

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน  
Screening and isolation of hydrogen-producing microbes  
with high potential for bio-production of hydrogen

โดย

น.ส.สังวาลย์ แก่นโส

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเพื่อการพัฒนา  
และสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2547

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือของผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ขอขอบคุณ ดร. ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีที่ขาดพร้อมทั้งคำปรึกษาและข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อโครงการเป็นอย่างดีตลอดมา ขอขอบคุณ ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล ที่ให้คำแนะนำเทคนิคการใช้ SEM และ TEM ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงที่ไม่ได้เอ่ยนามในที่นี้ อนึ่งโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทางการเงินจากทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเพื่อการพัฒนาและสนับสนุนงานวิจัย งานส่งเสริมการวิจัยฯ กองแผนงานสำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ดร. ธังวาลย์ แก่นโส

กุมภาพันธ์ 2548

### บทคัดย่อ

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างแม่น้ำโขงและน้ำพุร้อน สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 47 isolate เป็นเชื้อที่สร้างก๊าซได้ 11 isolate เชื้อที่ผลิตก๊าซได้มี 2 isolate คือ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ซึ่งผลิตก๊าซได้ 2.5 ml และ 4.0 ml ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB pH7.0 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากการนำเชื้อที่ผลิตก๊าซได้สูงที่สุด 2 isolate มาศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 เจริญได้ในช่วง pH4.0-8.0 (pH growth range) และช่วงอุณหภูมิ 20-50°C (temperature growth range) ส่วนการศึกษาความสามารถในการสร้างก๊าซรวมและประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ พบว่า สภาวะที่เชื้อทั้ง 2 isolate สร้างก๊าซได้ปริมาณมากที่สุดคือ ที่ pH7.0 และที่อุณหภูมิ 35°C โดยเชื้อ KRS4B/5 สร้างได้ 5.4 ml และ KRS4C/6 สร้างได้ 5.2 ml ในอาหาร NB 30 ml อย่างไรก็ตาม สัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้นั้น คิดเป็นเพียง 74.07% และ 73.07% ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดสำหรับเชื้อ KRS4B/5 คือที่ pH 6.0 (สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.9 ml จากปริมาณก๊าซรวม 2.2 ml คิดเป็น 86.36%) ที่อุณหภูมิ 45°C (สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.2 ml จากก๊าซรวม 1.4 ml คิดเป็น 85.71%) สำหรับเชื้อ KRS4C/6 คือที่ pH 6.0 และ pH 7.5 (สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 3.0 ml จากปริมาณก๊าซรวม 3.7 ml คิดเป็น 81.08%) ที่อุณหภูมิ 45°C (สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.5 ml จากก๊าซรวม 1.8 ml คิดเป็น 83.34%)

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 จัดอยู่ใน Genus *Paenibacillus* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าเชื้อ KRS4C/6 มีลำดับเบสที่คล้ายกับเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* ถึง 98% (98% similarity) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีก็สอดคล้อง ส่วนเชื้อ KRS4B/5 ถึงแม้จะมีลำดับเบสคล้ายกับเชื้อ *P. polymyxa* ถึง 97% แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างจาก *P. polymyxa*

### Abstract

The total of 47 isolates has been obtained from Khong river soil samples and Mai Chan hot spring and ten of them can produce gas. Isolates KRS4B/5 and KRS4C/6 grown in NB medium pH 7.0 at room temperature for 144 h. produced total gas of 2.5 ml and 4.0 ml respectively. Both isolates have temperature growth range of 20-50°C and pH growth range of 4.0-8.0. In this study, performance in gas production by KRS4B/5 and KRS4C/6 in 30 ml NB medium pH 7.0 at 35°C yielded 4 ml and 3.8 ml H<sub>2</sub> gas from total gas volume of 5.4 ml and 5.2 ml, calculated to 74% and 73% H<sub>2</sub> content respectively. However, highest H<sub>2</sub> gas contents of 86% and 83% could be obtained by culturing KRS4B/5 and KRS4C/6 respectively at 45°C pH 7.0, although under this condition the total H<sub>2</sub> gas volume obtained was markedly reduced to 1.2 ml and 1.5 ml. From 16S rRNA gene analysis KRS4B/5 and KRS4C/6 were placed within the vicinity of genus *Paenibacillus* with percentage similarities of 97% and 98% respectively with *P. polymyxa*.

