RECEIVED
DATE 4/12/51

BIOTEC
a member of NSTDA

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

รายงานฉบับสมบูรณ์
(ตุลาคม 2550 -- กันยายน 2551)

# ความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้

(ชุดโครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพเชิงพื้นที่: กรณีศึกษาอุทยานแห่งชาติขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช)

(Species Diversity of Acetic Acid Bacteria at Khanom-Mu Ko Talae Tai National Park, Nakhonsrithamrat Province)

BIOTEC
a member of NSTDA

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

รายงานฉบับสมบูรณ์
(ตุลาคม 2550 – กันยายน 2551)

# ความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้

(ชุดโครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพเชิงพื้นที่: กรณีศึกษาอุทยานแห่งชาติขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช)

(Species Diversity of Acetic Acid Bacteria at Khanom-Mu Ko Talae Tai National Park, Nakhonsrithamrat Province)

## *ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป*

1. **ชื่อโครงการวิจัย:** ความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้

   **Research Title:** Species Diversity of Acetic Acid Bacteria at Khanom-Mu Ko Talae Tai National Park, Nakhonsrithamrat Province

2. **ชื่อหัวหน้าโครงการ : ดร. ภัทรพร รัตนวารี**


   Dr. Pattaraporn Rattanawaree

   ที่อยู่ปัจจุบัน: หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค
   ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
   อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย 113 ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง
   อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

   โทรศัพท์ : 0-2564 6700 ต่อ 3333, โทรสาร 0-2564 6707

   E-mail : pattaraporn@biotec.or.th


   **ลงชื่อ** .....

   (ดร. ภัทรพร รัตนวารี)

3. **ชื่อหัวหน้าสถาบัน : ดร.กัญญวิมว์ กีรติกร**


   Dr. Kanyawim Kirtikara

   ที่อยู่ปัจจุบัน : หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค
   ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
   อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย 113 ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง
   อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

   โทรศัพท์ : 0-2564 6700 ต่อ 3236, โทรสาร 0-2564 6707

   E-mail : kanyawim@biotec.or.th


   **ลงชื่อ** .....

   (ดร. กัญญวิมว์ กีรติกร)

4. **ระยะเวลาตลอดโครงการ** : 1 ปี

   เริ่มโครงการ : ตุลาคม 2550

   สิ้นสุดโครงการ : กันยายน 2551

5. **งบประมาณตลอดการดำเนินงาน** : 242,000 บาท

**แหล่งทุน** BRT : **ชุดโครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพเชิงพื้นที่**, กรณีศึกษาอุทยานแห่งชาติขนอม - หมู่เกาะทะเลใต้ จังหวัดนครศรีธรรมราช

6. **คณะทำงาน**

6.1 **ดร. ภัทรพร รัตนวารี**

ตำแหน่ง : นักวิจัย

คุณวุฒิ : Ph.D. (Agricultural Science), Bioresources, Gifu University, Japan.

สถานที่ติดต่อ : หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย 113 ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ : 0-2564 6700 ต่อ 3333, โทรสาร 0-2564 6707

E-mail : pattaraporn@biotec.or.th

ความรับผิดชอบในโครงการ 60%

**ลงชื่อ** .....

(ดร. ภัทรพร รัตนวารี)

6.2 **นายทวีศักดิ์ มะลิมาศ**

ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยนักวิจัย

คุณวุฒิ : วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์ สาขาจุลชีววิทยา)

สถานที่ติดต่อ : หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย 113 ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ : 0-2564 6700 ต่อ 3333, โทรสาร 0-2564 6707

E-mail : taweesak.mal@biotec.or.th

ความรับผิดชอบในโครงการ 40%

**ลงชื่อ** .....

(นายทวีศักดิ์ มะลิมาศ)

7 **ผู้เชี่ยวชาญและที่ปรึกษาโครงการ**

7.1 Dr. Yuzo Yamada

ตำแหน่งปัจจุบัน : Professor Emeritus, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan

สถานที่ติดต่อ : 2-3-21 Seinancho, Fujieda, Shizuoka 426-0063, Japan

โทรศัพท์ : +81-54-635-2316

E-mail : yamada-yuzo@mub.biglobe.ne.jp, yamada_yuzo3@ybb.ne.jp

7.2 **รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์**

ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กทม.

โทรศัพท์ : 02-2188376

E-mail : somboon.T@Chula.ac.th

## ส่วนที่ 2 รายละเอียดของโครงการ

### 1. บทสรุปโครงการ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากตั้งอยู่ในภูมิประเทศและภูมิอากาศที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต มีพื้นที่ที่มีลักษณะหลากหลายทั้งบริเวณป่าไม้ เทือกเขา ที่ราบ พื้นที่ชุ่มน้ำ แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย เป็นต้น สามารถพบสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ทั้งพืช สัตว์ และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กรวมถึงจุลินทรีย์ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งพื้นที่ในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ เป็นพื้นที่ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่ทั้งทางบกและทางทะเลรวมกัน โดยพื้นที่ทางบกประกอบด้วย แนวเทือกเขาน้อยใหญ่ทอดตัวจากทิศเหนือสู่ทิศใต้ มีพื้นที่ราบผืนใหญ่ เชิงภูเขาเปิดสู่ฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย มียอดเขาสูง ส่วนพื้นที่ทางทะเลประกอบด้วยเกาะจำนวนมาก พื้นที่ส่วนใหญ่จัดเป็นพื้นที่ลุ่มน้ำซึ่งเป็นพื้นที่ต้นน้ำของลำห้วย ลำคลองน้อยใหญ่หลายสาย ดังนั้นจึงเป็นแหล่งที่คาดว่าจะมีความอุดมสมบูรณ์มากแห่งหนึ่ง แต่ยังไม่มีการศึกษาด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ดังกล่าวอย่างจริงจัง ทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานซึ่งจะนำมาใช้ในการวางแผนการบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพทางทะเลอย่างเหมาะสม

ความสำคัญของจุลินทรีย์นอกจากจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ แล้วจุลินทรีย์ยังจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตอาหาร เครื่องดื่ม สารเคมี เครื่องสำอาง และยารักษาโรค นอกจากนี้ยังมีการนำจุลินทรีย์ไปใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การบำบัดของเสียการเกษตร อีกด้วย อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาข้อมูลด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในแหล่งธรรมชาติน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่เช่น พืชและสัตว์

โครงการ "ความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้" มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ เพื่อเป็นข้อมูลด้านความหลากหลาย และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพด้านจุลินทรีย์อย่างยั่งยืนในอนาคตต่อไป โดยมีระยะเวลาดำเนินการเป็นเวลา 1 ปี คือ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2551

### 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่อาศัยอยู่ในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ จังหวัดนครศรีธรรมราช
2. เพื่อคัดแยก จำแนก และเก็บรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูเพื่อเป็นแหล่งข้อมูลด้านความหลากหลาย และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพในอนาคต

### 3. หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากตั้งอยู่ในภูมิประเทศที่มีลักษณะพื้นที่หลากหลายทั้งบริเวณป่าไม้ เทือกเขา ที่ราบ พื้นที่ชุ่มน้ำ แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย นอกจากนี้ยังมีภูมิอากาศที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหลากชนิดทั้ง พืช สัตว์ และ

