โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทะเลอ่าวไทยตอนกลาง

Population Structure of Bacteria in the Central Gulf of Thailand

นราพร สมบูรณ์นะ* และ ดลพร ศรีพันธ์
Naraporn Somboonna* and Dollaporn Sripan
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ พญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ.10330
*Corresponding author’s e-mail: Naraporn.S@chula.ac.th

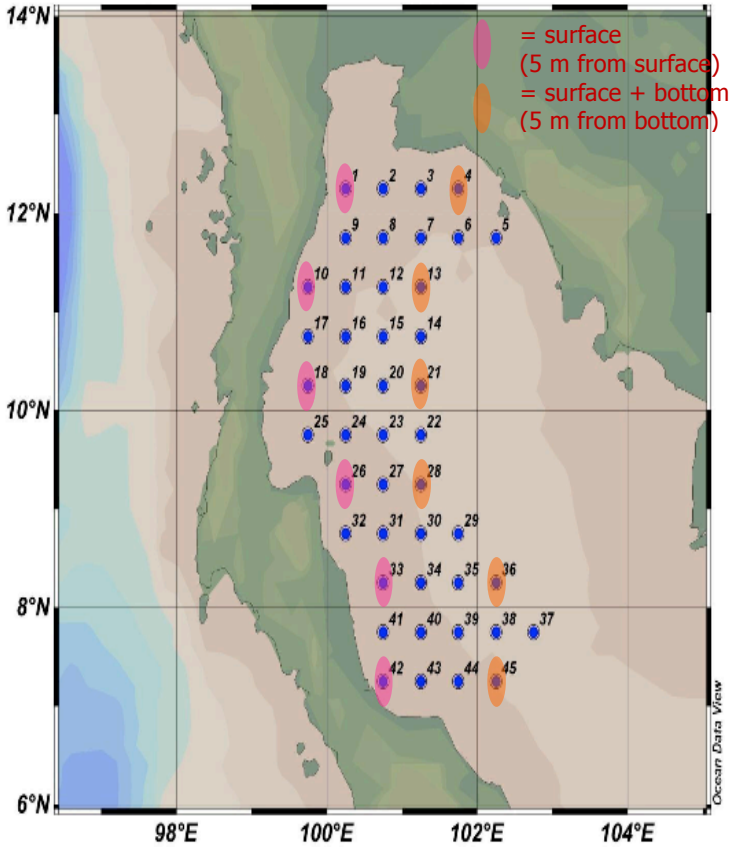
บทคัดย่อ: พื้นที่ส่วนใหญ่ของโลกประกอบด้วยบริเวณที่เป็นทะเลและมหาสมุทรเชื่อมต่อกันประมาณร้อยละ 71 ประเทศไทยมีอาณาเขตติดกับทะเล 2 ส่วน คือ ทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โดยจะมีความอุดมสมบูรณ์ด้วยทรัพยากรสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่และขยายพันธุ์ สิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมถึงจุลินทรีย์ในบริเวณนี้ล้วนมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันในการดำรงชีวิต โดยพบว่าตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ ได้แก่ กิจกรรมของมนุษย์ ฤดูกาล อุณหภูมิ ปริมาณแสง ระดับความลึกของน้ำและระยะห่างจากชายฝั่ง ดังนั้นการสร้างฐานข้อมูลที่สมบูรณ์และติดตามข้อมูลการเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดของประชากรแบคทีเรีย โดยเชื่อมโยงข้อมูลที่ได้กับข้อมูลสภาพแวดล้อมและระบบนิเวศนั้นจะทำให้มีความเข้าใจที่ดีขึ้นในความซับซ้อนของระบบนิเวศ อย่างไรก็ดี วิธีศึกษาความหลากหลายโดยการเพาะเลี้ยงสามารถพบเพียงน้อยกว่า 0.01% โครงการวิจัยนี้จึงทำการสร้างฐานข้อมูลโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่สมบูรณ์ที่พิกัดและระดับความลึกต่างๆ ของน้ำทะเลอ่าวไทยตอนกลางโดยวิธีไม่เพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ฐานข้อมูลที่แท้จริงที่ไม่ขึ้นกับการเพาะเลี้ยง
คำสำคัญ: โครงสร้างประชากร, แบคทีเรีย, อ่าวไทยตอนกลาง, 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ, ซีเควนซิ่ง

