

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก (aerobic endospore-forming rod bacteria) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) อย่างไรก็ตามบางชนิดเป็น gram variables โดยเซลล์ติดสีย้อมแบบแกรมไม่ชัดเจน เช่น *B. thermosphaericus* (Berkeley, et al., 2002, pp.100-116), *B. horti* (Yumoto, Yamazaki and Sawabe, 1998, pp.565-571), *B. oleronius* (Berkeley, et al., 2002, pp.100-116) และ *B. azotoformans* (Pichinoty, et al., 1983, pp.660-662) แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างเอนโดสปอร์ (endospores) ภายในเซลล์ปกติ (vegetative cells) ในสภาวะมีออกซิเจน (aerobic condition) ยกเว้นบางชนิดไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ เช่น *B. thermoamylovoran* (Combet-Blanc, Ollivier and Streicher, 1995, pp.9-16) และ *B. halodenitrificans* (Denariaz, Payne, and Gall, 1989, pp.145-151) การสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ กล่าวคือ มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนโดสปอร์ เพื่อเข้าสู่ระยะพัก (resting stage) และสร้างเอนโดสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (O' Leary, 1990, pp.109-115)

แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกมี mode of nutrition แบบ chemoheterotroph เมตาบอลิซึมเป็นแบบ aerobic หรือ facultative anaerobic ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามบางชนิดสามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอย่างแท้จริง (strictly anaerobic condition) เช่น *B. arseniciselenatis* (Boone and Zhao, 1995, pp.441-448) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดตั้งแต่โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เมทานอล (methanol) จนถึงสารโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนเช่น เซลลูโลส (cellulose) และไคติน (chitin) (Wisotzkey, et al., 1992, pp.263-269) เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์มีเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน และธาตุอาหารหลักอื่นที่หลากหลายส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งอาศัยต่างๆ บนพื้นผิวโลก หรือมีความหลากหลายของแหล่งอาศัยหรือความหลากหลายเชิงนิเวศ (ecological diversity) (Berkeley, et al., 2002, pp.47-61)

การจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

ปี ค.ศ.1980 นักอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (bacterial taxonomists / systematicists) รวบรวมแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ไว้ในหนังสือ Approved List of Bacterial Names โดยจัดหมวดหมู่แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็น 4 สกุล โดยสกุล *Bacillus* เป็นสกุลใหญ่ที่สุด (Berkeley and All, 1994, pp.1-8) ปัจจุบันพบแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก จำนวนมากกว่า 25 สกุล และมากกว่า 200 ชนิด (Fritze, 2004, pp.1245-1248; Garrity, Bell, and Lilburn, 2003; Garrity, et al., 2007) รายละเอียดของการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกตามลำดับอนุกรมวิธานเป็นโดเมน (Domain) อาณาจักร (Kingdom) หมวด (Phylum) ชั้น (Class) อันดับ (Order) วงศ์ (Family) สกุล (Genus) และชนิด (species) สรุปในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

การจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก
Domain Bacteria
Phylum <i>Firmicutes</i>
Class <i>Bacilli</i>
Order <i>Bacillales</i>
Family <i>Bacillaceae</i>
Genus <i>Bacillus</i>
Genus <i>Anoxybacillus</i>
Genus <i>Filobacillus</i>
Genus <i>Geobacillus</i>
Genus <i>Gracilibacillus</i>
Genus <i>Halobacillus</i>
Genus <i>Jeotgalibacillus</i>
Genus <i>Lentibacillus</i>
Genus <i>Marinibacillus</i>

ตาราง 1 (ต่อ)

การจัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

Genus *Oceanobacillus*

Genus *Paraliobacillus*

Family *Alicyclobacillaceae*

Genus *Alicyclobacillus*

Genus *Pasteuria*

Genus *Sulfobacillus*

Family *Paenibacillaceae*

Genus *Paenibacillus*

Genus *Ammoniphilus*

Genus *Aneurinibacillus*

Genus *Brevibacillus*

Genus *Pasteuria*

Genus *Thermobacillus*

Family *Sporolactobacillus*

Genus *Sporolactobacillus*

Family *Thermoactinomycetaceae*

Genus *Thermoactinomyces*

Family *Turcibacteraceae*

Genus *Turcibacter*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Fritze, 2004, pp.1245-1248

การจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

พัฒนาการด้านการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก มีความต่อเนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบัน รายละเอียดสรุป ในภาพ 1 ซึ่งการจัดจำแนกชนิดในระยะต้นพิจารณาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) โดยเฉพาะการเปรียบเทียบลักษณะของการสร้างและตำแหน่งที่พบ เอนโดสปอร์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาจากเซลล์เป็นสปอร์ อย่างไรก็ตามในเวลา ต่อมา มีการขยายตัวของการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญใน สภาวะแอโรบิก โดยเฉพาะการคัดแยก และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ดังนั้น การจัดจำแนกชนิดโดยพิจารณาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาจึงมีข้อจำกัดและขาดความถูกต้อง แม่นยำ นักอนุกรมวิธานแบคทีเรียจึงนำคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) ด้านต่างๆ เช่น คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) คุณสมบัติทาง สรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics) คุณสมบัติทางเคมี (chemical characteristics) และคุณสมบัติทางพันธุกรรม (genetic characteristics) เพื่อใช้ในการ จัดจำแนกชนิดของกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ร่วมกับการ พัฒนาหลักการจัดจำแนกชนิดโดยพิจารณาลักษณะทางฟีโนไทป์เชิงเปรียบเทียบตามหลักการ อนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัล (numerical taxonomy) ต่อมาเมื่อเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเฉพาะดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเทคโนโลยี มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว นักอนุกรมวิธานแบคทีเรีย จึงนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามหลักการของไฟโลเจนี (phylogenetic approach) ซึ่งใช้การเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียผ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ในบริเวณยีนที่มีเหมาะสมในการใช้เป็น phylogenetic chronometer เช่น ribosomal RNA genes หรือ rDNA รวมทั้ง housekeeping genes เป็นต้น (La Duc, et al, 2004, pp.383-394; Jensen, et al, 2005, pp.113-120; Ki, et al, 2009, pp.48-57)

มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากกว่า species cut-off line ที่กำหนด (Priest and Austin, 1993, pp.14-49)

ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกตามหลักการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม คือ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristics) คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางเคมี เช่น รูปร่างเซลล์ (cell shape) การเคลื่อนที่ (motility) การสร้างสปอร์ (sporulation) ความต้องการออกซิเจนในการเจริญ (oxygen requirement) การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) ความสามารถในการรีดิวซ์ซัลเฟต (sulfate reduction) ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ (sugar fermentation) (Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207; Holt, et al., 1994, pp.559-564) เป็นต้น โดย key characters ที่นิยมใช้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือ key characters ของ Gordon, et al. ที่อ้างอิงไว้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) (Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างของสกุล *Bacillus* ในขณะนั้นออกเป็น 21 ชนิด ต่อมา Priest, et al. (Priest et al., 1988, pp.1847-1882) ผูก key characters ของ Gordon, et al. ร่วมกับ key characters ของคณะนักวิจัยอื่นๆ ในการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ซึ่งในขณะนั้นหมายถึงสกุล *Bacillus* และสกุลที่ใกล้เคียง (*Bacillus* and related genera) โดยใช้ 118 คุณสมบัติทดสอบกับ 368 สายพันธุ์และกำหนด species cut-off line ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 83 เปอร์เซ็นต์ และ phenotypic-group cut-off line ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งกลุ่มสกุล *Bacillus* และสกุลที่ใกล้เคียงตามลักษณะทางฟีโนไทป์ได้ 4 กลุ่มคือ กลุ่ม *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *B. brevis* และ thermophiles ทั้งนี้จัดจำแนกได้ทั้งหมด 38 ชนิด ดังแสดงในตาราง 2 และจากการศึกษาของ Priest, et al. (1998) ตามหลักการอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลพบว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์มีความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์บางประการที่เด่นชัด ทำให้มีแนวคิดจัดเป็น taxospecies ใหม่ อย่างไรก็ตามในกลุ่มของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเจริญในสภาวะแอโรบิกที่มีความใกล้เคียงกันมาก เช่น *B. thuringiensis*, *B. cereus* และ *B. mycooides* ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดออกจากกันได้อย่างเด็ดขาด ดังนั้น Priest, et al. เสนอให้จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวตามหลักการไฟโล-จีนิ์ ร่วมกับอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลเพื่อจัดหมวดหมู่ใหม่ให้กับสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียง ภายหลังจากจัดหมวดหมู่ใหม่ Reva, et al. (2001) จัดจำแนกและเทียบเคียงแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเจริญในสภาวะแอโรบิก กลุ่ม mesophiles ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปกติ

ประมาณ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส และกลุ่ม neutrophiles ซึ่งเจริญได้ดีที่ pH~7 โดยใช้หลักการ จัดจำแนกและเทคนิคของ Gordon, et al. (Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) ทำให้สามารถ จัดหมวดหมู่แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเจริญในสภาวะแอโรบิก ตามรายละเอียดสรุป ดังภาพ 2 (Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371) ต่อมาผู้วิจัยหลายคณะทำ การพัฒนาชุดทดสอบโดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียในทางการค้า เรียกว่าระบบ API (API system) ซึ่งชุดทดสอบ API 20E และชุดทดสอบ API 50E มีประสิทธิภาพ เพียงพอในการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ ตลอดจนสะดวก รวดเร็ว และสามารถให้ผลในการทำซ้ำ (reproducibility) ได้ดีกว่าวิธีดั้งเดิม อย่างไรก็ตามชุดทดสอบมีราคาแพงกว่าวิธีดั้งเดิม (Logan and Berkeley, 1984, pp.1871-1882) รวมทั้งประสิทธิภาพที่จำกัดในการใช้จัดจำแนกชนิดของ แบคทีเรียที่แยกจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ

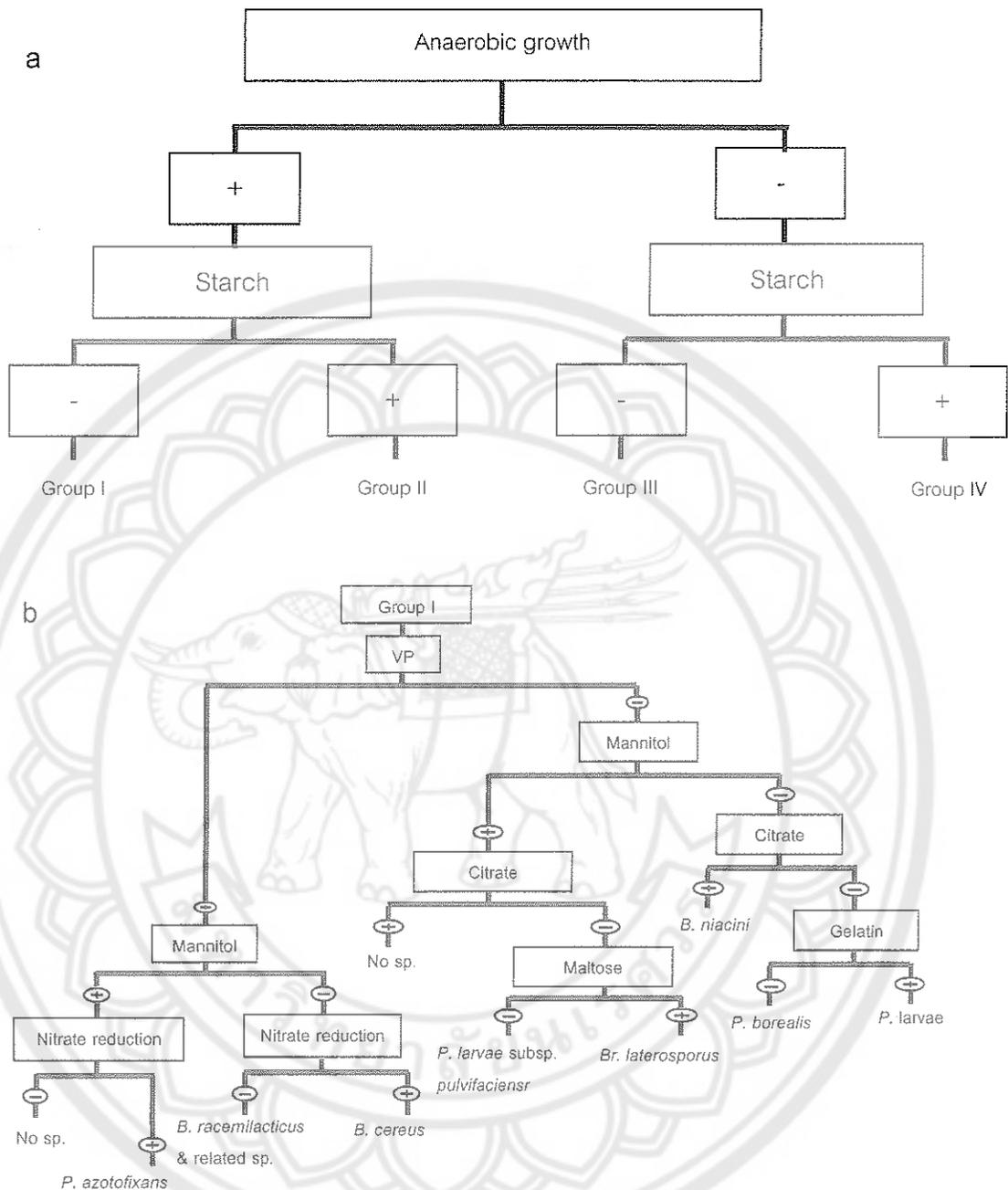
ตาราง 2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญใน สภาวะแอโรบิก

