

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิ้ง (Gliding bacteria) ที่แยกได้จากทะเลใน  
ประเทศไทย

โดย ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส และคณะ

สิงหาคม 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิ้ง (Gliding bacteria) ที่แยกได้จากทะเลใน  
ประเทศไทย

โดย ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส และคณะ

สิงหาคม 2550

รหัสโครงการ BRT R\_149011

## รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิ้ง (Gliding bacteria) ที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 1. ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์                        |
| 2. ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์   | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| 3. นายพรพจน์ ศรีสุขชยะกุล  | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย  
(โครงการ BRT)

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R\_149011

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นาวาเอก(พิเศษ) ภิญญ โดเลี้ยง และ ทหารเรือจากหน่วยจู่โจมและทำลายได้น้ำ กองทัพเรือ จ.ชลบุรี เป็นอย่างสูงที่กรุณาอนุเคราะห์เรือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง บริเวณฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี

### บทคัดย่อ

ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย โดยการเก็บตัวอย่างจากทะเล อาทิเช่น พิล์มชีวภาพ สาหร่าย สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ตั้งแต่บริเวณ จ.ชลบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ ภูเก็ต และนครศรีธรรมราช พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียไกลดิงได้ทั้งหมด 6 กลุ่มใหญ่ๆ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ 16s rDNA มีเพียง 1 กลุ่มที่จัดว่าเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดเดียวกันกับที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้วคือ *Tenacibaculum mesophilum* ในขณะที่อีก 3 กลุ่มนั้นเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน และได้ตั้งชื่อตามลักษณะ และแหล่งที่พบ ดังนี้คือ *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. *Aureispira maritima* sp. nov. และ *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp. nov. ส่วนแบคทีเรียอีกสองกลุ่มที่เหลือนั้นคาดว่าจะ เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่เช่นเดียวกัน แต่ยังต้องอาศัยการพิสูจน์เพื่อยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ และเป็นที่น่าสนใจว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลเหล่านี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค และสารต้านกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เป็นต้น

### Abstract

The study on diversity of marine gliding bacteria in Thailand including Chonburi, Samut Songkram, Samut Sakorn, Petchburi, Suratthani, Trang, Krabi, Phuket and Nakhon Si Thammarat had led to the discovery of 6 major groups of marine gliding bacteria. Among these, only one group was identified, by 16s rDNA sequencing technique, as a previously reported genus *Tenacibaculum mesophilum* whereas 3 other groups were proposed as new genera and species including *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. *Aureispira maritima* sp. nov. and *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp. nov. The other two groups are currently being investigated and the preliminary results suggested that they could potentially be either novel genus or species. It is also interesting to note that these marine gliding bacteria, when cultivated in suitable marine media, were able to produce chemical crude extracts with various biological activities including cytotoxicity, antimicrobial and enzyme inhibitory activities.

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียไกลดิ้งที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการสำรวจมาแล้วในระดับหนึ่งโดยพบว่ามีเชื้อที่จัดได้ว่าเป็นจีนัสและสปีชีส์ใหม่แล้วอย่างน้อย 3 สายพันธุ์แต่ยังมีเชื้ออีกกว่า 70 สายพันธุ์ที่ยังต้องการการศึกษาวิจัยรวมทั้งการแยกเชื้อเพิ่มเติมจากแหล่งและชนิดของตัวอย่างที่น่าสนใจ ทั้งนี้การจัดจำแนกเชื้อที่ได้จะอาศัยวิธีการร่วมกันระหว่าง การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA การทดสอบทางชีวเคมีและองค์ประกอบของเซลล์ เช่น กรดไขมันภายในเซลล์ และ respiratory quinone เป็นต้น ผลที่ได้จากการศึกษานี้คาดว่าจะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิ้งในทะเลที่ยังไม่มีการศึกษากันมากนัก และยังเป็นความร่วมมือกันของนักวิจัยในมหาวิทยาลัย สถาบันวิจัยทั้งในและต่างประเทศ และรวมถึงการพัฒนานักวิจัยใหม่ที่สนใจเกี่ยวกับทรัพยากรจุลินทรีย์ในทะเลอีกด้วย

## Executive Summary

This research project aims to study biological diversity of marine gliding bacteria in Thailand. According to our preliminary study, it was confirmed that there are at least 3 strains belonging to the new Genus in the Family Saprospiraceae. However, there are 70 more strains in our culture collection which need to be identified. The taxonomy of these bacteria will be done by the using the information from 16s rDNA sequences, biochemical characteristics as well as the cellular components i.e. fatty acid and respiratory quinone. This research project will ultimately yield the new knowledge about biological diversity of the understudied bacteria and the academic collaboration of Thai and international researchers.

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่ม Gliding ทั้ง 6 กลุ่มที่แยกได้จากทะเล	14
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของแบคทีเรียไกลดิง	16-17
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียไกลดิงในจีนัส <i>Rapidithrix</i> (กลุ่มที่ 5) <i>Flexithrix</i> และ <i>Persicobacter</i>	20
ตารางที่ 4 แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ <i>Rapidithrix thailandica</i> gen.nov., sp. nov.	21

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แผนภูมิ Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล	15
ภาพที่ 2 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล กลุ่มที่ 3	18
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล กลุ่มที่ 3	18
ภาพที่ 4 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลกลุ่มที่ 5	19