	สารบัญ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ		2
บทคัดย่อ		3
Abstract		4
สารบัญ		5
สารบัญตาราง		6
สารบัญภาพ		7
คำอธิบายสัญลักษณ์		8
บทนำ		9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย		10
เนื้อเรื่อง: การตรวจเอกซเรย์		11
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง		12
ผล และสรุปผลการทดลอง		16
สรุปผลการวิจัย		29
ข้อวิจารณ์		30
ข้อเสนอแนะ (Suggestion and Future Direction)		30
บรรณานุกรม		31
ภาคผนวก ก: การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี		33
ภาคผนวก ข: Biochemical Test		34
ประวัตินักวิจัย (Curriculum Vitae)		37

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้าที่
1. ลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแม่น้ำโขงที่ Aerobic condition	16
2. ลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแม่น้ำโขงที่ Anaerobic condition	17
3. ลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำพุร้อนที่ Aerobic condition	18
4. การเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6	19
5. ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เชื้อทั้ง 2 isolates สร้างในเวลา 144 ชั่วโมง	20
6. ปริมาณก๊าซทั้งหมดและก๊าซ H <sub>2</sub> ที่เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6	21
7. ปริมาณก๊าซที่เชื้อสร้างได้ในอาหาร NB pH 7 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิต่างๆ	22
8. ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ KRS 4B/5 และ KRS 4C/6	23
9. ผล Biochemical test ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6	24
10. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA sequence ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 กับฐานข้อมูลของ RDP	27
11. เปรียบเทียบลักษณะเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 กับเชื้อที่ทราบชนิดแล้วใน genus <i>Paenibacillus</i>	28

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ภาพ Fermentation tube	13
2. ปริมาณก๊าซที่เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างในเวลา 144 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB pH7.0 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้อง	20
3. ลักษณะ โคล โคนี และเซลล์ของเชื้อ KRS4B/5	22
4. ลักษณะ โคล โคนี และเซลล์ของเชื้อ KRS4C/6	23
5. ภาพ agarose gel electrophoresis ของ Genomic DNA สกัดจากเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ด้วยวิธี CTAB/NaCl	25
6. PCR product จากการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6	25

## คำอธิบายสัญลักษณ์

μl	Microliter
μm	Micrometer
Blastn	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide)
BioEdit	Nucleic acid sequence editing program
cm	Centimeter
°C	Degree Celcius
<b>CTAB/NaCl</b>	
dH <sub>2</sub> O	De-ionized water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
g	Gram
L, l	Litter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	Molar
N	Normality
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
OD <sub>600</sub>	Optical density at 600 nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Round per minute
rRNA	Ribosomal RNA
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodesyl Sulfate
TE	Tris EDTA
v/v	Volume by volume
vol.	Volume



## บทนำ

ปัจจุบันทั่วโลกประสบปัญหาอันสืบเนื่องมาจากปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษอย่างหนักหน่วงและเพิ่มความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ ดังที่ประสบอยู่ การเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็วทำให้ความต้องการใช้พลังงานและทรัพยากรมีเพิ่มมากขึ้นด้วย ปัญหาปริมาณขยะที่เพิ่มขึ้นเกินความสามารถในการกำจัดและปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษจึงเป็นผลที่ตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

แหล่งพลังงานหลักที่ทั่วโลกใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือพลังงานที่อยู่ในรูปฟอสซิล เช่น ปิโตรเลียมและถ่านหินซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการเผาไหม้ของปิโตรเลียมส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สะสมในบรรยากาศของโลกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะเรือนกระจกอันส่งผลให้อุณหภูมิของโลกเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลกระทบต่อสภาวะของโลกโดยรวมทั้งสภาวะโลกร้อน สภาวะการแห้งแล้งที่ยาวนาน และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศที่รุนแรงเป็นตัวอย่างผลกระทบที่เห็นได้อย่างชัดเจนดังที่ประสบอยู่ในปัจจุบัน

ด้วยสาเหตุนี้จึงมีการศึกษาและวิจัย เพื่อนำไปสู่การใช้พลังงานหมุนเวียนแทนการใช้พลังงานจากฟอสซิล ตัวอย่างพลังงานหมุนเวียนที่มีการค้นคว้าและนำมาใช้ในอดีตและปัจจุบัน เช่น พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากน้ำมันพืชหรือเอทานอล และก๊าซมีเทนที่ได้จากการหมักพืชและสารอินทรีย์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีเหล่านี้ต่างก็มีข้อจำกัด เช่น กระแสลมที่ไม่เหมาะสม เซลล์แสงอาทิตย์ที่มีราคาแพง ตามแต่กรณี ส่วนการผลิตก๊าซมีเทนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานนั้นยังมีข้อด้อยคือ การเผาไหม้ของก๊าซมีเทนส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ ก๊าซมีเทนยังเป็นก๊าซที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก

ปัญหาปริมาณขยะที่เพิ่มมากขึ้นเกินความสามารถในการกำจัดนั้น นอกจากจะส่งผลให้สิ่งแวดล้อมรอบๆ เป็นพิษแล้ว ยังเป็นภาระของสังคมที่จะต้องจัดการ ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายอีกเป็นจำนวนมาก ปัญหาความไม่พอเพียงของพลังงานและความต้องการที่จะกำจัดขยะนี้ หากนำมาพิจารณาแล้วจะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้สูงมากในการแก้ปัญหาทั้งสองควบคู่กันไป เนื่องจากขยะที่เกิดขึ้นในปริมาณมากๆ ส่วนใหญ่จะเต็มไปด้วยสารอินทรีย์ ซึ่งโดยปกติแล้วจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่แล้ว การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์หลายชนิดส่งผลให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำให้เกิดการเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งต่างจากการเผาไหม้ของก๊าซมีเทน ก๊าซไฮโดรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนปิโตรเลียมและก๊าซธรรมชาติได้ เนื่องจากเป็นพลังงานที่ไม่ก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอีกทั้งยังเป็นการกำจัดหรือลดปริมาณขยะได้ด้วยหากขยะถูกนำมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากวัสดุชีวภาพเพื่อใช้เป็นพลังงานนั้น ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในขณะนี้ทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกาและในยุโรป เพราะการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์มีความเป็นไปได้สูงในการพัฒนากระบวนการผลิตให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำได้ โดยเฉพาะการใช้ของเสียเป็น Substrate ในการผลิต จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จะอยู่ในกลุ่มสาหร่ายและแบคทีเรีย โครงการนี้มุ่งเน้นจะศึกษาในกลุ่มของแบคทีเรียเพราะ

เลี้ยงง่าย และมีอัตราการเจริญสูง จึงน่าจะสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญ และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ง่าย ตลอดจนการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการพื้นที่ไม่มากนัก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ที่ต้องใช้พื้นที่มากในการรองรับแสงที่จำเป็นต่อการเจริญ แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้นั้นมีอยู่หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเทอร์โมไฟล์ กลุ่มโฟโตซินเทติก และกลุ่มแอนาโรบิก เป็นต้น และจากสภาพพื้นที่ของประเทศไทยที่มีทั้ง น้ำพุร้อน แหล่งน้ำและของเสียมากมาย จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะมีการคัดแยกเชื้อเหล่านี้เพื่อนำมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกำจัดของเสียไปด้วยในขณะเดียวกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมองเห็นความต้องการในการหาความรู้ที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการบำบัดของเสียและเปลี่ยนรูปสารที่ไม่ต้องการให้มีคุณค่าในรูปของพลังงานได้

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยมีดังนี้

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากแหล่งธรรมชาติ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างก๊าซ
3. จำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซได้สูงสุด

## เนื้อเรื่อง

### การตรวจเอกสาร

#### การผลิตก๊าซ $H_2$ โดยวิธีชีวภาพ (Hydrogen Bio-production)

ในธรรมชาติมีความหลากหลายของพืช สัตว์ และรวมถึงจุลินทรีย์ด้วย โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นมีหลายชนิด จากข้อมูลงานวิจัยแหล่งต่างๆ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการทางชีวภาพ (Hydrogen Bio-production) มี 3 รูปแบบด้วยกันคือ 1.การใช้ Anaerobic Bacteria 2.การใช้ Cyanobacteria 3.การใช้ Photosynthetic Bacteria ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะในรูปแบบที่หนึ่ง

การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม Anaerobic Bacteria ในการทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น มีแบคทีเรียหลายกลุ่มด้วยกันที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ซึ่งได้แก่ *Clostridium* spp., Thermophile และ Hydrogenic Bacteria เป็นต้น ในการศึกษาสภาวะในการเจริญและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Clostridium* spp. Ginkel พบว่าปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นประกอบด้วย pH, substrate และ อุณหภูมิ ซึ่ง Ginkel พบว่าค่า pH ที่ดีที่สุดอยู่ในช่วง 4.5-6.5 ในส่วนของ substrate ที่ใช้พบว่าชนิดของ substrate ให้ปริมาณก๊าซที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ความเข้มข้นของ substrate มีผลโดยตรง โดยมีแนวโน้มคือปริมาณก๊าซจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ substrate เริ่มต้น (Ginkel, 2001) นอกจากนี้การเติมสารบางอย่างเช่น  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  และ  $NH_3-N$  ลงในถังหมัก จะส่งผลให้มีปริมาณก๊าซเพิ่มขึ้น (Ren *et.al.*, 2003)

จากการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มทนร้อน (Thermophile) สามารถคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อน โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 50-70°C Van Ootegham พบว่าเมื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการเจริญและผลิตก๊าซไฮโดรเจน Thermotogales มีข้อดีคือสามารถควบคุมการผลิตก๊าซได้ง่าย และในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้น การเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการจะถูกยับยั้ง (Van Ootegham *et.al.*, 2002)