กลุ่มฟิโนไทป์	ชนิด	ลักษณะทางฟิโนไทป์ภายในกลุ่ม
<i>B. polymyxa</i>	<i>B. circulans</i> , <i>B. lautus</i> , <i>B. lentimorbus</i> , <i>B. popilliae</i> , <i>B. psychrosaccharolyticus</i> , <i>B. alvei</i> , <i>B. amylolyticus</i> , <i>B. azotofixans</i> , <i>B. larvae</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. macquariensis</i> , <i>B. pabuli</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. pulvifaciens</i> , <i>B. apiarius</i> , <i>B. glucanolyticus</i> , <i>B. thiaminolyticus</i> , <i>B. validus</i>	ดำรงชีวิตแบบ facultative anaerobes เจริญได้ดีในสภาวะ แอนแอโรบิก สามารถสร้างกรด จากการใช้น้ำตาลหลายชนิด เอนโดสปอร์เป็นรูปวงรี sporangia พองโต
<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pantothenicus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. carotarum</i> , <i>B. niacini</i>	ดำรงชีวิตแบบ aerobes เจริญได้ดี ในสภาวะแอโรบิก สามารถสร้าง กรดจากการใช้น้ำตาลหลายชนิด เอนโดสปอร์เป็นรูปวงรี sporangia ไม่พองโต

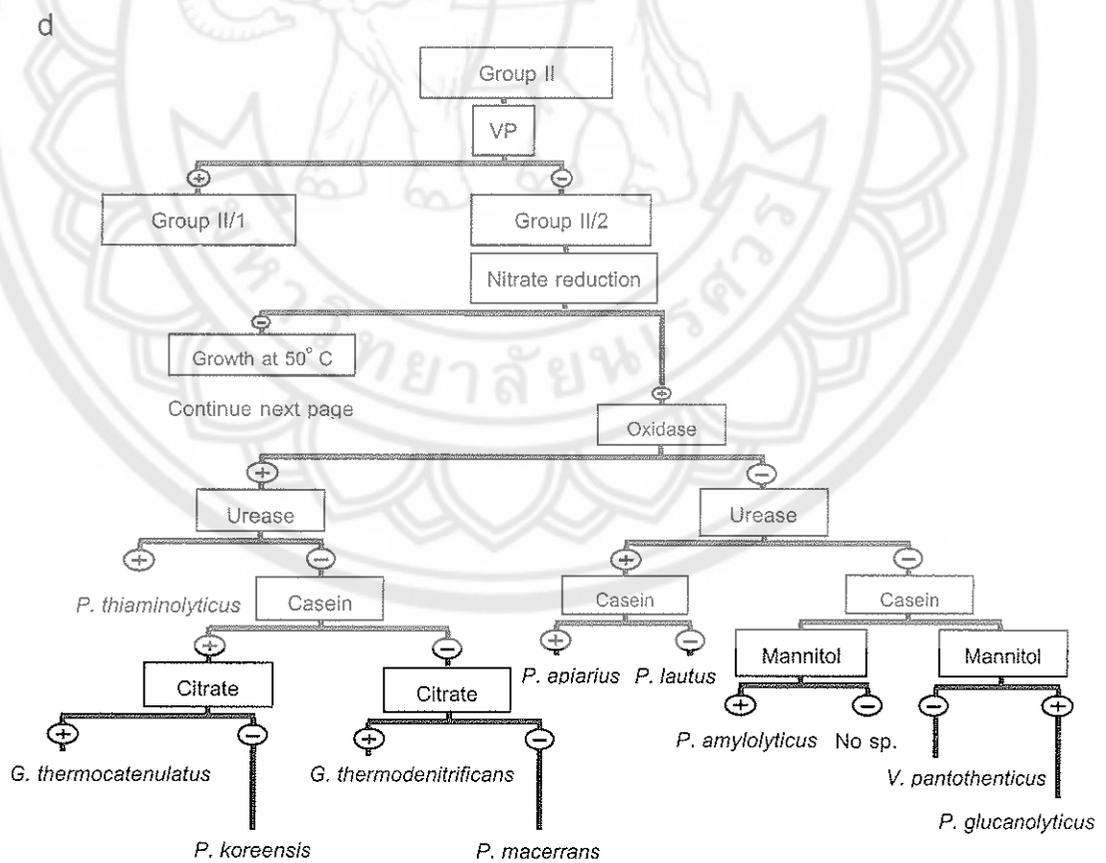
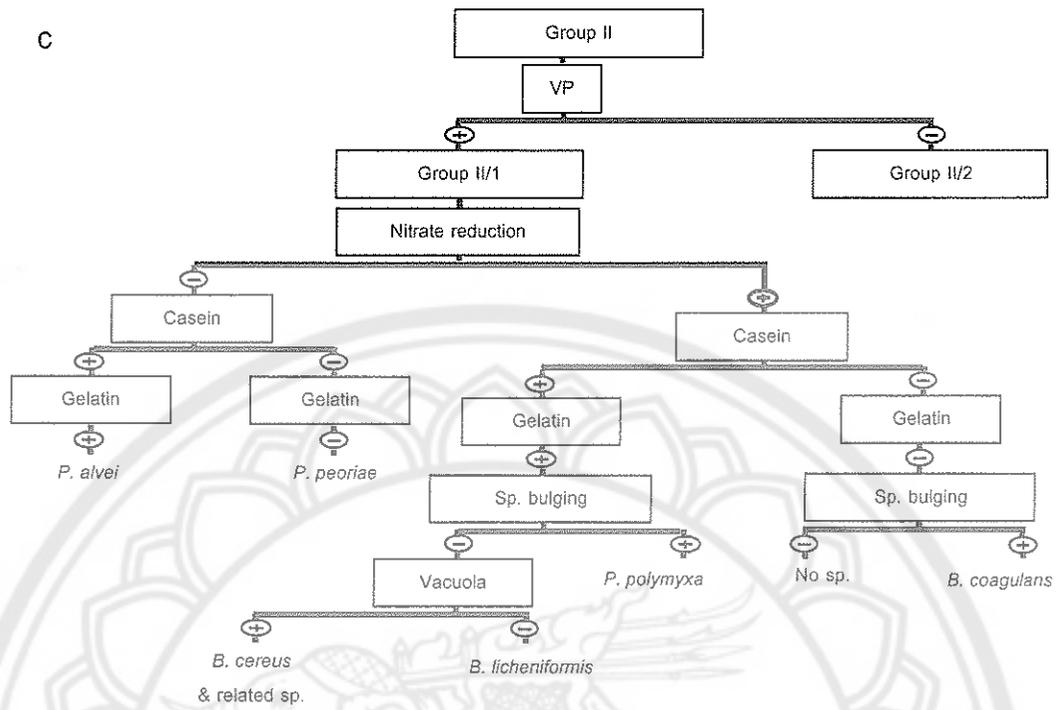
ตาราง 2 (ต่อ)

