวมได้ โดยการทำให้ phylogenetic analysis	5. ทำ phylogenetic analysis เปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างเองและเปรียบเทียบกับข้อมูลใน database เพื่อการจัดจำแนก

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ...80.....) เหตุผล เนื่องจากมีเชื้อบางส่วนตายไปเพราะเจริญช้ามาก จึงเกิดการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษา และ ยังทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจไม่สำเร็จ.....
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน เป็นการเก็บรวบรวมข้อมูลเบื้องต้น ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของเห็ดโคนในบริเวณจังหวัดกาญจนบุรี โดยอาศัยเทคนิคทางโมเลกุล.....

สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์ ได้เก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนเพิ่มเติมจากที่เคยทำมา และสามารถนำมาศึกษาเปรียบเทียบการกระจายตัวและชนิดของเห็ดโคนในประเทศไทยได้.....

ผลิตภัณฑ์.....

สิ่งประดิษฐ์.....

เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....

ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....

คู่มือ.....

วิดีทัศน์.....

การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาโท 1 คน

สนับสนุนการศึกษาวิทยานิพนธ์.....1.....เรื่อง (ระบุ) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ เชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล.....

อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน ได้ความรู้เกี่ยวกับวิธีการจัดจำแนกเห็ดโคนและการใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาเห็ดโคน.....

ด้านการเกษตร เป็นรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเห็ดโคน ซึ่งเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ.....

ด้านอุตสาหกรรม.....

ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....

ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....

ด้านเศรษฐกิจ เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเห็ดโคนในอนาคต.....

ด้านสังคม.....

ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....

ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....

เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ.....

นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเห็ดโคนในอนาคต.....

ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....

อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็นภาคผนวกของรายงาน)

- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ.....เรื่อง (ระบุ).....
- นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- นำเสนอทางนิทรรศการ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์).....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ยุทธศาสตร์การขจัดความยากจน
- ยุทธศาสตร์การพัฒนาคคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ยุทธศาสตร์การพัฒนากฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
- ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาธิปไตย
- ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ

ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก

อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่เจริญร่วมกับรังปลวกเลี้ยงราเท่านั้น และจะเจริญในระยะเวลาที่จำกัด ทำให้การเก็บตัวอย่างดอกเห็ดบริเวณรังปลวกทำได้ยากเนื่องจากชาวบ้านก็นิยมเก็บเห็ดเพื่อนำไปขาย เนื่องจากมีราคาแพง ทำให้การเก็บตัวอย่างสามารถเก็บได้แต่เม็ตราที่อยู่ในรังปลวก ไม่สามารถเก็บดอกเห็ดที่ขึ้นบริเวณรังปลวกได้ ทำให้ไม่สามารถระบุ species ของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อหัวหน้า

เอกภา อร่ามศิริวุฒิ

โครงการ

(.....*เอกภา อร่ามศิริวุฒิ*.....)

.....*เอกภา*.....)

.....*24 / กันยายน / 57*.....วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ก-๒(๒)7.52

ชื่อโครงการภาษาไทย ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา บริเวณจังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Study on the biodiversity and distribution of symbiotic basidiomycetes *Termitomyces* spp. (mushroom) of fungus-growing termites in Kanchanaburi province by using molecular method

เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์⁽¹⁾ กฤษณา ช่างกรวด⁽²⁾ สุเทพ ญาติ⁽³⁾ นิศ กীরติบุตร⁽⁴⁾ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์⁽⁵⁾
Yaovapa Aramsirirujwet⁽¹⁾ Krisana Chaikuad⁽²⁾ Suthap Yadee⁽³⁾ Nit Kirtibutr⁽⁴⁾ Poonpilai Suwanarit⁽⁵⁾

บทคัดย่อ

การศึกษาระยะการแพร่กระจายของเห็ดโคนในประเทศไทยเพื่อเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลเป็นสิ่งที่น่าสนใจ การทดลองนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคน (*Termitomyces*) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงราในพื้นที่ อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี โดยสามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนได้ทั้งสิ้น 31 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากเมล็ดร่าภายในสวนเห็ดรา 29 สายพันธุ์ และ จากดอกเห็ดโคน 2 สายพันธุ์ จากการศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) และเปรียบเทียบ similarity ในกลุ่มตัวอย่างและทำ phylogenetic tree พบว่าสามารถจัดกลุ่มเห็ดโคนที่แยกได้ออกเป็น 6 กลุ่ม และจากการศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอในส่วน of Large subunit (LS) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์กับข้อมูลในฐานข้อมูล พบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานพบในจังหวัดสระบุรี ปราชินบุรี นครราชสีมา และ จันทบุรี ทั้งจากปลวกชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้าง และไม่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของปลวก

คำสำคัญ: เห็ดโคน ปลวกเลี้ยงรา ความหลากหลายทางชีวภาพ

^{(1) (3) (5)} ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

⁽²⁾ สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กลุ่มงานแมลงและจุลชีววิทยาป่าไม้ กรมป่าไม้

⁽⁴⁾ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

The study about biodiversity of *Termitomyces* in Thailand is an interested field to understand the distribution of this fungi. Biodiversity of *Termitomyces* in the fungus growing termites in Thongphaphum district Kanchanaburi province were investigated. Total 31 isolates of *Termitomyces* were cultivated which 29 isolates from the fungus nodules and 2 isolates from the fruiting body. Based on the comparison of the internal transcribed spacer (ITS) region, these 31 isolates were classified into 6 groups. The comparison of the LSU rDNA region between all 31 isolates and 15 *Termitomyces* strains in database revealed that some isolated strains were closely related to the *Termitomyces* spp. found in Saraburi, Prachinburi Nakronratchasima and Chantaburi provinces from both same and different termites host. This result indicated that *Termitomyces* spp. were widely distribute and not specific to the termites host.

Key words: *Termitomyces* spp., fungus growing termites, biodiversity

บทนำ

เห็ดโคน (*Termitomyces*) เป็นเห็ดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จัดเป็นเห็ดที่คนทั่วไปรู้จักกันดี และนิยมรับประทานกันมาก เนื่องจากมีรสชาติอร่อยกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ ที่พบในประเทศไทย จึงทำให้เห็ดโคนมีราคาแพง ตามปกติเห็ดโคนจะออกดอกระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ สภาพธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคนจะต้องมีฝนตกลงมาเป็นปริมาณมากจนทำให้แผ่นดินชุ่มฉ่ำ เห็ดโคนพบทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะตั้งแต่จังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี พบมากที่สุด (ปัญญา, 2546) เห็ดโคนที่อยู่ภายในรังปลวกจะอยู่ในรูปของเส้นใยที่มารวมตัวกันจนเห็นเป็นเม็ดกลมๆ สีขาวอยู่ที่ผิวของสวนเห็ด (fungus comb) เมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และ ความชื้นที่เหมาะสม ตุ่มนี้ก็จะค่อยๆพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป (ปัญญา, 2546; Taprab et al., 2002) ชนิดของเห็ดโคนที่พบในประเทศไทย เช่น *Termitomyces clypeatus*, *T. globules*, *T. fuliginosus* และ *T. mammiformis* ซึ่งส่วนใหญ่การจดจำแนกเห็ดโคนในประเทศไทยจะใช้ลักษณะรูปร่างเป็นเกณฑ์ในการจดจำแนก



ภาพที่ 1 เห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) เจริญขึ้นมาจากสวนเห็ดรา (fungus comb) ในปลวกเลี้ยงรา
(ภาพโดย Dr. Inoue)

ที่มา: Ohkuma M. (2003)

กลุ่มปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา (fungus-growing termites) จัดอยู่ใน family Termitidae, subfamily Macrotermitinae พบมากในประเทศแถบแอฟริกา และเอเชีย เป็นปลวกชนิดทำรังอยู่ใต้ดิน มีความสามารถในการย่อยสลายสูง กินอาหารได้หลายอย่าง ทั้งเนื้อไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ตลอดจนเศษซากพืช (Slaytor, 1992; Abe *et al.*, 2000) ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ จะอยู่ร่วมกับเชื้อรา *Termitomyces* โดยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (symbiosis mutualism) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ภายในรังในบริเวณที่เรียกว่า สวนเห็ด (fungus comb หรือ fungus garden) ซึ่งสามารถเกิดเห็ดโคนขึ้นมาได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ในประเทศไทยพบว่า มีปลวกเพาะเลี้ยงเห็ดโคนอยู่ทั้งหมด 5 สกุลด้วยกัน คือ *Macrotermes*, *Odontotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes*, *Ancistrotermes* (ยุพาพร, 2546; ยุพาพร และ จารุณี, 2546) และจากการทดลองของ Taprab *et al.* (2002) ได้จัดจำแนกเห็ดโคนจากรังปลวกในจังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี สระบุรี และ นครราชสีมา โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล และได้สรุปว่าชนิดของปลวก ชนิดของเห็ดโคน และสถานที่ไม่มีความสัมพันธ์กันแบบจำเพาะเจาะจง

การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของรา *Termitomyces* ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงราในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล และเพื่อศึกษาการแพร่กระจายของรา *Termitomyces* ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี

วิธีวิจัย

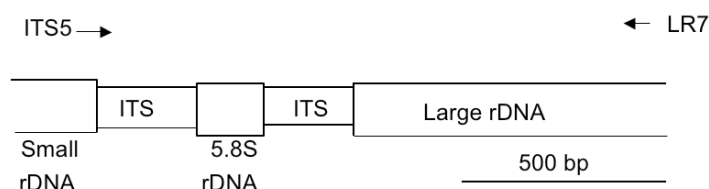
1. ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ด และ/หรือ เม็ดเส้นใยราที่เจริญอยู่ในสวนเห็ด ในรังปลวกชนิดต่างๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี

วิธีการ ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดและเม็ดเส้นใยราที่เจริญในสวนเห็ด ในรังปลวกชนิดต่างๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี โดยการเลือกเก็บเม็ดเส้นใยราจากในสวนเห็ดรา (Fungus comb) ภายในรังปลวกมาวางลงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) เลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ส่วนดอกเห็ดที่เก็บมาได้ จะทำการฉีกเอาเนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดมาวางลงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) เพื่อเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์และใช้ในการศึกษาต่อไป ทุกขั้นตอนทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

2. การเก็บรักษาเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

วิธีการ ทำการถ่ายเชื้อราที่เก็บได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป เชื้อเห็ดโคนที่ได้ต้องทำการเลี้ยงบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 28°C ไม่สามารถเก็บรักษาในตู้เย็นได้ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นที่เจริญเร็วกว่า ทำให้สามารถเก็บรักษาเชื้อเห็ดโคนได้เพียง 31 สายพันธุ์ จากตอนแรกที่สามารถแยกได้ถึง 40 สายพันธุ์

3. สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA และ ทำ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ITS5 และ LR5 หรือ LR7 เพื่อ amplify ในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) และ large-subunit (LSU) rDNA ดังแสดงในภาพที่ 2



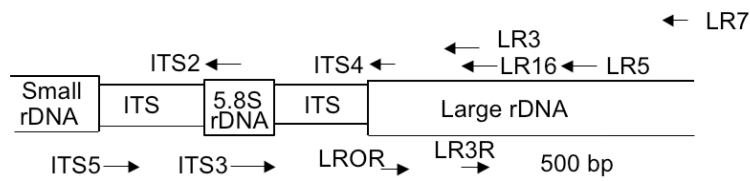
ภาพที่ 2 ส่วนของ rDNA ที่ทำการศึกษาในการทดลองนี้

วิธีการ สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เลี้ยงไว้นาน 3 สัปดาห์ โดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas ตัดชิ้นส่วนของเส้นใยใส่ลงในหลอด 1.5 ml tube จากนั้นใส่ lysis solution 400 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที นำออกมาใส่ chloroform 600 μ l ทันทันทีและกลับหลอด 3-5 ครั้งเบาๆ นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นย้ายน้ำส่วนบนใส่ลงในหลอดใหม่และใส่ precipitation solution (ที่เตรียมใหม่) 800 μ l เขย่าเบาๆ โดยการกลับหลอดนาน 2 นาที และ centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที รินเอาส่วนน้ำทิ้งไป และล้าง DNA pellet ใน 1.2 M NaCl solution 100 μ l vortex เบาๆ ให้ DNA pellet ละลาย จากนั้นใส่ ethanol ที่เย็นจัด 300 μ l ลงไป ปล่อยให้ DNA ตกตะกอนที่ -20°C นาน 10 นาที และปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ริน ethanol ออก และใส่ 70%

ethanol ที่เย็นจัด 100 μ l และปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นละลาย DNA ใน TE sterile ด้วยการ vortex เบาๆ เก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป

ทำ PCR (polymerase chain reaction) ของ DNA ที่สกัดไว้ โดยใช้ primers ITS5 และ LR5 หรือ LR7 เพื่อ amplify ในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) และ large-subunit (LSU) rDNA PCR mixture ประกอบด้วย DNA ตัวอย่าง 0.5 μ l, 10x Ex Tag buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l, ExTag 0.5 μ l, ITS5 (10pmol/ μ l) 1 μ l, LR5 (10pmol/ μ l) 1 μ l, sterile deionized water 38 μ l รวม 50 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (My Genie 32 Thermal Block, BiONEER) โดยมี cycle ดังนี้ คือ initial denaturation ที่ 94 °C 5 นาที 30 cycle ของ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที, annealing ที่ 55 °C 45 วินาที, และ extension ที่ 72 °C 2 นาที นำ PCR product มา run บน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

4. ทำ direct sequence ในส่วนของ ITS1, ITS2 และ บางส่วนของ Large subunit โดยใช้ primers ITS3, ITS4, ITS5, LROR, LR3, LR16 และ LR5 ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ทิศทางของ primers ที่ใช้หาลำดับดีเอ็นเอในการทดลองนี้