จุลินทรีย์ ซึ่งพื้นที่ในเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ เป็นพื้นที่ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่ทั้งทางบกและทางทะเลรวมกัน โดยพื้นที่ทางบกประกอบด้วย แนวเทือกเขาน้อยใหญ่ทอดตัวจากทิศเหนือสู่ทิศใต้ มีพื้นที่ราบฝืนใหญ่ เชิงภูเขาเปิดสู่ฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย มียอดเขาสูง ส่วนพื้นที่ทางทะเลประกอบด้วยเกาะจำนวนมาก พื้นที่ส่วนใหญ่จัดเป็นพื้นที่ลุ่มน้ำซึ่งเป็นพื้นที่ต้นน้ำของลำห้วย ลำคลองน้อยใหญ่หลายสาย ดังนั้นจึงเป็นแหล่งที่น่าจะมีความอุดมสมบูรณ์มากแห่งหนึ่ง แต่ยังไม่มีการศึกษาด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ดังกล่าว ประกอบกับการศึกษาด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นให้ความสนใจในสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ซึ่งได้แก่ พืช และ สัตว์ ในขณะที่สิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด คือจุลินทรีย์ ทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานด้านจุลินทรีย์ซึ่งจะนำมาใช้ในการวางแผนการบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพทางทะเลอย่างเหมาะสม

ความสำคัญของจุลินทรีย์นอกจากจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบนิเวศต่างๆ แล้วจุลินทรีย์ยังจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีความสำคัญในเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตสารที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตอาหาร เครื่องดื่ม สารเคมี เครื่องสำอาง และยารักษาโรค นอกจากนี้ยังมีการนำจุลินทรีย์ไปใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การบำบัดของเสีย การเกษตร นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียเป็นตัวอย่างในการศึกษาและวิจัยด้านอื่นๆ อีกด้วย อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาข้อมูลด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในแหล่งธรรมชาติน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่เช่น พืชและสัตว์

จากการสำรวจและคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Yamada และคณะ, 1999; Lisdiyanti และคณะ 2003; Seearuangchai และคณะ, 2004) ได้มีการค้นพบและมีการรายงานแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่จำนวนหลายชนิดจากแหล่งตัวอย่าง เช่น ผลไม้ ดอกไม้ ดิน ฯลฯ อย่างต่อเนื่อง (Yamada และคณะ 2000, Katsura และคณะ 2001; Lisdiyanti และคณะ, 2000, 2001, 2002; Tanasupawat และคณะ, 2004; Yukphan และคณะ, 2004, 2005, 2008; Taweesak และคณะ, 2008) ในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรียสกุลใหม่จำนวน 5 สกุล ที่เพิ่งถูกค้นพบ เป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ที่พบในประเทศไทย 2 สกุล และแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทย จำนวน 5 สปีชีส์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทยและรวมทั้งประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างไรก็ตามจำนวนชนิดของแบคทีเรียที่พบและคัดแยกได้นั้นยังมีจำนวนน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนที่คาดว่ามีอยู่ในธรรมชาติ โดยคาดว่าได้มีการศึกษาและคัดแยกเพียงร้อยละ 5 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คาดว่ามีอยู่ในธรรมชาติ ดังนั้นจึงควรมีการสำรวจความหลากหลาย และเก็บรวมรวมจุลินทรีย์เพื่อการอนุรักษ์ไม่ให้ทรัพยากรด้านนี้ของประเทศสูญหายไปและมีการนำใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างยั่งยืน จากการรายงานก่อนหน้านี้ได้มีการคัดแยกและพบแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่จากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะในตัวอย่างดอกไม้ ผลไม้ และแหล่งอื่นในธรรมชาติ (Katsura และคณะ 2001; Lisdiyanti และคณะ 2003; Tanasupawat และคณะ, 2004; Loganathan และ Nair 2004; Yukphan et al., 2004, 2008; Taweesak และคณะ, 2008) ดังนั้นแหล่งตัวอย่างเหล่านี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาเนื่องจากเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้สูง

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความหลากหลาย เก็บรวบรวม และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติขนอม - หมู่เกาะทะเลใต้ การศึกษาครั้งนี้จะคัดแยกแบคทีเรียจากวัสดุในธรรมชาติ เช่น ดอกไม้ ผลไม้ ดิน น้ำ และตะกอนดินในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม - หมู่เกาะทะเลใต้ จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาศึกษาลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ เช่น ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นข้อมูลในการจำแนกชนิด โดยจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จะมีการเก็บรวมรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. (BIOTEC Culture Collection) เพื่อการศึกษาวิจัยและการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต

## 4. วิธีการดำเนินงาน

### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกแบคทีเรีย

การเก็บตัวอย่างสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียจะทำการเก็บตัวอย่าง จำนวน 2 ครั้ง โดยตัวอย่างที่สนใจสำหรับนำมาคัดแยกจุลินทรีย์ ได้แก่ วัสดุในธรรมชาติ เช่น ผลไม้ ดอกไม้ ดิน กรวด น้ำ และส่วนต่างๆ ของต้นไม้ ในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ เป็นต้น

### 4.2 การคัดแยกแบคทีเรีย

นำตัวอย่างที่ได้มาคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูโดยวิธี Enrichment culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 3.5 จำนวน 4 ชนิด ซึ่งมีแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ Glucose, Sucrose, Sorbitol และ Methanol ซึ่งจะสามารถแยกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสกุลต่างๆได้ จากนั้นบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตุการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถสังเกตุได้จากความขุ่นของอาหาร คัดเลือกตัวอย่างที่มีการเจริญของแบคทีเรีย มาเขี่ยให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Glucose-Ethanol-Calcium carbonate Agar (GECA) จากนั้นบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูโดยสังเกตุจากความสามารถในการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี เขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร GECA จนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์จากลักษณะของการเจริญ ถ้ามีการปนเปื้อนให้เขี่ยเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวอีกครั้งจนได้สายพันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์ เก็บสายพันธุ์ที่บริสุทธิ์แล้วในอาหารวุ้นเอียง GECA สำหรับการศึกษาต่อไป

### 4.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จะเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80°C ณ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. เพื่อการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

### 4.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA

แยกดีเอนเอของแบคทีเรียที่ต้องการจำแนกชนิด และเพิ่มจำนวนดีเอนเอบริเวณ 16S rDNA ด้วย PCR โดยใช้ Universal Primers ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ด้วย ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ตัวอย่างกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยวิธี BLAST Homology Search (http://www.ddbj.nig.ac.jp/ หรือ www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

4.5 **การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ Multiple alignments กับสายพันธุ์ใกล้เคียง ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X (version 1.81) (Thompson et al., 1997) คำนวณ Distance matrices ด้วย Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980) และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) โดยการทำซ้ำ 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985).

