โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายของโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งงานและผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิ้ม *Apis florea*

Diversity of probiotic bacteria in digestive tract of workers and drones of dwarf honeybee *Apis florea*

ชื่อนิสิต นางสาวอาภาศิริ นพรัตน์ **เลขประจำตัว** 6032066423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหลากหลายของโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งงานและผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิ้ม *Apis florea*

Diversity of probiotic bacteria in digestive tract of workers and drones of dwarf honeybee *Apis florea*

นางสาวอาภาศิริ นพรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา
ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: ความหลากหลายของโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งงานและผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิ้ม *Apis florea*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวอาภาศิริ นพรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย (probiotic bacteria) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพที่ดีต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ช่วยรักษาสมดุลของภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหารและลดการบุกรุกของสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน จึงทำให้ปัจจุบันคนหันมาสนใจศึกษา probiotic bacteria มากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีโรคในผึ้งซึ่งเป็นแมลงที่สำคัญต่อการผสมเกสรพืชเศรษฐกิจจำนวนมาก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะค้นหา probiotic bacteria ในทางเดินอาหารของผึ้ง เพื่อนำไปสู่การสร้างสุขภาวะที่ดีของผึ้งในอนาคต และเพื่อเป็นการทดแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในผึ้ง เริ่มแรกสนใจศึกษา probiotic bacteria ในผึ้งมิ้ม (*Apis florea*) แต่พบอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) แทน นำตัวอย่างผึ้งหลวงในวรรณะผึ้งงานที่เก็บมาจากจังหวัดสมุทรสงครามจำนวน 3 ตัวมาทำการกำจัดเชื้อภายนอกตัวผึ้งด้วย 10 mL 70% ethanol เป็นเวลา 1 นาที, ตามด้วย 10 mL 6% (w/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 1 นาที, แล้วล้างด้วย 10 mL sterile d-H_2O เป็นเวลา 1 นาที, ตามลำดับ ตัดเอาเฉพาะส่วนท้อง (abdomen) ของผึ้งไปทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเฉพาะในภาวะที่มีออกซิเจน นำส่วนท้องของผึ้งไปบดใน phosphate buffer saline ปริมาตร 700 μL ด้วย pestle พลาสติก ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที, แล้วจึงดูดส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 200 μL ลงไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Brain heart infusion*, นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, ข้ามคืน ทำการนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวที่พบ สังเกตลักษณะ และทำ colony PCR เพื่อ identify ชนิดของแบคทีเรีย เลือกโคโลนี 4 โคโลนี สกัด DNA โดยใช้ปลาย pipette tip สัมผัสโคโลนีเล็กน้อย แล้วย้ายไปสู่ 10 mM TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 20 μL, ทำให้เซลล์แตกโดยเก็บไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที, แล้วบ่มที่ 96 °C เป็นเวลา 5 นาที, แล้ว vortex, ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วจึงทำการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) เตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรสุดท้าย 25 μL ที่ประกอบด้วย 12.5 μL Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara), 2 μL DNA, 1 μL ของแต่ละ primer (10 μM) และ d-H_2O, มีภาวะการทำงานที่เริ่มต้นด้วย 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที, 55 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที, และสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที สังเกต PCR product ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, คาดหวัง PCR product ขนาด 1,400 bp, นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย *QIAquick* PCR purification kit (cat. # 28104, Qiagen) และส่งไปทำ DNA sequencing เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่อไป จากการศึกษาเหล่านี้อาจทำให้ทราบชนิดของ probiotic bacteria ในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง probiotic bacteria และสุขภาพของผึ้งเพื่อช่วยลดการเกิดโรคในผึ้ง จนนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ผึ้งได้ในอนาคต

คำสำคัญ: โพรไบโอติกแบคทีเรีย, ผึ้งหลวง, ยาปฏิชีวนะ, โรคของผึ้ง, 16S rRNA

Research Title	: Diversity of probiotic bacteria in digestive tract of workers and drones of dwarf honeybee *Apis florea*
Student name	: Miss Arpasiri Nopparat
Advisor	: Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

Probiotic bacteria are non-pathogenic microorganisms. It is important to promote good health for host, maintain immune balance in the digestive system and reduce the invasion of pathogenic microorganisms. Thus, it leads to an interest of many people nowadays. Since there are many diseases in honeybees, important insects in the pollination of many economic crops, we are interested in finding probiotic bacteria in the bees' digestive tract to contribute to the health of bees in the future and to replace or reduce the use of antibiotics to treat disease in bees. At the beginning, we were interested in probiotic bacteria in dwarf honeybee *Apis florea* but obstacles in bacterial culture were found. Hence, giant honeybee *A. dorsata* was used instead. Three workers of *A. dorsata* collected from Samut Songkhram province were externally sterilized by 10 ml of 70% ethanol for 1 min and 10 ml of 6% (w/v) sodium hypochlorite for 1 min. Then, they were rinsed with 10 ml of sterile d-H_2O for 1 min. After dry, only abdomen was used to cultivate bacteria under aerobic condition. Three abdomens were homogenized in 700 μL of 1x phosphate buffer saline with plastic pestle. The sample was spun at 6,000 rounds per min at room temperature for 1 min, and then 200 μL of supernatant was spread on Brain heart infusion agar. The plate was incubated at 37 °C, overnight. Next, number of single colonies was counted. Characteristics of colonies were observed. Colony PCR was next used to identify bacterial species. Four colonies were representative for DNA extraction. A sterile pipette tip was slightly touched a target colony and transferred to 20 μL of 10 mM TE buffer (pH 7.5). Cells were broken by keeping at -20 °C for 30 min, incubating at 96 °C for 5 min, then, mixed by vortex. It was repeated 3x. Next, partial sequences of 16S rRNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR). A reaction mixture (final volume of 25 μL) contained 12.5 μL of Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara), 2 μL of DNA, 1 μL of each primer (10 μM) and d-H_2O. The condition of PCR was initially started with 95 °C for 1 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. Then, the last final extension was at 72 °C for 7 min. PCR product was checked by 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis with the expected size of PCR product at 1,400 bp. After that, PCR product was purified by QIAquick PCR purification kit (cat. # 28104, Qiagen) and sent for DNA sequencing in order to identify bacteria species in the future. These studies might be used to identify the probiotic bacteria in the *A. dorsata*'s digestive tract. It can be used as a guideline for studying the relationship

between probiotic bacteria and bee's health to reduce disease in bees and lead to increasing the yield of bee products in the future.