กลุ่มฟิโนไทป์	ชนิด	ลักษณะทางฟิโนไทป์ภายในกลุ่ม
<i>B. brevis</i>	<i>B. azotoformans</i> , <i>B. badius</i> , <i>B. gordonae</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. aneurinoliticus</i> , <i>B. alginolyticus</i> , <i>B. chondroitinus</i> , <i>B. freudenreichii</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>B. globisporus</i> , <i>B. insolitus</i> , <i>B. pasteurii</i> , <i>B. psychrophilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. aminovorans</i> , <i>B. marinus</i>	ดำรงชีวิตแบบ facultative anaerobes ส่วนใหญ่ไม่สามารถ สร้างกรดจากการใช้น้ำตาล เอนโดสปอร์เป็นรูปวงรีหรือทรงกลม sporangia พองโต
Thermophiles	<i>B. coagulans</i> , <i>B. smithii</i> , <i>B. kaustophilus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. thermoglucosidasius</i> , <i>B. flavothermus</i> , <i>B. pallidus</i> , <i>B. schlegelii</i> , <i>B. thermocatenulatus</i> , <i>B. thermocloacae</i> , <i>B. thermodenitrificans</i> , <i>B. thermooleovorans</i> , <i>B. thermoruber</i> , <i>B. tusciae</i>	สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า

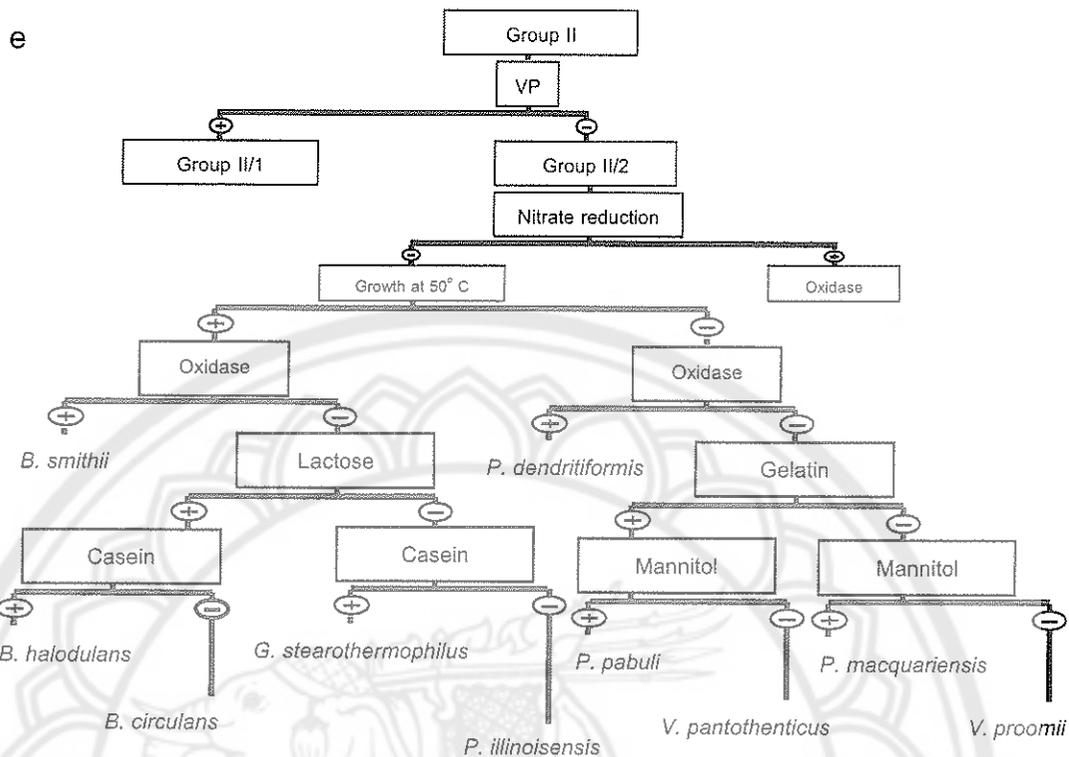
ที่มา: ดัดแปลงจาก Priest, et al., 1988, pp.1847-1882



ภาพ 2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ตามหลักการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม; (a), แผนผังการจัดจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย; (b), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย I; (c), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย II/1; (d), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย II/2 ที่ให้ผล nitrate reduction เป็นบวก; (e), แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มย่อย II/2 ที่ให้ผล nitrate reduction เป็นลบ



ภาพ 2 (ต่อ)



ภาพ 2 (ต่อ)

หมายเหตุ: +, การทดสอบให้ผลบวก; -, การทดสอบให้ผลลบ; B., *Bacillus*; Br., *Brevibacillus*; G., *Geobacillus*; P., *Paenibacillus*; V., *Virgibacillus*; Casein, การย่อยเคซีน; Citrate, การใช้ซิเตรท; Fructose, การหมักฟรุกโตส; Galactose, การหมักกาแลกโตส; Gas, การผลิตแก๊สจากการหมักกลูโคส; Gelatin, การย่อยเจลาติน; Glucose, การหมักกลูโคส; Maltose, การหมักมอลโตส; Mannitol, การหมักแมนนิทอล; NaCl, การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก; Nitrate red., การรีดิวซ์ไนเตรท; ONPG, กิจกรรมของ β -galactosidase ทดสอบโดยการย่อย o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; Salicin, การหมักซาลิซิน; Sp. bulging, sporangia พองโต; Starch, การย่อยแป้ง; Succinate, การใช้ซัคซิเนต; Tyrosine, การย่อยไทโรซีน; Urea, การย่อยยูเรีย; Vacuoles, มีแวคิวโอลในไฮโดพลาสซึม; VP, การทดสอบ Voges-Proskauer

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207; Holt, et al., 1994, pp.559-564; Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371