6. **ระยะเวลาโครงการ**: 1 ปี (ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2550 – 30 กันยายน 2551)

7. **สถานที่ทำวิจัย**

7.1. หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

113 ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

8. **ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อสิ้นสุดโครงการ**

- เก็บรวบรวมแบคทีเรียได้อย่างน้อย 150 isolates
- พบจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ 1 สายพันธุ์
- มีบทความเสนอตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ 1 เรื่อง
- มีการนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการต่างๆ 1 ครั้ง
- มีฐานข้อมูลแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้

9. **แผนการปฏิบัติงานตลอดโครงการ**

| **กิจกรรม** | **ต.ค. 50 - มี.ค. 51** | **เม.ย. 51 - ก.ย. 51** | **ผลที่คาดว่าจะได้รับ** |
|---|---|---|---|
| 1. การเก็บตัวอย่าง | — — | | อย่างน้อย 100 ตัวอย่าง |
| 2. การคัดแยกแบคทีเรีย | — — | | อย่างน้อย 150 สายพันธุ์ |
| 3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย | | | ทั้งหมดที่คัดแยกได้ |
| 4. การจำแนกแบคทีเรีย | — — | | - จำแนกในระดับสปีชีส์ อย่างน้อย 50 สายพันธุ์<br>- พบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ 1 สปีชีส์ |
| 5. ฐานข้อมูลจุลินทรีย์ | | — | มีฐานข้อมูลจุลินทรีย์ |
| 6. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ | | — | มีบทความวิชาการเสนอตีพิมพ์ (manuscript) 1 เรื่อง |
| 8. Report | | — | รายงานฉบับสมบูรณ์ |

10. **ผลการดำเนินงาน**

**10.1. การเก็บตัวอย่าง การคัดแยก และการเก็บรักษาแบคทีเรีย**

จากการเก็บตัวอย่าง ดอกไม้ ผลไม้ สาหร่ายทะเล และทรายในทะเล จำนวนทั้งสิ้น 179 ตัวอย่าง ในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ ระหว่างวันที่ 12-16 มีนาคม 2550 และ ครั้งที่ 2 วันที่ 1-4 พฤษภาคม 2551 (ภาพที่ 1) สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้ทั้งสิ้น 183 สายพันธุ์ (ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1) โดยได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 จำนวน 70 สายพันธุ์ และจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จำนวน 113 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกทั้งหมดได้ถูกเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80°C และในถังไนโตรเจนเหลว ณ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. เพื่อการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

**ภาพที่** 1. ตัวอย่างลักษณะพื้นที่ ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

**ตารางที่** 1. จำนวนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ

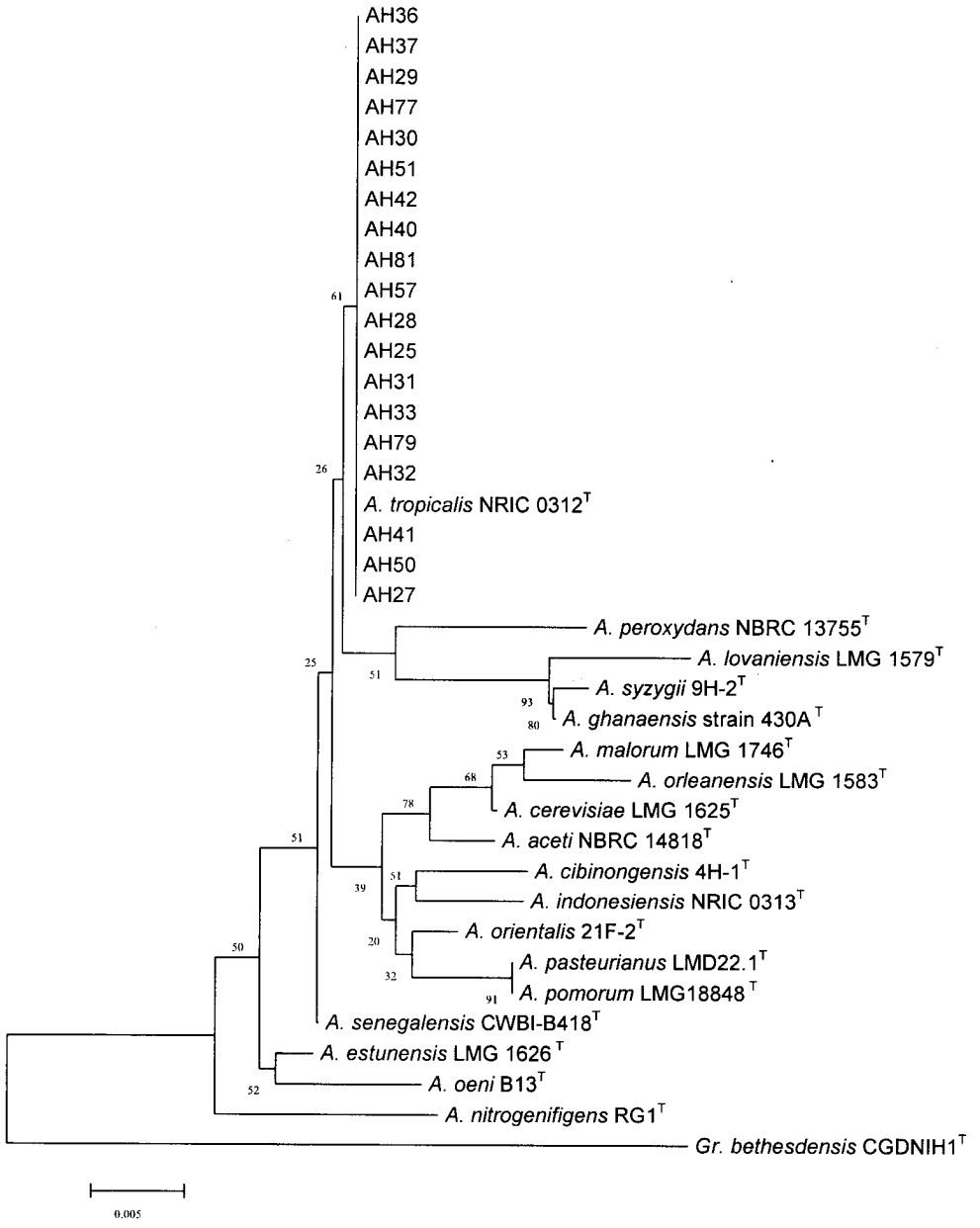
| ประเภทตัวอย่าง | เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 | | | | | เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 | | | | | | รวมทั้งหมด |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | เกาะแตน | เกาะมัดสุ่ม | เกาะวังนอก | ป่าชายเลน | รวม | เกาะแตน | เกาะมัดสุ่ม | เกาะวังนอก | เกาะราบ | หาดท้องชิง | รวม | |
| ดอกไม้ | 36 | 3 | - | 2 | 41 | 51 | 7 | 18 | 3 | 8 | 87 | 128 |
| ผลไม้ | 25 | - | - | - | 25 | 19 | - | 1 | - | - | 20 | 45 |
| สาหร่าย | - | - | 2 | - | 2 | 4 | - | 1 | - | - | 5 | 7 |
| ทราย | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | 2 |
| น้ำจืดขัง | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 |
| **รวมทั้งหมด** | **63** | **3** | **2** | **2** | **70** | **74** | **7** | **21** | **3** | **8** | **113** | **183** |