## บทนำ

แบคทีเรียไกลดิง (Gliding bacteria) คือกลุ่มของแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่เคลื่อนที่ได้โดยการเลื่อนตัว (gliding) บนพื้นผิวที่แข็งโดยที่ไม่ได้อาศัย flagella และมีรูปร่างลักษณะที่ต่างกันไปตามแต่ชนิด เช่น ลักษณะที่เป็นแท่ง (rod) เส้นยาว (filament) หรือเป็นเกลียว (spiral) สามารถพบได้ทั้งบนบก และในน้ำซึ่งรวมทั้งในทะเล แบคทีเรียไกลดิงนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มที่มีการสร้าง fruiting body ได้แก่ Myxobacteria ซึ่งจัดอยู่ใน Order Myxobacterales และกลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body ซึ่งได้แก่แบคทีเรียใน Sub-Order และ Order ต่างๆดังนี้ คือ Sub-Order Chlorobiinae (Green Sulfur Bacteria), Order Beggiatoales (Sulfur Bacteria), Order Leucotrichales (Organoheterotrophic bacteria) และ Order Cytophagales เป็นต้น จากที่ผ่านมาในอดีตการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียไกลดิงจะอยู่ในกลุ่มของ Myxobacteria ที่แยกได้จากดินเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเหตุผลที่ว่า Myxobacteria มีการสร้าง fruiting body ที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวที่ง่ายต่อการสังเกตและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บตัวอย่างดินหรือตัวอย่างที่อยู่บนบกก็สามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการเก็บตัวอย่างที่อยู่ในทะเล แต่ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากทะเลเพิ่มมากขึ้น (Iizuka *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Iizuka *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Nedashkovskaya *et al.*, 2003; Nedashkovskaya *et al.*, 2004a-f; Nedashkovskaya *et al.*, 2005a-k; Nedashkovskaya *et al.*, 2006a,b) ทำให้ทราบว่าแท้จริงแล้วการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงในน้ำยังมีอยู่อย่างจำกัดทั้งในด้านของการศึกษาเกี่ยวกับชนิด ความหลากหลาย และการใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียไกลดิงที่อาศัยอยู่ในทะเลไม่ว่าจะอยู่ในน้ำทะเล ตะกอนดิน หรืออยู่ร่วมกับจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆเช่น ในฟิล์มชีวภาพ พืชและสัตว์ทะเลก็ตาม ในประเทศไทยเองจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยที่ได้ทำการสำรวจ เก็บตัวอย่าง (ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต) จากทะเลในประเทศไทยเพื่อแยกแบคทีเรียไกลดิงพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียไกลดิงจากตัวอย่างดังกล่าวได้ประมาณ 80 isolates โดยที่ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จำนวนหนึ่งด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบ่งชี้ว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยมีความแตกต่างจากแบคทีเรียไกลดิงที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยคาดว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้นี้สามารถที่จะจัดอยู่ใน Genera และ species ใหม่ได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียไกลดิง 3 สายพันธุ์ที่ผู้วิจัยได้ศึกษาแล้วพบว่ามีความแตกต่างจากแบคทีเรียไกลดิง Genera อื่นใน Family Saprospiraceae โดยที่คณะผู้วิจัยได้เสนอชื่อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ว่า *Aureospira marina* gen.nov., sp.nov. ซึ่งขณะนี้ได้ตีพิมพ์ผลงานดังกล่าวในวารสาร International Journal of Systematic Bacteriology เป็นที่เรียบร้อยแล้ว อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียไกลดิงอีกกว่า 70 isolates ที่ผู้วิจัยคาดว่าจะจะเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ที่ต่างจาก 3 สายพันธุ์นี้ โดยที่ข้อมูลในเบื้องต้นที่ผู้วิจัยได้ตรวจสอบแล้วพบว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แตกต่างจากแบคทีเรียไกลดิงที่เคยมีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ โดยพิจารณาจากผลการทำ 16s rDNA sequencing ที่ให้ค่า % similarity ต่ำกว่า 92 เมื่อเทียบกับจีโนมที่ใกล้เคียงที่สุดคือ *Flexibacter* และ *Tenacibaculum* ซึ่งผลที่ได้นี้ยังจะต้องอาศัยการศึกษาวิจัยในรายละเอียดเพื่อที่จะจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียไกลดิงนี้ต่อไป เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลนี้มีคุณสมบัติในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญๆเช่น อาทิเช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ตลอดไปจนถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบางชนิด เป็น

ต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มนักวิจัยในประเทศสหพันธรัฐเยอรมันที่พบว่า Myxobacteria ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสูตรโครงสร้างใหม่ๆ (รายละเอียดเพิ่มเติมในข้อ 3.2)

ดังนั้นการสำรวจและวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยจึงมีความน่าสนใจและสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาทรัพยากรชีวภาพของประเทศเนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ชายฝั่งทะเลและหมู่เกาะต่างๆอยู่จำนวนมากทั้งในฝั่งอ่าวไทยและอันดามันซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพที่สูงมากแห่งหนึ่งของโลก จึงเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะมีโอกาสค้นพบแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ที่มีความน่าสนใจและศักยภาพในการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และผลจากการวิจัยยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในทะเลที่ยังมีการศึกษากันอย่างจำกัดในปัจจุบันอีกด้วย

### วัตถุประสงค์

- 1 เพื่อศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกจากทะเลในประเทศไทยโดยอาศัยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ
- 2 เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงที่พบในประเทศไทย

### ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

แนวทางในการวิจัยในโครงการนี้จะเริ่มจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ประมาณ 80 สายพันธุ์ที่พร้อมสำหรับการนำมาศึกษาได้ทันที โดยที่เชื้อเหล่านี้ได้มาจากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่างๆดังนี้คือ พื้นที่ชายฝั่งภาคตะวันออกได้แก่บริเวณเกาะพระ อ.สัตหีบ และชายหาดในจังหวัดชลบุรี ป่าชายเลนและชายหาดในจังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี ชายหาดในจังหวัดตรัง กระบี่ พังงา ภูเก็ต กองหินไต้ในเขตเกาะเต่า จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช

เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดจะนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพิจารณาจากลักษณะของโคโลนี สี การสร้าง/ไม่สร้าง fruiting body รูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คุณสมบัติการติดสี Gram's staining สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16s rDNA จะเริ่มจากการสกัด DNA จากเซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงด้วย Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตรวจสอบ DNA ที่ได้ด้วย agrose gel electrophoresis จากนั้นจึงเพิ่มจำนวน copy ของ 16s rDNA โดยวิธี PCR โดยอาศัย universal primers 9F และ 1510R ทำให้บริสุทธิ์ของ PCR product ที่ได้โดย GFX PCR DNA และ Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) นำ PCR products ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA โดยการใส่ DNA sequencer และ primers ทั้งหมด 8 primers ได้แก่ 9F, 339F, 785F, 1099F, 536R, 802R และ 1115R ทั้งนี้ผู้วิจัยวางแผนที่จะส่งตัวอย่าง genomic DNA ของเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปยังห้องปฏิบัติการที่ให้บริการทางด้าน sequencing เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าการที่ผู้วิจัยจะทำ PCR และ sequencing เอง อีกทั้งยังมีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยทั่วไปจะใช้เวลาไม่เกิน 7 วันหลังจากที่ได้รับตัวอย่าง (Macrogen Inc., Seoul, Korea) ข้อมูลของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของเชื้อแต่ละชนิดจะนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยอาศัย BLAST search จากนั้นจึงใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 (Thompson et al., 1997) ในการทำ alignment ของ 16s rDNA gene sequences ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree คัดเลือกเชื้อที่คาดว่าจะจะเป็นชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่มาทำการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ ได้แก่ คุณสมบัติทางชีวเคมีเช่น ความสามารถในการย่อยเคซีน (Smibert & Krieg, 1994) แป้ง (Smibert & Krieg, 1994) tween 20, 40, 60 และ 80 (Barrow & Feltham, 1993) agar และ carboxymethyl cellulose (Smibert & Krieg, 1994) G+C content (Mesbah et al, 1989) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ จะทำโดยการวิเคราะห์ด้วย GC/MS การวิเคราะห์ respiratory quinone (Komagata & Suzuki, 1987) ช่วงอุณหภูมิ (8-37 °C) pH (5-9) และความต้องการหรือการทนเกลือที่เหมาะสมในการเจริญ