Abstract: Earth's surface is covered by sea and ocean for approximately 71%. In Thailand, the marine time zones comprise the Gulf of Thailand, and the Andaman Sea. These zones are enriched with marine lives, habitats and hatchery place. Organisms and microorganism all have intricate relationships in the marine ecosystems. Influencing factors include anthropogenic activity, season, temperature, sunlight, water depth, and distances from the seashore. Hence, complete database for current and ongoing numbers and types of bacteria, relevant to physical and chemical properties help understand these complex marine ecosystems. However, culture-dependent biodiversity study generally discovers less than 0.01%. The present study thereby use culture-independent method to obtain bacterial profiles of different marine geographical coordinates and depths of the Central Gulf of Thailand.
Keywords: population structure, bacteria, Central Gulf of Thailand, 16S ribosomal RNA, sequencing

บทนำ

พื้นที่ของโลกส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำทะเลและมหาสมุทรเชื่อมต่อกันประมาณร้อยละ 71 (Kennedy *et al*. 2010) ประเทศไทย นับว่าเป็นประเทศหนึ่งที่มีอาณาเขตติดทะเล มีความยาวของขอบฝั่งกว่า 2,400 กิโลเมตร ติดกับทะเล 2 ส่วนด้วยกัน คือ ทะเลฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน อ่าวไทยมีกองหินธรรมชาติ ป่าชายเลน แนวปะการัง รวมถึงมีแม่น้ำใหญ่หลายสายที่พัดพาอาหารของสัตว์ทะเลและแร่ธาตุต่างๆลงสู่อ่าวไทย อ่าวไทยจึงมีความอุดมสมบูรณ์ด้วยทรัพยากรสัตว์น้ำนานาพันธุ์ที่เข้ามาหากินขยายพันธุ์และใช้เป็นที่หลบภัยจากคลื่นลมรวมไปถึงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณอ่าวไทยล้วนมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันในการดำรงชีวิตโดยพบว่าตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ ได้แก่ กิจกรรมของมนุษย์ ฤดูกาล อุณหภูมิ ปริมาณแสง ระดับความลึกของน้ำ และระยะห่างจากชายฝั่ง (Dong *et al*. 2010; Yooseph *et al*. 2010) มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์และระบบนิเวศโดยใช้วิธีเมตาจีโนมิคส์ (Susannah *et al*. 2005) รายงานว่าหากทราบรหัสทางพันธุกรรมจะทำให้ทราบชนิด โครงสร้าง การทำงาน และกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ รวมทั้งยังช่วยให้ เข้าใจระบบนิเวศให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

การสร้างฐานข้อมูลที่สมบูรณ์ของประชากรจุลินทรีย์โดยเชื่อมโยงข้อมูลของสภาพแวดล้อมนั้นกับชนิดของจุลินทรีย์จะช่วยให้มีความเข้าใจในระบบนิเวศที่ซับซ้อนให้ดียิ่งขึ้นและเป็นข้อมูลในการอนุรักษ์สิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆอีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อการสืบค้นข้อมูลในภายหลังซึ่งอาจมีการค้นพบจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่และใช้เปรียบเทียบเพื่อจัดกลุ่ม หรือเพื่อใช้เปรียบเทียบความหลากหลายกับทะเลน่านน้ำทั่วโลก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทะเลอ่าวไทยตอนกลางด้วยวิธีเมตาจีโนมิคส์โดยอาศัย next generation sequencing เพื่อสร้างฐานข้อมูลที่สมบูรณ์สำหรับแบคทีเรียในบริเวณนี้และมีความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับระบบนิเวศ ความหลากหลาย และรูปแบบการกระจายของประชากรของแบคทีเรียในทะเลอ่าวไทยตอนกลาง ผลของงานวิจัยนี้ยังมีประโยชน์ต่อการสืบค้นเอนไซม์ทางเทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์ด้วย



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณอ่าวไทยตอนกลางในภาชนะเก็บที่ปลอดเชื้อ (รูปที่ 1) โดยภาชนะที่ใช้เก็บน้ำตัวอย่าง ใช้ขวดน้ำดื่มขนาด 6 ลิตร 4 ขวดต่อตัวอย่างโดยเปิดขวดแล้วเทน้ำดื่มทิ้งก่อนใช้เก็บตัวอย่าง
2. สกัดเมตาจีโนมิคส์ดีเอ็นเอ โดยทำตามขั้นตอน Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (Epicenter, Wisconsin, USA)