## 10.2. การจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA

แบคทีเรียจำนวน 79 สายพันธุ์ ได้ถูกคัดเลือกเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA โดยพิจารณาจากตัวอย่างที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่ต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นมี 9 สายพันธุ์ ที่สามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียกลุ่มอื่นซึ่งไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู และ 70 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียซึ่งจำแนกเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งสามารถจำแนกเป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) จำนวน 52 สายพันธุ์ (10 สปีชีส์) โดยจำแนกเป็น 3 สกุล ได้แก่ *Acetobacter*, *Asaia* และ *Gluconobacter* และมี 18 สายพันธุ์ (5 สปีชีส์; 25.7%) ที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ (candidate of new species) ในจำนวนนี้คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสกุลใหม่ (candidate of new genus) จำนวน 3 สายพันธุ์ (1 สกุล; 2 สปีชีส์) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียจำนวน 19 สายพันธุ์ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ดังภาพที่ 2 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Acetobacter tropicalis* ดังนั้นจึงสามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 19 สายพันธุ์เป็น *Acetobacter tropicalis*

แบคทีเรียจำนวน 27 สายพันธุ์ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรียในสกุล *Asaia* ดังภาพที่ 3 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มวิวัฒนาการ (ดังภาพที่ 3) โดยแบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 1 จำนวน 10 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Asaia bogorensis* สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Asaia bogorensis* แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 2 จำนวน 1 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Asaia lannaensis* สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Asaia lannaensis* แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 3 จำนวน 6 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Asaia siamensis* และ *Asaia krungthepensis* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการนี้ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แน่ชัดเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Asaia siamensis* และ *Asaia krungthepensis* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ควรพิจารณาควบคู่กับการจำแนกชนิดด้วยวิธีการอื่น เช่น การเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความเหมือนของดีเอนเอกับดีเอนเอของ type strains (DNA-DNA hybridization) แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 4, 5 และ 6 จำนวน 2, 7 และ 1สายพันธุ์ (ตามลำดับ) มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในสกุล *Asaia* แต่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแตกต่างไปจากแบคทีเรียที่ทราบชื่อแล้ว ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้จึงอาจจะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจะต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลักษณะอื่นๆ เพื่อพิสูจน์แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ต่อไป เช่น การทำ DNA-DNA hybridization ซึ่งแบคทีเรียที่จะเสนอเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่นั้นจะต้องมี % DNA-DNA similarity เมื่อเปรียบเทียบกับ type strains ของสายพันธุ์ใกล้เคียงน้อยกว่า 70%

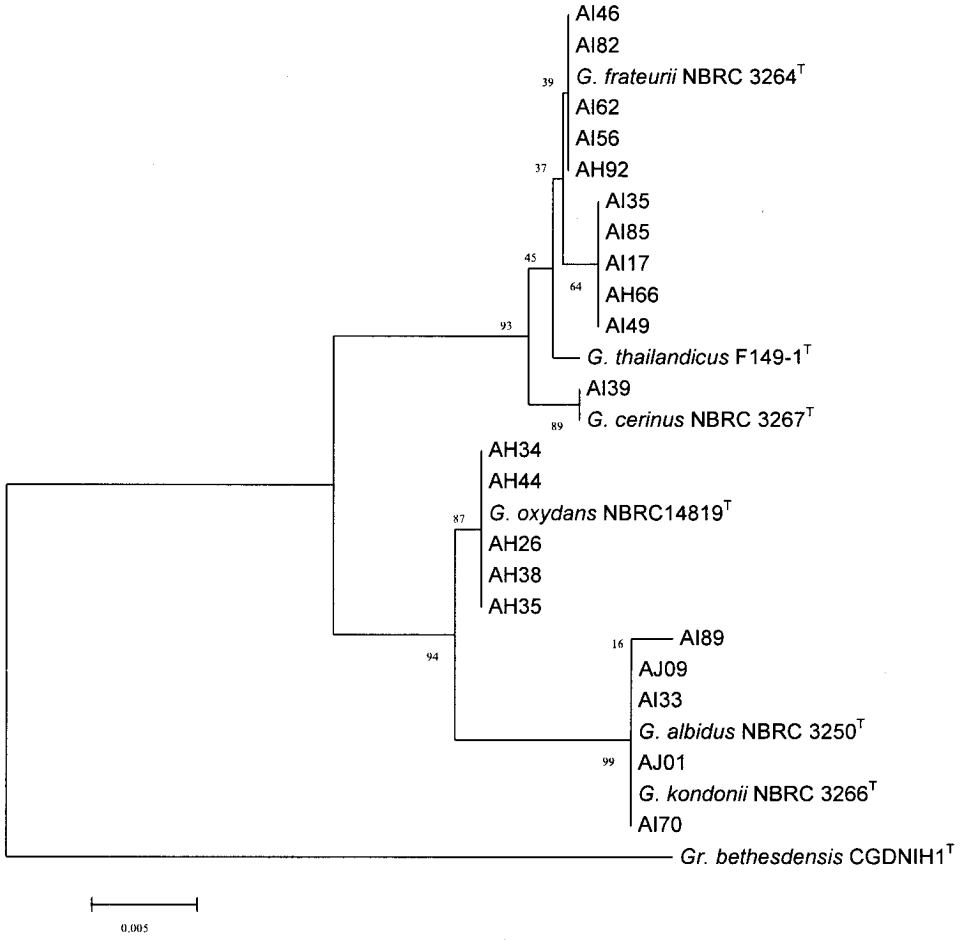



**ภาพที่** 2. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอนเอบริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter*

**ภาพที่** 3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอนเอบริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Asaia*

แบคทีเรียจำนวน 21 สายพันธุ์ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรียสกุล *Gluconobacter* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มวิวัฒนาการ (ดังภาพที่ 4) โดยแบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Gluconobacter frateurii* สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Gluconobacter frateurii* แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 2 จำนวน 5 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Gluconobacter frateurii* และ *Gluconobacter thailandicus* แต่มีลำดับวิวัฒนาการที่แตกต่างไปจาก type strains ของ *Gluconobacter frateurii* และ *Gluconobacter thailandicus* ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้จึงอาจจะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจะต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลักษณะอื่นๆ เพื่อพิสูจน์แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ต่อไป แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 3 จำนวน 1 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Gluconobacter cerinus*