Keywords: 16S rRNA, antibiotic, *Apis dorsata*, bee disease, probiotic bacteria

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือมาโดยตลอด ตั้งแต่เริ่มคิดโครงการ จัดหาสถานที่จับผึ้ง วางแผนการทดลอง สอนและให้ความรู้เกี่ยวกับวิธีทำการทดลองในขั้นตอนต่าง ๆ แก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นขณะทำการทดลอง ตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขปรับปรุงรูปเล่มรายงานให้มีความสมบูรณ์ รวมทั้งอนุเคราะห์ห้องทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนคอยให้กำลังใจและให้ข้อคิดดี ๆ เสมอมา ทำให้โครงการนี้สามารถดำเนินไปได้อย่างราบรื่นและสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวพรรณทิวา คงคารัตน์ พี่ปริญญาเอกในห้องปฏิบติการ รวมถึงนางสาวกัณธิดา ภมรพล นางสาวกนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธุ์ และนางสาวอรณัชชา จำลอง เพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้จนทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณมารดา และเพื่อน ๆ ในภาควิชาชีววิทยาที่น่ารักทุกคน ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจจนทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, อาจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา, อาจารย์ ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. ผึ้งหลวง 3
2.2. โพรไบโอติก 4
2.2.1. โพรไบโอติกที่พบในทางเดินอาหารของผึ้ง 5
2.3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA 5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 6
3.1. การเก็บตัวอย่างผึ้งหลวง 6
3.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 6
3.3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 7
3.4. การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 7
3.5. การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ 8
3.6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย 8
บทที่ 4 ผลการศึกษา 9
4.1. ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 9
4.2. ผลการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 10
4.3. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย 11
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 12
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 13
6.1. สรุปผลการศึกษา 13
6.2. ข้อเสนอแนะ 13
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 13

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 13
เอกสารอ้างอิง 14
ภาษาไทย 14
ภาษาอังกฤษ 14
ภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของดีเอ็นเอแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* 20
ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของดีเอ็นเอแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* เทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN 21

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ผึ้งหลวง *APIS DORSATA* 3
ภาพที่ 2 รังผึ้งหลวง 4
ภาพที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *BRAIN HEART INFUSION* 6
ภาพที่ 4 ตรวจสอบ PCR PRODUCT ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS..... 8
ภาพที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *BRAIN HEART INFUSION*..... 9
ภาพที่ 6 ผลการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CROSS STREAK PLATE 10
ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบ PCR PRODUCT ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS .. 11

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ในปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบการใช้ชีวิตเนื่องจากวิถีชีวิตและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ผู้คนส่วนใหญ่จึงเริ่มให้ความสนใจและตระหนักเกี่ยวกับปัญหาสุขภาพมากขึ้น ส่งผลให้ผู้คนหันมาออกกำลังกายและเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย รวมถึงมีการใช้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น อาหารเสริม มาเป็นตัวช่วยในการบำรุงและดูแลสุขภาพอีกทางหนึ่ง โดยผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เป็นที่นิยมนั้นมักมีส่วนประกอบสำคัญอย่างโพรไบโอติก เนื่องจากมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่บ่งชี้ให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อร่างกายของมนุษย์เผยแพร่ออกมาอย่างต่อเนื่องทำให้อุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่มีความสนใจในการศึกษาและส่งเสริมการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์สุขภาพเพิ่มขึ้น (Kechagia et al., 2013)

โพรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคซึ่งมีบทบาทสำคัญในการบำรุงรักษาสมดุลของภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหารผ่านการมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับเซลล์ภูมิคุ้มกัน รวมถึงการลดค่า pH ของลำไส้ ลดการบุกรุกจากสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรค และช่วยปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันภายในโฮสต์ โดยกลุ่มโพรไบโอติกแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษามากที่สุด ได้แก่ *Lactobacillus, Bifidobacterium* และ *Saccharomyces* รวมถึงยังมีหลักฐานทางวิชาการจำนวนมากที่ยืนยันว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียนั้นส่งผลอย่างมีประสิทธิภาพต่อโรคที่เกิดจากความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคท้องร่วงเฉียบพลันจากการติดเชื้อ โรคท้องร่วงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ โรคท้องร่วงจากเชื้อ *Clostridium difficile* (Williams, 2010; Wilkins & Sequoia, 2017)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในต่างประเทศที่ศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารของผึ้งและการเสริมสร้างสุขภาวะที่ดีของผึ้งโดยการใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกแบคทีเรียอีกมากมาย โดยการเพิ่มขึ้นของผลผลิตน้ำผึ้งนั้นส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับสุขภาพของฝูง ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งเป็นผลมาจากถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติ อาหาร น้ำหวานเกสร และปริมาณน้ำ โดยฝูงผึ้งที่มีสุขภาพดีจะสามารถผลิตน้ำผึ้งได้มากกว่า ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับกลไกระดับโมเลกุลของโพรไบโอติกแบคทีเรียในการปกป้องฝูงผึ้งจากเชื้อโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษา (Royan, 2019)

รายงานการวิจัยของคุณ Daisley และคณะ (2019) ที่ได้ทำการทดลองนำ BioPatty ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงผึ้งชนิดหนึ่งที่อุดมไปด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรียหลากหลายชนิด เช่น

Lactobacillus plantarum Lp39, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 *และ Lactobacillus kunkeei* BR-1 มาใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ที่ติดเชื้อ *Paenibacillus larvae* อันเป็นสาเหตุการเกิดโรคตัวอ่อนผึ้งเน่าอเมริกัน (Amercican foulbrood disease) หนึ่งในโรคระบาดร้ายแรงในผึ้งพันธุ์ พบว่าสามารถลดความชุกของเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงยังสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของผึ้งพันธุ์ในระยะตัวอ่อนที่ติดเชื้อของโรคได้อีกด้วย

