The Journal of Applied Science **Vol. 15 No. 2: 103-119 [2016]**
วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ doi:10.14416/j.appsci.2016.12.001
ISSN 1513-7805 Printed in Thailand

Academic Article

บทบาทของ Verrucomicrobia ในลำไส้ปลวกชั้นต่ำ

Roles of Verrucomicrobia in lower termite hindgut

จันทิยา อิสณพงษ์

Jantiya Isanapong

ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ 10800

Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800

E-mail: jantiya.i@sci.kmutnb.ac.th

บทคัดย่อ

ปลวกมีบทบาทสำคัญทางนิเวศวิทยา โดยทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่พบในเนื้อไม้และสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่พบในผนังเซลล์พืชให้กลายเป็นสารประกอบคาร์บอนกลับคืนสู่สิ่งแวดล้อม โดยทั่วไประบบย่อยอาหารของปลวกชั้นต่ำประกอบด้วยลำไส้ส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนหลังที่ขยายออกเป็นกระเปาะ (dilated hindgut) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดอาศัยอยู่ โดยในของเหลว 1 ไมโครลิตร สามารถพบจุลินทรีย์ได้ทั้ง 3 โดเมน (domain) คือ ยูคาร์ยา อาร์เคีย และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะหลั่งเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสเพื่อย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้เป็นแอซีเทต (acetate) ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์หลักที่ปลวกสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนโดยทำการตรึงไนโตรเจนให้แก่ปลวก เนื่องจากในเนื้อไม้ซึ่งเป็นอาหารของปลวกนั้นแทบจะไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งช่วยควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนภายในกระเปาะหลังให้มีสภาวะแบบไร้ออกซิเจนที่บริเวณกลางกระเปาะ และมีความเข้มข้นในระดับต่ำ (microoxic) ที่ขอบกระเปาะ จากการศึกษาจีโนม (genome) mRNA และโปรตีนของแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia หลายสายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากลำไส้ส่วนหลังของปลวก *Reticulitermes flavipes* พบว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสโดยตรวจพบจีน (gene) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เช่น xylanase, acetyl xylan esterase, cellulase (glycoside hydrolase family 5) เป็นต้น รวมทั้งตรวจพบจีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (*nif*) และจีนที่ช่วยกำจัดออกซิเจน

ที่แพร่เข้าไปในลำไส้ปลวกให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือ *cbb3*-type cytochrome oxidase ซึ่งแสดงถึงบทบาทของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการช่วยให้ปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ และสังคมชีวิตของลำไส้ปลวกสามารถดำเนินต่อไปได้

คำสำคัญ: ปลวก, ลำไส้ส่วนหลังของปลวก, ลิกโนเซลลูโลส, Verrucomicrobia*, Diplosphaera colotermitum*

Abstract

Termites play an important ecological role in degrading organic matters and recalcitrant compounds like lignocellulose in wood materials and releasing the carbon compounds back to the environment. In general, the digestive tract of lower termites consists of the foregut, midgut and dilated hindgut. The dilated hindgut composes of abundant and diverse microorganisms covering 3 domains of life which are Eukarya, Archaea and Bacteria. These microbes secrete cellulase and hemicellulase enzymes to degrade lignocellulosic materials into acetate. Then, acetate can be further absorbed by termites as their energy source. Moreover, microbes play an essential role in the nitrogen metabolism by providing nitrogen for the termites because termite's diet contains no nitrogen content. Microbes can also help maintain anoxic condition at the gut core and microoxic concentrations at the gut periphery. Studies of genome sequences, mRNA and proteins in several strains of bacteria in the phylum "Verrucomicrobia" isolated from the hindgut of termites *Reticulitermes flavipes* reveal that the bacteria have a potential role in degrading lignocellulose because of the presence of several lignocellulose genes, such as xylanase, acetyl xylan esterase, cellulase (glycoside hydrolase family 5). Moreover, the availability of nitrogen fixing genes (*nif*) indicates a potential role in fixing nitrogen for the termite. Besides, the presence of *cbb3*-type cytochrome oxidase, an enzyme that has high affinity to oxygen, reveals a vital role of the bacterial strains in controlling oxygen level in the hindgut in order to sustain biochemical reactions and microbial community living in the hindgut.

Keywords: termite, termite hindgut, lignocellulose, Verrucomicrobia*, Diplosphaera colotermitum*

บทนำ

ปลวก (termites) จัดเป็นแมลงชนิดหนึ่งที่มีความเป็นอยู่แบบสัตว์สังคมคล้ายกับผึ้งหรือมด คือ ประชากรประกอบด้วยวรรณะ (castes) ต่าง ๆ ได้แก่ วรรณะสืบพันธุ์ (reproductive termites) วรรณะกรรมกร (workers) และวรรณะทหาร (soldiers) ปลวกมักสร้างรังอยู่ในที่มืดและอับชื้น เช่น อาศัยอยู่ในเนื้อไม้ ใต้ดิน หรืออาศัยอยู่ตามจอมปลวก เป็นต้น ปลวกแต่ละชนิดจะกินอาหารแตกต่างกันไป โดยทั่วไปแหล่งอาหารของปลวกแบ่งเป็น 4 ประเภท

ได้แก่ ไม้ ดินและฮิวมัส (humus) ใบไม้ และไลเคน (จารุณีและขวัญชัย, 2551) เป็นที่ทราบกันดีว่าปลวกสามารถทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในหลายด้าน เช่น กัดกินวัสดุอุปกรณ์และอาคารบ้านเรือนที่สร้างจากไม้ กัดกินกล้าไม้ รากพืชผลทางการเกษตร หรือไม้ยืนต้นในป่า เป็นต้น อย่างไรก็ตาม หากไม่นับความเสียหายทางเศรษฐกิจดังกล่าวแล้ว ในแง่นิเวศวิทยาสามารถกล่าวได้ว่า ปลวกมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรคาร์บอน (carbon cycle) โดยทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียวัตถุ หรือสารประกอบคาร์บอนที่พบในเนื้อไม้ให้กลายเป็นฮิวมัสหรือธาตุอาหารในดิน รวมทั้งปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์กลับคืนสู่สิ่งแวดล้อม

ลักษณะพิเศษที่ทำให้ปลวกได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยคือ ระบบย่อยอาหารของปลวกสามารถย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกโนเซลลูโลสที่พบในเนื้อไม้หรือเศษวัสดุเหลือทิ้งจากพืช ลิกโนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ ประกอบด้วยเซลลูโลส (20-50%) เฮมิเซลลูโลส (15-35%) และลิกนิน (18-35%) (Niและ Tokuda, 2013) โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสเป็นฮอมอพอลิเมอร์ (homopolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของน้ำตาลเพียงชนิดเดียวคือ น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะบีตาไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic linkage) ส่วนเฮมิเซลลูโลสหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไซแลน (xylan) มีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ประกอบด้วยน้ำตาลหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอนห้าอะตอม เช่น ไซโลส อะราบิโนส เป็นต้น เกาะกับหมู่โซ่ข้าง เช่น acetyl, arabinofuranosyl, และ 4-O-methyl glucuronyl เป็นต้น (Blumและคณะ, 1999) ทั้งนี้ ปลวกจะใช้คาร์บอนในเนื้อไม้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตาม ปลวกจะไม่สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในเนื้อไม้ได้เลย หากปราศจากกลุ่มของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวก

ความสัมพันธ์ระหว่างปลวกและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวก มีความสัมพันธ์แบบภาวะพึ่งพากัน (mutualism) คือ สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดได้ประโยชน์จากการอาศัยอยู่ร่วมกัน ไม่สามารถแยกกันดำรงชีวิตได้ โดยปลวกทำหน้าที่ย่อยสลายไม้ให้เป็นชิ้นเล็กๆ เมื่อเศษไม้เหล่านี้เคลื่อนไปที่ลำไส้ จุลินทรีย์ที่อาศัยในลำไส้ปลวกจะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นแอซีเทต (Nakashimaและคณะ, 2002) ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์หลักที่ปลวกสามารถนำไปใช้ในการเติบโตและดำรงชีวิต ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์ก็ได้รับประโยชน์จากสารอาหารหรือเศษไม้ที่ปลวกกินเข้าไป นอกจากบทบาทหน้าที่ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสแล้ว จุลินทรีย์ยังมีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน เนื่องจากในเนื้อไม้ซึ่งเป็นอาหารของปลวกนั้น แทบจะไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ดังนั้นปลวกสามารถได้รับไนโตรเจนจากจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ตรึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศหรือหมุนเวียนไนโตรเจนจากของเสีย เช่น กรดยูริก รวมทั้งบทบาทของจุลินทรีย์ในการกำจัดออกซิเจนที่แพร่เข้าไปในลำไส้ปลวกให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาต่างๆ ทั้งที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนสามารถดำเนินต่อไปได้ ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่อาศัยในลำไส้ปลวกมากขึ้น เนื่องจากเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการคัดแยกจุลินทรีย์มาใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก

ให้ได้น้ำตาลหรือเอทานอล หรือแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งอาจนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรมหรือใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ลักษณะของลำไส้ปลวกชั้นต่ำ (lower termites)

ปลวกมีจำนวนทั้งหมดประมาณ 2,600 สปีชีส์ (Eggleton, 2010) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ ปลวกชั้นต่ำ (lower termites) และปลวกชั้นสูง (higher termites) โดยจากปลวกจำนวนทั้งหมด 7 วงศ์ (family) จัดเป็นปลวกชั้นต่ำ 6 วงศ์ ได้แก่ Mastotermitidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae และ Termopsidae ส่วนปลวกชั้นสูงได้แก่ Termitidae (LoและEggleton, 2010) สิ่งที่ใช้จำแนกปลวกชั้นต่ำและปลวกชั้นสูงคือ ในกระเปาะหลังของปลวกชั้นต่ำจะมีโพรโทซัวกลุ่มที่มีแฟลเจลลัม (flagellated protist) เช่น Oxymonads และ Parabasalids แต่ในปลวกชั้นสูงจะไม่พบโพรโทซัวดังกล่าว (LoและEggleton, 2010) โพรโทซัวกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ปลวกกินเข้าไป โดยในกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นอาศัยเอนไซม์ทั้งจากตัวของปลวกเองซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเซลลูเลส (endocellulase) และเอนไซม์ที่หลั่งจากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยในลำไส้ส่วนหลังของปลวก (Brune, 2014) โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต เช่น เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส เป็นต้น จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase, GH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) พันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตได้ เอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งเป็นหลายแฟมิลี่ (family) ดังนั้น จึงเรียกชื่อเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น glycoside hydrolase family (GHF) โดยทั่วไประบบย่อยอาหารของปลวกชั้นต่ำมีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเท่าปลวกชั้นสูง สามารถแบ่งระบบย่อยอาหารของปลวกชั้นต่ำได้เป็น 2 ส่วนหลัก คือ

1) ลำไส้ส่วนหน้าและส่วนกลาง (foregut and midgut) เป็นบริเวณที่มีการย่อยสลายเศษไม้ที่ถูกบดให้มีขนาดเล็กประมาณ 20 ถึง 50 ไมโครเมตร (Yoshimuraและคณะ, 1996) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลาย ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสในบริเวณนี้อาศัยเอนไซม์เอนโดเซลลูเลสที่หลั่งมาจากต่อมน้ำลาย (salivary gland) และลำไส้ส่วนกลางของปลวกเอง เช่น endo-β-1,4-glucanase (endoglucanase, EG) และ β-glucosidase เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายในลำไส้ส่วนนี้จะเกิดขึ้นเฉพาะในบริเวณอสัณฐาน (amorphous region) ของเซลลูโลส จึงยังไม่เกิดการย่อยสลายที่สมบูรณ์

2) ลำไส้ส่วนหลังซึ่งขยายออกเป็นกระเปาะ (dilated hindgut) มีความยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร (Ohkuma, 2008) การที่ลำไส้ส่วนหลังมีการขยายออกเป็นกระเปาะ ทำให้เซลลูโลสมีระยะเวลาที่อยู่ในลำไส้นานขึ้น ส่งผลให้การย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์และปลวกสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้จากบริเวณนี้ ทั้งนี้ เป็นที่ทราบกันดีว่า จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ส่วนหลังทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลส Todakaและคณะ (2007) ได้ศึกษาจีน (gene) ของโพรโทซัวที่คัดแยกมาจากลำไส้ส่วนหลังของปลวกชั้นต่ำ *Reticulitermes speratus* พบว่า

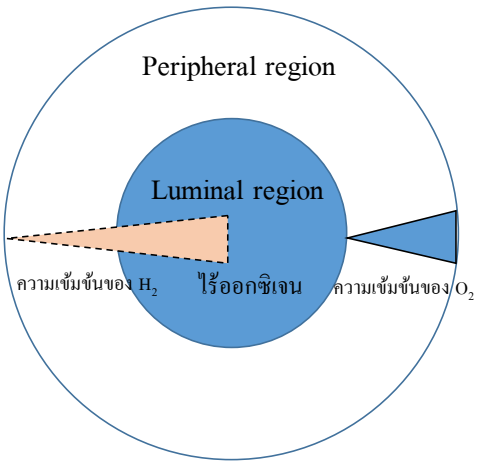
โพรโทซัวมีจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เช่น GHF5, 7, 45, β-glucosidase และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและไซแลนเนสหลายชนิด เช่น xylanases (GHF8 และ 11), arabinosidases (GHF43), α-arabinofranosidase (GHF62), และ endo-1,4-β-mannanase (GHF26) เป็นต้น (Todakaและคณะ, 2007) โดยโพรโทซัวจะย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธีเอนโดไซโทซิส (endocytosis) และย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