นำเชื้อที่ผ่านการแยกและจัดจำแนกแล้วมาเก็บรักษาด้วยการ Freeze-dry ตามวิธีการมาตรฐานสากลของการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทางศูนย์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทยได้ดำเนินการอยู่แล้ว เนื่องจากพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียไกลดิงให้รอดชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลาอันนานซึ่งเหมาะแก่การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาวเพื่อการศึกษาและการใช้ประโยชน์ต่อไป

## ผลการศึกษา

### 1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

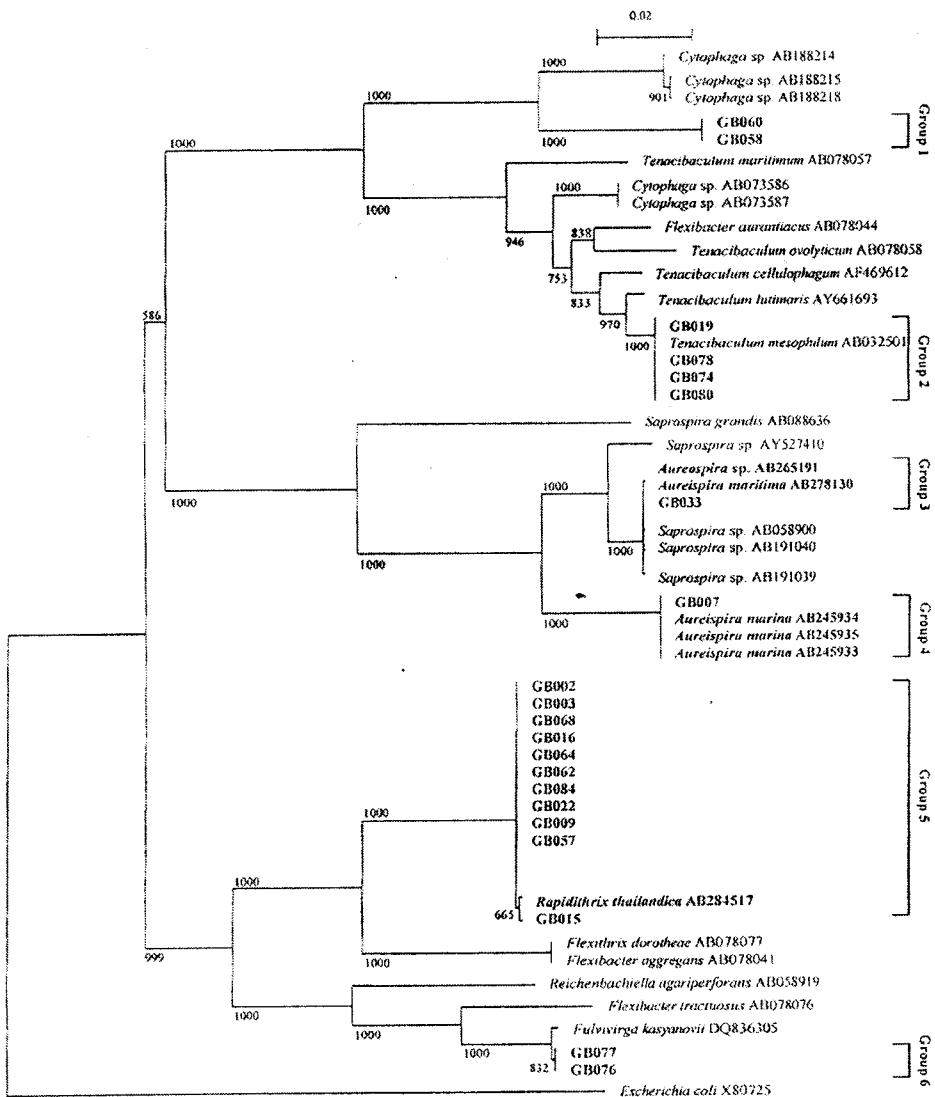
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มด้วยกันดังแสดงในตารางที่ 1 โดยที่กลุ่มที่ 5 ซึ่งมีรูปร่างของเซลล์ที่แตกต่างกันแต่จัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากไม่สามารถสร้างรงควัตถุเช่นเดียวกับเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มอื่นๆ และแบคทีเรียไกลดิงบางสายพันธุ์ในกลุ่มนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ catalase ได้ซึ่งต่างจากกลุ่มอื่นๆที่ให้ผล catalase test เป็นลบ สำหรับแบคทีเรียไกลดิงที่มีการสร้างรงควัตถุนั้นพบว่าเฉดสีของรงควัตถุที่สร้างมีตั้งแต่ เหลืองอ่อน เหลือง เหลืองส้ม ส้ม แอปริคอต และชมพูอ่อน ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วรงควัตถุที่พบในแบคทีเรียไกลดิงมักเป็นสารประเภทคาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ที่มีสีแตกต่างกันไป และเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลทุกกลุ่มมีการเจริญดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทะเลจากธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ หากเปลี่ยนเป็นน้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial seawater) หรือทดแทนด้วยเกลือแร่ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเลเช่น NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> และ CaCl<sub>2</sub> พบว่าเชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ดี ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในการวิจัยนี้ไม่เพียงแต่ต้องการเกลือแต่ยังต้องการสารอาหารหรือปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญที่มีอยู่ในน้ำทะเลตามธรรมชาติเท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในงานวิจัยนี้เป็น แบคทีเรียในทะเลอย่างแท้จริง (true marine bacteria) ไม่ใช่เป็นเพียงแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophiles) หรือทนเกลือ (halotolerance)

ตารางที่ 1 ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่ม Gliding ทั้ง 6 กลุ่มที่แยกได้จากทะเล