ในประเทศไทยผึ้งเป็นหนึ่งในแมลงที่มีความสำคัญต่อความหลากหลายทางระบบนิเวศน์อย่างมาก โดยผึ้งมีส่วนช่วยในการผสมเกสรให้กับพืชที่มีดอก ทำให้เกิดการกระจายพันธุ์ และเกิดเป็นความหลากหลายทางสปีชีส์ (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2548) นอกจากนี้ผึ้งยังเป็นแมลงเศรษฐกิจที่เป็นประโยชน์และมีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์มาอย่างแพร่หลายและยาวนาน ทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร เครื่องสำอาง การแพทย์ และสิ่งแวดล้อม จึงมีการเลี้ยงผึ้ง เพื่อเก็บผลผลิตจากผึ้งโดยเฉพาะ ซึ่งนำมาสู่อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งที่ทำให้เกิดการสร้างรายได้และการจ้างงานมหาศาล (ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร, 2561) และถึงแม้ยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคร้ายแรงในฟาร์มผึ้งในประเทศไทย แต่ก็มีหลายพื้นที่ที่ประสบปัญหาโรคในผึ้งเช่นเดียวกันกับนานาประเทศทั่วโลก เช่น พบการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน (European foulbrood disease) และการติดเชื้อจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคชอล์คบรูด (Chalkbrood) ในผึ้งพันธุ์ (Seanbualuang, 2012)

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

ค้นหาโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* เนื่องจากพบอุปสรรคในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนสายพันธุ์ผึ้งจากผึ้งมิ้ม *Apis florea* มาทำการศึกษาในผึ้งหลวงแทน โดยทำการศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ และมุ่งหวังเพื่อให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการสร้างสุขภาวะที่ดีของผึ้ง รวมถึงทดแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในผึ้ง

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ผึ้งหลวง

ผึ้งหลวง หรือ Giant honeybee (*Apis dorsata*) เป็นหนึ่งในผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทย และจัดเป็นผึ้งที่มีขนาดของลำตัวใหญ่ (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และคณะ, 2549) มีการแพร่กระจายครอบคลุมหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เนปาล อินเดีย อินโดนีเซีย กัมพูชา ลาว เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย และบริเวณอ่าวเปอร์เซีย (Maa, 1953; Sakagami et al., 1980) สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มักจะทำรังขนาดใหญ่อยู่บนต้นไม้สูง ๆ หรือห้อยอยู่ตามหน้าผาและอาคารต่าง ๆ รวมถึงมักพบรังของผึ้งหลวงอยู่ในบริเวณเดียวกันเป็นจำนวนมาก (Oldroyd & Wongsiri, 2006; Oldroyd et al., 2000) โดยรังของผึ้งหลวงจะมีลักษณะคล้ายรูปครึ่งวงรี แผ่นรวงรังมีชั้นเดียว และมีน้ำผึ้งอยู่ประมาณ 1.8-4 กิโลกรัมต่อหนึ่งรัง (Kallapur, 1950; Morse & Laigo, 1969) คนไทยในท้องถิ่นส่วนมากนั้นเชื่อว่าน้ำผึ้งจากผึ้งหลวงมีคุณภาพมากกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ทั้งน้ำผึ้งและตัวอ่อนผึ้งจากผึ้งหลวงเป็นที่นิยมและส่งผลต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Oldroyd & Wongsiri, 2006) รวมถึงผึ้งหลวงยังมีบทบาทสำคัญในการผสมเกสรของพันธุ์ไม้และพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในบริเวณที่ราบลุ่มแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อีกด้วย (Itioka et al., 2001; Oldroyd & Nanork, 2009) โดยทั่วไปผึ้งหลวงจะใช้เวลาเกาะทำรังประมาณ 3-4 เดือนเท่านั้น เมื่อเกิดการขาดแคลนอาหารก็จะทำการอพยพไปหาที่อยู่ใหม่ ซึ่งผึ้งหลวงสามารถอพยพเป็นระยะทางไกล ๆ ได้ และหากพบบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ก็จะกลับมาทำรังซ้ำเป็นประจำทุกปี (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และคณะ, 2549) นอกจากนี้ผึ้งหลวงยังเป็นผึ้งที่มีพฤติกรรมที่ดุร้าย หากรังถูกบุกรุกหรือถูกรบกวนจะมีผึ้งงานจำนวนหนึ่งบินออกมาไล่ต่อยผู้บุกรุก และผึ้งงานยังสามารถบินออกไปหาอาหารในระยะทางไกล ๆ ได้อีกด้วย (Lindauer, 1961; Morse et al., 1969; Seeley et al., 1982)

ภาพที่ 2 ผึ้งหลวง *Apis dorsata*
(https://www.flickr.com/photos/nico_bees_wasps/5592220666)

ภาพที่ 2 รังผึ้งหลวง

(https://www.planetbee.org/planet-bee-blog//bee-case-study-apis-dorsata)

2.2. โพรไบโอติก

โพรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะของระบบทางเดินอาหาร ไม่ก่อให้เกิดโรคและมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยมีส่วนช่วยในการกระตุ้นกลไกของระบบภูมิต้านทาน (Mortazavian, 2007; Salvatore, 2010) ปรับปรุงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (Floch et al., 2011) ยับยั้งการก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่าง ๆ (Toma, 2006; Salminen, 2005) รวมถึงความสามารถในการแข่งขันการเข้าเกาะเยื่อบุผนังลำไส้เพื่อลดปริมาณการเข้าเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคผ่านการปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เช่น แบคเทอริโอซิน หรือสารเมตาบอไลต์ เช่น กรดอะซิติกและกรดแลคติก (Candela et al., 2008; Cotter et al., 2005; Servin 2004) อีกทั้งยังไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Isa & Razavi, 2017)

โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของโพรไบโอติกกับสุขภาวะที่ดีของร่างกายนั้นมีมาอย่างยาวนาน ตั้งแต่ในปี ค.ศ.1900 คุณ Tissier ทำการแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* จากทารกที่ดื่มนมมารดาได้เป็นคนแรก และพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของทารกเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการป้องกันภาวะท้องเสียในทารกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่พบในลำไส้ของทารกที่ไม่ได้ดื่มนมมารดา (Schrezenmier & de Verse, 2001) จากนั้นก็มีการวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติกและสุขภาวะที่ดีของร่างกายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนทำให้โพรไบโอติกเป็นที่รู้จักและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ซึ่งโพรไบโอติกแบคทีเรียส่วนใหญ่นั้นจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีกลุ่มของ *Lactobacillus* และ