Nakashimaและคณะ (2002) ได้ศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสในระบบย่อยอาหารส่วนกลางและส่วนหลังของปลวกชั้นต่ำ *Coptotermes formosanus* Shiraki (Rhinotermitidae) โดยใช้การวัดเชิงคุณภาพและวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่า เอนไซม์ที่พบในลำไส้ส่วนกลางและส่วนหลังเป็นคนละชนิดและไม่ซ้ำซ้อนกัน โดยในต่อมน้ำลาย ลำไส้ส่วนหน้า และลำไส้ส่วนกลางพบเอนไซม์ที่ผลิตจากตัวปลวกเอง ได้แก่ endo-β-1,4-glucanase หรือ (GHF9) โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในลำไส้ส่วนกลางจะน้อยกว่าในต่อมน้ำลาย โดยมีค่าเท่ากับ 8.9% และ 80.8% ตามลำดับ ส่วนในลำไส้ส่วนหลังจะไม่พบเอนไซม์ GHF9 แต่พบเอนไซม์ GHF7 ที่ผลิตมาจากโพรโทซัวที่อาศัยในบริเวณดังกล่าว เมื่อทำการสกัดเอนไซม์หยาบ (crude extract) ออกมาจากทั้งสองบริเวณเพื่อทดสอบการย่อยสลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (crystalline cellulose) พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ส่วนหลังมีกิจกรรมในการย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 25.15 ยูนิตต่อปลวก ซึ่งมากกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สกัดจากต่อมน้ำลาย ลำไส้ส่วนหน้า และส่วนกลางรวมกันซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.29 ยูนิตต่อปลวก (Nakashimaและคณะ, 2002) ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fujitaและคณะ (2010) ซึ่งพบเอนไซม์ endoglucanase (GHF9) สูงถึง 6% จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่หลั่งจากลำไส้ส่วนกลางของปลวก *C. formosanus* (Fujitaและคณะ, 2010)

ระดับแก๊สออกซิเจนและไฮโดรเจนและปฏิกิริยาในลำไส้ส่วนหลัง

จากการตรวจวัดระดับออกซิเจนในกระเปาะหลังของปลวก *R. flavipes* โดยใช้ออกซิเจนไมโครอิเล็กโทรด พบว่า บริเวณส่วนกลางของกระเปาะ (luminal region) ประมาณร้อยละ 40 มีสภาวะแบบไร้ออกซิเจน และรัศมีจากส่วนกลางของกระเปาะออกไป ความเข้มข้นของออกซิเจนจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น โดยระยะจากจุดกึ่งกลางออกไปประมาณ 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของออกซิเจนประมาณ 45 และ 130 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งบริเวณที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนในระดับต่ำ (microoxic) จะอยู่บริเวณขอบของกระเปาะ (peripheral region) คิดเป็นร้อยละ 60 (Bruneและคณะ, 1995) แสดงให้เห็นว่าภายในกระเปาะหลังมีสภาวะแบบไร้ออกซิเจนเฉพาะส่วนกลางของกระเปาะเท่านั้น และระดับความเข้มข้นของออกซิเจนมีค่าเพิ่มขึ้นจากบริเวณส่วนกลางไปยังขอบกระเปาะ ดังแสดงในรูปที่ 1 ในส่วนของความดันพาร์เชียลของแก๊สไฮโดรเจน (hydrogen partial pressure) ซึ่งเป็นแก๊สอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของปลวก พบว่า ปลวกแต่ละสปีชีส์มีปริมาณแก๊สไฮโดรเจนแตกต่างกันไป ทั้งนี้ ปริมาณของแก๊สไฮโดรเจนในกระเปาะหลังมีทิศทางตรงข้ามกับระดับออกซิเจน นั่นคือไฮโดรเจนมีความเข้มข้นสูงที่สุดบริเวณส่วนกลางของกระเปาะและมีค่าลดลงเมื่อเข้าใกล้ขอบกระเปาะ โดยใน

Zootermopsis nevadensis, Reticulitermes santonensis, และ *Cryptotermes secundus* มีความดันพาร์เชียลที่บริเวณตอนกลางของกระเปาะเท่ากับ 55, 25, 2 kPa ตามลำดับ (Pester และ Brune, 2007) การที่บริเวณกลางกระเปาะมีแก๊สไฮโดรเจนสูงเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น ๆ เนื่องจากแก๊สไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส รวมทั้งโพรโทซัวและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเปาะมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจน Inoue และคณะ (2007) ได้ตรวจพบจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนคือ Fe-hydrogenase ในกระเปาะหลังของปลวกชั้นต่ำ *C. formosanus* ซึ่งเป็นจีนของโพรโทซัว *Pseudotrichonympha grassii* (Inoue และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตาม การมีปริมาณไฮโดรเจนเกิดขึ้นมากเกินไป อาจทำให้กระบวนการหมักไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ จึงต้องมีปฏิกิริยาที่ช่วยลดปริมาณไฮโดรเจนลง เพื่อช่วยให้กระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้



รูปที่ 1. ความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจน (◀) และแก๊สไฮโดรเจน(◁)ในกระเปาะหลังของปลวก โดย luminal และ peripheral region คือบริเวณส่วนกลางและขอบของกระเปาะ ตามลำดับ

เนื่องจากขนาดที่เล็กมากของปลวก ทำให้มีโอกาสที่ออกซิเจนจะแพร่เข้าไปในลำไส้ปลวกจนถึงระดับที่สมดุลกับความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศ แต่จากการตรวจวัดพบว่าเฉพาะบริเวณขอบโดยรอบกระเปาะเท่านั้นที่ยังคงมีความเข้มข้นของออกซิเจนในระดับต่ำ โดยเชื่อว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณขอบกระเปาะมีบทบาทในการป้องกันและกำจัดออกซิเจนที่แพร่เข้ามาในบริเวณกระเปาะหลังโดยใช้ออกซิเจนที่แพร่เข้ามาในกระบวนการหายใจ (Breznak และ Pankratz, 1977) ทั้งนี้มีการประมาณว่าออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในกระบวนการหายใจคิดเป็น 21% ของออกซิเจนที่ปลวกใช้ในการหายใจ (Brune และคณะ, 1995) ทำให้บริเวณส่วนกลางกระเปาะมีสภาวะแบบไร้ออกซิเจน นอกจากนี้การที่ความเข้มข้นของออกซิเจนในบริเวณต่าง ๆ ของกระเปาะหลังมีความเข้มข้นต่างกัน ถือว่ามีความสำคัญมากต่อการดำรงชีวิตของปลวกและจุลินทรีย์ที่อาศัยในลำไส้ปลวก เนื่องจากช่วยให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ

ทั้งที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้ตามปกติ โดยปฏิกิริยาเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเมแทบอไลต์หลักคือ แอซีเทตที่ปลวกสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ตัวอย่างเช่น

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

- การย่อยสลายเซลลูโลสและการหมัก

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ถูกย่อยบางส่วนแล้วจากลำไส้ส่วนกลาง จะเคลื่อนที่มายังกระเปาะหลังและถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่หลั่งมาจากจุลินทรีย์ เช่น โพรโทซัวและแบคทีเรีย ซึ่งโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายจะถูกหมักต่อไปจนกระทั่งได้แอซีเทต แก๊สไฮโดรเจน (H_2) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ดังปฏิกิริยาที่ 1 ซึ่งปลวกจะดูดซึมแอซีเทตที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานต่อไป