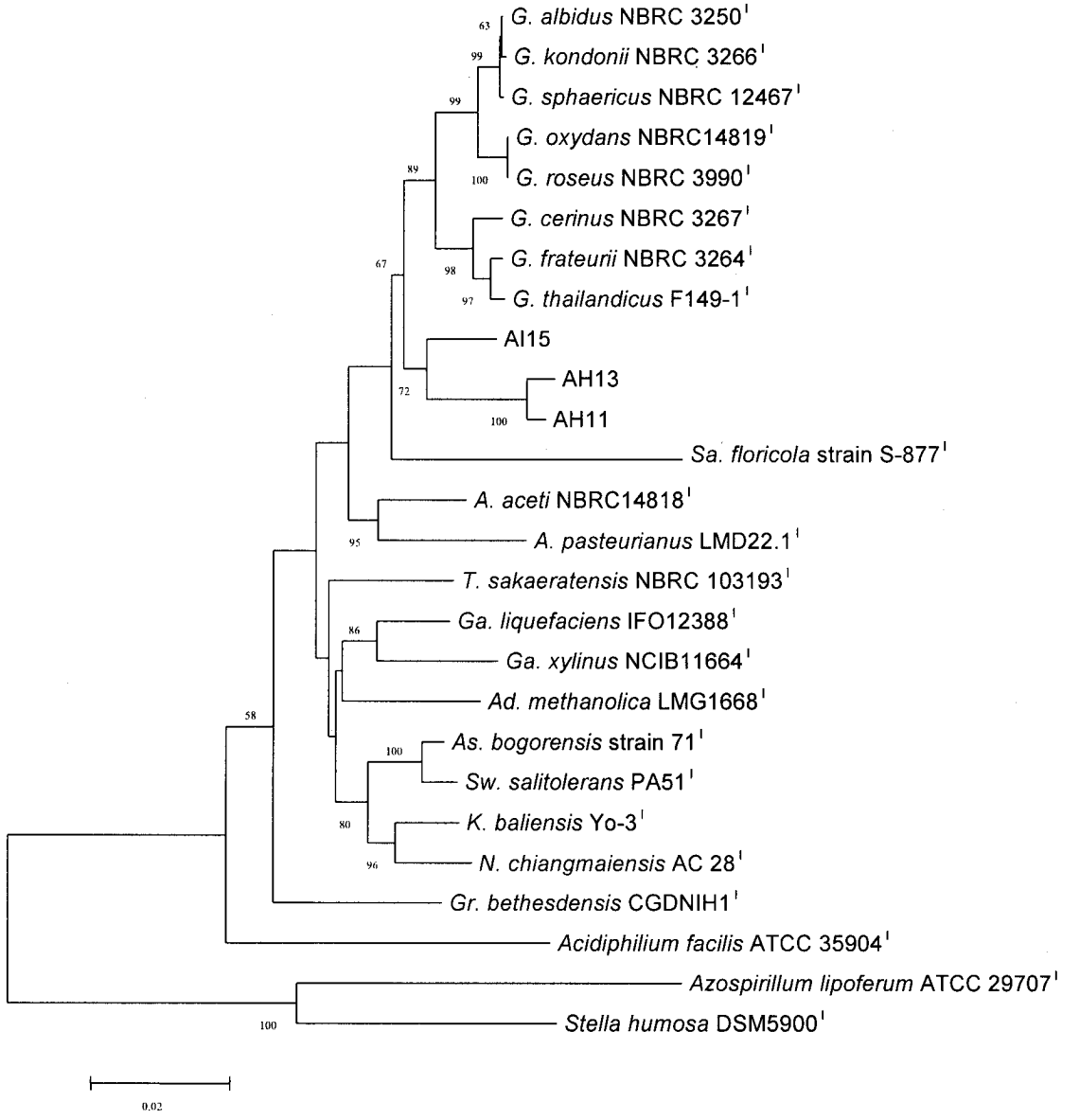
สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Gluconobacter cerinus* แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 4 จำนวน 5 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Gluconobacter oxydans* สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Gluconobacter oxydans* และ แบคทีเรียในกลุ่มวิวัฒนาการที่ 5 จำนวน 5 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ type strains ของ *Gluconobacter albidus* และ *Gluconobacter kondonii* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ควรพิจารณาควบคู่กับการจำแนกชนิดด้วยวิธีการอื่น เช่น การเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความเหมือนของดีเอนเอกับดีเอนเอของ type strains (DNA-DNA hybridization) หรือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ITS




**ภาพที่** 4. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอนเอบริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Gluconobacter*

แบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแตกต่างไปจากแบคทีเรียสกุลอื่นของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Gluconobacter* มากที่สุด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มวิวัฒนาการ (ดังภาพที่ 5) ซึ่งสามารถแบ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม

วิวัฒนาการที่ 1 จำนวน 1 สายพันธุ์ และแบคทีเรียกลุ่มวิวัฒนาการที่ 2 จำนวน 2 สายพันธุ์ แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มวิวัฒนาการนี้อาจจะเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งจะต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลักษณะอื่นๆ เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ต่อไป




**ภาพที่** 5. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอนเอบริเวณ16S rDNA ของแบคทีเรียซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่

**ตารางที่** 2 สรุปผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

| สกุล | ชนิด | เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 | | | | | เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 | | | | | | Grand Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | เกาะแตน | เกาะมัดสุ่ม | เกาะวังนอก | ป่าชายเลน | รวม | เกาะแตน | เกาะมัดสุ่ม | เกาะวังนอก | เกาะราบ | หาดท้องชิง | รวม | |
| แบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ acetic acid bacteria | | 4 | 1 | - | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 | - | - | 3 | 9 |
| *Acetobacter* | *A. tropicalis* | 19 | - | - | - | 19 | - | - | - | - | - | - | 19 |
| *Asaia* | *As. bogorensis* | 5 | - | - | - | 5 | - | - | 2 | 2 | 1 | 5 | 10 |
| | *As. lannaensis* | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | *As. siamensis/ As. krungthepensis* | 1 | - | 1 | - | 2 | 2 | - | 2 | - | - | 4 | 6 |
| | *Asaia* sp. (new sp. candidates) | 4 | - | - | - | 4 | 1 | - | 5 | - | - | 6 | 10 |
| *Gluconobacter* | *G. albidus/ G. kondonii* | - | - | - | - | - | 3 | 1 | - | - | 1 | 5 | 5 |
| | *G. cerinus* | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 |
| | *G. frateurii* | - | - | - | - | - | 4 | - | 1 | - | - | 5 | 5 |
| | *G.oxydans* | 5 | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - | - | 5 |
| | *Gluconobacter* sp. (new sp. candidates) | 1 | - | - | - | 1 | 4 | - | - | - | - | 4 | 5 |
| new genus | new genus | 2 | - | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | 1 | 3 |
| **Grand Total** | | **42** | **1** | **1** | **1** | **45** | **17** | **2** | **11** | **2** | **2** | **34** | **79** |

**10.3. การเปรียบเทียบความเหมือนกันของดีเอนเอของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ AH11, AH13 และ AI15 เทียบกับ Type strains โดย DNA-DNA hybridization**

จากการเปรียบเทียบความเหมือนกันของดีเอนเอของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ AH11, AH13 และ AI15 พบว่าแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ทั้งสามสายพันธุ์นั้นมีความเหมือนกันของดีเอนเมื่อเปรียบเทียบกับ type strain น้อยกว่า 70% (ตารางที่ 3) ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ทั้งสามสายพันธุ์ (Rosselló-Mora และ Amann, 2001)