Tanisho and Shimazaki (2003) ศึกษากระบวนการหมักแบบครั้งเดียว (Batch cultivation) ของเชื้อ *Clostridium butyricum* และ *Enterobacter aerogenes* โดยใช้น้ำทิ้งจากน้ำมันปาล์ม (Palm Oil Mill Effluent, POME) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (Substrate) พบว่า *C. butyricum* ให้  $H_2$  2.2 NL และ *E. aerogenes* ให้  $H_2$  1.9 NL ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และพบว่าการเติมไนโตรเจน (1% Peptone) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ปริมาณ  $H_2$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการเลี้ยงเชื้อร่วมกับ *Aspergillus niger* ไม่ส่งผลต่อปริมาณ  $H_2$

De Vrije และคณะ ศึกษาการใช้เอนไซม์และกระบวนการทางเคมีในการย่อยสลายพวก Cellulose, Hemicellulose และ lignin ในพืช *Miscanthus* ด้วยวิธีการหมักเพื่อใช้เป็นอาหารเริ่มต้น พบว่าได้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตก๊าซ  $H_2$  ของเชื้อ *T. elfii* ได้ดีกว่าการใช้ Glucose ในกระบวนการหมัก

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำและดินจากแม่น้ำโขงในเขตจังหวัดมุกดาหาร น้ำพุร้อนห้าแห่งในภาคเหนือ โดยเก็บตัวอย่างในขวดเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อ และแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดการเดินทาง ทำการคัดแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากนำตัวอย่างถึงห้องทดลอง ตัวอย่างที่เหลือจากการทดลองถูกเก็บในห้องมีตู้ที่อุณหภูมิ 4°C

### 2. คัดแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ

#### 2.1 ตัวอย่างดินแม่น้ำโขง

1. นำตัวอย่างดิน 25 g ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 225 ml จากนั้นมาทำ Serial dilution  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

2. Spread ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ขั้นตอนการแยกเชื้อทั้งหมดทำใน Anaerobic Chamber

3. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมา streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยการ streak โคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารแข็ง NA ใหม่อีก 3 ซ้ำ ในระหว่างการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จะทำการศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่าง ขนาด และการติดสีของเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คววดูไปด้วย เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อ

#### 2.2 ตัวอย่างน้ำพุร้อน

1. ทำ serial dilution  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

2. Spread ลงบนอาหาร NA ที่มีความเข้มข้นของอาหารเป็น 0.5 เท่าจากสูตรอาหารปกติ โดยให้ความเจือจาง  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$  บ่มที่อุณหภูมิ 60°C และ 70°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 60°C และ 70°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยการ streak โคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารแข็ง NA ใหม่อีก 3 ซ้ำ ในระหว่างการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จะทำการศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่าง ขนาด และการติดสีของเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คววดูไปด้วย เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อ

### 3. การเก็บรักษาเชื้อ

1. นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาณ 3 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock เชื้อในการทดลอง

2. ในการเก็บเชื้อระยะยาวที่ -80°C จะเติม glycerol 0.5 ml ให้มีความเข้มข้น 15%(v/v) ลงใน culture 3 ml เพื่อรักษาสภาพเซลล์ แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

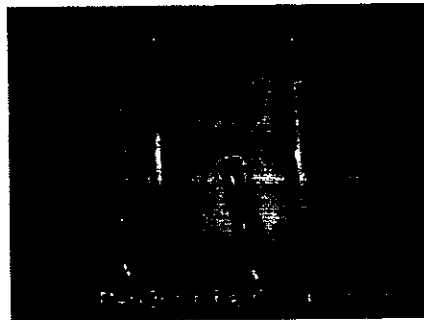
#### 4. ทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซของเชื้อที่ได้คัดแยกได้

##### 4.1.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างก๊าซได้ (Screening)

ทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซโดยการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร NB ในหลอดทดลองที่มีการใส่หลอดดักก๊าซ (Duram Tube) แล้ววัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นใน Duram Tube

##### 4.1.2. ทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซไฮโดรเจน

1. เลี้ยงเชื้อที่ให้ก๊าซรวมในปริมาณมากที่สุดที่คัดเลือกได้ในข้อ 1 ด้วยอาหาร NB ปริมาตร 30 ml ใน Fermentation Tube (ภาพที่ 1) โดยใช้เชื้อที่เลี้ยงใน NB มาแล้ว 24 ชั่วโมงปริมาณ 0.3 ml เป็นเชื้อตั้งต้น (0.1% inoculum) บ่มที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณก๊าซรวมทุกๆ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่
2. หาปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดจากการหมักโดยการเติม 3 N NaOH ปริมาตร 30 ml ลงใน Fermentation Tube เพื่อทำปฏิกิริยากับก๊าซ CO<sub>2</sub> จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้เต็ม tube ปิดฝาให้สนิท โดยไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ที่บริเวณฝา ทำการผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที วัดปริมาณก๊าซที่เหลือใน tube ซึ่งถือได้ว่าเป็นก๊าซไฮโดรเจน บันทึกปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 1 Fermentation tube