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2 \qquad \text{ปฏิกิริยาที่ 1}$$

- รีดักทีฟ แอซีโทเจเนซิส (Reductive acetogenesis) และเมทาโนเจเนซิส (methanogenesis)

ทั้งรีดักทีฟ แอซีโทเจเนซิสและเมทาโนเจเนซิสเป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์ใช้แก๊ส H_2 และ CO_2 จุลินทรีย์ที่ผลิตแอซีเทตผ่านปฏิกิริยารีดักทีฟ แอซีโทเจเนซิส (ปฏิกิริยาที่ 2) เรียกว่า แอซีโทเจน (acetogen) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น สไปโรคีท (spirochetes) โดยเฉพาะ *Treponema primitia* (Leadbetterและคณะ, 1999) โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้ทำให้มีแอซีเทตเกิดขึ้น 1 ใน 3 ของแอซีเทตที่ผลิตได้ทั้งหมด (PesterและBrune, 2007) ส่วนเมทาโนเจนคือ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้ H_2 และ CO_2 เป็นซับสเตรต (ปฏิกิริยาที่ 3) โดยทั่วไปเมทาโนเจนจะอาศัยอยู่บริเวณที่มีไฮโดรเจนต่ำกว่าแอซีโทเจน เช่น บริเวณใกล้ขอบกระเปาะหรืออาศัยอยู่ในโพรโทซัว ตัวอย่างเช่น เมทาโนเจนิกอาร์เคีย (methanogenic archaea) ที่คัดแยกออกมาจากกระเปาะหลังของปลวก *R. flavipes* ได้แก่ *Methanobrevibacter filiformis* (Leadbetterและคณะ, 1998)

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \qquad \text{ปฏิกิริยาที่ 2}$$

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad \text{ปฏิกิริยาที่ 3}$$

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาวะใช้ออกซิเจน

- การผลิตแอซีเทตจากแลคเตท

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ทำการย่อยสลายเซลโลไบโอสและไซโลสได้เป็นแลคเตท (lactate) โดยนอกเหนือจากแอซีเทตที่มีปริมาณมากที่สุดในกระเปาะหลังคิดเป็น 86% โมลของสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดแล้ว แลคเตทจะมีปริมาณรองลงมาคิดเป็น 1 ใน 3 ของคาร์บอนที่หมุนเวียนอยู่ในกระเปาะ (TholenและBrune, 2000) การมีออกซิเจนที่ขอบของกระเปาะทำให้แบคทีเรีย *Lactococci* และ *Enterococci*

สามารถเปลี่ยนแลคเตทเป็นแอซีเทตได้ ทำให้ความเข้มข้นของแลคเตทในกระเปาะหลังไม่สูงมากนัก ดังนั้น การที่ขอบของกระเปาะมีออกซิเจนอยู่ จึงมีความสำคัญมากกล่าวคือ ทำให้ จุลินทรีย์สามารถผลิตแอซีเทตให้แก่ปลวกได้

สังคมของจุลินทรีย์ในลำไส้ปลวก

การที่ความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจนและไฮโดรเจนในกระเปาะหลัง มีความเข้มข้นแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ ทำให้พบจุลินทรีย์หลากหลายชนิดในลำไส้ปลวก ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนในการเติบโต (anaerobic and aerobic microbes) และจุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจนไม่แท้ (facultative anaerobic microbes) สังคมของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ส่วนหลังของปลวกชั้นต่ำมีหลากหลายชนิดและมีความหนาแน่นสูง โดยในของเหลว 1 ไมโครลิตร ที่สกัดจากลำไส้ปลวกสามารถพบจุลินทรีย์ได้ถึง 3 โดเมน คือ ยูคาร์ยา (Eukarya) เช่น โพรโทซัวที่สามารถย่อยเซลลูโลส, อาร์เคีย (archaea) และแบคทีเรีย (Petersonและ Scharf, 2016) โดยในปลวก *R. speratus* พบโพรโทซัว เช่น *Trichonympha agilis*, *Trichonympha mirabilis* (Ohtokoและคณะ, 2000) โพรโทซัวที่พบในปลวก *C. formosanus* เช่น *Pseudotrichonympha grassii*, *Holomastigotoides mirabile* (Watanabeและคณะ, 2002) เป็นต้น

นอกจากโพรโทซัวที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลสแล้ว สิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรแคริโอตก็มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของปลวกด้วยเช่นกัน เนื่องจากเศษไม้ซึ่งเป็นอาหารของปลวกนั้น มีคาร์บอนเป็นส่วนประกอบหลักและแทบจะไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบเลยหรือมีก็น้อยมาก ทำให้เศษไม้มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมาก อย่างไรก็ตาม ปลวกสามารถได้รับไนโตรเจนโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเปาะหลัง ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย ดังปฏิกิริยาที่ 4 นอกเหนือจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศแล้ว จุลินทรีย์ยังช่วยในการหมุนเวียนไนโตรเจนจากของเสีย เช่น แอมโมเนีย โดยอาศัยเอนไซม์ glutamine synthetase เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นกรดแอมิโน โดยแบคทีเรียที่สามารถหมุนเวียนไนโตรเจนมาใช้มักจะมีจีนที่เกี่ยวข้องกับ dinitrogenase reductase (Nodaและคณะ, 2002), ammonium transporter, urease และ urea transporter เป็นต้น (Hongoh, 2010)

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16\ Pi \qquad \text{ปฏิกิริยาที่ 4}$$

โพรแคริโอตที่อาศัยในกระเปาะหลังของปลวกประมาณ 90% ไม่สามารถคัดแยกได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะมีความสัมพันธ์แบบภาวะพึ่งพากันกับปลวก จึงอาจส่งผลต่อความสำเร็จในการคัดแยกแบคทีเรีย ดังนั้น การศึกษาสังคมชีวิตในลำไส้ปลวกส่วนใหญ่จะใช้วิธีทางชีวโมเลกุล เช่น ศึกษาโดยใช้จีน 16S rRNA โดยทั่วไปโพรแคริโอตที่อาศัยอยู่ในลำไส้แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ โพรแคริโอตที่อาศัยอยู่ร่วมกับโพรโทซัว ได้แก่ กลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในโพรโทซัวเรียกว่า endosymbionts เช่น แบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes, Proteobacteria (Nodaและคณะ, 2005;