   2.1 กรองตัวอย่างน้ำทะเลอย่างหยาบด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อหนา 4 ชั้น จะได้ตัวอย่างน้ำทะเลที่มีจุลินทรีย์ขนาดไม่เกิน 30 ไมครอน

   2.2 นำตัวอย่างน้ำทะเลที่กรองอย่างหยาบแล้วมากรองอย่างละเอียดด้วยชุดเครื่องกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน

   2.3 สกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ โดยทำตามขั้นตอนของ Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (Epicenter, Wisconsin, USA) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 100 ไมโครลิตร เก็บเมตาจีโนมิคส์ดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C
3. ตรวจสอบคุณภาพของเมตาจีโนมิคส์ดีเอ็นเอโดยการทำ agarose gel electrophoresis

   3.1 ทำ agarose gel electrophoresis ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ใช้ 1 kb plus DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ตั้ง voltage สูง 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเปลี่ยน voltage เป็น 50 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

   3.2 ถ่ายภาพภายใต้เครื่อง UV transilluminator และ Gel documentation เพื่อตรวจดูแถบของดีเอ็นเอ
4. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

   4.1 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีทำ agarose gel electrophoresis และตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอ

   4.2 นำเจลที่มีแถบดีเอ็นเอมาสกัดเจลเพื่อเอาดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย elution buffer และ ddH_2O ตาม ลำดับ โดยปริมาตรขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

   4.3 เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยทำเทคนิค PCR ตามสภาวะดังนี้ ขั้นแรกใช้อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$C นาน 4 นาที ต่อมาสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$C นาน 45 วินาที, อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C นาน 55 วินาที, อุณหภูมิ 72 $^{\circ}$C นาน 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 30-35 รอบ จากนั้นใช้อุณหภูมิ 72 $^{\circ}$C นาน 10 นาที

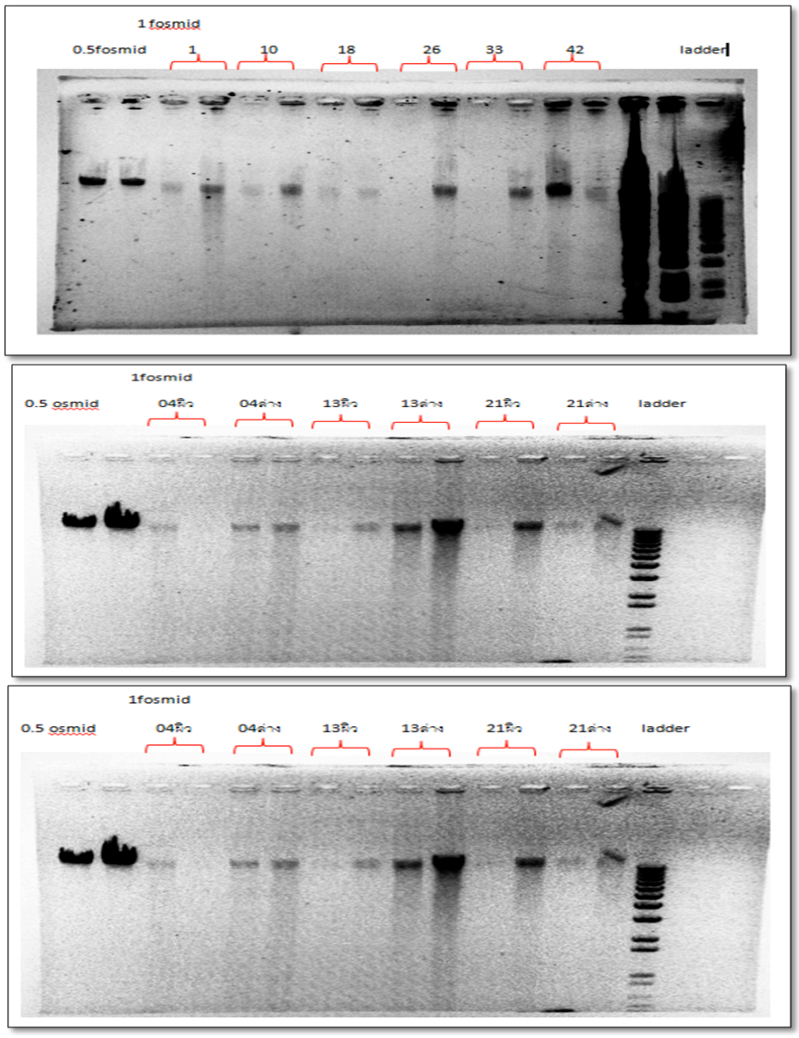
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากทุกตัวอย่างๆ ละ 2 ซ้ำ และตรวจสอบคุณภาพของเมตาจีโนมิคส์ดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบดีเอ็นเอของตัวอย่างน้ำทะเลมีขนาดมีขนาดตามที่ระบุไว้ในชุดสกัดคือมีหนึ่งแบนอยู่ในช่วง 12,000-40,000 ลำดับเบส ดังรูปที่ 2 และค่าดีเอ็นเอที่ประมาณได้จากการสกัดซ้ำ 1 และซ้ำ 2 นำมาคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ยในหน่วยนาโนกรัมต่อลิตร ได้ดังตารางข้างล่าง พบว่าบริเวณน้ำลึกส่วนใหญ่จะมีค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอซึ่งแสดงถึงความอุดมสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์มากกว่าที่บริเวณผิวน้ำ (เช่น 45 surface เปรียบเทียบกับ 45 bottom, 36 surface เปรียบเทียบกับ 36 bottom และ 28 surface เปรียบเทียบกับ 28 bottom เป็นต้น) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อน เนื่องจากบริเวณก้นทะเลได้รับผลกระทบจากความแปรปรวนของอากาศ กระแสน้ำ มลพิษจากเรือ และอื่นๆน้อยกว่า นอกจากนี้คาดว่าบริเวณน้ำก้นทะเลอาจมีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ทั้งในน้ำทะเลและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในตะกอนดินด้วย ดังนั้นปริมาณจุลินทรีย์ที่บริเวณก้นทะเลจึงมากกว่าบริเวณ ผิวน้ำ