กลุ่มที่	ลักษณะและคุณสมบัติ									
	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (μ)	ความยาวของ filament (μ)	ความกว้างของ helix (μ)	ความลึกของ helix (μ)	วงชีวิต	Catalase test	Seawater requirement	
1	negative	Spiral	0.8	10-150	1.5	4-9	สั้น	-	+	
2	negative	Spiral	0.8	10-150	1.5	4-9	แอมบิโคท	-	+	
3	negative	Spiral	0.8-1.2	10-500	1.5-2.0	5-7	ขมพูอ่อน	-	+	
4	negative	Unbranched multicellular, long filament	0.6-1.5	300-1200	-	-	เหลืองอ่อน-สั้น	-	+	
5	negative	หลากหลาย	0.5	1-30 up to 500	-	-	-	-/+	+	
6	negative	Rod	0.5	2.5	-	-	เหลือง	N/A	+	

## 2. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of 16s rDNA และการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree

ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA จากเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้พบว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิงออกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Cytophaga* sp. โดยมีค่า % similarity ประมาณ 93 กลุ่มที่ 2 ที่ใกล้เคียงกับ *Tenacibaculum mesophilum* โดยมีค่า % similarity ประมาณ 99 กลุ่มที่ 3 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่คือ *Aureispira maritima* sp.nov. กลุ่มที่ 4 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่คือ *Aureispira marina* gen.nov., sp.nov. กลุ่มที่ 5 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่อีกเช่นกันคือ *Rapidithrix thailandica* gen.nov., sp.nov. และกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Fulvivirga kasayanovii* โดยมีค่า % similarity ประมาณ 98 ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับรายละเอียดของแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียไกลดิง ผลการจัดจำแนกเชื้อและค่า % similarity จะแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 1 แผนภูมิ Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของแบคทีเรียไกลดิง

รหัส เชื้อ	TISTR No.	แหล่งที่มา/สถานที่	ผลการจัดจำแนกเชื้อด้วยการวิเคราะห์ 16s rDNA sequence		
			Related Genus or species	% Identical	Newly proposed Genus or species
GB001		ฟองน้ำ สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Cytophaga</i> sp.	91	
GB002	1741	เปลือกหอย หาดหยงหลัง	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB003	1747	สาหร่าย สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB004	1725	ฟองน้ำ สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Aureispira maritima</i>	94	
GB005	1736	เศษเชือก หาดในยาง	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB007		เพรียง หาดหยงหลัง	<i>Saprospira</i> sp.	93	<i>Aureispira marina</i>
GB008	1744	ปะการัง สูดานหอย 75 ล้านปี	Alpha-proteobacterium	96	
GB009	1742	สาหร่าย หาดหยงหลัง	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB011		สาหร่าย สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Flexibacter</i> sp. (SH19.43.1)	100	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB014		สาหร่ายสีเขียว สูดานหอย 75 ล้านปี			unculturable bacteria
GB015	1750	สาหร่ายสีแดง สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB016	1740	หญ้าทะเล สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB018	1695/1	เศษชิ้นพลาสติกบริเวณชายหาด	<i>Aureispira maritima</i>	87	
GB019		กระดองปลาหมึก หาดสุรินทร์	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99	
GB021	1715	สาหร่ายสีแดงอมน้ำตาล หาดปึกเตียน	<i>Saprospira</i> sp.	87	<i>Aureispira maritima</i>
GB022	1710	เปลือกหอย หาดเจ้าสำราญ	<i>Flexithrix aggregans</i>	92	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB024	1705	สาหร่าย หาดวอนนภา	<i>Saprospira</i> sp.		
GB026	1707	ตะไคร่น้ำ หาดวอนนภา	<i>Bacillus</i> sp.	90	
GB033	1692	ทรายใต้ผิวน้ำ อ่างศิลา	<i>Saprospira</i> sp.	99	<i>Aureispira maritima</i>
GB037	1727	ซากปะการัง สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Bacillus flexus</i>	98	
GB038		หญ้าทะเล หาดราไวย์	<i>Saprospira</i> sp.	99	<i>Aureispira maritima</i>
GB039	1734	สาหร่าย หาดในหาน	<i>Aureispira maritima</i>	85	
GB041		สาหร่าย สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Saprospira</i> sp.	99	<i>Aureispira maritima</i>
GB042	1733	สาหร่าย หาดในหาน	unculturable bacterium	98	
GB043		ฟองน้ำ สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Saprospira</i> sp.		<i>Aureispira marina</i>
GB046		เปลือกหอย หาดปึกเตียน	Gamma proteobacteria		
GB051		เปลือกไม้ หาดยาว	<i>Saprospira</i> sp.		<i>Aureispira marina</i>
GB052		สาหร่าย สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Saprospira</i> sp.		<i>Aureispira marina</i>
GB055		ซากเพรียง สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Saprospira</i> sp.	99	<i>Aureispira maritima</i>
GB056		ปะการังสีส้ม สูดานหอย 75 ล้านปี	<i>Flexibacter</i> sp.	86	
GB057		ไม้ผุ สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB058		สาหร่ายสีน้ำตาล สัตหีบ	<i>Cytophaga</i> sp.	93	
GB060		เปลือกหอย สัตหีบ	<i>Cytophaga</i> sp.	93	
GB061		เปลือกหอย สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB062		ปะการัง สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB063		biofilm สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB064		สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB065		เปลือกหอย สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB067		เปลือกหอย สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB068		ปะการัง สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB072		biofilm สัตหีบ	<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB074		ฟองน้ำ เกาะกระ	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99	<i>T. mesophilum</i>
GB076		ใบไม้ เกาะกระ	<i>Fulvivirga kasayanovii</i>	98	New species
GB077		ใบไม้ เกาะกระ	<i>Fulvivirga kasayanovii</i>	98	New species
GB078		ฟองน้ำ เกาะกระ	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99	<i>T. mesophilum</i>
GB080		เปลือกหอย เกาะกระ	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99	<i>T. mesophilum</i>