Satoและคณะ, 2009) และกลุ่มที่อาศัยอยู่ที่ผิวของโพรโทซัว เรียกว่า ectosymbionts เช่น Spirochaetes, และ Synergistetes (Hongohและคณะ, 2007; Nodaและคณะ, 2003) โดยทั่วไป โพรแคริโอตที่อาศัยบริเวณส่วนกลางกระเปาะมีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่อาศัยบริเวณขอบกระเปาะประมาณ 5 เท่า โดยโพรแคริโอตที่อยู่ร่วมกับโพรโทซัวและโพรแคริโอตที่อาศัยอย่างอิสระมีจำนวน 2.71 x 10^7 เซลล์ ส่วนกลุ่มที่อาศัยบริเวณขอบกระเปาะมีจำนวน 5.35 x 10^6 เซลล์ (Nakajimaและคณะ, 2005) โดยกลุ่มของแบคทีเรียที่พบมากที่ขอบกระเปาะของปลวก *R. speratus* คือ Actinobacteria, Firmicutes และ Bacteroidetes ส่วนที่พบมากในบริเวณกลางกระเปาะ เช่น Spirochaetes และ Termite group 1 (Nakajimaและคณะ, 2005) ต่อมาเมื่อมีการศึกษาโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัยมากขึ้นคือ next generation sequencing พบว่า มีโพรแคริโอตในลำไส้ส่วนหลังของปลวก *R. flavipes* มากกว่า 4,761 สปีชีส์ และในจำนวนนั้น 99.9% เป็นแบคทีเรีย และ 0.11% เป็นอาร์เคีย โดยสัดส่วนที่พบมากที่สุดคือ ไฟลัม Spirochaetes (24.9%) รองลงมาคือ Elusimicrobia (19.8%), Firmicutes (17.8%), Bacteroidetes (14.1%), Proteobacteria (11.4%), Fibrobacteres (5.8%), Verrucomicrobia (2.0%), Actinobacteria (1.4%) และ Tenericutes (1.3%) (Bouciasและคณะ, 2013) ส่วนอาร์เคียที่พบว่าสามารถผลิตแก๊สมีเทนได้ เช่น *M. filiformis* (Leadbetterและคณะ, 1998)

แบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia ที่พบในลำไส้ปลวก

แบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia เป็นแบคทีเรียที่พบในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น น้ำจืด น้ำทะเล ในดิน นาข้าว บ่อน้ำพุร้อน และลำไส้ปลวก เป็นต้น ข้อมูลจากการสำรวจทางเมทาจีโนมิก (metagenomics) โดยใช้จีน 16S rRNA พบว่า มีแบคทีเรียในไฟลัมนี้ประมาณ 500 สปีชีส์ แต่มีเพียงไม่กี่สปีชีส์เท่านั้นที่สามารถถูกคัดแยกได้ (Leeและคณะ, 2009) ไฟลัม Verrucomicrobia จัดเป็นไฟลัมใหม่ที่ยังมีการศึกษาไม่มากนัก จากการสำรวจทางเมทาจีโนมิกได้มีการตรวจพบแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia ในลำไส้ปลวกหลายสปีชีส์ โดย Nakajimaและคณะ (2005) ได้ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้ในกระเปาะหลังของปลวก *R. speratus* พบว่า มี Verrucomicrobia จำนวนน้อยมากที่ขอบกระเปาะคิดเป็น 1-2% และบริเวณกลางกระเปาะประมาณ 5% สำหรับกลุ่มที่พบมากที่สุดบริเวณขอบและกลางกระเปาะ คือ Firmicutes คิดเป็น 33% และ Spirochaetes คิดเป็น 40% ตามลำดับ นอกจากนี้ Bouciasและคณะ (2013) ได้ตรวจพบแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia ประมาณ 2% ในกระเปาะหลังของปลวก *R. flavipes* อย่างไรก็ตาม บทบาทหน้าที่ของแบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่ชัดเจนนัก ซึ่งส่วนหนึ่งมาจากข้อจำกัดในเรื่องของการคัดแยกแบคทีเรีย จนกระทั่ง Stevensonและคณะ (2004) ได้คัดแยกแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia สำเร็จ จึงได้เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า <u>*T*</u>*ermite* <u>*A*</u>*ssociated* <u>*V*</u>*errucomicrobium* (TAV) ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 5 สายพันธุ์คือ TAV1 – TAV5 โดยได้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้จากลำไส้ส่วนหลังของปลวก *R. flavipes* วรรณะกรรมกร ด้วยการนำสารสกัดจากลำไส้ปลวกมาเจือจางแบบอนุกรมโดยใช้อาหารเหลว basal salts พีเอช 7.0 สภาวะที่ใช้บ่มเชื้อคือ ที่ความเข้มข้นของออกซิเจน 2%, CO_2 5%, N_2 93% และแสงน้อย ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30 วัน แล้วนำโคโลนีที่เติบโตบนอาหารแข็งไปศึกษาโดยใช้เทคนิค Plate Wash Polymerase Chain Reaction (PWPCR) และเพิ่มจำนวนจีน

โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะเจาะจงกับจีน 16S rRNA ของไฟลัม Verrucomicrobia ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ TAV1 และ TAV2 สามารถคัดแยกได้จากอาหารแข็ง basal medium ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ เพปโทนและแอซีเทต ส่วนสายพันธุ์ TAV3 และ TAV4 คัดแยกได้จากอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่เติมแอซีเทต (Stevensonและคณะ, 2004) ดังนั้น การที่สามารถคัดแยกแบคทีเรีย Verrucomicrobia ซึ่งมีจำนวนไม่มากนักออกจากลำไส้ปลวกได้สำเร็จทำให้สามารถศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียได้เพิ่มเติม โดยได้มีการจัดแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้อยู่ในวงศ์ *Opitutaceae* แบคทีเรียเหล่านี้จึงได้ชื่อว่า *Opitutaceae bacterium strain TAV1, Diplosphaera colotermitum (TAV2)* และ *Opitutaceae bacterium strain TAV5* ปัจจุบันนี้วงศ์ *Opitutaceae* ประกอบด้วย 3 จีนัส คือ *Opitutus* (Chinและคณะ, 2001), *Alterococcus* (ShiehและJean, 1998) และ *Diplosphaera* (Wertzและคณะ, 2012) โดยจำนวนแบคทีเรียในวงศ์นี้คิดเป็น 2.4% ซึ่งถือว่ามีจำนวนไม่มากนักเมื่อเทียบกับวงศ์อื่น (Coleและคณะ, 2009) ตารางที่ 1 แสดงลักษณะจีโนมของแบคทีเรียในวงศ์ *Opitutaceae*

ตารางที่ 1. ลักษณะจีโนมของแบคทีเรียในวงศ์ *Opitutaceae* (RodriguesและIsanapong, 2014)

Species	***Size (Mb)***	***GC %***	***Number of Genes***	***Number of Proteins***	***NCBI accession***
Opitutus terrae	*5.96*	*65.3*	*4,704*	*4,632*	NC_010571
Diplosphaera colotermitum	*5.22*	*60.8*	*4,896*	*4,826*	NZ_ABEA00000000
Alterococcus agarolyticus	*ND**	*65.8*	*ND**	*ND**	-
Opitutaceae bacterium strain TAV1	*7.07*	*63.4*	*6,051*	*5,987*	NZ_AHKS02000000
Opitutaceae bacterium strain TAV5	*7.41*	*63.9*	*6,056*	*6,006*	NZ_AGJF00000000