Bifidobacterium เป็นสายพันธุ์หลักที่ใช้ในการรักษาความผิดปกติของลำไส้ (Marco et al., 2006) แต่ก็มีโพรไบโอติกแบคทีเรียบางตัวที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* Nissle 1917 (Nissle 1959) ที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการท้องผูกเรื้อรังและอาการลำไส้ใหญ่บวมในประเทศเยอรมนี (Mollenbrink & Bruckschen, 1994; Schutz, 1989)

2.2.1. <u>โพรไบโอติกที่พบในทางเดินอาหารของผึ้ง</u>

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของผึ้งนั้นมีลักษณะเฉพาะ โดยแบคทีเรียที่พบมากมีทั้งหมด 3 กลุ่ม (Phyla) หลัก คือ *Proteobacteria*, *Firmicutes* และ *Actinobacteria* ซึ่งมีบางชนิดจัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถพัฒนาไปเป็นโพรไบโอติกได้ เนื่องจากสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เพปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) และกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก กรดอะซิเตต และกรดฟอร์มิก) ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อโรคได้ (Lamei, 2018; Olofsson et al., 2016) รวมถึงมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากผึ้งต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Niode et al., 2020)

2.3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

การจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA นั้นเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากสามารถพบยีน 16S rRNA ได้ในแบคทีเรียทุกชนิด (Woese, 1987) และยังสามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรียที่เติบโตได้ยาก รวมถึงนำไปใช้กับตัวอย่างที่ผ่านการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย (Relman & Falkow, 1992; Brouqui & Raoult, 2001; Harris et al., 2002)

ยีน 16S rRNA เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.5 kb จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในโพรแคริโอต สามารถนำมาใช้จำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูง (Gürtler & Stanisich, 1996) และมีความแตกต่างของข้อมูลที่จำเพาะในบริเวณแปรผันของโครงสร้างยีน 16S rRNA (Barry et al., 1991) รวมถึงมีความแปรผันทางวิวัฒนาการต่ำ (Janda & Abbott, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลได้โดยง่าย (Clarridge, 2004)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเก็บตัวอย่างผึ้งหลวง

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงตัวเต็มวัยจำนวน 3 ตัว จากจังหวัดสมุทรสงคราม โดยใช้วิธีการจุดไฟที่กิ่งไม้ทำให้เกิดควันแล้วนำไปจ่อที่รังผึ้งหลวงให้ผึ้งบินออกจากรัง แล้วทำการครอบผึ้งลงถุงซิปล็อคขนาด 20 x 25 นิ้ว และปิดปากถุงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำตัวอย่างผึ้งที่ได้มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสทันทีที่กลับมาถึงห้องปฏิบัติการ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตัวอย่างผึ้งที่ใช้ในครั้งนี้นั้นได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิทยาศาสตร์ของนางสาวกนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธุ์

3.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เริ่มจากทำการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ภายนอกออก โดยผึ้งแต่ละตัวจะถูกนำไปแช่ใน 70% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 6% (w/v) sodium hypochlorite ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วย sterile d-H_2O ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำการตัดเอาเฉพาะส่วนท้อง (abdomen) ของผึ้งไปทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเฉพาะในภาวะที่มีออกซิเจน โดยนำส่วนท้องของผึ้งไปบดใน phosphate buffer saline ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ด้วย pestle พลาสติก แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Brain heart infusion* แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการนับจำนวนโคโลนีที่พบและสังเกตลักษณะ หากมีการเจริญของโคโลนีจำนวนมากให้ทำการเลือกโคโลนีของเชื้อมาถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้งด้วยเทคนิค cross streak plate เพื่อให้ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว

ภาพที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Brain heart infusion*

3.3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ทำการสุ่มเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมาจำนวน 4 โคโลนี มาทำให้เซลล์แตก โดยนำแต่ละโคโลนีมาใส่ใน 10 mM TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการ vortex ตามลำดับ โดยทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นนำมาทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ คือ eu27F เป็น forward primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5’ – GAGAG TTTGA TGCTG GCTCA G – 3’ และ eu1495R เป็น reverse primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5’ – CTACG GCTAC CTTGT TACGA – 3’ ซึ่งจะทำการเตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (10 μM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรในแต่ละตัวและ d-H_2O โดยมีภาวะการทำงาน ดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Denaturatio	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที	

3.4. การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.3 มาทำการสังเกตด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ที่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเติม Ecodye ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้เป็น 100bp DNA Ladder และดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ 6X Loading Dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำการ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 80 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตเห็นสีเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ของ agarose gel แล้วจึงนำแผ่นเจลออกไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV Fluorescence & Colorimetry ซึ่งคาดหวังว่าจะพบ PCR product ที่มีขนาด 1,400 bp

ภาพที่ 4 ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

3.5. การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย *QIAquick* PCR purification kit (cat. # 28104, Qiagen) โดยเติม PB buffer ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ทำการผสมให้เข้ากันจะได้สารผสมสีเหลือง จากนั้นดูดใส่ลงในคอลัมน์ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วทำการล้างคอลัมน์ด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการชะ PCR product ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร โดยพยายามชะที่บริเวณกึ่งกลาง ตามด้วยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

3.6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย

ส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA โดย Macrogen แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบและวิเคราะห์กับฐานข้อมูล Genbank ที่มีการเก็บรวบรวมและบันทึกไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่อไป

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ดังนี้

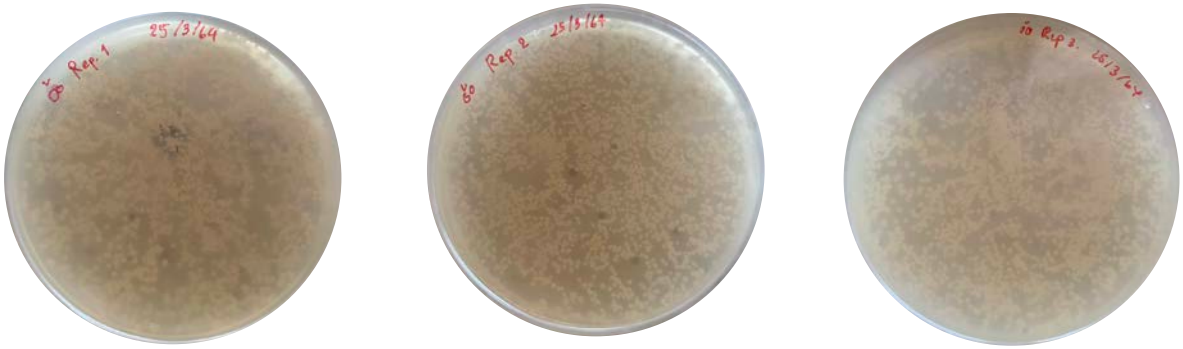
ส่วนที่ 4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย นำเสนอผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากทางเดินอาหารผึ้งหลวง โดยกล่าวถึงปริมาณและลักษณะสัณฐานของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ

ส่วนที่ 4.2 ผลการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis นำเสนอเกี่ยวกับการพบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งหลวง โดยนำเสนอเป็นภาพถ่ายจากเครื่อง UV Fluorescence & Colorimetry ที่แสดงให้เห็นแถบของ PCR product บนแผ่นเจล

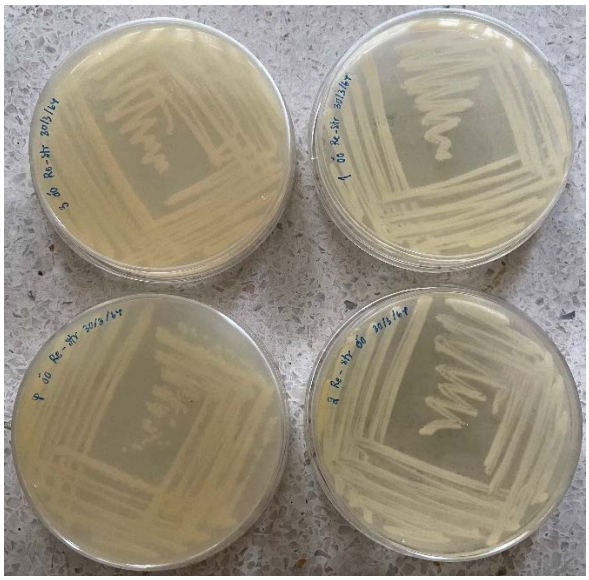
ส่วนที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย นำเสนอเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารผึ้งหลวง โดยกล่าวถึงขนาดของลำดับของนิวคลีโอไทด์และผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่พบ

4.1.ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากทางเดินอาหารของผึ้งหลวงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Brain heart infusion* แล้วนำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน พบว่า มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก โดยพบเชื้อแบคทีเรียประมาณ 8339 โคโลนีต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ ซึ่งเชื้อที่เจริญมีลักษณะเป็นจุดทรงกลมขนาดเล็ก สีขาวขุ่น พื้นผิวเรียบ นูนขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 5 แต่เนื่องจากโคโลนีที่ได้มีปริมาณที่ค่อนข้างหนาแน่นจึงทำการ cross streak plate อีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวดังแสดงในภาพที่ 6



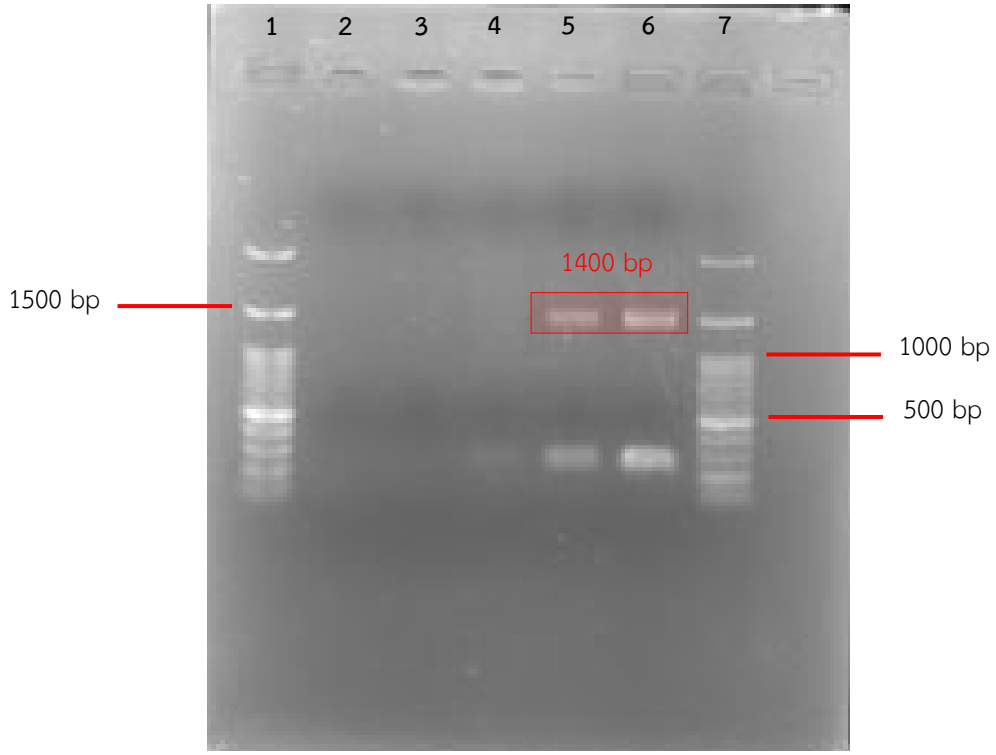
ภาพที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Brain heart infusion*



ภาพที่ 6 ผลการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak plate

4.2.ผลการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

จากการตรวจสอบ PCR product ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 80 โวลต์ แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV Fluorescence & Colorimetry พบว่า เลนที่ 1 และ 7 เกิดแถบของ 100bp DNA Ladder หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน, เลนที่ 2 ไม่พบแถบ เนื่องจากเป็น negative control ที่ไม่มีดีเอ็นเอ, เลนที่ 3 และ 4 ไม่พบแถบของ PCR product ตามที่คาดหวัง ในขณะที่เลนที่ 5 และ 6 พบแถบของ PCR product ขนาดประมาณ 1,400 bp ตามที่คาดหวัง นั่นคือพบดีเอ็นเอของแบคทีเรียในทางเดินอาหารผึ้งหลวง ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

4.3.ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย

จากการส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วทั้ง 2 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ที่ Macrogen ได้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์กลับมา โดย DNA 1 และ DNA 2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 205 เบส และ 1397 เบส ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 1 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA 1 มีความใกล้เคียงกับ *Klebsiella oxytoca* (CAV1015) ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA 2 มีความใกล้เคียงกับ *Klebsiella* sp. (UIWRF0941) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 2 จึงสามารถระบุได้เบื้องต้นว่าแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวงจากการศึกษาในครั้งนี้ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Klebsiella* species