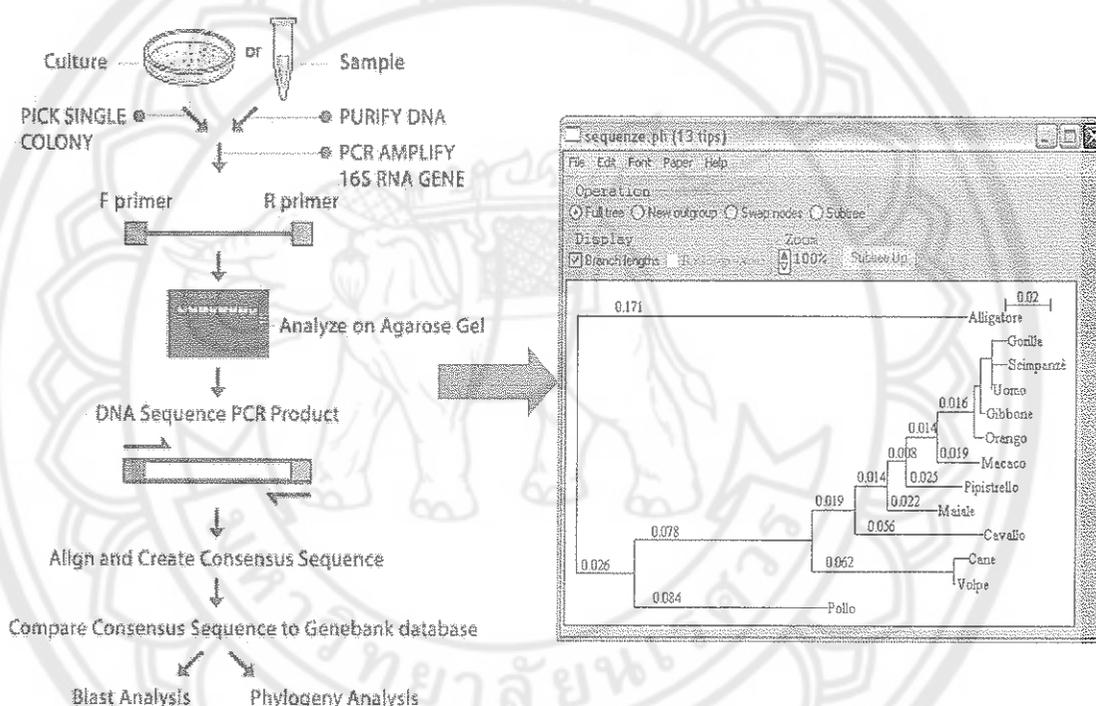
2. การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและไฟโลจีนี

การจัดจำแนกแบบที่เรียตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงาน ผลทดสอบของบางการทดสอบมีความผันแปรขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และสถานะที่ใช้ทดสอบ ทำให้ผลการทดสอบผิดพลาด นำสู่การจัดจำแนกที่ผิด (misidentification) ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและไฟโลจีนี โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rDNA หรือ 16S rDNA ซึ่งเป็นเทคนิคในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน

2.1 การจัดจำแนกโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA genes หรือ SSU rDNA

การจัดจำแนกแบบที่เรียโดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA genes หรือ SSU rDNA เป็นเทคนิคในการจัดจำแนกแบคทีเรียซึ่งได้รับความนิยมแพร่หลาย รวมถึงได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้อง แม่นยำสูง ทำซ้ำได้ และใช้ระยะเวลาสั้น นอกจากนี้สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียโดยใช้ต้นไม้วิวัฒนาการหรือ phylogenetic tree ขั้นตอนในการจัดจำแนกดังกล่าวสรุปในภาพ 3 จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น ส่งผลต่อการปฏิบัติครั้งสำคัญในด้านการจัดจำแนกแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่พบ คือ ในทางปฏิบัติเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสำหรับกรวิจัยที่มีจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวนมาก ซึ่งแยกได้จากแหล่งอาศัยต่างๆ ที่เป็นเป้าหมาย สำหรับการจัดจำแนกตามหลักการดังกล่าวที่สำคัญ คือ ในปี ค.ศ.1991 Ash, et al. โดยทำการศึกษาต่อเนื่องกันมา เริ่มจาก Fox, et al. (Fox, Pechman and Woese, 1977, pp.44-57) ที่ศึกษาสมาชิกในสกุล *Bacillus* ที่ทราบชนิดแล้วจากวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมโดย Gordon, et al. ประกอบด้วย *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* และ *B. pasteurii* โดย Fox, et al. พบว่า *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *B. pumilus* จัดอยู่ในกลุ่มของ phylogenetic tree มีความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันให้เป็น RNA group 1 ส่วนอีก 2 ชนิดคือ *B. stearothermophilus* ให้เป็น RNA group 2 และ *B. pasteurii* ให้เป็น RNA group 3 ซึ่งต่อมา Clausen, et al. (Clausen, Jones and Stackebrandt, 1985, pp.2659-2663) พบว่าสมาชิกในสกุล *Bacillus* บางชนิดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับ filamentous gliding bacterium บางชนิด รวมทั้ง Stackebrandt, et al. (Stackebrandt, et al., 1987, pp.2553-2529) ซึ่งพบว่าสกุล *Bacillus* และสกุล *Sporosarcina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทรงกลมสร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน และมีการศึกษาต่อเนื่องกันมาที่แสดงให้เห็นความสำคัญของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใน

การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้มากยิ่งขึ้น (Berkeley, et al., 2002, pp.8-21) มาจนถึง Ash, et al. ที่ได้จัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สว่าง เอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก สกุล *Bacillus* ผลที่ได้สามารถแบ่งกลุ่ม *Bacillus* ได้ 5 กลุ่ม ดังแสดงในภาพ 4 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นความไม่สอดคล้องกันของผลการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ตลอดจนความหลากหลายทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเสนอให้มีการจัดหมวดหมู่ใหม่ (Ash, et al., 1991, pp.202-206)



ภาพ 3 แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA genes หรือ SSU rDNA

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก http://www.acgtinc.com/specialty_dna_sequencing.htm

2.2 การจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่สำคัญเทคนิคหนึ่งในการใช้จัดจำแนกและจัดกลุ่มแบคทีเรีย โดยอาศัยการเปรียบเทียบรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่กำหนดการสร้าง ribosomal RNA ที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการวิจัยอย่างต่อเนื่องพบว่า รูปแบบ ARDRA หรือรูปแบบ ARDRA สามารถนำไปใช้ยืนยันผลการจัดจำแนกแบคทีเรีย ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ซึ่งให้ผลการจัดจำแนกถูกต้อง แม่นยำ และช่วยลดค่าใช้จ่ายจากการทำ 16S rDNA sequence analysis ซึ่งมีราคาแพง ทั้งนี้เนื่องจากรูปแบบ ARDRA สามารถใช้ประเมินการจัดกลุ่ม และเทียบเคียงสกุลและชนิดของแบคทีเรียก่อนทำ 16S rDNA sequence analysis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับเทคนิค DNA fingerprint นอกเหนือจาก ARDRA ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก มีหลายวิธี ตัวอย่างเช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยแต่ละวิธีมีความสามารถในการจำแนกได้ในลำดับอนุกรมวิธานที่แตกต่างกันคือ RFLP, PFGE, AFLP และ RAPD จำแนกได้ในลำดับอนุกรมวิธานระดับชนิด (species) ไปจนถึงสายพันธุ์ (strains) ในขณะที่ ARDRA สามารถจำแนกในลำดับอนุกรมวิธานระดับสกุลไปจนถึงระดับชนิด เป็นต้น (Savelkoul, et al., 2004, pp.3083-3091) ดังแสดงในภาพ 5 จากเหตุผลดังกล่าววิธี ARDRA จึงได้รับความนิยมในการใช้ร่วมกับ 16S rDNA sequence analysis เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และสกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดในสายวิวัฒนาการ

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
16S rDNA sequencing				
Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)				
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)				
Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)				
Amplified fragment length polymorphism (AFLP)				
Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)				

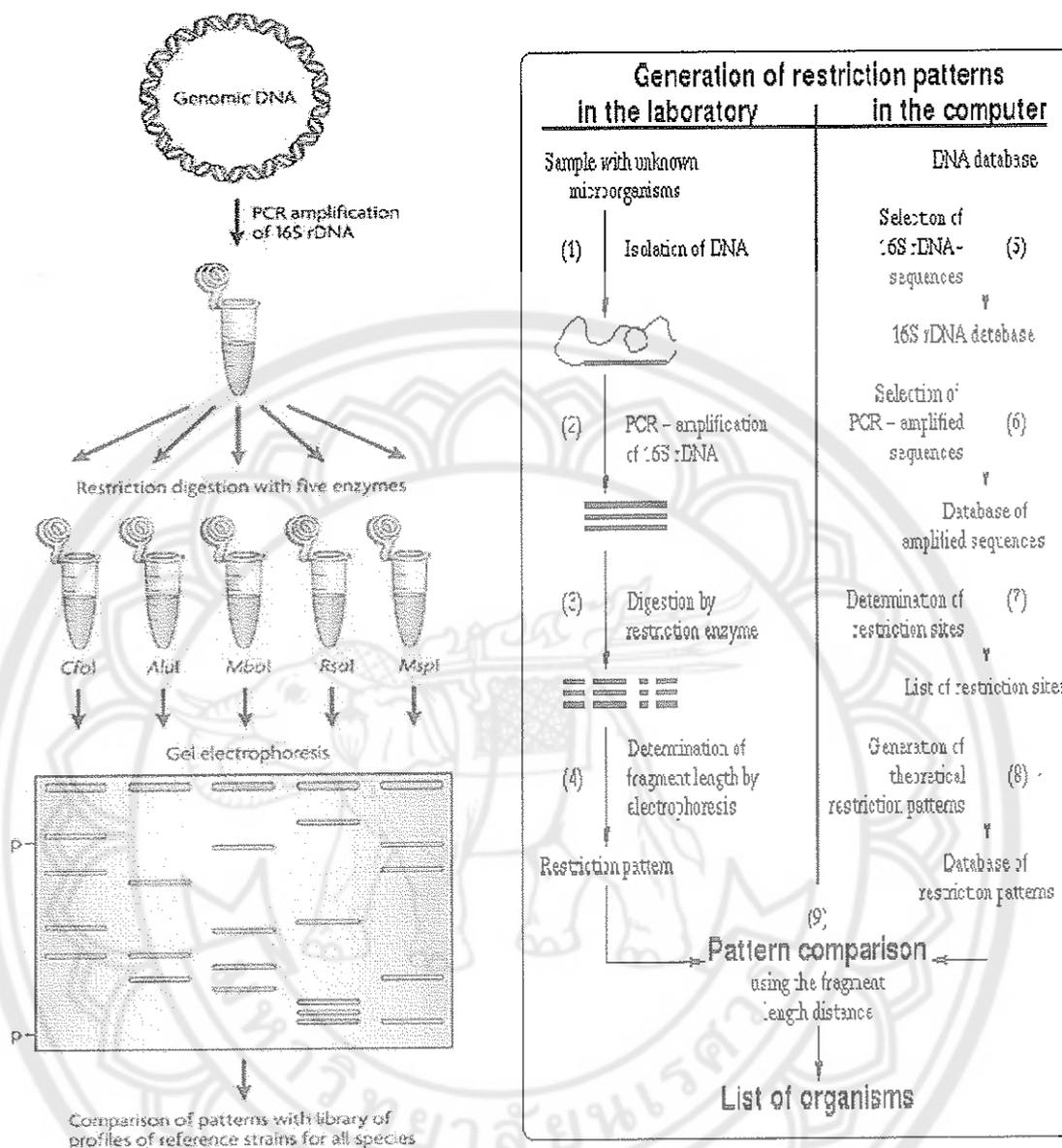
ภาพ 5 แสดงประสิทธิภาพของเทคนิค DNA fingerprints ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย
ในลำดับอนุกรมวิธานที่แตกต่างกัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Savelkoul, et al., 2004, pp.3083-3091

เทคนิค ARDRA เป็นเทคนิคที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับ locus-specific RFLP โดยใช้ 16S rDNA เป็นยีนเป้าหมาย ขั้นตอนเริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ (primers) ที่เหมาะสม ตามด้วยขั้นตอนการย่อย PCR products หรือ amplicons ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนนำไปวิเคราะห์โดยใช้ agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของ DNA fingerprint หรือรูปแบบ ARDRA เปรียบเทียบกับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง เทียบเคียง หรือ reference strains ซึ่งได้ข้อมูลจาก database ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้ทดสอบจริง โดยปัจจุบันมีโปรแกรมสำเร็จรูปออนไลน์ที่สามารถสร้างรูปแบบ ARDRA เช่น RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>) (Hermjakob, Giegerich and Arnold, 1997, pp.131-139; Porwal, et al., 2009, pp.1-27) รายละเอียดของการประยุกต์ใช้เทคนิค ARDRA เพื่อการจัดจำแนกแบคทีเรียสรุปในภาพ 6 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค ARDRA กับการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ได้แก่ งานวิจัยของ Henydrickx, et al. ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *HaeIII*, *DpnII*, *RsaI*, *BfaI* และ *Tru9I* ในการตัด SSU rDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ทำให้ได้รูปแบบ ARDRA ที่นำไปใช้ในการจัดจำแนกสมาชิกของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกในสกุล *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* และ *Virgibacillus* (Henydrickx, et al., 1998, pp.99-106; Shida, et al, 1996, pp.939-946) ออกจากสกุล