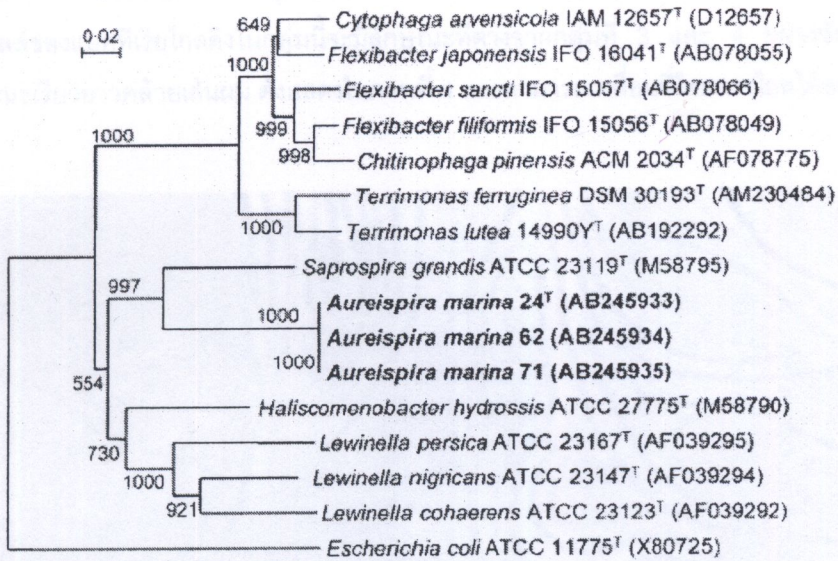
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของแบคทีเรียไกลดิง (ต่อ)

รหัส เชื้อ	TISTR No.	แหล่งที่มา/สถานที่	ผลการจัดจำแนกเชื้อด้วยการวิเคราะห์ 16s rDNA sequence		
			Related Genus or species	% Identical	Newly proposed Genus or species
GB081		ซากปู เกาะกระ	<i>Flexithrix aggregans</i>	90	<i>Rapidithrix thailandica</i>
GB084			<i>Flexithrix aggregans</i>	91	<i>Rapidithrix thailandica</i>

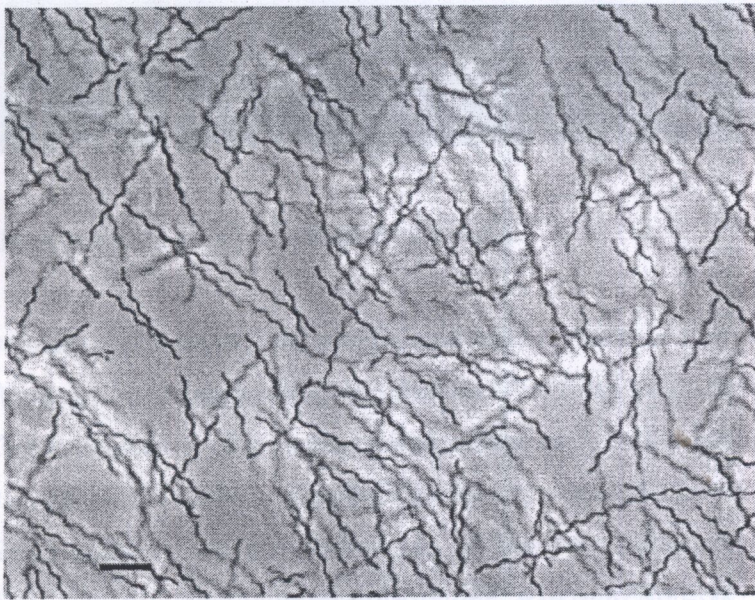
### 3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อที่คาดว่าจะเป็ชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่

จากผลการวิจัยในข้อ 2 จะเห็นว่ามึเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลอย่างน้อย 5 กลุ่มจากทั้งหมด 6 กลุ่มที่คาดว่าจะเป็แบคทีเรียไกลดิงชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้คัดเลือก แบคทีเรียในกลุ่มที่ 3, 4 และ 5 มาศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดจำแนกเชื้อต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวมีจำนวนของเชื้อที่แยกได้มากที่สุด และข้อจำกัดในด้านเวลาและงบประมาณของโครงการวิจัย สำหรับแบคทีเรียไกลดิงที่เหลือนั้นผู้วิจัยจะนำมาศึกษาต่อไปในโครงการวิจัยอื่นหลังจากนี้ สำหรับวิธีการตรวจสอบเพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อนั้น ผู้วิจัยได้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อได้แก่ ความสามารถในการย่อยเคซีน (Smibert & Krieg, 1994) แป้ง (Smibert & Krieg, 1994) tween 20, 40, 60 และ 80 (Barrow & Feltham, 1993) agar และ carboxymethyl cellulose (Smibert & Krieg, 1994) G+C content (Mesbah et al, 1989) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ จะทำโดยการวิเคราะห์ด้วย GC/MS การวิเคราะห์ respiratory quinone (Komagata & Suzuki, 1987) ช่วงอุณหภูมิ (8-37 °C) pH (5-9) และความต้องการหรือการทนเกลือที่เหมาะสมในการเจริญ

โดยที่ผลปรากฏว่าเมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของเชื้อที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree เชื้อในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 3 สายพันธุ์จะจัดอยู่ใน Family *Saprospiraceae* ดังแสดงในภาพที่ 2 และผลจากการวิเคราะห์ความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี DNA-DNA hybridization เทียบกับ *Saprospira grandis* ATCC23119<sup>T</sup> ให้ค่าของ % similarity เท่ากับ 86 ดังนั้นจึงจัดให้เชื้อในกลุ่มนี้อยู่ในจีนัสใหม่ที่เรียกว่า *Aureispira* เนื่องจากโคโลนีมีลักษณะสีเหลืองทองและมีเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเกลียว (spiral) ดังแสดงในภาพที่ 3 พร้อมกับกำหนดชื่อสปีชีส์คือ *marina* ซึ่งแสดงถึงแหล่งที่พบแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ G+C content ของเชื้อในกลุ่มนี้ให้ค่าในช่วงของ 38-38 mol% ซึ่งต่างจากปริมาณ G+C content ของ *S. grandis* NCIMB1363<sup>T</sup> ที่มีค่าเท่ากับ 49.8 mol% แต่ทั้ง *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. และ *S. grandis* NCIMB1363<sup>T</sup> มี respiratory quinone ชนิดเดียวกันคือ MK-7 สำหรับลักษณะอื่นๆ ของ *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. นั้นพบว่าจะมีช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญตั้งแต่ 25-30 องศาเซลเซียส และจะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 8 หรือ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6.0-8.0 สามารถย่อยสลาย tyrosine ได้ แต่จะไม่สามารถย่อย agar, alginate, carboxymethyl cellulose, citrate, DNA หรือแป้งได้ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ ไม่สร้าง acetoin, H<sub>2</sub>S, indole ตลอดจนเอนไซม์ lipase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl-  $\beta$ -glucosamidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase อีกทั้งยังไม่สามารถสร้างกรดได้จากน้ำตาล arabinose, cellobiose, dulcitol, fructose, galactose, glucose, glycerol, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose หรือ xylose (Hosoya et al., 2006)



ภาพที่ 2 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล กลุ่มที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล กลุ่มที่ 3