#### 5. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการการเจริญและการสร้างก๊าซไฮโดรเจน

1. นำเชื้อที่คัดแยกได้มา sub-culture อาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยบ่มที่สถานะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนตามลักษณะที่เชื้อสามารถเจริญได้
2. Inoculate เชื้อในข้อ 1 ลงใน Fermentation Tube ที่มีอาหาร NB 30 ml บ่มที่อุณหภูมิ 15-90°C บันทึกการเจริญ (วัด OD<sub>600</sub>) และวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นเป็นระยะจนกระทั่งปริมาณก๊าซมีค่าคงที่
3. Inoculate เชื้อในข้อ 1 ลงใน Fermentation Tube ที่มีอาหาร NB 30 ml ที่ค่า pH ต่างๆ (4-9) บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ได้จากการทดลองในข้อ 2 บันทึกการเจริญของเชื้อและปริมาณ ก๊าซที่เกิดขึ้นเป็นระยะจนกระทั่งปริมาณก๊าซมีค่าคงที่

## 6. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งได้แก่ ลักษณะของเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์, การสร้างสปอร์ โดยดูขนาดและตำแหน่งของสปอร์ เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบการจัดจำแนกเชื้อ

## 7. Standard Biochemical test

แบคทีเรียมีความต้องการอาหารและกิจกรรมของเซลล์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ดังนั้นกิจกรรมทางชีวเคมี ความสามารถในการใช้ Substrate ตลอดจนธาตุอาหารอื่นๆเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน จึงสามารถใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียได้ กิจกรรมทางชีวเคมีที่ทดสอบเช่น Catalase Activity, Oxidase Activity, Urease Activity และอื่นๆ รวมทั้งความสามารถในการ Hydrolyze แป้ง และน้ำตาลอื่นๆ เป็นต้น

## 8. 16S rRNA Gene Analysis

1. เพิ่มจำนวนเซลล์โดยการเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น centrifuge ด้วยความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาเฉพาะเซลล์

2. สกัด genomic DNA จาก 10 ml culture โดยวิธี CTAB/NaCl

3. ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rRNA Gene โดยใช้ Fd1 และ Rd1 Universal Primer สำหรับ Bacteria

ในการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ใช้ Fd1 และ Rd1 primer โดยทำ PCR ในปริมาตรรวม 20 $\mu$ l ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ

1. Master Mix 2X	10 $\mu$ l
2. Fd1 primer	1 $\mu$ l
3. Rd1 primer	1 $\mu$ l
4. Water	6 $\mu$ l
5. DNA template	2 $\mu$ l
ปริมาตรรวม	20 $\mu$ L

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

Preheat	94°C	1 นาที
Denature	94°C	30 วินาที
Annealing	60°C	15 วินาที
Extension	72°C	2 นาที
ทำ PCR 30 รอบ		

4. อ่านลำดับเบส (sequence) ของ 16S rRNA Gene (Bio Service Unit, Biotech)

5. วิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA Gene โดยการวิธีเทียบเคียงอย่างง่ายกับฐานข้อมูลของ RDP โดยใช้โปรแกรม Blastn (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide)

## ผล และสรุปผลการทดลอง

## 1. การคัดแยกเชื้อ

## 1.1 การคัดแยกเชื้อจากดินริมฝั่งแม่น้ำโขง

คัดแยกเชื้อภายใต้ Aerobic condition และ anaerobic condition ได้เชื้อทั้งหมด 36 isolates มีความสามารถในการผลิตก๊าซจำนวน 10 isolates (ตารางที่ 1 และ 2)

Aerobic condition

ลำดับ ที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การสร้าง ก๊าซ
		ขนาด	สี	ความนูน	ขอบ	
1	KRS2Ba	-	ขาวขุ่น	แผ่, ลาม	-	-
2	KRS2Bb	3mm	ขาวขุ่น	flat	entire	-
3	KRS2Bc	3-5mm	ขาวขุ่น	raised	entire	-
4	KRS2Bd	1-2mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-
5	KRS4C1	(คล้ายเส้นใย)	ขาวขุ่น	-	filamentous	-
6	KRS4C3	1-3mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-
7	KRS4C4	(คล้ายเส้นใย)	ขาวขุ่น	-	filamentous	-
8	KRS4C4a	(คล้ายเส้นใย)	ขาวขุ่น	-	filamentous	-
9	KRS4C4b	1.5-3.5mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-
10	KRS4C4c	1-3.5mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-
11	KRS4C5	-	ขาวขุ่น	แผ่, ลาม	-	-
12	KRS4C6	-	ขาวขุ่น	แผ่, ลาม	-	-
13	KRS4C7	-	ขาวขุ่น	แผ่, ลาม	-	-
14	KRS4C10	(คล้ายเส้นใย)	ขาวขุ่น	-	filamentous	-