*ND = ไม่ได้ถูกตรวจสอบ (not determined)

จากการศึกษารายละเอียดจีโนมของแบคทีเรียในวงศ์ *Opitutaceae* ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลวก โดย Isanapongและคณะ (2012) ได้ศึกษาจีโนมของแบคทีเรีย *Opitutaceae bacterium* strain TAV1 ด้วยวิธี Illumina sequencing และ 454 pyrosequencing พบว่า สายพันธุ์ TAV1 มีจีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสหลายชนิด เช่น GHF5, cellulase, endo-1,4-β-

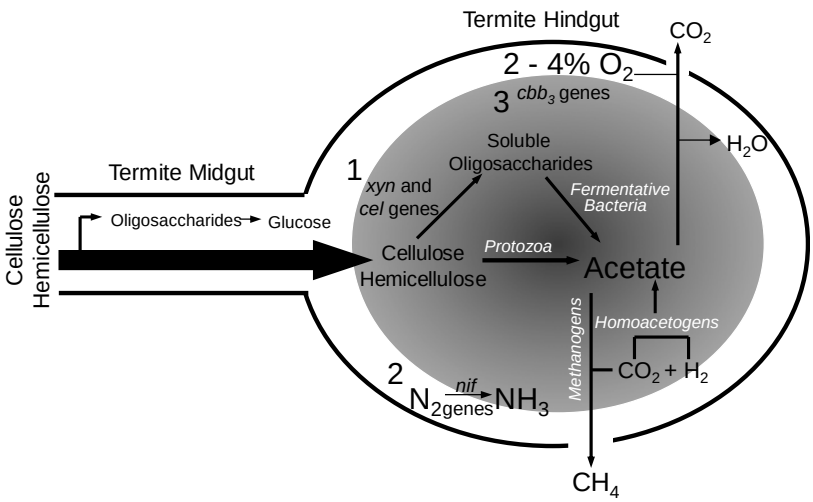
xylanase, N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, peptidoglycan glycosyltransferase, และ 1,4-α-glucan branching enzyme เป็นต้น (Isanapongและคณะ, 2012) ต่อมา Kotakและคณะ (2015) ได้ศึกษาจีโนมของแบคทีเรีย *Opitutaceae bacterium* strain TAV5 ด้วยวิธี Illumina sequencing (HiSeq 2000) และ 454 sequencing (FLX Titanium) พบว่า สายพันธุ์ TAV5 จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเมทิโลโทรฟ (methylotroph) เนื่องจากมีจีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม เช่น จีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของฟอร์เมท เช่น formate dehydrogenase, formate transporter เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบจีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสคือ GHF5, GHF9 และเฮมิเซลลูโลส คือ GH8, 10, 26, 28 และ 53 รวมทั้งจีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อย protocatechuate ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากลิกนิน เช่น 3-carboxymuconate cyclase (EC 5.5.1.5) และ 4-carboxymuconolactone decarboxylase (EC 4.1.1.44) หรือจีนที่เกี่ยวข้องกับการเปิดวงแหวนอะโรมาติก เช่น dioxygenases และ dienelactone hydrolase (EC 3.1.1.45) และมีการตรวจพบจีนที่เกี่ยวข้องกับการรวมแอมโมเนียและซัลเฟต (ammonia and sulfate assimilation) รวมทั้งจีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในวัฏจักรยูเรียและการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น (Kotakและคณะ, 2015)

ฟีโนไทป์ (phenotype) ของ *Diplosphaera colotermitum* (TAV2)

แบคทีเรีย *Opitutaceae bacterium* อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ *Diplosphaera colotermitum* (TAV2) โดย Wertzและคณะ (2012) ได้ศึกษาฟีโนไทป์ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้และได้เรียกชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Diplosphaera colotermitum* เนื่องจากลักษณะเด่นที่มักจะพบเซลล์ที่มีลักษณะกลมอยู่เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม (*Diplosphaera*) และระบุแหล่งที่มาจากลำไส้ปลวก (*colotermitum*) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 ไมครอน เคลื่อนที่ไม่ได้ โคโลนีบนอาหารแข็งมีสีครีมขนาดประมาณ 2-4 มิลลิเมตร โคโลนีมีลักษณะฉ่ำ คล้ายมีเมือก ขอบเรียบ จากการศึกษาพบว่า เซลล์ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ peroxidase มีจีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (*nif*) และสามารถเติบโตได้บนอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (nitrogen-free medium) และเติบโตได้ดีในสภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ (microaerobic condition) ประมาณ 2-8% โดยมีเวลาที่ใช้ในการเติบโตเป็นสองเท่า (generation time) เท่ากับ 7.7 – 8.3 ชั่วโมง ในขณะที่ใช้เวลาในการเติบโตที่สภาวะออกซิเจน 12 - 20% มีค่าเท่ากับ 9.2 – 11.7 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียไม่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแม้จะทดสอบโดยใช้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายหลายชนิด อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตคือ 30°C (มีช่วงอุณหภูมิที่สามารถเติบโตได้คือ 15 ถึง 35°C) และพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตคือ 7.0 (มีช่วงพีเอชที่สามารถเติบโตได้คือ 5.5 ถึง 7.5) ซับสเตรตที่เซลล์สามารถใช้ในการเติบโต เช่น กลูโคส กาแลกโทส (galactose) มอลโทส (maltose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และแป้ง (starch) เป็นต้น ส่วนซับสเตรตที่เซลล์ไม่สามารถใช้ในการเติบโต เช่น ฟรุกโตส ไรโบส ซูโครส gluconic acid, xanthine และ tannic acid เป็นต้น (Wertzและคณะ, 2012)

บทบาทของ *Diplosphaera colotermitum* (TAV2) ในลำไส้ปลวก

Isanapongและคณะ (2013) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการสร้าง mRNA โดยใช้วิธี microarray hybridization และโปรตีนโดยใช้วิธี LC-MS/MS ของแบคทีเรีย *D. colotermitum* TAV2 ใน 2 สภาวะคือ ที่ความเข้มข้นของออกซิเจน 2% และ 20% โดยที่ออกซิเจน 2% เป็นการจำลองสภาวะความเข้มข้นออกซิเจนในลำไส้ปลวก และออกซิเจน 20% เป็นความเข้มข้นของออกซิเจนในบรรยากาศทั่วไป ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้น่าจะมีศักยภาพในการย่อยสลายไซแลน สามารถตรึงไนโตรเจนและผลิตกรดแอมิโนและมีส่วนช่วยในการกำจัดออกซิเจนในลำไส้ปลวก โดยอาศัยอยู่บริเวณขอบของกระเปาะหลังซึ่งบทบาทของแบคทีเรียชนิดนี้ในลำไส้ปลวกสามารถอธิบายได้ด้วยแบบจำลองดังรูปที่ 2 และสามารถอธิบายรายละเอียดในแต่ละประเด็นได้ดังนี้ (Isanapongและคณะ, 2013)