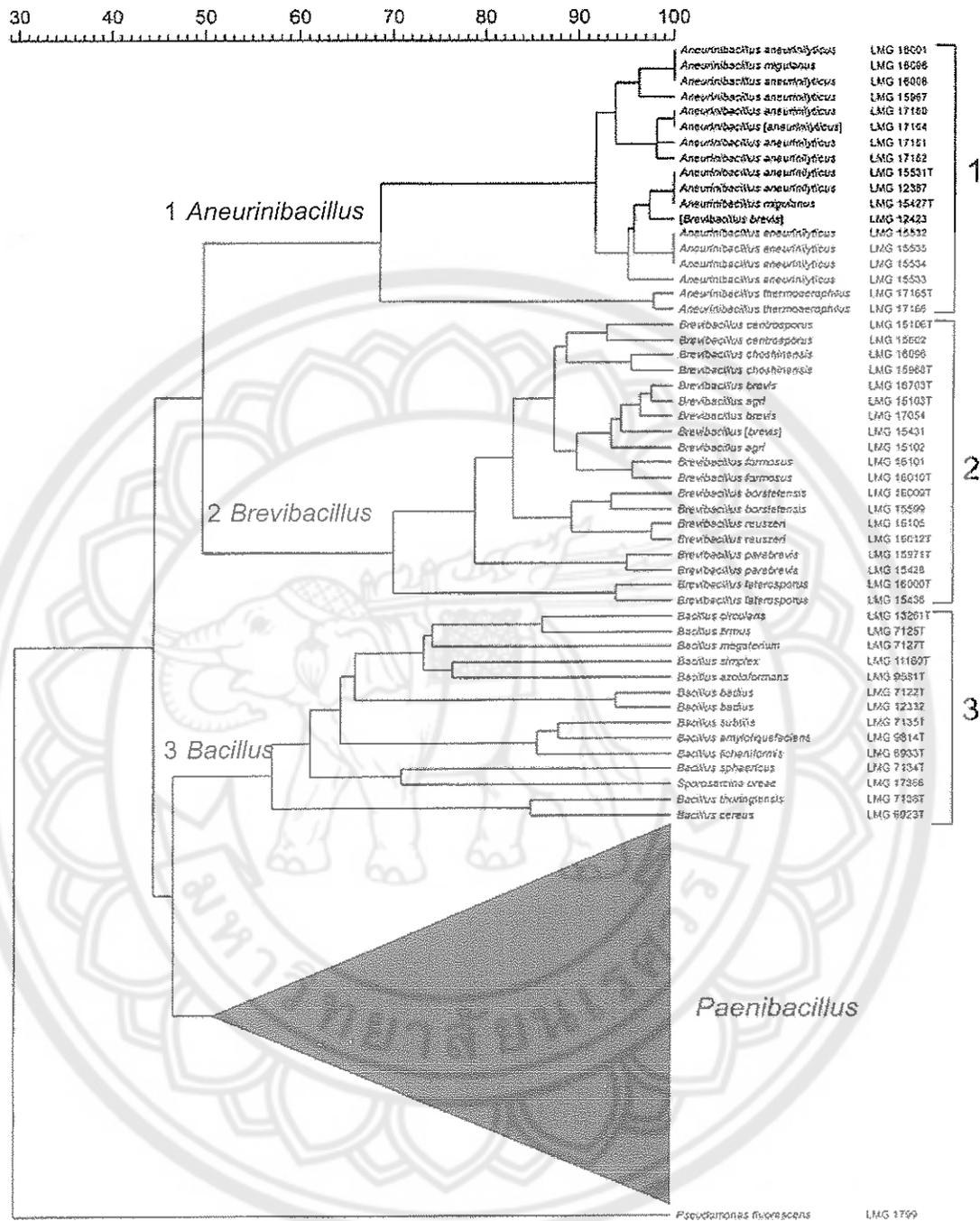
Bacillus ได้อย่างชัดเจน (Henydrickx, et al., 1997, pp.808-817) รายละเอียดสรุปดังแสดงในภาพ 7 รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ phylogenetic tree ไปจากงานวิจัยในปี 1991 ของ Ash, et al. กล่าวคือมีการจัดหมวดหมู่ใหม่ให้กลับสกุล *Bacillus* ซึ่ง Ash, et al. ได้แบ่งไว้ตาม *Bacillus* RNA groups ดังสรุปในภาพ 8 เช่น สมาชิกของ *Bacillus* RNA group 3 บางชนิดจัดตั้งเป็นสกุลใหม่คือ *Paenibacillus* และสมาชิกของ *Bacillus* RNA groups 4 จัดตั้งเป็นสกุลใหม่ชื่อ *Virgibacillus* เป็นต้น และด้วยความสามารถของเทคนิค ARDRA ที่จัดจำแนกแบคทีเรียได้ในลำดับอนุกรมวิธานขั้นสูงคือระดับสกุล จึงใช้ยืนยันผลกับเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA genes ในการจัดหมวดหมู่ให้กับแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกได้เป็นอย่างดี ดังสรุปไว้เป็นลำดับขั้นของพัฒนาการในการจัดหมวดหมู่ใหม่ให้กลับสกุล *Bacillus* แสดงไว้ในตาราง 3





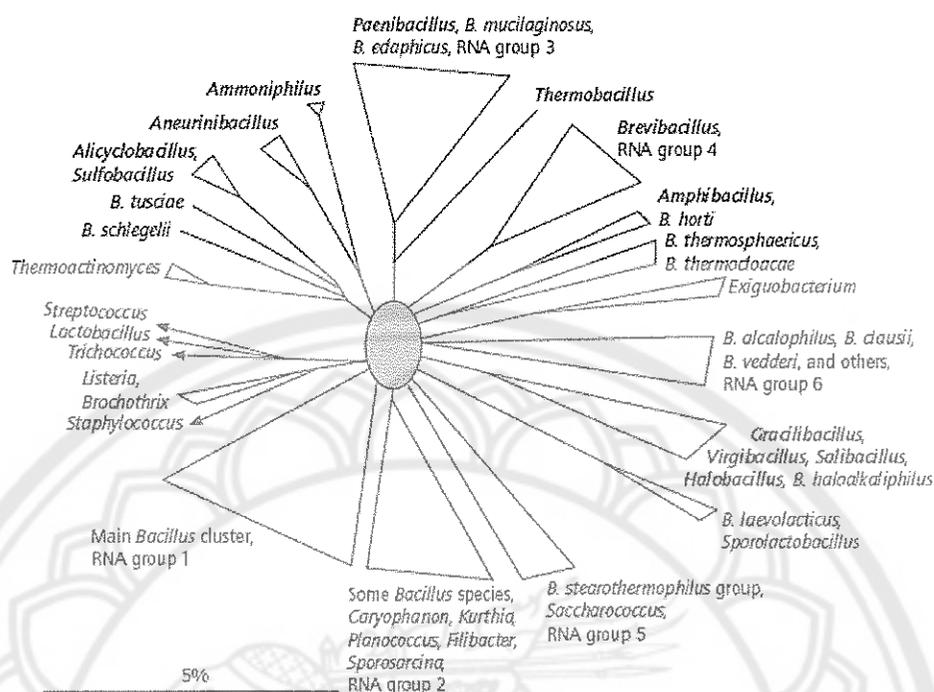
ภาพ 6 แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยเทคนิค ARDRA

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hermjakob, Giegerich and Arnold, 1997, pp.131-139



ภาพ 7 แสดง dendrogram ของการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์
เจริญในสภาวะแอโรบิก สกุล *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* และ
Paenibacillus โดยใช้เทคนิค ARDRA ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*, *DpnII*,
RsaI, *BfaI* และ *Tru9I*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Henydrickx, et al., 1997, pp.808-881