5. ทำการหาลำดับข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ (sequence) และวิเคราะห์ผล โดยทำ multiple alignment ใน gene sequence ที่ได้โดยใช้ DNASIS-MAC V3.7 (Hitachi) โดยใช้ Higgins's method โดยในขั้นแรกได้ทำการวิเคราะห์ในส่วนของ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 gene เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน database โดยการทำ BLAST search จากนั้นวิเคราะห์ DNA sequence ในส่วนของ LSU rDNA sequence เพื่อเปรียบเทียบกับผล DNA sequence ที่มี submit อยู่ใน database และสร้าง phylogenetic tree

ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอถูก aligned โดยใช้ CLUSTAL W package และเช็คด้วยตา ใช้โปรแกรม MEGA4 ในการสร้าง neighbor-joining trees โดยใช้ bootstrap 1000

ผลและวิจารณ์

1. ในขั้นแรกสามารถเก็บตัวอย่างเม็ดเส้นใยราที่เจริญอยู่ในสวนเห็ด ในรังปลวกชนิดต่างๆ ในอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรีได้ในทุกจีนัสของปลวกที่มีรายงานว่า เป็นปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทย คือ *Macrotermes*, *Microtermes*, *Hypotermes*, *Odontotermes* และ *Ancistrotermes* ตามตารางที่ 1 ในกรณีของดอกเห็ด ได้ทำการขอซื้อจากชาวบ้านที่นำมาวางขายจึงไม่สามารถระบุชนิดของปลวกได้

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของปลวกและจำนวน isolate ของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้

รหัสตัวอย่าง	จำนวน isolate เห็ดโคนที่แยกได้/รัง	ชนิดปลวก*
No.1, 3, 14	1/4/1	<i>Odontotermes proformosanus</i>
No.2, 12, 13	2/5/4	<i>Hypotermes makhimensis</i>
No.6	5	<i>Ancistrotermes pakistanicus</i>
No.8	2	<i>Odontotermes maesodensis</i>
No.11	3	<i>Macrotermes carbonarius</i>
No.15	2	<i>Microtermes obesi</i>
Mushroom 1	1	unknown
Mushroom 2	1	unknown

หมายเหตุ *จัดจำแนกชนิดของปลวกโดยนางสาวกฤษณา ซายกวอด สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้

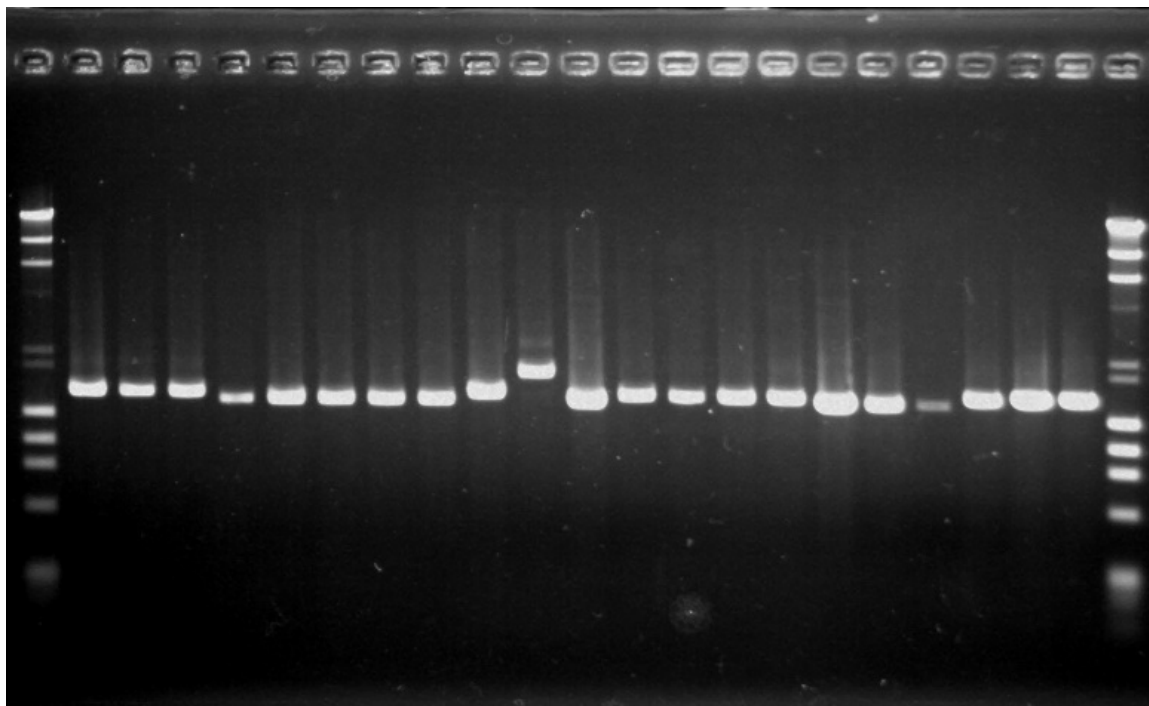
2. ได้ทำการแยกเชื้อเห็ดโคนให้บริสุทธิ์ และทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ได้ทั้งสิ้น 40 isolate แต่หลังจากทำการถ่ายเชื้อไปเรื่อยๆ พบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญเร็วกว่าเห็ดโคน ทำให้เหลือเชื้อเห็ดโคนเพียง 31 isolate