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียพร้อมทั้งระบุชนิดของแบคที่เรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของผึ้งหลวงได้ โดยในการทดลองนี้พบแบคทีเรียชนิด *Klebsiella* ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าจุลินทรีย์ที่พบในผึ้งจะมีการกระจุกตัวอยู่ที่ส่วนหลังของระบบย่อยอาหาร นั่นคือส่วนของลำไส้ตอนกลางและตอนท้าย โดยแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากลำไส้ของผึ้งส่วนใหญ่ ได้แก่ *Escherichia, Enterobacter, Proteus, Hafnia, Klebsiella* และ *Erwinia* (Tysset & Durand, 1968; Gilliam et al., 1988) รวมถึงงานวิจัยของคุณ Chechotkina และคณะ (2011) ที่กล่าวว่าลำไส้ของผึ้งนั้นจะประกอบไปด้วยแบคทีเรียอย่างน้อย 10 สกุลที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Citrobacter, Hafnia, Escherichia, Morganella, Pantoea* และ *Providencia* จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบแบคทีเรียดังกล่าวในการทดลองนี้

Klebsiella นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ พบได้ทั่วไปในลำไส้ ปาก จมูก น้ำและดิน มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปอดบวม การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ภาวะโลหิตเป็นพิษ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาจะส่งผลให้ *Klebsiella* เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ ที่ทำให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจนส่งผลให้การติดเชื้อมีความรุนแรงและยากต่อการรักษา โดยสายพันธุ์ที่มีการพบและศึกษามากที่สุด คือ *Klebsiella pneumoniae* และ *Klebsiella oxytoca* (Singh et al., 2016) ซึ่ง *K. oxytoca* ก็เป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียที่พบในการทดลองนี้เช่นกัน

และถึงแม้แบคทีเรียในกลุ่ม *Klebsiella* จะสามารถก่อให้เกิดโรคได้ แต่ *Klebsiella* ก็เป็นหนึ่งในแบคทีเรียในทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ โดยงานวิจัยของคุณ Disayathanoowat และคณะ (2012) ได้ทำการแยกแบคทีเรียออกจากลำไส้ส่วนกลางของ *Apis cerana indica* และนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae* และ *Klebsiell oxytoca* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบางตัวในกลุ่ม *Klebsiella* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Paenibacillus larvae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันได้อีกด้วย

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองค้นหาโพรไบโอติกแบคทีเรียในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* ในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าไม่พบโพรไบโอติกแบคทีเรียอย่างที่คาดหวัง พบเพียงแบคทีเรียในกลุ่ม *Klebsiella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคได้ จึงไม่จัดเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรีย

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

การทำความสะอาดภายนอกตัวผึ้ง ควรทำให้มั่นใจว่าไม่มีการตกค้างของ ethanol หรือ sodium hypochlorite ที่อาจส่งผลต่อขั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ อีกทั้งในการตัดส่วนท้องของผึ้งก็ควรทำให้มั่นใจว่าไม่ได้ตัดนำเอาส่วนทางเดินอาหารของผึ้งออกมาด้วย จนทำให้ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นั้นควรเลือกใช้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว เพื่อยืนยันให้แน่ใจว่าดีเอ็นเอที่ได้มาจากแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว รวมถึงอาจเลือกใช้ไพรเมอร์อื่น ๆ เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ควรทำการตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงว่าเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียจริงหรือไม่ โดยการนำไปเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค หากพบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงสามารถยับยั้งหรือทำให้ *E. coli* ตายได้ แสดงว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงนี้เป็นโพรไบโอติกแบคทีเรีย

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ในอนาคตอาจมีการศึกษาการนำโพรไบโอติกที่แยกได้จากผึ้งสายพันธุ์หนึ่งไปประยุกต์ใช้กับผึ้งอีกสายพันธุ์หนึ่ง เช่น การนำโพรไบโอติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของผึ้งหลวงมาผสมกับอาหารที่ใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวกับสุขภาวะของผึ้งและการเกิดโรค รวมถึงผลที่มีต่อผลิตภัณฑ์ผึ้ง เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร, สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และณพศิษฎ์ จักรพิทักษ์. (2561). *คู่มือการเลี้ยงผึ้ง*. [ออนไลน์]. Retrieved from http://www.smart-beekeeper.com/Content/Ebook/%E0%B8%84%E0%B8%B9%E0%B9%88%E0%B8%A1%E0%B8%B7%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%A5%E0%B8%B5%E0%B9%89%E0%B8%A2%E0%B8%87%E0%B8%9C%E0%B8%B6%E0%B9%89%E0%B8%87.pdf

วิสุทธิ์ ใบไม้. (2548). *ความหลากหลายทางชีวภาพ วัฒนธรรม และสังคมไทย*. กรุงเทพฯ. ชวนพิมพ์.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์ และปิยมาศ นานอก. (2549). ผึ้งหลวงกับคนเมือง. *วารสารราชบัณฑิตยสถาน, 31*(2), 508–515. Retrieved from http://sci.bsru.ac.th/sciweb/e-magazine/8-2/chapter-10.pdf

ภาษาอังกฤษ

Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K., & Gannonl, F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for dna probes to identify eubacteria. *Genome Research, 1*(1), 51–56. doi: 10.1101/gr.1.1.51

Brouqui, P., & Raoult, D. (2001). Endocarditis due to rare andfastidious bacteria. *Clinical Microbiology Reviews, 14*(1), 177–207. doi: 10.1128/CMR.14.1.177-207.2001

Candela, M., Biagi, E., Turroni, S., Vitali, B., & Brigidi, P. (2008). Mechanisms involved in the intestinal interaction between host and bifidobacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease, 20*(4), 189–192. doi: 10.3402/mehd.v20i4.7575

Chechyotkina, U. E., Evteeva, N. I., Rechkin, A. I., & Radaev, A. A. (2011). Enterobacterium as part of the microflora of the digestive system of honey bees in different seasons. *Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod*, *2*, 149–153.