ภาพ 8 แสดง phylogenetic tree ของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์
เจริญในสภาวะแอโรบิก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Berkeley, et al., 2002, pp.18-32

ตาราง 3 แสดงการพัฒนาวิธีจัดจำแนกและการจัดหมวดหมู่ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ
แบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

Species	mol	RNA Group	Recently described
Numerical classification	เปอร์เซ็นต์ G+C	16S rRNA sequencing	genera 16S rRNA sequencing + ARDRA
<i>Bacillus polymyxa</i> group			
<i>B. lautus</i>	51	1	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. lentimorbus</i>	38	1	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. popilliae</i>	41	1	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. alvei</i>	46	3	<i>Paenibacillus</i>

ตาราง 3 (ต่อ)

Species	mol	RNA Group	Recently described
Numerical classification	เปอร์เซ็นต์ G+C	16S rRNA sequencing	genera 16S rRNA sequencing + ARDRA
<i>B. amylolyticus</i>	53	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. azotofixans</i>	52	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. larvae</i>	38	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. macerans</i>	52	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. macquariensis</i>	40	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. pabuli</i>	49	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. polymyxa</i>	44	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. pulvifaciens</i>	44	3	<i>Paenibacillus</i>
<i>B. subtilis</i> group			
<i>B. pantothenicus</i>	37	1	<i>Virgibacillus</i>
<i>B. laterosporus</i>	40	4	<i>Brevibacillus</i>
<i>B. subtilis</i> group			
<i>B. pantothenicus</i>	37	1	<i>Virgibacillus</i>
<i>B. laterosporus</i>	40	4	<i>Brevibacillus</i>
<i>B. brevis</i> group			
<i>B. brevis</i>	47	4	<i>Brevibacillus</i>
<i>B. aneurinolyticus</i>	42	UG	<i>Aneurinibacillus</i>
Thermophiles			
<i>B. kaustophilus</i>	53	5	<i>Geobacillus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	52	5	<i>Geobacillus</i>
<i>B. thermoglucosidasius</i>	45	5	<i>Geobacillus</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Ash, et al., 1991, pp.202-206;
Berkeley, et al., 2002, pp.18-32

3. การจัดจำแนกตามหลักการอนุกรมวิธานแบบพอลีฟาสสิก

การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานแบบพอลีฟาสสิกหรือ polyphasic approach เป็นการผนวกอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและอนุกรมวิธานแบบไฟโลจีนีร่วมกัน ทั้งนี้เพื่อให้ species concept ของแบคทีเรียมีความสมบูรณ์มากขึ้น โดยเฉพาะผลการจัดจำแนกที่ถูกต้อง แม่นยำ และเที่ยงตรง โดยแบบแผนอนุกรมวิธานแบบพอลีฟาสสิกที่นิยมใช้จัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปัจจุบันประกอบไปด้วย (i) traditional biochemical tests หรือการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม (ii) chemotaxonomic characters เช่น รูปแบบของ fatty acid methyl ester (FAME) และ/หรือ pyrolysis mass spectrometry เป็นต้น และ (iii) genomic character (ribotyping และ nucleic acid probes) (Berkeley, et al., 2002, pp.123-140) ตัวอย่างของการจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก เช่น O' Donnell, et al. (O' Donnell, et al., 1980, pp.448-459) ซึ่งเป็นกลุ่มนักวิจัยในระยะเริ่มแรกของการในอนุกรมวิธานแบบพอลีฟาสสิกในการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ โดยอาศัยเทคนิค biochemical tests, pyrolysis mass spectrometry และ DNA-DNA hybridization ในการจัดจำแนกสกุล *Bacillus* จำนวน 4 ชนิดคือ *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกบาง strains ที่เดิมอยู่ใน *B. amyloliquefaciens* จัดจำแนกใหม่ไปอยู่ใน *B. subtilis* รวมทั้ง Heyndrickx, et al. (1995- ปัจจุบัน) ซึ่งได้ทำการจัดหมวดหมู่ใหม่ให้สมาชิกในสกุล *Bacillus* ไปตั้งเป็นสกุลใหม่ได้หลายสกุลด้วยกัน โดยอาศัยเทคนิคทั้งเก่าและใหม่ผนวกเข้าด้วยกันเป็นอนุกรมวิธานแบบพอลีฟาสสิก ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Heyndrickx, et al. เช่น ในปี 1995 โดยอาศัยเทคนิค biochemical tests, ARDRA, FAME, SDS-PAGE ของโปรตีนที่ผนังเซลล์, pyrolysis mass spectrometry (Py-MS), DNA base composition (G+C contents), 16S rDNA sequence และ DNA-DNA hybridization ทำให้สามารถจัดหมวดหมู่ให้กับ *B. gordonae* และ *B. validus* จัดตั้งอยู่ในสกุลและชนิดใหม่คือ *Paenibacillus gordonae* และ *P. validus* (Hendrickx, et al, 1995, pp.661-669) และในปี 1998 ทำให้สามารถจัดหมวดหมู่ให้กับ *B. pantothenicus* จัดตั้งอยู่ในสกุลและชนิดใหม่คือ *Virgibacillus pantothenicus* เป็นต้น (Hendrickx, et al, 1998, pp.99-106)

ป
QR
๙1
๓820
2๕๕4



30 ส.ย. 2554

อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน

สำนักหอสมุด

อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ได้รับการจัดตั้งเป็นอุทยานแห่งชาติเมื่อวันที่ 12 มิถุนายน พ.ศ.2524 เป็นอุทยานแห่งชาติที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของประเทศไทย มีเนื้อที่ประมาณ 2,915 ตารางกิโลเมตร หรือ 1,821,687 ไร่ พื้นที่ครอบคลุมท้องที่อำเภอแก่งกระจาน อำเภอหนองหญ้าปล้อง อำเภอบำเหน็จ อำเภอเขาย้อย จังหวัดเพชรบุรี และอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ตั้งอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 12 องศา 26 ลิปดา ถึง 13 องศา 19 ลิปดาเหนือ และเส้นแวงที่ 99 องศา 4 ลิปดา ถึง 99 องศา 39 ลิปดาตะวันออก สภาพภูมิอากาศมี 2 ฤดูกาล คือฤดูฝนและฤดูแล้ง ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยเท่ากับ 967.9 มิลลิเมตรต่อปี อุณหภูมิเฉลี่ยรายเดือน 28 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยรายเดือน 76 เปอร์เซ็นต์ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2548) โดยลักษณะภูมิประเทศประกอบด้วยเทือกเขาสลับซับซ้อน ยอดเขาสูงสุดสูงประมาณ 1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง พื้นที่ประกอบด้วยป่าดิบ (evergreen forest) เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 1,560,194 ไร่ ป่าเบญจพรรณ (mixed deciduous forest) 183,969 ไร่ และป่าเต็งรัง (dry dipterocarp forest) 1,981 ไร่ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2543)