3. นำเชื้อเห็ดโคน ที่เจริญบนอาหาร PDA มาสกัดดีเอ็นเอ และทำ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ITS5 และ LR5 เพื่อ amplify ในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) และ large-subunit (LSU) rDNA และทำ direct sequence เนื่องจากประสบปัญหาไม่สามารถโคลนได้สำเร็จ ทำการ sequence โดยใช้ primers ITS3, ITS4, ITS5, LROR, LR3, LR16 และ LR5 ผลการวิเคราะห์ nucleotide sequence ที่ได้โดยใช้โปรแกรม MEGA5 ในการสร้าง neighbor-joining trees และใช้ค่า bootstrap 1000

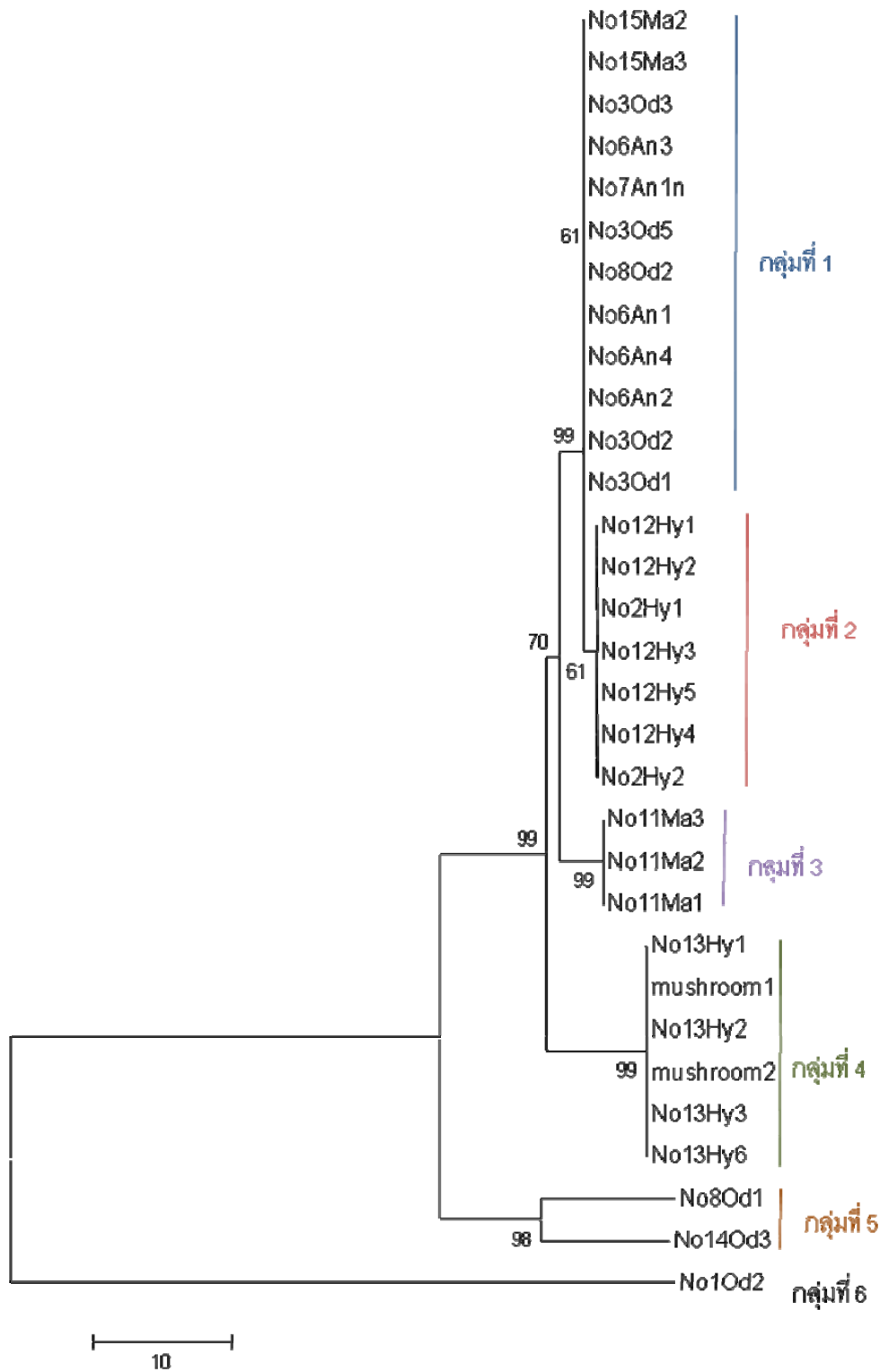
โดยใช้พื้นฐานของ sequence similarity และ phylogenetic analysis ในส่วนของ ITS sequence สามารถจัดกลุ่มของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยส่วนใหญ่แล้ว เชื้อที่แยกได้จากรังเดียวกันจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นในกลุ่มที่ 1 ที่มีความหลากหลายของเชื้อเห็ดที่ได้จากต่างรัง และต่างชนิดของปลวกอยู่ในกลุ่มนี้ แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับปลวกที่มันอาศัยอยู่ร่วมด้วย ในกรณีของกลุ่มที่ 4 เชื้อที่แยกได้จากดอกเห็ด (mushroom 1 และ mushroom2) นั้น คณะผู้วิจัยไม่ทราบชนิดของปลวกที่เห็ดนี้อาศัยอยู่ด้วย เนื่องจากได้มาจากการซื้อจากชาวบ้านในบริเวณที่ไปเก็บตัวอย่างที่นำมา