อย่างไรก็ดี เพื่อวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการทำ next generation sequencing ซึ่งต้องใช้เงินทุนและคณะผู้วิจัยจะดำเนินการในลำดับต่อไป

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทะเลอ่าวไทยตอนกลางพบว่าในแต่ละพื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง ทั้งบริเวณผิวน้ำและน้ำก้นทะเลพบว่ามีประชากรจุลินทรีย์อยู่ทุกจุดแต่มีความหลากหลายเพียงใดนั้นจะมีการศึกษาต่อโดยการทำ next generation sequencing ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่ามีจุลินทรีย์ชนิดใดบ้างและเป็นสัดส่วนเท่าใดในแต่ละพื้นที่ และจะช่วยให้มีความเข้าใจในความหลากหลายและห่วงโซ่อาหารหรือระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตในทะเลอ่าวไทยตอนกลางได้ดีขึ้น และนำไปสู่การสร้างฐานข้อมูลประชากรแบคทีเรียบริเวณอ่าวไทยตอนกลางที่สมบูรณ์



รูปที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์ของเมตาจีโนมิคส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างต่อน้ำ 1 ลิตร ในหน่วยนาโนกรัมต่อลิตร

Station no.	DNA in ng per liter of seawater	Station no.	DNA in ng per liter of seawater
1	36.75	36 bottom	84
10	26.25	28 surface	21
18	15.75	28 bottom	210
26	40.95	21 surface	57.75
33	30.45	21 bottom	31.5
42	115.5	13 surface	26.25
45 surface	47.25	13 bottom	147
45 bottom	78.75	4 surface	14.7
36 surface	57.75	4 bottom	47.25

เอกสารอ้างอิง

Susannah GT and Edward MR (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*; 6: 805-814

Edward FD. (2005) Microbial community genomics in the ocean. *Nature Reviews Microbiology* 3: 459–469

Dong H, Jiang H, Yu B and Liu X. (2010) Impacts of environmental change and human activity on microbial ecosystems on the Tibetan Plateau, *NW China. GSA*; 20 : 4-10.

Humblot C and Guyot JP. (2009) Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Appl Environ Microbiol*; 75(13): 4354-61.

Shaw AK, Halpern AL, Beeson K, Tran B, Venter JC and Martiny JBH. (2008) It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. *Environ Microbiol*; 10: 2200-2210.