สำหรับเชื้อในกลุ่มที่ 4 จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกับเชื้อในกลุ่มที่ 3 แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA เปรียบเทียบกันแล้วพบว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กันซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งใน phylogenetic tree ของแบคทีเรียไกลดิงทั้งสองกลุ่ม ดังปรากฏในภาพที่ 1 และเมื่อทดสอบคุณลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มที่ 4 โดยละเอียดก็สามารถจัดให้เชื่อดังกล่าวเป็นสปีชีส์ใหม่ภายใต้จีนัส *Aureispira* โดยกำหนดชื่อสปีชีส์เป็น *maritima* (Hosoya et al., 2007)



ส่วนเชื้อในกลุ่มที่ 5 ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดในบรรดาแบคทีเรียไกลดิงทุกกลุ่มที่แยกได้จากการวิจัยนี้ มีรูปร่างลักษณะของเซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มนี้จะมีลักษณะที่ต่างจากกลุ่มที่ 3 และ 4 อย่างชัดเจนกล่าวคือ เซลล์จะมีลักษณะเรียวยาวคล้ายเส้นผม ดังแสดงในภาพที่ 4 และสามารถเคลื่อนที่โดยการไถลได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 4 แสดงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลกลุ่มที่ 5

และจากการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียไกลดิงในจีนัส *Flexithrix* และ *Persicobacter* กับแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มที่ 5 พบว่ามีคุณสมบัติที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้อยู่ในจีนัสใหม่ที่เรียกว่า *Rapidithrix* เนื่องจากลักษณะที่คล้ายเส้นผมและการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว โดยมีชื่อสปีชีส์ว่า *thailandica* ตามประเทศที่พบ แบคทีเรียไกลดิงชนิด *Rapidithrix thailandica* gen.nov., sp. nov. สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วง 5-10 ลักษณะของโคไลนีสีเทาเมกอกสามารถใช้ เปปโติน และแอมโมเนียเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ดี สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase, alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, trypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase และ  $\alpha$ -fucosidase แต่ไม่พบว่าสร้างเอนไซม์ catalase, lipase (C14),  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase และ  $\alpha$ -mannosidase ผลการวิเคราะห์ปริมาณ G+C ให้ค่าอยู่ในช่วงของ 40-43 mol% ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จะแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะของแบคทีเรียไกลดิงในจีนัส *Rapidithrix* (กลุ่มที่ 5) *Flexithrix* และ *Persicobacter*

Characteristic	<i>Rapidithrix</i>	<i>Flexithrix</i>	<i>Persicobacter</i>
Cell morphology	No sheathed filaments	Sheathed filaments	Long rod
Color of cell mass	Light olive grey	yellow	pink to orange
DNA G+C content (mol%)	40-43	37.2	40-42
Oxidase	+	+	+
Catalase	-	+	-
Cystine arylamidase	+	-	ND
Trypsin	+	-	ND
Acid phosphatase	+	-	ND
Optimum temperature (°C)	25-30	35-40	25-30
Optimum pH	5-10	6.5-8	7-9
Cellular fatty acid:			
Non-polar	16:1 $\omega$ 5c iso-15:0	16:1 $\omega$ 5c iso-15:0	iso-17:1 <sup>a</sup> 16:0 iso-18:1
3-OH	iso-17:0 3OH iso-15:0 3OH 16:0 3OH	iso-17:0 3OH iso-15:0 3OH 16:0 3OH	iso-17:0 3OH
Utilization as nitrogen source :			
Peptones	+	+	+
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+	+	ND
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	+	- <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Described in Nagamuna & Horikoshi (1994)

<sup>b</sup>Characteristics variable with different strains: the type strain is positive

ที่มา Srisukchayakul et al. (2007)

ทั้งนี้จะมีเชื้อบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ได้เนื่องจากไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนของ DNA ด้วยวิธีการ PCR ได้สำเร็จ ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุที่ ชนิดของ primers ที่เลือกใช้ในการทำ PCR นั้นไม่เหมาะสมกับแบคทีเรียไกลดิงในบางกลุ่มที่ต่างจากแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มๆอื่น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วพบว่าสามารถที่จะเพิ่มจำนวนของ DNA ด้วยวิธีการ PCR ได้จาก primers ที่มีอยู่ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่เมื่อวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA แล้วให้ผลที่ใกล้เคียงกับ alpha-proteobacteria ทั้งๆที่ลักษณะของโคโลนีและเซลล์ ตลอดจนการเคลื่อนที่ของเซลล์ภายใต้การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้นยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มไกลดิงอย่างชัดเจน ซึ่งจะต้องอาศัยการวิจัยต่อไปเพื่อที่จะจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ซึ่งมีความแตกต่างจากแบคทีเรียไกลดิงทุกกลุ่มที่ได้รายงานไว้ในการวิจัยนี้

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ *Rapidithrix thailandica* gen.nov.,  
sp. nov.

Fatty acid	Composition (%)
10:0	1.5
11:0 ISO	2.0
Unknown 13.565	1.6
14:0	1.2
15:0 ISO	6.3
15:0 ANTEISO	0.8
15:0	0.6
Sum In Feature 2 (14:0 3-OH/16:1 ISO I)	0.8
16:0 ISO	1.0
Sum In Feature 3 (15:0 ISO 2-OH/16:1ω7c)	1.5
16:1ω5c	44.8
16:0	4.0
15:0 ISO 3-OH	4.3
Sum In Feature 4 (17:1 ANTEISO B/i I)	5.8
17:1 ANTEISO A	0.7
Unknown 16.582	0.7
17:0 ISO	1.7
17:0 ANTEISO	0.7
16:0 ISO 3-OH	0.7
16:0 3-OH	3.8
18:0 ISO	0.6
18:0	1.4
17:0 ISO 3-OH	10.8

ที่มา Srisukchayakul et al. (2007)

#### 4. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้

ขณะนี้เชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ได้นำมาเก็บรักษาด้วยวิธีการ Freeze-dry ณ คลังเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยจะมีการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อเป็นระยะตามกำหนดเวลา