หมายเหตุ: คำอธิบายรหัสเชื้อ

KRS คือ Khong River Soil

B คือ ตัวอย่างดินริมฝั่งแม่น้ำ

C คือ ตัวอย่างดินใต้น้ำ

ตารางที่ 1 เชื้อและลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแม่น้ำโขงภายใต้ Aerobic condition



**Anaerobic condition**

ลำดับ ที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี					การสร้าง ก๊าซ
		ขนาด	สี	ความนูน	ขอบ	ลักษณะ พิเศษ	
1	KRS2B/1	1mm	ขาว	convex	-	-	-
2	KRS2B/2	4mm	เหลืองขุ่น	convex	erose	-	สร้างก๊าซ
3	KRS2B/3	2mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-	สร้างก๊าซ
4	KRS2B/4	3-4mm	เหลืองขุ่น	flat	rhizoid	-	-
5	KRS2B/5	4mm	ใส	flat	rhizoid	-	-
6	KRS2B/6	-	ขาวขุ่น	flat	lobate	clear zone	สร้างก๊าซ
7	KRS4B/1	-	ใส	flat	filamentous	-	-
8	KRS4B/2	5mm	ขาวขุ่น	convex	erose	-	-
9	KRS4B/3	3-4mm	ขาวขุ่น	raised	erose	-	-
10	KRS4B/4	2-5	ใส	raised	lobate	-	-
11	KRS4B/5	2mm	ขาว	umbonate	entire	-	สร้างก๊าซ
12	KRS4B/6	2mm	กลางขาว/ข้างใส	flat	undulate	-	-
13	KRS4B/7	3mm	ขาวขุ่น	raised	undulate	-	-
14	KRS4B/8	-	ขาวขุ่น	-	filamentous	-	-
15	KRS4C/1	แผ่,ลาม	ขาวขุ่น	flat	erose	-	สร้างก๊าซ
16	KRS4C/2	-	เหลืองขุ่น	raised	rhizoid	-	สร้างก๊าซ
17	KRS4C/3	7-8mm	ใส	convex	entire	-	-
18	KRS4C/4	-	ขาวขุ่น	-	filamentous	--	-
19	KRS4C/5	2mm	ขาว	raised	entire	-	สร้างก๊าซ
20	KRS4C/6	1mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-	สร้างก๊าซ
21	KRS4C/7	1mm	ขาวขุ่น	convex	entire	clear zone	สร้างก๊าซ
22	KRS4C/8	2mm	ขาวขุ่น	convex	entire	-	สร้างก๊าซ

หมายเหตุ: คำอธิบายรหัสเชื้อ

KRS คือ Khong River Soil

B คือ ตัวอย่างดินริมฝั่งแม่น้ำ

C คือ ตัวอย่างดินใต้น้ำ

ตารางที่ 2 เชื้อและลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินแม่น้ำโขงภายใต้ anaerobic condition

## 1.2. การคัดแยกเชื้อจากน้ำพุร้อนแม่จัน

คัดแยกเชื้อภายใต้ Aerobic Condition ที่อุณหภูมิ 60°C และ 70°C ในอาหาร NB เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดแยกเชื้อได้ 11 isolates (ตารางที่ 3)

ลำดับ ที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี					การสร้าง ก๊าซ
		ขนาด	สี	ความนูน	ขอบ	ลักษณะพิเศษ	
1	MJ6_70_1W	4 mm	ขาวขุ่น	convex	entire		-
2	MJ6_70_2	3 mm	ใส	convex	entire		-
3	MJ6_70_3W	แผ่น ,ลาม	ขาวขุ่น	-	lobe		-
4	MJ6_70_4Y	4 mm	เหลือง	convex	entire	มีจุดสีเหลือง กลางโคโลนี ริมโคโลนีใส	-
5	MJ6_60_5Y	3 mm	เหลืองใส	-	lobe		-
6	MJ6_60_6	แผ่น ,ลาม		-	lobe		-
7	MJ5_70_1W	7 mm	ขาวขุ่น	-	erose		-
8	MJ5_70_2	4 mm	ใส	convex	entire		-
9	MJ5_70_3W	2 mm	ขาวขุ่น	convex	entire		-
10	MJ5_60_4Y	6 mm	เหลืองใส	ขรุขระ	lobe		-
11	MJ5_60_5	4 mm	ใส	ขรุขระ	undulate	มีจุดสีขาวตรง กลาง	-

หมายเหตุ: MJ5 คือ น้ำพุร้อนแม่จัน จ.เชียงใหม่ ตัวเลขแสดงรหัสบ่อ

\_70\_ คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ

W = white Y = yellow คือ ลักษณะสีของโคโลนี

ตารางที่ 3 ลักษณะเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำพุร้อนภายใต้ Aerobic condition

### สรุปผลการคัดแยกเชื้อ

#### 1. คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินแม่น้ำโขง

คัดแยกภายใต้ Aerobic condition แยกเชื้อได้	14	Isolates
คัดแยกภายใต้ Anaerobic condition แยกเชื้อได้	22	Isolates
รวมเชื้อทั้งหมด	36	Isolates
เชื้อที่ผลิตก๊าซ	10	Isolates