วางขาย จาก phylogenetic tree ที่ได้ ระบุว่าเป็นไปได้ว่าเห็ดโคนชนิดนี้อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงราในจีนัส *Hypotermes* sp.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

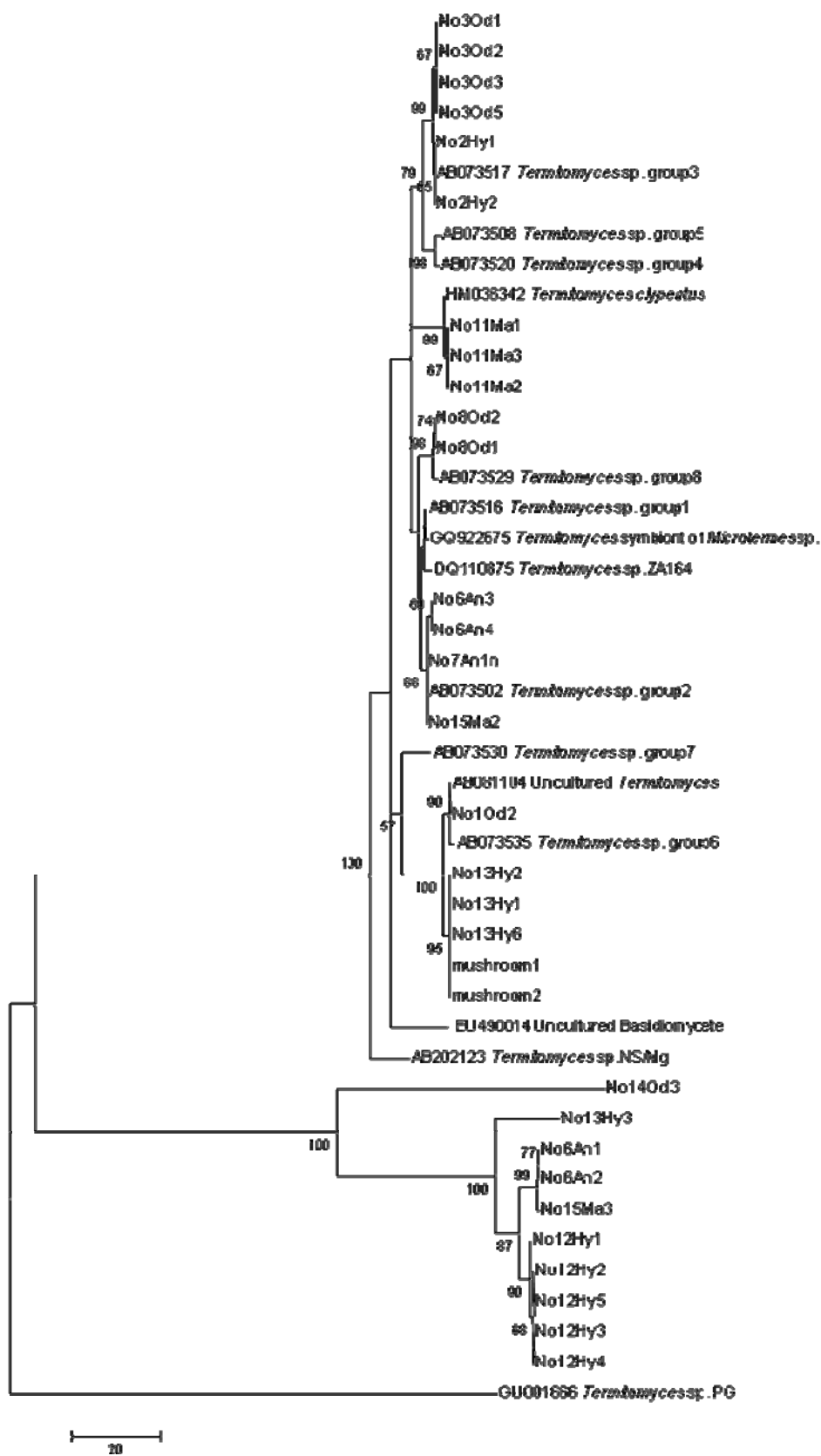


ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลการ run PCR product บน 1% agarose gel ที่ 100 V นาน 30 นาที โดยใช้ตัวอย่าง 3 μ l และ Marker 5 μ l แถวที่ 1 marker DNA 017, แถวที่ 2 เชื้อเห็ดโคน No.12 Hy 2, แถวที่ 3 เชื้อเห็ดโคน No.12 Hy 3, แถวที่ 4 เชื้อเห็ดโคน No.12 Hy 5, แถวที่ 5 เชื้อเห็ดโคน No.13 Hy 2, แถวที่ 6 เชื้อเห็ดโคน No.13 Hy 3, แถวที่ 7 เชื้อเห็ดโคน No.13 Hy 4, แถวที่ 8 เชื้อเห็ดโคน No.13 Hy 6, แถวที่ 9 No.1 Od 2, แถวที่ 10 เชื้อเห็ดโคน No.3 Od 4, แถวที่ 11 No10 Ma1, แถวที่ 12 Mushroom1, แถวที่ 13 No6 An2, , แถวที่ 14 No6 An4, , แถวที่ 15 No6 An3, , แถวที่ 16 No12 Hy 1, , แถวที่ 17 No.13 Hy 1, , แถวที่ 18 No13 Hy5, , แถวที่ 19 No13 Hy 7, , แถวที่ 20 No15 Ma1, , แถวที่ 21 No15 Ma2, , แถวที่ 22 No 15 Ma3 และ , แถวที่ 23 marker DNA 017



ภาพที่ 5 การจัดกลุ่มเชื้อราเห็ดโคนที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลในส่วนของ ITS region โดยใช้พื้นฐานของ sequence similarity และ phylogenetic analysis

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์หาลำดับ sequence บางส่วนในส่วนของ large subunit ทุกตัวอย่าง เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน database ที่คณะผู้วิจัยได้เคยศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ รวมถึงเปรียบเทียบกับข้อมูลใน database ในตัวอย่างจากแหล่งอื่นๆด้วย ผลการวิเคราะห์ การทำ phylogenetic tree ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 neighbor-joining trees เปรียบเทียบระหว่างเชื้อราเห็ดโคนที่แยกได้จากการทดลองนี้ เปรียบเทียบกับ เชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานทำการทดลองอื่นที่จังหวัดอื่นๆในประเทศไทยและตัวอย่างเห็ดโคนที่มีใน database