รูปที่ 2. แบบจำลองแสดงบทบาทหน้าที่ของ *D. colotermitum* ในกระเปาะหลังของปลวก โดย 1 คือ การย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส 2 คือ การตรึงไนโตรเจน และ 3 คือ ศักยภาพในการกำจัดออกซิเจน (Isanapongและคณะ, 2013)

เมแทบอลิซึมของคาร์บอน จากการศึกษาจีโนมของ *D. colotermitum* พบว่ามีจีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์บอน เช่น จีนที่เกี่ยวกับการย่อยสลายไซแลนและเซลลูโลส เช่น xylanase, acetyl xylan esterase, cellulase (glycoside hydrolase family 5), 1,4-β-glucanase และ α-L-arabinofuranosidase เป็นต้น จากการศึกษาการสร้าง mRNA และโปรตีน พบว่า *D. colotermitum* อาจมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโครงสร้างของไซแลน เนื่องจากเซลล์ได้มีการสร้างทั้ง mRNA และโปรตีนหลายชนิดในสภาวะออกซิเจน 2% เช่น acetyl xylan

esterase, xylan α-1,2-glucuronosidase และ xylose isomerase ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไซแลนมีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ จึงต้องการเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายโครงสร้างดังกล่าว (Brune, 2014)

เมแทบอลิซึมของไนโตรเจน มีความสำคัญมากต่อการเติบโตของปลวก เนื่องจากแหล่งอาหารของปลวกนั้นประกอบด้วยคาร์บอนเกือบทั้งหมดและแทบจะไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ดังนั้น ปลวกจึงต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ในการจัดหาไนโตรเจนให้ ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่า *D. colotermitum* มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน เนื่องจากตรวจพบเพปไทด์ (peptide) ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน เช่น dinitrogenase reductase (*nifH*) ในสภาวะออกซิเจน 2% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wertzและคณะ (2012) ที่พบว่า *D. colotermitum* สามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากมีจีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (*nif*) นอกจากนี้จากผลการศึกษาเกี่ยวกับการสร้าง mRNA และโปรตีน พบว่า *D. colotermitum* สามารถสังเคราะห์กรดแอมิโนได้หลายชนิด รวมทั้งในสภาวะออกซิเจน 2% ยังตรวจพบเอนไซม์ glutamate dehydrogenase และ glutamate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน นอกจากนี้ยังตรวจพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแอมิโนออร์นิทีน (ornithine) และเอนไซม์ยูรีเอส (urease α-subunit domain protein) แสดงให้เห็นถึงการหมุนเวียนไนโตรเจนจากของเสีย จากการตรวจพบ mRNA และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนในด้านต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียชนิดนี้น่าจะมีศักยภาพในการจัดหาไนโตรเจนให้แก่ปลวกได้ หรือมีการหมุนเวียนแลกเปลี่ยนไนโตรเจนระหว่างแบคทีเรียและปลวก แม้ว่าจำนวนประชากรของ Verrucomicrobia ในลำไส้ปลวกจะมีจำนวนไม่มากนัก แต่ก็มีบทบาทสำคัญในสิ่งแวดล้อมที่แทบจะไม่มีไนโตรเจนอยู่เลย (Isanapongและคณะ, 2013)

ศักยภาพในการกำจัดออกซิเจน จากการศึกษาจีโนมของ *D. colotermitum* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้น่าจะอาศัยอยู่บริเวณขอบของกระเปาะหลัง และมีบทบาทในการช่วยควบคุมความเข้มข้นออกซิเจนในกระเปาะหลังของปลวก เนื่องจากในขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียสามารถคัดแยกได้ในสภาวะที่ออกซิเจน 2% นอกจากนี้ ในสภาวะออกซิเจน 2% เซลล์มีการสร้างโปรตีน *cbb3*-type cytochrome oxidase ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับออกซิเจนได้ดี ทั้งนี้ จากการศึกษาอัตราการเติบโตของ *D. colotermitum* ที่สภาวะออกซิเจน 2% และออกซิเจน 20% พบว่า ที่สภาวะออกซิเจน 2% มีอัตราการเติบโตเท่ากับ 0.0368 ชั่วโมง$^{-1}$ ซึ่งสูงกว่าอัตราการเติบโตที่สภาวะออกซิเจน 20% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0313 ชั่วโมง$^{-1}$ ทำให้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าที่สภาวะออกซิเจน 2% เร็วกว่าสภาวะออกซิเจน 20% ประมาณ 4 ชั่วโมง (Isanapongและคณะ, 2013) ทั้งนี้ ข้อมูลดังกล่าวเป็นการยืนยันฟีโนไทป์ของแบคทีเรียซึ่งเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ การที่เซลล์เติบโตได้ช้าที่สภาวะออกซิเจน 20% อาจเป็นเพราะเกิดความเครียดจากความเข้มข้นของออกซิเจนที่มากเกินไป (oxidative stress) จึงต้องใช้เวลาในการปรับสภาพเพื่อให้เซลล์สามารถเติบโตได้ ส่งผลให้ใช้เวลาในช่วง lag phase นานขึ้น นอกจากนี้ในสภาวะออกซิเจน 20% ยังพบเพปไทด์ที่ได้มาจาก superoxide dismutase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำจัดออกซิเจน และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

กับการสร้าง [Fe-S] clusters ซึ่งเป็นโปรตีนซ่อมแซมในช่วงที่เกิดสภาวะ oxidative stress ผลิตมากขึ้นด้วย (Isanapongและคณะ, 2013)

สรุป

สังคมชีวิตในลำไส้ส่วนหลังของปลวกประกอบด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งมีความหนาแน่นแตกต่างกันไป จุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีบทบาทหน้าที่ซ้ำซ้อนหรือแตกต่างกันไป แต่มีวัตถุประสงค์ร่วมกันคือเพื่อทำให้สังคมชีวิตในลำไส้ปลวกสามารถดำรงอยู่ได้ ปลวกไม่สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในเนื้อไม้ได้อย่างสมบูรณ์ หากปราศจากกลุ่มของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวกช่วยในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และเปลี่ยนเป็นแอซีเทต ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักของปลวก นอกเหนือจากโพรโทซัวที่อาศัยในลำไส้ปลวกที่ทำหน้าที่ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสแล้ว แบคทีเรียก็อาจมีบทบาทหน้าที่ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากการศึกษาจีโนม mRNA และโปรตีนของแบคทีเรียในไฟลัม Verrucomicrobia คือ *D. colotermitum* ที่สกัดจากลำไส้ปลวกชั้นต่ำ พบว่า มีจีนและการผลิตโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส มีศักยภาพในการจัดหาไนโตรเจนให้แก่ปลวก และมีบทบาทช่วยควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนภายในกระเปาะหลัง ในด้านการใช้ประโยชน์ อาจนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น การโคลนจีนและผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ เซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลส เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

จารุณี วงศ์ข้าหลวง และขวัญชัย เจริญกรุง, (2551) ปลวกการป้องกันและกำจัด, พิมพ์ครั้งที่ 1, อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 104 หน้า.