## 2. คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำพุร้อนแม่จัน

คัดแยกภายใต้ Aerobic condition แยกเชื้อได้	11	Isolates
คัดแยกภายใต้ Anaerobic condition	ไม่ได้คัดแยก	
รวมเชื้อทั้งหมด	11	Isolates
เชื้อที่ผลิตก๊าซ	0	Isolate

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติ 2 แหล่ง คือ ตัวอย่างดินริมฝั่งแม่น้ำโขง และ ตัวอย่างน้ำพุร้อนแม่จัน คัดแยกได้ทั้งหมด 47 isolates ในการทดสอบการเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อทั้งหมด ในอาหาร NB ปริมาตร 10 ml ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหารที่มีค่า pH เหมือนกัน พบว่าเป็นเชื้อที่สร้างก๊าซได้ 10 isolates ได้แก่เชื้อ KRS2B/2, KRS2B/3, KRS2B/6, KRS4B/5, KRS 4C/1, KRS4C/2, KRS4C/5, KRS4C/6, KRS4C/7 และ KRS4C/8 นำเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างก๊าซได้มากที่สุด มาศึกษาการสร้างก๊าซในการทดลองขั้นต่อไป

## 2. ความสามารถในการเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

### 2.1 ความสามารถในการเจริญและการสร้างก๊าซที่ pH ต่างๆ ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

pH อาหารเลี้ยงเชื้อ	KRS4B/5		KRS4C/6	
	การสร้างก๊าซ	OD <sub>600</sub>	การสร้างก๊าซ	OD <sub>600</sub>
3	-	0.1967	-	0.1247
4	-	0.0461	-	0.0514
5	-	0.1168	-	0.1845
6	+	0.2235	+	0.2718
7	+	0.3534	+	0.3168
8	+	0.2854	+	0.2577
9	-	0.0040	-	0.0171
10	-	-0.0010	-	0.0018
11	-	0.0055	-	0.0088

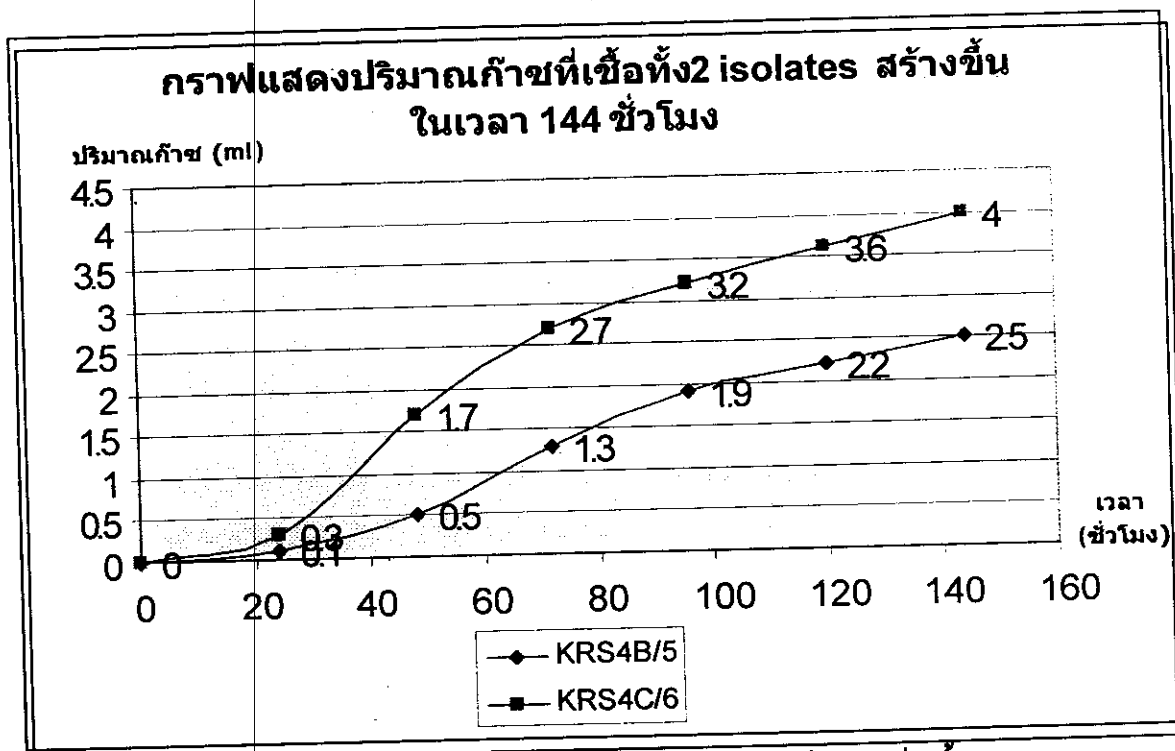
\* อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 3 อาหารมีความขุ่น ไม่ได้เกิดจากการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 4 การเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มี pH 3.0 – 11 ปริมาณ 10 ml

