

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	อนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสสิกและศักยภาพการเป็นฟรีไบโอดิกของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Nostochopsis</i> spp. จากภาคเหนือของประเทศไทย
ผู้เขียน	นางสาวมานิตา โมธรรม
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี พิรพรพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชชาติชาย โชนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. จีรพร เพกเกาะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Nostochopsis spp. เป็นกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่กินได้ มีการเจริญโดยก่อตัวเป็นโคโลนีขนาด 0.1-8 เซนติเมตร ลักษณะเป็นก้อนเมือกหนาบเหนียว ก้อนกรวด หรือแผ่นปูนซีเมนต์ใต้น้ำในลำธารหรือแม่น้ำตื้นที่มีน้ำใส จัดอยู่ใน ไฟลัม Cyanobacteria ออเดอร์ Nostocales และแฟมิลี Hapalosiphonaceae เก็บตัวอย่าง *Nostochopsis* spp. ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเมษายน 2554 จาก 9 จุด ได้แก่ ตัวอย่างจากบ่อน้ำบริเวณเรือนกระจกสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 4 จุด ที่จังหวัดน่านคือ แม่น้ำน่าน 2 จุด แม่น้ำยาว 1 จุดเก็บตัวอย่าง และจังหวัดแม่ฮ่องสอน 2 จุดเก็บตัวอย่าง พบว่าคุณภาพน้ำของจุดเก็บตัวอย่างทุกจุดอยู่ในระดับดีถึงปานกลาง การบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนและเติม Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดจีโนมิก DNA จาก *Nostochopsis* spp. เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอสูง ลดการปนเปื้อนจากโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ เหมาะแก่การนำไปเป็น template สำหรับการทำพีซีอาร์ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายใน

เซลล์ และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยศึกษาชิ้น 16S rDNA ด้วยลำดับเบสของ 16S-23S ITS และ *nifH* ยีน จาก 10 ไอโซเลต พบว่า *Nostochopsis* มีความคล้ายคลึงกับ *Fischerella*, *Hapalosiphon* และ *Westiellopsis* 98% *Nostochopsis* sp.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Nostochopsis* sp. HA4207-MV1 98% และบางไอโซเลตอาจจะเป็นจิ้นส์ใหม่

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียพวกนี้ด้วยสูตรอาหาร BG-11 ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และใช้หินปูนเป็นที่ยึดเกาะเป็นเวลา 2 เดือน ได้ชีวมวล 1,061 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อลิตร และพบว่าการใช้สิ่งยึดเกาะมีความสำคัญต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียพวกนี้

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดคือ 49.03 ± 0.08 (w/w) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 49.28 ± 5.08 % (w/w) ($p < 0.05$) ซึ่งพบในตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน น้ำตาลรีดิซ สูงสุดคือ 7.16 ± 0.26 % (w/w) ($p < 0.05$) พบในตัวอย่างจากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ขนาดพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ระหว่าง 6-9 ซึ่งประกอบด้วยมโนแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กรดกลูโคโรนิก กาแลคโตส กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส และแรมโนส การศึกษาการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ (DP9) และ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (DP4) เพื่อดูความสามารถในการเป็นพรีไบโอติก โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสม พบว่า เชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติก คือ *Lactobacillus fermentum* CM33 สามารถเจริญได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Salmonella enteritidis* และเชื้อประจำถิ่น *Escherichia coli* O157:H7 ได้

Thesis Title Polyphasic Taxonomy and Prebiotic Potential of
Cyanobacteria *Nostochopsis* spp. from Northern Thailand

Author Miss Manita Motham

Degree Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Associate Professor Dr. Yuwadee Peerapornpisal	Advisor
Assistant Professor Dr. Chartchai Khanongnuch	Co-advisor
Lecturer Dr. Wasu Pathom-aree	Co-advisor
Lecturer Dr. Jeeraporn Pekkoh	Co-advisor

ABSTRACT

Nostochopsis spp. are edible cyanophyte which form thick mucilaginous colonies, 0.1-8 cm in diameter, attached on under water rocks, cobbles or concrete blocks in transparent shallow streams or rivers. They are classified in the Phylum Cyanobacteria, Order Nostocales and Family Hapalosiphonaceae. *Nostochopsis* spp. were collected during November 2010 to April 2011 from nine sampling sites. Four sampling sites were glass houses of Queen Sirikit Botanical Garden, Mae Rim, Chiang Mai Province, two were at Nan River, one was at Nam Yao River, Nan Province and two were at Mae Hong Son Province. The water quality at all sampling

sites were clean - moderate. Crushing cells with liquid nitrogen with the addition of Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) was most suitable for *Nostochopsis* spp. genomic DNA extraction to obtain high amount of DNA and reduce contamination from proteins and polysaccharides. The DNA is suitable for PCR template. Morphological and ultrastructural studies as well as evolutionary relationship by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene with the 16S-23S intergenetic segment and *nifH* gene of 10 isolates were conducted. Isolates of *Nostochopsis* were 98% similar to *Fischerella*, *Hapalosiphon* and *Westiellopsis*. *Nostochopsis* sp.2 showed 98% similarity with *Nostochopsis* sp. HA4207-MV1. Some isolates may be new genus.

The biomass yield of $1,061 \pm 0.01$ mg dry wt.l⁻¹ was obtained when this cyanobacteria was grown in BG-11 medium without nitrogen source for 2 months using limestone as substrate. It was also found that, the substrate was essential for cyanobacterial growth.

Polysaccharides were extracted by hot water method. The highest polysaccharide content of $49.03 \pm 0.08\%$ (w/w) ($p < 0.05$) and the highest total sugar of $49.28 \pm 5.08\%$ w/w were obtained in the samples from Nan River. The highest reducing sugar was $7.16 \pm 0.26\%$ (w/w) ($p < 0.05$) in the samples from Queen Sirikit Botanical Garden. Degree of polymerization of polysaccharide (DP) varied from 6-9. The monosaccharides from *Nostochopsis* were glucuronic acid, galactose, glucose, fructose, mannose and rhamnose. The possibility of using polysaccharide (DP9) and oligosaccharide (DP4) from *Nostochopsis* as prebiotic was determined in pure and mixed cultivation. It was found that a probiotic species; *Lactobacillus fermentum* CM33 was able to grow. However, no growth inhibition of pathogenic species; *Salmonella enteritidis* and a normal flora; *Escherichia coli* O157:H7 were observed.