Blum D.L., Li X.L., Chen H. and Ljungdahl L.G. (1999) Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. Appl. Environ. Microbiol., 65(9), 3990-3995.

Boucias D.G., Cai Y., Sun Y., Lietze V.U., Sen R et al., (2013) The hindgut lumen prokaryotic microbiota of the termite *Reticulitermes flavipes* and its responses to dietary lignocellulose composition. Mol. Ecol., 22(7): 1836-1853.

Breznak J.A. and Pankratz H.S., (1977) In situ morphology of the gut microbiota of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki]. Appl. Environ. Microbiol., 33(2): 406-426.

Brune A., Emerson D. and Breznak J.A., (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. Appl. Environ. Microbiol., 61(7): 2681-2687.

Brune A., (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nat. Rev. Micro., 12(3): 168-180.

Chin K.J., Liesack W. and Janssen P.H., (2001) *Opitutus terrae* gen. nov., sp. Nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1965-1968.

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B et al., (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res., 37: 5 pages, doi: 10.1093/nar/gkn879

Eggleton P., (2010) "An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology", pp. 1-26, In: Bignell D.E., Roisin Y. and Lo N. (Eds), Biology of Termites: a Modern Synthesis, Springer, Netherlands.

Fujita A., Hojo M., Aoyagi T., Hayashi Y., Arakawa G et al., (2010) Details of the digestive system in the midgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. J. Wood Sci., 56(3): 222-226.

Hongoh Y., Sato T., Dolan M.F., Noda S., Ui S et al., (2007) The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the "synergistes" group. Appl. Environ. Microbiol., 73(19): 6270-6276.

Hongoh Y., (2010) Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(6): 1145-1151

Inoue J.I., Saita K., Kudo T., Ui S. and Ohkuma M., (2007) Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of Parabasalian symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. Eukaryot. Cell., 6(10): 1925-1932.

Isanapong J., Goodwin L., Bruce D., Chen A., Detter C et al., (2012) High-quality draft genome sequence of the *Opitutaceae* bacterium strain TAV1, a symbiont of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. J. Bacteriol., 194(10): 2744-2745.

Isanapong J., Hambright W., Willis A.G., Boonmee A., Callister S.J et al., (2013) Development of an ecophysiological model for *Diplosphaera colotermitum* TAV2, a termite hindgut Verrucomicrobium. The ISME J., 7(9): 1803-1813.

Kotak M., Isanapong J., Goodwin L., Bruce D., Chen A et al., (2015) Complete genome sequence of the *Opitutaceae* bacterium strain TAV5, a potential facultative methylotroph of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. Genome Announc., 3(2): 2 pages, doi: 10.1128/genomeA.00060-15

Leadbetter J.R., Crosby L.D. and Breznak J.A., (1998) *Methanobrevibacter filiformis* sp. nov., A filamentous methanogen from termite hindguts. Arch. Microbiol., 169(4): 287-292.

Leadbetter J.R., Schmidt T.M., Graber J.R. and Breznak J.A., (1999) Acetogenesis from H_2 plus CO_2 by spirochetes from termite guts. Science, 283(5402): 686-689.

Lee K.C., Webb R.I., Janssen P.H., Sangwan P., Romeo T et al., (2009) Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum *Planctomycetes*. BMC Microbiol., 9: 5.

Lo N. and Eggleton P., (2010) "Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts", pp. 27-50, In: Bignell D.E., Roisin Y. and Lo N. (Eds), Biology of Termites: a Modern Synthesis, Springer, Netherlands.

Nakajima H., Hongoh Y., Usami R., Kudo T. and Ohkuma M., (2005) Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. FEMS Microbiol. Ecol., 54(2): 247-255.

Nakashima K., Watanabe H., Saitoh H., Tokuda G. and Azuma J.I., (2002) Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. Insect Biochem. Molec., 32(7): 777-784.

Ni J. and Tokuka G., (2013) Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. Biotechnol. Adv., 31(6): 838-850.

Noda S., Iida T., Kitade O., Nakajima H., Kudo T. and Ohkuma M., (2005) Endosymbiotic bacteroidales bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Appl. Environ. Microbiol., 71(12): 8811-8817.

Noda S., Ohkuma M. and Kudo T., (2002) Nitrogen fixation genes expressed in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Microbes Environ., 17(3), 139-143.

Noda S., Ohkuma M., Yamada A., Hongoh Y. and Kudo T., (2003) Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. Appl. Environ. Microbiol., 69(1): 625-633.

Ohkuma M., (2008) Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. Trends Microbiol., 16(7): 345-352.

Ohtoko K., Ohkuma M., Moriya S., Inoue T., Usami R. and Kudo T., (2000) Diverse genes of cellulase homologues of glycosyl hydrolase family 45 from the symbiotic protists in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus*. Extremophiles., 4(6): 343-349.

Pester M. and Brune A., (2007) Hydrogen is the central free intermediate during lignocellulose degradation by termite gut symbionts. The ISME J., 1(6): 551-565.

Peterson B.F. and Scharf M.E., (2016) Lower termite associations with microbes: synergy, protection, and interplay. Front. Microbiol., 7: Article ID 422, 7 pages, http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00422.

Rodrigues J. and Isanapong J., (2014) "The family *Opitutaceae*", pp. 751–756, In: Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E. and Thompson F. (Eds), The Prokaryotes—Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea, 4th edition, Springer, Berlin Heidelberg.

Sato T., Hongoh Y., Noda S., Hattori S., Ui S. and Ohkuma M., (2009) *Candidatus Desulfovibrio* trichonymphae, a novel intracellular symbiont of the flagellate *Trichonympha agilis* in termite gut. Environ. Microbiol., 11(4): 1007-1015.

Shieh W.Y. and Jean W.D., (1998) *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. Can. J. Microbiol., 44(7): 637-645.

Stevenson B.S., Eichorst S.A., Wertz J.T., Schmidt T.M. and Breznak J.A., (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. Appl. Environ. Microbiol., 70(8): 4748-4755.

Tholen A. and Brune A., (2000) Impact of oxygen on metabolic fluxes and in situ rates of reductive acetogenesis in the hindgut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. Environ. Microbiol., 2(4): 436-449.

Todaka N., Moriya S., Saita K., Hondo T., Kiuchi I et al., (2007) Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. FEMS Microbiol. Ecol., 59(3): 592-599.

Watanabe H., Nakashima K., Saito H. and Slaytor M., (2002) New endo-beta-1,4-glucanases from the parabasalian symbionts, *Pseudotrichonympha grassii* and *Holomastigotoides mirabile* of *Coptotermes termites*. Cell. Mol. Life Sci., 59(11): 1983-1992.

Wertz J.T., Kim E., Breznak J.A., Schmidt T.M. and Rodrigues J. L.M., (2012) Genomic and physiological characterization of the Verrucomicrobia isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. Appl. Environ. Microbiol., 78(5): 1544-1555.

Yoshimura T., Fujino T., Itoh T., Tsunoda K. and Takahashi M., (1996) Ingestion and decomposition of wood and cellulose by the protozoa in the hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) as evidenced by polarizing and transmission electron microscopy. Holzforschung., 50(2): 99-104.