

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่ย่อย
เซลลูโลสในกระเพาะรูเมนของโคवाल่ำปูน

ผู้เขียน

นางสาวพรทิพย์ แสนยอง

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร. เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อจำแนกชนิดของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคवाल่ำปูนโดยศึกษาวิเคราะห์ 16s rDNA gene และ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรแบคทีเรียย่อยเซลลูโลสในกระเพาะรูเมนของโคवाल่ำปูนโดยการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคवाल่ำปูน จำนวน 3 ตัว มาคัดแยกเชื้อ และ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียย่อยเซลลูโลส จากนั้นนำแบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA gene ด้วยเทคนิค PCR และ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อบ่งชนิดของแบคทีเรีย พบว่า Cellulolytic bacteria มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.4×10^7 CFU/ml สามารถแยกโคโลนีได้ 4 ชนิด คือ โคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะทรงกลม มีขนาดเล็ก โคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะทรงกลม มีขนาดเล็ก และ มีวงใสล้อมรอบ โคโลนีสีขาวอมเหลือง ลักษณะทรงกลม มีขนาดเล็ก และ โคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะทรงกลม มีขนาดใหญ่ การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไอโซเลตกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank $\geq 95\%$ เท่ากับ 14 ไอโซเลต และ มีค่าความเหมือน $< 95\%$ เท่ากับ 6 ไอโซเลต นอกจากนี้การจำแนกตามกลุ่ม phylum พบว่ามีเพียง 1 phylum คือ Gram-positive bacteria ประกอบด้วย *Enterococcus faecalis* เท่ากับ 60% ของไอโซเลตทั้งหมด *Clostridium bartlettii* เท่ากับ 20% ของไอโซเลตทั้งหมด *Clostridium butyricum*, *Clostridium proteolyticum*, *Enterococcus canintestin* และ *Proteus mirabilis* เท่ากับ 5% ของไอโซเลตทั้งหมด ซึ่งจำนวนของ *Enterococcus faecalis* พบมากที่สุดในการเพาะรูเมนของโคवाल่ำปูน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cellulolytic bacteria จำนวน 20 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต CMUCB1, CMUCB2, CMUCB3 และ CMUCB4 มีความคล้ายคลึงกับ *Clostridium bartlettii* strain

DSM16795 ในขณะที่ไอโซเลต CMUCB5, CMUCB6, CMUCB7, CMUCB8, CMUCB9, CMUCB10, CMUCB11, CMUCB12, CMUCB13, CMUCB14, CMUCB15 และ CMUCB16 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus faecalis* strain JCM5803 นอกจากนี้ ไอโซเลต CMUCB17, CMUCB18, CMUCB19 และ CMUCB20 มีความคล้ายคลึงกับ *Proteus mirabilis* strain NCTC11938, *Clostridium butyricum* strain VPI13266, *Enterococcus canintestini* strain LMG13590 และ *Clostridium proteolyticum* strain CG ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ พบว่า CMUCB3 มีความคล้ายคลึงกับ *Clostridium bartlettii* มากที่สุด และ CMUCB15 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus faecalis* มากที่สุด

Thesis Title Genetic Diversity of Cellulolytic Bacteria in Rumen of White Lamphun Cattle

Author Miss Pornthip Sanyong

Degree Master of science (Agriculture) Animal Science

Thesis Advisory Committee Dr. Saowaluck Yammuan-Art Advisor
Assoc. Prof. Dr. Supamit Mekchay Co-advisor

Abstract

The objective of this study were isolate bacteria in rumen of White Lamphun Cattles by 16s rDNA gene and evaluate relationship of bacteria in rumen of White Lamphun Cattles. Rumen fluid was colleted from 3 fisturated White Lamphun Cattles and Cellulolytic bacteria were identified and cultured. Then, DNA were extracted for PCR amplification on 16s rDNA gene of conserved regions and sequence analysis. It was found that concentration of cellulolytic bacteria was 6.4×10^5 CFU/ml and there were 4 catagories of cellulolytic bacteria including small white cocci, small white cocci and surround with clear area, small yellowish - white cocci and large white cocci. Comparative sequence analysis of each isolates with GenBank, whereas it was identical to fragment of 16s rDNA found that homology levels $\geq 95\%$ were 14 isolates and homology levels $< 95\%$ were 6 isolates. Moreover, phylum classification of cellulolytic bacteria revealed that the total 20 isolates belonged to Gram-positive bacteria phylum including *Enterococcus faecalis* were 60% of total isolates. *Clostridium bartlettii* were 20% of total isolates. *Clostridium butyricum*, *Clostridium proteolyticum*, *Enterococcus canintestini* and *Proteus mirabilis* were 5% of total isolates. The amount of *Enterococcus faecalis* was highest in rumen of White Lamphun Cattles. CMUCB1, CMUCB2, CMUCB3 and CMUCB4 had similarity with *Clostridium bartlettii* strain DSM16795. On the other hand, isolates of CMUCB5, CMUCB6, CMUCB7, CMUCB8, CMUCB9, CMUCB10, CMUCB11, CMUCB12, CMUCB13, CMUCB14, CMUCB15 and CMUCB16 had similarity with *Enterococcus faecalis* strain JCM5803, whereas isolates of CMUCB17, CMUCB18, CMUCB19 and CMUCB20 had

similarity with *Proteus mirabilis* strain NCTC11938, *Clostridium butyricum* strain VPI13266, *Enterococcus canintestini* strain LMG13590 and *Clostridium proteolyticum* strain CG, respectively. Moreover, phylogenetic tree analysis found that the similarity between CMUCB3 and *Clostridium bartlettii* was highest and the similarity between CMUCB15 and *Enterococcus faecalis* was highest.