จาก Phylogenetic tree ที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่คณะผู้วิจัยเคยทำ (Taprab et al, 2002) พบว่าตัวอย่าง No.2 ที่แยกได้จากรังปลวก *Hypotermes makhmensis* จากจังหวัดกาญจนบุรีทั้งสองสายพันธุ์ มีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. (AB073517) ที่แยกได้จากรังปลวก *Hypotermes* sp. จากจังหวัดสระบุรี และ ตัวอย่าง No.8 ที่แยกได้จากรังปลวก *Odontotermes maesodensis* จากจังหวัดกาญจนบุรีมีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. (AB073529) ที่แยกได้จากรังปลวก *Macrotermes annandalei* จากจังหวัดจันทบุรี ส่วนตัวอย่าง No.15 ที่แยกได้จากรังปลวก *Microtermes obesi* จากจังหวัดกาญจนบุรีมีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. ในกลุ่ม 2 (AB073502) ในงานวิจัยของ Taprab et al. (2002) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากปลวก 2 ชนิดและจากสองแหล่งคือ จากปลวก *Microtermes* จากจังหวัดปราจีนบุรี และจากปลวก *Odontotermes* จากจังหวัดจันทบุรี ในกรณีของ ตัวอย่าง No.1 ที่แยกได้จากรังปลวก *Odontotermes proformosanus* จากจังหวัดกาญจนบุรีมีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. (AB073535) ที่แยกได้จากรังปลวก *Odontotermes* sp. จากจังหวัดนครราชสีมา (Taprab et al, 2002) และใกล้เคียงกับ uncultured *Termitomyces* sp. (AB081104) ที่สกัดดีเอ็นเอได้จากสวนเห็ดราของปลวก *Odontotermes* จากจังหวัดกาญจนบุรี (Moriya et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าเห็ดโคนหนึ่งสายพันธุ์มีการแพร่กระจายเกือบทั่วทุกพื้นที่ของประเทศไทยและไม่มี ความจำเพาะเจาะจงกับปลวกที่มันอาศัยอยู่ด้วย

การทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุการแพร่กระจายของเห็ดโคนในจังหวัดกาญจนบุรีได้ เนื่องจากการเก็บตัวอย่างทำแต่ในบริเวณอำเภอทองผาภูมิ ดังนั้น จากการทดลองนี้ จึงสามารถบอกได้เพียงว่ามีเชื้อเห็ดโคนในเขตอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี มีความหลากหลายอย่างน้อย 6 สายพันธุ์ ซึ่งดูได้จากผลการทำ phylogenetic analysis ที่ระบุว่าสามารถแยกเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ออกเป็น 6 กลุ่ม แต่ยังไม่สามารถระบุ species ที่แน่นอนได้ เนื่องจากข้อมูลในฐานข้อมูลยังมีจำกัด ประกอบกับระยะที่ไปเก็บตัวอย่างไม่มีเห็ดโคนเจริญอยู่บริเวณรอบรังปลวก และเมื่อเห็ดโคนออกดอกจะมีชาวบ้านออกมาเก็บอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีราคาแพง จึงเป็นการยากที่จะได้ดอกเห็ดจากรังปลวกโดยตรง จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดเพื่อระบุ species ของเห็ดได้ ในเห็ดโคน 6 สายพันธุ์นี้ มีบางสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานว่าพบในบริเวณจังหวัดสระบุรี ปราจีนบุรี นครราชสีมา และ จันทบุรี แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนมีการแพร่กระจายไปได้ไกล ดังนั้นจึงควรมีการทดลองศึกษาเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนจากทั่วทุกภาคของประเทศไทยเพื่อจะได้ทราบถึงสายพันธุ์เห็ดโคนที่พบในประเทศไทย จัดเก็บเป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเห็ดโคนและความสัมพันธ์กับชนิดของปลวก

สรุปและเสนอแนะ

จากผลการทดลองนี้ จะเห็นว่าชนิดของเห็ดโคนในแต่ละสถานที่ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกัน แสดงว่าเห็ดโคนมีการแพร่กระจายได้เป็นบริเวณกว้าง แต่การที่จะระบุว่าเห็ดโคนในแต่ละสถานที่เป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ จำเป็นมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลด้วย เพื่อที่จะได้ทราบว่าดีเอ็นเอที่เราสกัดได้เป็นของเห็ดโคนจีนส์และสปีชีส์อะไร เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดโคนส่วนใหญ่จะทำแยกกันระหว่างการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยากับการศึกษาทาง

โมเลกุล ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดของเห็ดโคนให้แน่นอน ดังนั้นการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางโมเลกุลจึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาและรายงานลงในฐานข้อมูลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกรียตี. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก(เห็ดโคน) ครั้งที่1.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก(เห็ดโคน) ครั้งที่1.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร.

ยุพาพร สรณวัตร. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก(เห็ดโคน) ครั้งที่1.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร.

ยุพาพร สรณวัตร และ จารุณี วงศ์ข้าหลวง. 2546. **ปลวกและบทบาทในระบบนิเวศน์.**

สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจและผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้.

Abe, T., D.E. Bignell and M. Higashi. 2000. **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology.**

Kluwer Academic Publishers.

Korb, J. and D.K. Aanen. 2003. The evolution of uniparental transmission of fungal symbionts in

fungus-growing termites (Macrotermitinae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 53: 65-71.

Moriya S., T. Inoue, M. Okhuma, Y. Taprab, T. Johjima, P. Suwanarit, U. Sangwanit, C.

Vongkaluang, N. Noparatnaraporn and T. Kudo. 2005. Fungal Community Analysis of

Fungus Gardens in Termite Nests. **Microbes and Environments.**20(4): 243-252.

Ohkuma, M. 2003. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **App.**

Microbiol. Biotechnol. 61: 1-9.

Slaytor, M. 1992. Cellulose digestion in termites and cockeoches: What role do symbionts play.

Comp. Biochem. Physiol. 103B (4): 775-784.

Taprab, Y., M. Ohkuma, T. Johjima, Y. Maeda, S. Moriya, T. Inoue, P. Suwanarit, N.

Noparatnaraporn and T. Kudo. 2002. Molecular Phylogeny of Symbiotic Basidiomycetes of

Fungus-growing Termites in Thailand and Their Relationship with the Host. **Biosci.**

Biotechnol. Biochem. 66 (5): 1159-1163.