#### ปัญหาอุปสรรคและแนวทางการแก้ไข

การวิเคราะห์ทางชีวเคมีส่วนใหญ่ไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยในประเทศไทย จึงต้องมีการส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการในต่างประเทศที่คณะผู้วิจัยมีความร่วมมืออยู่คือ Institute of molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่นโดยร่วมมือกับ Prof. Akira Yokota ซึ่งทำให้มีความล่าช้าในการส่งตัวอย่างและการวิเคราะห์ผลดังกล่าว อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้วางแผนที่จะแก้ปัญหานี้ในอนาคตโดยการไปทำวิจัยระยะสั้น ณ ห้องปฏิบัติการดังกล่าวซึ่งจะเป็นการเรียนรู้เทคนิคในการวิเคราะห์สำหรับการทำอนุกรมวิธานของแบคทีเรียไกลดิงและแบคทีเรียชนิดอื่นๆเพื่อพัฒนาความสามารถในการวิจัยด้านนี้ในประเทศไทยต่อไป ซึ่งขณะนี้หัวหน้าคณะผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนการใช้จ่ายบางส่วนสำหรับเป็นค่าเดินทาง ค่าที่พัก และค่าเบี้ยเลี้ยงจากทางสถาบันต้นสังกัดคือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และคาดว่าจะสามารถเดินทางไปฝึกอบรมในด้านดังกล่าวในเร็ววัน

## เอกสารอ้างอิง

- Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C., Kanjana-Opas, A., and Yokota, A. 2006. *Aureispira marina* gen.nov., sp.nov., a gliding, arachidonic acid containing bacteria isolated from Thai Southern coastlines. *International Systematic and Evolution Microbiology* 200; 56: 2931-2935.
- Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C., Kanjana-Opas, A., and Yokota, A. *Aureispira maritima* sp. nov., isolated from marine barnacle. *International Systematic and Evolution Microbiology* (in press)
- Johansen, E.J., Nielsen, P. and Sjöholm, C. 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola*, gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Cytophaga lytica* to *Cellulophaga lytica* gen.nov., sp. comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:1231-1190.
- Komagata, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 19: 161-207.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S. 1998. Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiology Letters*. 169:317-322.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, W.J. and Yamanaka, S. 2003. *Plesiocystis pacifica* gen.nov., sp.nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coast of Japan. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:189-195.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Tokura, M., Hiraishi, A. and Yamanaka, S. 2003. *Enhygromyxa salina* gen.nov., sp.nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 189-196.
- Lee, K.Y., Kwon, K.K., Cho, H.K., Kim, W.H., Park, H.J. and Lee, K.K. 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilm. *The Journal of Microbiology*. 41: 183-188.
- Li, Z.Y., Hu, W., Zhang, Q.Y., Qiu, Z., Zhang, Y. and Wu, H.B. 2002. A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. *Journal of Microbiological Methods*. 50: 205-209.
- Mesbah, M., Premachandran, U. and Whitman, W.B. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39: 159-166
- Nakagawa, Y., Suzauki, M. and Hatano, K. 2001. Phylogenetic diversity of *Cytophaga*-like strains isolated from the sub-tropical zone of Japan. *Institute for Fermentation Osaka Research*

*Communications*. 20:61-71.

- Nedashkovskaya, O., Suzuki, M., Vysotskii, M. and Mikhailov, V. 2003. *Reichenbachia agraperforans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 81-85.
- Nedashkovskaya, O., Vancanneyt, M., Van Trappen, S., Vandemeulebroecke, K., Lysenko, A., Rohde, M., Falsen, E., Frolova, G., Mikhailov, V., and Swings, J. 2004<sup>a</sup>. Description of *Algoriphagus aquimarinus* sp. nov., *Algoriphagus chordae* sp. nov. and *Algoriphagus winogradskyi* sp. nov., from sea water and algae, transfer of *Hongiella halophila* Yi and Chun 2004 to the genus *Algoriphagus* as *Algoriphagus halophilus* comb. nov. and emended descriptions of the genera *Algoriphagus* Bowman *et al.* 2003 and *Hongiella* Yi and Chun 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1757-1764.
- Nedashkovskaya, O., Suzuki, M., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Lysenko, A., Mikhailov, V., and Swings, J. 2004<sup>b</sup>. *Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1643-1648.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Han, S., Rhee, M., Lysenko, A., Rohde, M., Zhukova, N., Frolova, G., Mikhailov, V., and Bae, K. 2004<sup>c</sup>. *Algibacter lectus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from green algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1257-1261.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Han, S., Lysenko, A., Rohde, M., Rhee, M., Frolova, G., Falsen, E., Mikhailov, V., and Bae, K. 2004<sup>d</sup>. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orientalis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1017-1023.
- Nedashkovskaya, O., Suzuki, M., Lysenko, A., Snauwaert, C., Vancanneyt, M., Swings, J., Vysotskii, M. and Mikhailov, V. 2004<sup>e</sup>. *Cellulophaga pacifica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 54: 609-613.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Han, S., Rhee, M., Lysenko, A., Falsen, E., Frolova, G., Mikhailov, V., and Bae, K. 2004<sup>f</sup>. *Ulvibacter litoralis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 119-123.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Suzuki, M., Shevchenko, L., Lee, M., Lee, K., Park, M., Frolova, G., Oh, H., Bae, K., Park, H., and Mikhailov, V. 2005<sup>a</sup>. *Pontibacter actiniarum* gen. nov., sp. nov., a novel member of the phylum 'Bacteroidetes', and proposal of *Reichenbachiella* gen. nov. as

a replacement for the illegitimate prokaryotic generic name *Reichenbachia* Nedashkovskaya et al. 2003. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 2583-2588.

- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lysenko, A., Park, M., Mikhailov, V., Bae, K., and Park, H. 2005<sup>b</sup>. *Roseivirga echinicomitans* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus *Roseivirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1797-1800.
- Nedashkovskaya, O., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Engelbeen, K., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Hoste, B., Mergaert, J., Tan, T., Frolova, G., Mikhailov, V., and Swings, J. 2005<sup>c</sup>. Reclassification of [*Cytophaga*] *marinoflava* Reichenbach 1989 as *Leeuwenhoekiella marinoflava* gen. nov., comb. nov. and description of *Leeuwenhoekiella aequorea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1033-1038.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lysenko, Anatoly M., Frolova, Galina M., Mikhailov, Valery V., Bae, K., Lee, D., and Kim, I. 2005<sup>d</sup>. *Gramella echinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 391-394.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lysenko, A., Frolova, G., Mikhailov, V., and Bae, K. 2005<sup>e</sup>. *Bizionia paragorgiae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the soft coral *Paragorgia arborea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 375-378.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lee, K., Mikhailov, V., and Bae, K. 2005<sup>f</sup>. *Gillisia mitskevichiae* sp. nov., a novel bacterium of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 321-323.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lysenko, A., Mikhailov, V., Bae, K., Kim, I. 2005<sup>g</sup>. *Salagentibacter mishustinae* sp. nov., isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 235-238.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lee, D., Lysenko, A., Shevchenko, L., Frolova, G., Mikhailov, V., Lee, K., and Bae, K. 2005<sup>h</sup>. *Roseivirga ehrenbergii* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum 'Bacteroidetes', isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 231-234.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lysenko, A., Frolova, G., Mikhailov, V., Lee, K., and Bae, K. 2005<sup>i</sup>. Description of *Aquimarina muelleri* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of [*Cytophaga*] *latercula* Lewin 1969 as *Stanierella latercula* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 225-229.

- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Lee, K., Bae, K., Frolova, G., Mikhailov, V., and Kim, I. 2005<sup>l</sup>. *Pibocella ponti* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the green alga *Acrosiphonia sonderi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 55: 177-181.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Han, S., Snauwaert, C., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, K., Lysenko, A., Rohde, M., Frolova, G., Mikhailov, V., and Bae, K. 2005<sup>k</sup>. *Winogradskyella thalassocola* gen. nov., sp. nov., *Winogradskyella epiphytica* sp. nov. and *Winogradskyella eximia* sp. nov., marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 49-55.
- Nedashkovskaya, O., Kim, S., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Lysenko, A., Rohde, M., Frolova, G., Zhukova, N., Mikhailov, V., Bae, K., Oh, H., and Swings, J. 2006<sup>a</sup>. *Formosa agariphila* sp. nov., a budding bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine \ environments, and emended description of the genus *Formosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 161-167.
- Nedashkovskaya O., Kim S., Vancanneyt. M., Lysenko, A., Shin, D., Park, M., Lee, K., Jung, W., Kalinovskaya N., Mikhailov, V., Bae, K., Swings, J. 2006<sup>b</sup>. *Echinicola pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel flexibacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 953-8.
- Smitbert, R.M. and Krieg, N.R. 1994. Phenotypic characterization. In *Manual of Method for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P.Gerhardt. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Srisukchayakul, P., Suwanachart, C., Sangnoi, Y., Kanjana-Opas, A., Hosoya, S., Yokota, A., and Arunpairojana, V., 2007. *Rapidithrix thailandica* gen.nov., sp.nov., a marine gliding bacteria isolated from Andaman sea, the southern coastline of Thailand. *International Systematic and Evolution Microbiology* (in press)
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen.nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 51: 1639-52.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.

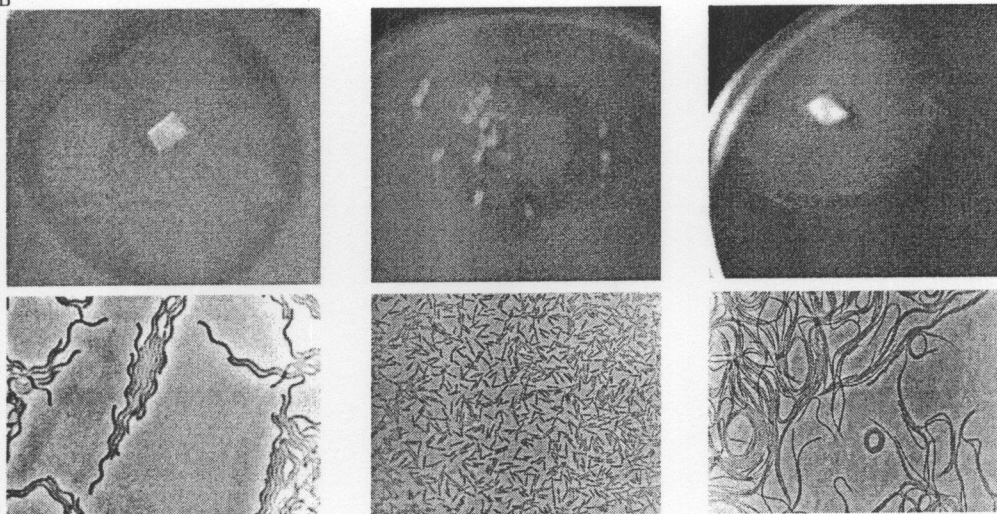
## ภาคผนวก

เอกสารสรุปผลงานวิจัย 1 แบคทีเรียไกลดิงจากทะเลในประเทศไทย

แบคทีเรียไกลดิง (Gliding bacteria) คือกลุ่มของแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้โดยการเลื่อนไถลตัว (gliding) บนพื้นผิวที่แข็งโดยที่ไม่ได้อาศัย flagella ในการเคลื่อนที่เช่นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้โดยทั่วไป ทั้งนี้แบคทีเรียไกลดิงจะมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะที่เป็นแท่ง (rod) เส้นยาว (filament) หรือเป็นเกลียว (spiral) สามารถพบได้ทั้งบนบก และในน้ำซึ่งรวมทั้งในทะเล แบคทีเรียไกลดิงนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่มที่มีการสร้าง และกลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พัฒนาการมาจากเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ให้สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เช่นเดียวกับสปอร์ของเชื้อรา

คณะผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วย นายยุทธพงษ์ สังข์น้อย นักศึกษาปริญญาเอกหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมี ดร. อัครวิทย์ กาญจนโอภาส จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. วัลภา อรุณไพโรจน์ (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม) และ นายพรพจน์ ศรีสุขชะกุล จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่บริเวณชายฝั่งและที่ระดับความลึก 10-15 เมตรจากทะเลในประเทศไทย บริเวณจังหวัด ชลบุรี สมุทรสงคราม เพชรบุรี ตรัง กระบี่ ภูเก็ต และ นครศรีธรรมราช เพื่อแยกแบคทีเรียไกลดิงที่อาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว โดยทางคณะผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียไกลดิงได้กว่า 70 สายพันธุ์และจากการจัดจำแนกในขั้นต้นโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับของดีเอ็นเอในส่วนของ 16s rDNA ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถใช้จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงนั้นพบว่า แบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยส่วนใหญ่ (กว่าร้อยละ 80) มีความแตกต่างจากแบคทีเรียไกลดิงที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และขณะนี้สามารถจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้แล้วว่าเป็นแบคทีเรียไกลดิงใน Genera ใหม่ถึง Genera คือ *Aureispira* และ *Rapidithrix* และคาดว่า จะมีการค้นพบแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ในส่วนที่กำลังศึกษาอยู่อีก

และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยนี้มีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงซึ่งสามารถใช้เป็นยารักษาโรคหรืออาหารเสริมสุขภาพ ตลอดจนสารชีวผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ซึ่งขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังศึกษาถึงการนำประโยชน์จากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลนี้ควบคู่กัน



ตัวอย่างรูปร่างลักษณะของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรียไกลดิงชนิดต่างๆที่แยกได้จากทะเล