Clarridge, J. E., III (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews, 17*(4), 840–862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for

food. *Nature Reviews Microbiology, 3*(10), 777–788. doi: 10.1038/nrmicro1273

Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Burton, J. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2019). Novel probiotic approach to counter Paenibacillus larvae infection in honey bees. *The ISME Journal, 14*(2), 476–491. doi: 10.1038/s41396-019-0541-6

Disayathanoowat, T., Yoshiyama, M., Kimura, K., & Chantawannakul, P. (2012). Isolation and characterization of bacteria from the midgut of the Asian honey bee (Apis cerana indica). *Journal of Apicultural Research, 51*(4), 312–319. doi: 10.3896/IBRA.1.51.4.04

Floch, M. H., Walker, W. A., Madsen, K., Sanders, M. E., Macfarlane, G. T., Flint, H. J., Dieleman, L. A., Ringel, Y., Guandalini, S., Kelly, C. P., & Brandt, L. J. (2011). Recommendations for probiotic use—2011 update. *Journal of Clinical Gastroenterology, 4*, S168–S171. doi: 10.1097/MCG.0b013e318230928b

Gilliam, M., Lorenz, B. J., & Richardson, G. V., (1988). Digestive enzymes and micro-organisms in honey bees (Apis melifera L.) influence of streptomycin, age, season and pollen. *Microbios, 55*, 95–114.

Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology, 142*, 3–16. doi: 10.1099/13500872-142-1-3

Harris, K. A., Fidler, K. J., Hartley, J. C., Vogt, J., Klein, N. J., Monsell, F. & Novelli, V. M. (2002). Unique case of Helicobacter sp. osteomyelitisin an immunocompetent child diagnosed by broad-range 16S PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 40*(8), 3100–3103. doi: 10.1128/JCM.40.8.3100-3103.2002

Isa, J. K., & Razavi, S. H. (2017). Characterization of Lactobacillus plantarum as a potential probiotic in vitro and use of a dairy product (yogurt) as food carrier. *Applied Food Biotechnology, 4*(1), 11–18. doi: 10.22037/afb.v4i1.13738

Itioka, T., Inoue, T., Kaliang, H., Kato, M., Nagamitsu, T., Momose, K., Sakai, S., Yumoto, T., Mohamad, S. U., Hamid, A. A., & Yamane, S. (2001) Six-year population fluctuation of giant honey bee Apis dorsata (Hymenoptera: Apidae) in tropical lowland dipterocarp forest in Sarawak. *Annals of the Entomological* Society of America*, 94*(4), 454–549.

doi: 10.1603/0013-8746(2001)094[0545:SYPFOT]2.0.CO;2

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology, 45*(9), 2761–2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN nutrition*, *2013*, 481651. doi: 10.5402/2013/481651

Lamei, S. (2018). *The effect of honeybee-specific lactic acid bacteria on American foulbrood disease of honeybees* [Doctoral dissertation]. Lund University.

Lindauer, M. (1961). *Communication among social bees*. Harvard University Press, Cambridge.

Maa, T. C. (1953). An inquiry into the systematics of the Tribus Apidini or honey bees (Hymenoptera). *Treubia, 21*, 525–640.

Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology, 17*(2), 204–210. doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.005

Mollenbrink, M., & Bruckschen, E. (1994). Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich), 89*(11), 587–593.

Morse, R. A., & Laigo, F. M. (1969). *Apis dorsata in the Philippines*. Monograph.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal* of *Biotechnology*, *5*(1), 1–18.

Niode, N. J., Salaki, C. L., Rumokoy, L. J. M., & Tallei, T. E. (2020). Lactic acid bacteria from honey bees digestive tract and their potential as probiotics. *Advances in Biological Sciences Research, 8*, 236–241. doi: 10.2991/absr.k.200513.041

Nissle, A. (1959). Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of *E. coli* therapy (mutaflor). *Medizinische, 4*(21), 1017–1022.

Oldroyd, B. P., & Nanork, P. (2009). Conservation of Asian honey bees. *Apidologie, 40*(3), 296–312. doi: 10.1051/apido/2009021

Oldroyd, B. P., Osborne, K. E., & Mardan, M. (2000). Colony relatedness in aggregations of Apis dorsata Fabricius (Hyme-noptera, Apidae). *Insectes Sociaux, 47*(1), 94–95. doi: 10.1007/s000400050015

Oldroyd, B. P., & Wongsiri, S. (2006) *Asian honey bees: Biology, conservation and human interactions*. Harvard University Press, Cambridge.

Olofsson, T. C., Butler, E., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., & Vasquez, A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound* Journal, *13*(5), 668–679. doi: 10.1111/iwj.12345

Relman, D. A., & Falkow, S. (1992). Identification of unculturedmicroorganisms: Expanding the spectrum of characterized microbialpathogens. *Infectious Agents and Disease, 1*(5), 245–253.

Royan, M. (2019). Mechanisms of probiotic action in the honeybee. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 29*(2), 95–103. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025358

Sakagami, S. F., Matsumura, T., & Ito, K. (1980). Apis laboriosa in Himalayas: The little know worlds' largest honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Insecta Matsumurana, 19*, 47–77.

Salminen, S. J., Gueimonde, M., & Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition, 135*(5), 1294–1298. doi: 10.1093/jn/135.5.1294

Salvatore, S., & Vandenplas, Y. (2010). Prebiotics and probiotics in therapy and prevention of gastrointestinal diseases in children. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive foods in promoting health* (pp. 181–203). Academic Press, Boston. doi: 10.1016/B978-0-12-374938-3.00013-X

Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*, 361S–364S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.361s.

Schutz, E. (1989). The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study. *Fortschr Med*, *107*(28), 599–602.

Seanbualuang, P. (2012). Basic knowledge of beekeeping. *Naresuan University Journal, 20*(2), 93–100.

Seeley, T. D., Seeley, R. H., & Akratanakul, P. (1982). Colony defense strategies of the honey bee in Thailand. *Ecological Monographs*, *52*(1), 43–63. doi: 10.2307/2937344

Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews, 28*(4), 405–440. doi: 10.1016/j.femsre.2004.01.003.

Singh, L., Cariappa, M. P., & Kaur, M. (2016). Klebsiella oxytoca: An emerging pathogen?. *Medical journal Armed Forces India*, *72*, S59–S61. doi: 10.1016/j.mjafi.2016.05.002

Toma, M. M., & Pokrotnieks, J. (2006). Probiotics as functional food: Microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis, 710*, 117–129.

Tysset, C., & Durand, C. (1968). Contribution a l'etude du microbisme intestinal des abeilles butineuses saines (Apis mellifera L.). *Bulletin apicole de documentation scientifique et technique et d'information, 11*(2), 107–118.

Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for gastrointestinal conditions: A summary of the evidence. *American Family Physician, 96*(3), 170–178.

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy, 67*(6), 449–458. doi: 10.2146/ajhp090168

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews, 51*(2), 221–271. doi: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของดีเอ็นเอแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata*

DNA 1

GCATCTCGGGCCAAAGCTGGCAGCAAATTGCAAAACCTTCTGCATCTAAACGGCCAG
TGTTGGTACTGGTGTTCCTTACAGGAGGCAAAATGAACTTAAGACGACCGAAGTATT
TCGTAAAAATCGTCGATATCGGCAGTCTGACCCAGGCCGCTGAAGTCTTGCACATCG
CACAACCCGCGCTGAGCCACACCAAACTCTAATC

DNA 2

CCCGCGCGTTAGCTCTCGGGCCAAAGCTGGCAAGCAAATTGCAAAACCTTACTGCAT
CTAAACGGCCAGTGTTGGTACTGGTGTTCCTTACAGGAGGCAAAATGAACTTAAGAC
GACTGAAGTATTTCGTAAAAATCGTCGATATCGGCAGTCTGACCCAGGCCGCTGAAG
TCTTGCACATCGCACAACCAGCGCTGAGCCAGATTCAAACTCTCAACTCGCGAGGTC
GCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG
ATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGT
TCCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCC
GAAGGCACCAAAGCATCTCTGCCAAATTCCCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGC
TCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGA
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCTCACCTGAGCGTCAGTCT
TTGTCCAGGCGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCAGTTCATG
GCTACGCCTGGAAGTCTACCCCCCTCCACAAGACTACAGCCTGCCAGGATCGAATGC
AGGTCTCAGGCTGAGCGCGGGCATTTCATATCCAACTAGACTGACCGCCAGCGTGCG
CTTTACATGAGTTATTCTCATTAGCGCTAGCACCAGCCGTATCAACGTTTGCTGCTG
CCACGGAGTTAGCAAGAAACTTCTTCTTTCCCTTACGGGAAATGAAAGAAGGGGATG
AAGCTTGACACCCCTCCTCCCCGCCGCCCGGAAATGAATGACTTTAATGCCCCGCAA
GGGTCCTCCCCCCATCGGCCGGTTGGGGGCTGGGGGTCCCGTTGGGGGAAAATTCAA
AAAAATTCCCCCCCCCCGTGTAAACCCCCCGGGAAAAAGGGGGGGGGAATTCCGTTT
TTATTTTCCCGGGGGGGTCTAGAAAAACCCCCCGCAAACCCCGCCGGAGGGGGGGGC
CCCATAAAAAGAAAAAAAAAAACCTCCCCCCCAAAAAAAATATCTCCCTTTGGAAAA
AGTTCCGAAAGGGCGCGGGGGATGGGAGCCCCCCCCCCCCTTTGGGCAGAGGAAAAG
AAGAAAGGCGTGAAAAAAAATTCGGTGAA

ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของดีเอ็นเอแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของผึ้งหลวง *Apis dorsata* เทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BLASTN

DNA 1

Klebsiella oxytoca strain CAV1015, complete genome

Sequence ID: CP017928.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
312 bits (345)	1e-80	184/189 (97%)	2/189 (1%)	Plus/Minus

```
Query 4        TCTCGGGCCAAA-GCTGGCA-GCAAATTGCAAAACCTTCTGCATCTAAACGGCCAGTGTT  61
               |||| |||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2372619  TCTCCGGCCAAAAGCTGGCAAGCAAATTGCAAAACCTTCTGCATCTAAACGGCCAGTGTT  2372560

Query 62       GGTACTGGTGTTCCTTACAGGAGGCAAAATGAACTTAAGACGACCGAAGTATTTCGTAAA  121
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct 2372559  GGTACTGGTGTTCCTTACAGGAGGCAAAATGAACTTAAGACGACTGAAGTATTTCGTAAA  2372500

Query 122      AATCGTCGATATCGGCAGTCTGACCCAGGCCGCTGAAGTCTTGCACATCGCACAACCCGC  181
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct 2372499  AATCGTCGATATCGGCAGTCTGACCCAGGCCGCTGAAGTCTTGCACATCGCACAACCGGC  2372440

Query 182      GCTGAGCCA  190
               |||||||||
Sbjct 2372439  GCTGAGCCA  2372431
```

DNA 2

Klebsiella sp. UIWRF0941 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KR190283.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1195 bits (1324)	0.0	726/766 (95%)	2/766 (0%)	Plus/Minus

```
Query  218   CTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAA  277
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1153  CTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAA  1094

Query  278   GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTT  337
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1093  GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTT  1034

Query  338   TGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  397
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1033  TGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  974

Query  398   ACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCG  457
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  973   ACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCG  914

Query  458   AAGGCACCAAAGCATCTCTGCCAAATTCCCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC  517
             |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  913   AAGGCACCAAAGCATCTCTGCCAAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC  854

Query  518   GTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA  577
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  853   GTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA  794

Query  578   GTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCC  637
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  793   GTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCC  734

Query  638   ACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATC  697
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  733   ACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATC  674

Query  698   TAATCCTGTTTGCTCGCCACGCTTTCTCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGCGGCCGC  757
             ||||||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  673   TAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGC  614

Query  758   CTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCAGTTCATGGCTACGCCTGGAAGTCTAC  817
             |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||  ||||| ||||||| |||||
```

```
Sbjct  613   CTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTAC  554

Query  818   CCCCCTCCACAAGACTACAGCCTGCCAGGATCGAATGCAGGTCTCAGGCTGAGCGCGGGC  877
             ||||||| |||||||| ||||||||||  |||||||||| || |||| ||||| ||||
Sbjct  553   CCCCCTCTACAAGACTCCAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGG  494

Query  878   ATTTCATATCCAACTAGACTGACCGCCAGCGTGCGCTTTAC-ATGAGTTATTCTCATTAG  936
             |||||| |||| ||| ||| ||||||| ||||||||||||    ||| ||||  ||||
Sbjct  493   ATTTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAA  434

Query  937   CGCTAGCACCAGCCGTATCAACGTTTGCTGCTGCCACGGAGTTAGC  982
             |||| |||||  |||||| | ||   ||||||| ||||||||||||
Sbjct  433   CGCTTGCACCCTCCGTATTACCG-CGGCTGCTGGCACGGAGTTAGC  389
```