**ตารางที่ 3** ความเหมือนกันของดีเอนเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ AH11, AH13 และ AI15 และ Type strains โดย DNA-DNA hybridization

| Labeled DNA from | DNA-DNA similarity (%) of | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Isolate AH11 | Isolate AH13 | Isolate AI15 | *Saccharibacter floricola* JCM 12116$^T$ | *Acetobacter aceti* NBRC 14818$^T$ | *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819$^T$ | *Asaia bogorensis* NBRC 16594$^T$ |
| Isolate AH11 | **100.00** | 12.26 | 5.38 | 3.40 | 3.84 | 4.71 | 7.85 |
| Isolate AH13 | 12.64 | **100.00** | 9.26 | 5.78 | 6.82 | 6.32 | 11.52 |
| Isolate AI15 | 5.70 | 7.63 | **100.00** | 4.65 | 5.52 | 5.98 | 8.14 |
| *Saccharibacter floricola* JCM 12116$^T$ | 6.20 | 5.67 | 6.74 | **100.00** | 6.45 | 2.34 | 7.67 |

**10.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ AH11, AH13 และ AI15**

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาชีวเคมี ของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์พบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ดังตารางที่ 4 โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter, Asaia, Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter* และ *Granulibacter* ได้จากความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีเตทและแลคเตท (oxidation of acetate and lactate) และสามารถจำแนกความแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Gluconobacter* และ *Tanticharoenia* ได้จากความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มี 30% Glucose และอาหาร Glutamate และ Mannitol agar และสามารถจำแนกความแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Neoasaia* ได้จากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มี 0.35% acetic acid

**ตารางที่** 4 ลักษณะของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ AH11, AH13 และ AI15

| Characteristics | AH11 | AH13 | AI 15 | *Acetobacter aceti* NBRC 14818$^T$ | *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819$^T$ | *Acidomonas methanolica* NRIC 0498$^T$ | *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388$^T$ | *Asaia bogorensis* NBRC 16594$^T$ | *Kozakia baliensis* NBRC 16664$^T$ | *Swaminathania salitolerans* strain PA51$^T$ | *Saccharibacter floricola* strain S-877$^T$ | *Neoasaia chiangmaiensis* strain AC28$^T$ | *Granulibacter bethesdensis* CGDNIH1$^T$ | *Tanticharoenia sakaeratensis* strain AC37$^T$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Flagellation | None | None | None | Per | Pol | Pol[e] | Per | Per | None | Per | None | None | None | Pol |
| Oxidation of | | | | | | | | | | | | | | |
| Acetate | - | - | - | + | - | + | + | w | w | w | - | - | w | - |
| Lactate | - | - | - | + | - | - | + | w | w | w | w | - | + | - |
| Growth on: | | | | | | | | | | | | | | |
| 30% D-Glucose (w/v) | + | + | + | - | - | +[e] | - | + | w | + | + | + | nd | - |
| Glutamate agar | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - |
| Mannitol agar | + | + | + | vw | + | w | + | + | + | + | + | + | w | + |
| Methanol | | | | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Growth in the presence of | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.35% acetic acid (w/v) | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | - | + | nd | + |
| 1% $KNO_3$[a] | | | | - | - | + | - | - | - | + | nd | - | nd | - |
| Production of acetic acid from ethanol | - | w | + | + | + | + | + | - | + | + | w/- | + | vw | + |
| Water-soluble brown pigment production | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | nd | - |
| Production of dihydroxyacetone from glycerol | - | - | - | + | + | - | + | w | w | + | - | w | - | + |
| Production of levan-like polysaccharide | - | - | - | - | - | - | - | - | + | nd | - | - | nd | - |
| Assimilation of ammoniac nitrogen on | | | | | | | | | | | | | | |

| Characteristics | AH11 | AH13 | AI 15 | *Acetobacter aceti* NBRC 14818$^T$ | *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819$^T$ | *Acidomonas methanolica* NRIC 0498$^T$ | *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388$^T$ | *Asaia bogorensis* NBRC 16594$^T$ | *Kozakia baliensis* NBRC 16664$^T$ | *Swaminathania salitolerans* strain PA51$^T$ | *Saccharibacter floricola* strain S-877$^T$ | *Neoasaia chiangmaiensis* strain AC28$^T$ | *Granulibacter bethesdensis* CGDNIH1$^T$ | *Tanticharoenia sakaeratensis* strain AC37$^T$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D-Glucose | w | - | - | - | w | w | - | + | - | nd | - | - | + | w |
| D-Mannitol | - | - | + | - | w | w | - | + | - | nd | - | w | nd | w |
| Ethanol | w | - | - | + | - | w | - | - | - | nd | - | - | nd | - |
| Acid production from | | | | | | | | | | | | | | |
| D-Mannitol | - | - | + | - | + | w | - | + | - | - | + | w | - | + |
| D-Sorbitol | - | - | w | - | + | - | - | +(d) | - | + | - | +(d) | - | + |
| Dulcitol | - | - | w | - | w | - | - | +(d) | - | v | - | w | - | w |
| Glycerol | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | w/- | + |
| Ethanol | - | w | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + |
| Major isoprenoid quinone | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-9 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | Q-10 | nd | Q-10 |
| DNA G+C mol% | | | | 58.6[f] | 60.6[f] | 62[e] | 64.5[f] | 60.2[g] | 57.2[h] | 57.6-59.9 | 52.3 | 63.1 | 59.1 | 60.6[f] |

+, positive; -, negative; w, weakly positive; vw, very weakly positive; d, delayed; v, variable; nd, not determined.

Cited from [a]Loganathan and Nair[9] except for the data of *Neoasaia chiangmaiensis* strain AC28$^T$ and *Tanticharoenia sakaeratensis* strain AC37$^T$, [b]Jojima *et al.*[10], [c]Yukphan *et al.*[11], [d]Greenberg *et al.*[13], [e]Yamashita *et al.*[4], [f]Yamada *et al.*[28], [g]Yamada *et al.*[7], and [h]Lisdiyanti *et al.*[8]

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความเหมือนกันของดีเอนเอเทียบกับ Type strains โดย DNA-DNA hybridization และลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่นั้นสามารถเสนอชื่อแบคทีเรียสกุลใหม่ จำนวน 1 สกุล 2 ชนิด โดยตั้งชื่อสกุลว่า *Swingsia* และพร้อมเสนอชื่อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิดคือ *Swingsia thailandicus* และ *Swingsia tanensis* ซึ่งขณะนี้อยู่ในระหว่างการเตรียมเอกสารเพื่อขอตีพิมพ์ผลงานวิจัยดังกล่าว

**10.5. การเสนอผลงานงานประชุมวิชาการ**

ได้มีการเสนอผลงานวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์จำนวน 1 เรื่องได้แก่ เรื่อง "Species Diversity of Acetic Acid Bacteria at Khanom-Mu Ko Talae Tai National Park, Nakhonsrithamrat Province" ในงานประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12 ที่ จ.สุราษฎร์ธานี

## 11. สรุปและวิจารณ์ผล

จากการเก็บตัวอย่าง ดอกไม้ ผลไม้ สาหร่ายทะเล และทรายในทะเล จำนวนทั้งสิ้น 179 ตัวอย่าง ในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ ระหว่างวันที่ 12-16 มีนาคม 2550 และ ครั้งที่ 2 วันที่ 1-4 พฤษภาคม 2551 สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้ทั้งสิ้น 183 สายพันธุ์ แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกทั้งหมดได้ถูกเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C และในถังไนโตรเจนเหลว ณ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. เพื่อการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

แบคทีเรียจำนวน 79 สายพันธุ์ ได้ถูกคัดเลือกเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA โดยพิจารณาจากตัวอย่างที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่ต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นมี 8 สายพันธุ์ ที่สามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียกลุ่มอื่นซึ่งไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู และ 71 สายพันธุ์ สามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งสามารถจำแนกเป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) จำนวน 52 สายพันธุ์ (10 สปีชีส์) โดยจำแนกเป็น 3 สกุล ได้แก่ *Acetobacter*, *Asaia* และ *Gluconobacter* สามารถจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวเป็น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. tropicalis*, *As. bogorensis*, *As. lannaensis*, *G. cerinus*, *G. frateurii*, และ *G. oxydans* และไม่สามารถจำแนกได้แน่ชัด 2 กลุ่มวิวัฒนาการ ได้แก่ *As. siamensis/As. krungthepensis* และ *G. albidus/G. kondonii* และมี 19 สายพันธุ์ (6 สปีชีส์; 26.8%) ที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ (candidate of new species) ในจำนวนนี้คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสกุลใหม่ (candidate of new genus) จำนวน 4 สายพันธุ์ (2 สกุล; 2 สปีชีส์) จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ AH11, AH13 และ AI15 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี และการเปรียบเทียบความเหมือนกันของดีเอนเอเทียบกับ Type strain พบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ดังกล่าวเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่จริงซึ่งสามารถจำแนกเป็น 2 ชนิด โดยกำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมเอกสารเพื่อเสนอดีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ และเสนอชื่อแบคทีเรียว่า *Swingsia thailandicus* และ *Swingsia tanensis*

## 12. สรุปผลการดำเนินงานโครงการ

จากการเก็บตัวอย่าง ดอกไม้ ผลไม้ สาหร่ายทะเล และทรายในทะเล จำนวนทั้งสิ้น 179 ตัวอย่าง ในบริเวณอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้ทั้งสิ้น 183 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียจำนวน 19 สายพันธุ์ (6 สปีชีส์; 26.8%) ที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ (candidate of new species) ซึ่งจากการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ AH11, AH13 และ AI15 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี และการเปรียบเทียบความเหมือนกันของดีเอนเอเทียบกับ Type strain พบว่าเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่จำนวน 2 ชนิด โดยเสนอชื่อว่า *Swingsia thailandicus* และ *Swingsia tanensis* ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมเอกสารเพื่อเสนอตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ นอกจากนี้ได้มีการเสนอผลงานวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์จำนวน 1 เรื่องในงานประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12 ที่ จ.สุราษฎร์ธานี และได้มีการปรับปรุงฐานข้อมูลแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้

## เอกสารอ้างอิง


Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the $\alpha$-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 559-563.

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, w., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T., Komakata, K. (2003) Diversity of Acetic Acid Bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiol. Cult. Coll.* **19** (2), 91-99.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., and Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**, 147-165.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., and Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47**, 119-131.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 813-818.

Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y., (2008). *Asaia lannaensis* sp. nov., a New Acetic Acid Bacterium in the *Alpha-Proteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 666-671.

Rosselló-Mora, R., R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews. **25 (1)**, 39–67.

Saitou, N, Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4 : 406-425.

Seearuangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**, 47-53.

Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O. and Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **50**, 159-167.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, J. D. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Res. 24: 4876-4882.

Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. and Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**, 23-28.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823-829.

Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Potacharoen, W., and Yamada, Y., (2008). *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a New Osmotolerant Acetic Acid Bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 672-676.

Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., and Yamada, Y. (2005a). *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**, 301-311.

Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., and Yamada, Y. (2004c). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 313-316.

# ภาคผนวก

**ตารางภาคผนวกที่** 1. รายชื่อของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ

| CODE | BCC Code | Original code | Source | Location | Date of collection |
|---|---|---|---|---|---|
| AH11 | 25710 | IS19G1 | ดอกผกากรอง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH13 | 25711 | IS28GG4 | ดอกชุมเห็ดเทศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH14 | 25712 | IS29GG1 | ลูกย่านาง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH16 | 25713 | IS29GG2 | ลูกย่านาง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH17 | 25714 | IS31G1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH18 | 25715 | IS31G2 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH19 | 25716 | IS34GG1 | ดอกมะเขือพวง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH20 | 25717 | IS34GG2 | ดอกมะเขือพวง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH21 | 25718 | IS35GA1 | ดอกรางจืด | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH22 | 25719 | IS35GA2 | ดอกรางจืด | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH23 | 25720 | IS38G1 | ดอกรัก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH24 | 25721 | IS38G2 | ดอกรัก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH25 | 25722 | IS3GA1 | สาหร่ายทะเลแข็ง | Ao-HinKon, Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH26 | 25723 | IS40G1 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH27 | 25724 | IS40G2 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH28 | 25725 | IS40GA1 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH29 | 25726 | IS40GG1 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH30 | 25727 | IS40GG2 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH31 | 25728 | IS40SU1 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH32 | 25729 | IS40SU2 | ลูกตาล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH33 | 25730 | IS41G2 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH34 | 25731 | IS41G3 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH35 | 25732 | IS41G4 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH36 | 25733 | IS41GA2 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH37 | 25734 | IS41GG1 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH38 | 25735 | IS41GG2 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH39 | 25736 | IS41GG3 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH40 | 25737 | IS41SU1 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |

| CODE | BCC Code | Original code | Source | Location | Date of collection |
|---|---|---|---|---|---|
| AH41 | 25738 | IS41SU2 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH42 | 25739 | IS42GA1 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH43 | 25740 | IS42Ga2 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH44 | 25741 | IS42GG1 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH45 | 25742 | IS42GG2 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH46 | 25743 | IS42SU1 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH47 | 25744 | IS42SU2 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH48 | 25745 | IS42SU3 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH49 | 25746 | IS42SU4 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH50 | 25747 | IS43SU1 | ลูกกระทกลก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH51 | 25748 | IS44SU1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH52 | 25749 | IS46G1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH53 | 25750 | IS46G2 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH54 | 25751 | IS46G3 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH55 | 25752 | IS46GG1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH56 | 25753 | IS46GG2 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH57 | 25754 | IS47G1 | เนื้อในลูกมะพร้าวหล่น | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH58 | 25755 | IS49GG1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH59 | 25756 | IS50G1 | ดอกรสสุคนธ์ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH60 | 25757 | IS50GG1 | ดอกรสสุคนธ์ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH61 | 25758 | IS50GG2 | ดอกรสสุคนธ์ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH62 | 25759 | IS50SU1 | ดอกรสสุคนธ์ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH63 | 25760 | IS50SU2 | ดอกรสสุคนธ์ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH64 | 25761 | IS51G1 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH65 | 25762 | IS51G2 | ดอกไม้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH66 | 25763 | IS53G1 | สาหร่ายริมหาด | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH67 | 25764 | IS53G2 | สาหร่ายริมหาด | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH68 | 25765 | IS56G1 | ทรายก้นทะเล | Ao-Ook, Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH69 | 25766 | IS56G2 | ทรายก้นทะเล | Ao-Ook, Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |

| CODE | BCC Code | Original code | Source | Location | Date of collection |
|---|---|---|---|---|---|
| AH70 | 25767 | IS56G3 | ทรายก้นทะเล | Ao-Ook, Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH71 | 25768 | IS59GG1 | ดอกไม้ | Koh-MudSum, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH73 | 25769 | IS59SU1 | ดอกไม้ | Koh-MudSum, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH74 | 25770 | IS59SU2 | ดอกไม้ | Koh-MudSum, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH75 | 25771 | IS86GA1 | ดอกโกงกาง | Mangrove, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park's Office | 14-Mar-07 |
| AH76 | 25772 | IS86GA2 | ดอกโกงกาง | Mangrove, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park's Office | 14-Mar-07 |
| AH77 | 25773 | IS41G1 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH78 | 25774 | IS41GA1 | ผลไม้ลูกสีแดง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH79 | 25775 | IS43G1 | ลูกกระโทลก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH80 | 25776 | IS43SU2 | ลูกกระโทลก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH81 | 25777 | IS45GA1 | ผลไม้นิ่มสีดำ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 13-Mar-07 |
| AH86 | 25782 | IS98GG1 | สาหร่ายรูปหูหนู | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 14-Mar-07 |
| AH87 | 25783 | IS98GG2 | สาหร่ายรูปหูหนู | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 14-Mar-07 |
| AH88 | 26046 | ISS17GG1 | ดอกหางนกยูง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH89 | 26047 | ISS18G2 | ดอกพลับพลึง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH90 | 26048 | ISS18GG1 | ดอกพลับพลึง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH91 | 26049 | ISS19GG1 | ดอกไม้สีเหลืองคล้ายดอกขี้เหล็ก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH92 | 26050 | ISS20GG1 | ดอกขี้เหล็ก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH93 | 26051 | ISS20SU1 | ดอกขี้เหล็ก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH94 | 26052 | ISS24G1 | ดอกผกากรอง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH95 | 26053 | ISS24G2 | ดอกผกากรอง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH96 | 26054 | ISS24GG1 | ดอกผกากรอง | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH97 | 26055 | ISS32GG1 | ผลไม้สีขาว ใบคล้ายใบจิก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH98 | 26056 | ISS33G1 | ดอกหูกวางทะเล | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AH99 | 26057 | ISS34G1 | ดอกโฮญ่าสีขาว | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI01 | 26058 | ISS34G2 | ดอกโฮญ่าสีขาว | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI02 | 26059 | ISS34GG1 | ดอกโฮญ่าสีขาว | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI03 | 26060 | ISS35GG1 | ดอกไม้สีขาว ใบใหญ่ | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI04 | 26061 | ISS35GG2 | ดอกไม้สีขาว ใบใหญ่ | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |

| CODE | BCC Code | Original code | Source | Location | Date of collection |
|---|---|---|---|---|---|
| AI05 | 26062 | ISS35GG3 | ดอกไม้สีขาว ใบใหญ่ | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI06 | 26063 | ISS37G1 | ดอกกาฝาก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI07 | 26064 | ISS37G2 | ดอกกาฝาก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI08 | 26065 | ISS37G3 | ดอกกาฝาก | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI09 | 26066 | ISS39G1 | น้ำขังในโพรงไม้ | Koh-Wangnok, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI12 | 26067 | ISS49G1 | ดอกไม้สีเหลืองคล้ายดอกถั่ว ใบคล้ายดอกขี้เหล็ก | Koh-Rab, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI13 | 26068 | ISS49G2 | ดอกไม้สีเหลืองคล้ายดอกถั่ว ใบคล้ายดอกขี้เหล็ก | Koh-Rab, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI14 | 26069 | ISS50GG1 | ดอกไม้สีขาว | Koh-Rab, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI15 | 26070 | ISS53GA1 | ดอกคราม | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI16 | 26071 | ISS53GG1 | ดอกคราม | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI17 | 26072 | ISS54G1 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI18 | 26073 | ISS54G2 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI19 | 26074 | ISS54GA1 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI20 | 26075 | ISS54GA2 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI21 | 26076 | ISS54SU1 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI22 | 26077 | ISS54SU2 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI23 | 26078 | ISS54SU3 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI24 | 26079 | ISS54SU6 | ดอกไม้ป่า(ลูกรูปไข่) | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI25 | 26080 | ISS55G1 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI26 | 26081 | ISS55GA1 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI27 | 26082 | ISS55GA2 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI28 | 26083 | ISS55GA3 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI29 | 26084 | ISS55GG1 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI30 | 26085 | ISS55SU1 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI31 | 26086 | ISS55SU2 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI32 | 26087 | ISS55SU3 | ผลไม้ ที่มีดอกสีชมพู-ม่วง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI33 | 26088 | ISS56G1 | ดอกสีชมพู-ม่วง คล้ายดอกโคลงเคลง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |

| CODE | BCC Code | Original code | Source | Location | Date of collection |
|---|---|---|---|---|---|
| AI34 | 26089 | ISS56GG1 | ดอกสีชมพู-ม่วง คล้ายดอกโคลงเคลง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI35 | 26090 | ISS57G1 | ลูกหว้าก้นครก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI36 | 26091 | ISS57G4 | ลูกหว้าก้นครก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI37 | 26092 | ISS57GG1 | ลูกหว้าก้นครก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI38 | 26093 | ISS57GG2 | ลูกหว้าก้นครก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI39 | 26094 | ISS58G1 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI40 | 26095 | ISS58G2 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI41 | 26096 | ISS58GA1 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI42 | 26097 | ISS58SU1 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI43 | 26098 | ISS58SU2 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI44 | 26099 | ISS58SU3 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI45 | 26100 | ISS58SU4 | ดอกโคลงเคลงขี้นก | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI46 | 26101 | ISS59G1 | ดอกหางนกยูงฝรั่ง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI47 | 26102 | ISS59GA1 | ดอกหางนกยูงฝรั่ง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI48 | 26103 | ISS59GG1 | ดอกหางนกยูงฝรั่ง | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI49 | 26104 | ISS60G1 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI50 | 26105 | ISS60G2 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI51 | 26106 | ISS60G3 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI52 | 26107 | ISS60GA1 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI53 | 26108 | ISS60GA2 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI54 | 26109 | ISS60GA3 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI55 | 26110 | ISS60GG1 | ดอกเสลดพังพอนตัวผู้ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI56 | 26111 | ISS61G1 | ดอกผักบุ้งทะเล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI57 | 26112 | ISS61GA1 | ดอกผักบุ้งทะเล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI58 | 26113 | ISS61SU1 | ดอกผักบุ้งทะเล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI59 | 26114 | ISS61SU2 | ดอกผักบุ้งทะเล | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI60 | 26115 | ISS62G1 | ผลไม้ป่า | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI61 | 26116 | ISS62GG2 | ผลไม้ป่า | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |
| AI62 | 26117 | ISS63G1 | ดอกว่านสี่ทิศ | Koh-Tan, Hat Khanom - Mu Ko Thale Tai Nation Park | 4-May-07 |