## 2.2 ความสามารถในการสร้างก๊าซ ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

เชื้อที่ทดสอบ	ปริมาณก๊าซที่เชื้อผลิตได้ในอาหาร NB pH7.0 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้อง (ml)						
	0 hr.	24 hr.	48 hr.	72 hr.	96 hr.	120 hr.	144 hr.
KRS4B/5	0	0.1	0.5	1.3	1.9	2.2	2.5
KRS4C/6	0	0.3	1.7	2.7	3.2	3.6	4.0

ตารางที่ 5 ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่เชื้อทั้ง 2 isolates สร้างในเวลา 144 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB pH7.0 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 2 ปริมาณก๊าซที่เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างในเวลา 144 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB pH7.0 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้อง

## 2.3 สรุปความสามารถในการเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

ในการทดสอบความสามารถในการเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 พบว่าที่อุณหภูมิห้องเชื้อทั้ง 2 isolates สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 4-8 และเจริญได้ดีที่สุดที่ pH7 สร้างก๊าซได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 6-8 และสร้างก๊าซได้สูงที่สุดที่ pH7.0 (ตารางที่ 4)

ในการเลี้ยงเชื้อใน Fermentation tube ในอาหาร NB ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างก๊าซได้ 2.5 ml และ 4.0 ml ตามลำดับ (ภาพที่ 2) โดยจะเริ่มสร้างก๊าซที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและมีค่าคงที่เวลาประมาณ 144 ชั่วโมง

### 3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างก๊าซไฮโดรเจน

#### 3.1 การหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เชื้อสร้างได้ในอาหาร NB ที่ pH ต่างๆ

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซทั้งหมดและก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ในอาหาร NB ที่มี pH ระหว่าง 5.5 - 7.5 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง เป็นดังตาราง

pH	KRS4B/5			KRS4C/6		
	total gas (ml)	H <sub>2</sub> (ml)	% H <sub>2</sub>	total gas (ml)	H <sub>2</sub> (ml)	% H <sub>2</sub>
5.5	1.6	1.3	81.25	3.0	2.4	80.00
6.0	2.2	1.9	86.36	3.7	3.0	81.08
6.5	2.8	2.1	75.00	3.5	2.7	77.14
7.0	3.1	2.6	83.82	4.0	3.1	77.50
7.5	3.7	3.0	81.03	3.7	3.0	81.08

หมายเหตุ ที่ pH 5.0 และ pH 8.5 เชื้อทั้ง 2 isolates ไม่สร้างก๊าซ

ตารางที่ 6 ปริมาณก๊าซทั้งหมดและก๊าซ H<sub>2</sub> ที่เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างได้ที่ pH 5.5-7.5

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ในอาหาร NB ที่มีค่า pH ต่างๆ ระหว่าง 5.0-8.5 เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าและการสร้างก๊าซมีแนวโน้มลดลง เมื่อ pH ลดลง เชื้อ KRS4B/5 สร้างก๊าซได้มากที่สุดที่ pH 7.5 โดยมีปริมาตรเท่ากับ 3.7 ml และเป็นก๊าซไฮโดรเจน 3.0 ml ซึ่งคิดเป็น 81.08% ของก๊าซรวมหรือเท่ากับ 810.8 ml H<sub>2</sub>/l total gas formed และคิดเป็น 100 ml H<sub>2</sub>/l media อย่างไรก็ตามสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนที่เชื้อ KRS4B/5 สร้างได้สูงที่สุดคือที่ pH 6.0 คิดเป็น 86.36% หรือเท่ากับ 863.6 ml H<sub>2</sub>/l total gas formed แต่คิดเป็นเพียง 63.33 ml H<sub>2</sub>/l media เท่านั้น

เชื้อ KRS4C/6 สร้างก๊าซได้มากที่สุดที่ pH 7.0 โดยมีปริมาตรเท่ากับ 4.0 ml และเป็นก๊าซไฮโดรเจน 3.1 ml ซึ่งคิดเป็น 77.5% ของก๊าซรวม และคิดเป็น 103.33 ml H<sub>2</sub>/l media อย่างไรก็ตามสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนที่เชื้อ KRS4C/6 สร้างได้สูงที่สุดที่ pH 6.0 และ pH 7.5 ซึ่งคิดเป็น 81.08% หรือเท่ากับ 810.8 ml H<sub>2</sub>/l total gas formed และคิดเป็น 100 ml H<sub>2</sub>/l media

#### 3.2 การหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เชื้อสร้างได้ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณก๊าซทั้งหมดและก๊าซไฮโดรเจน ที่เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างได้ใน NB pH 7.0 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

อุณหภูมิ	KRS4B/5			KRS4C/6		
	total gas (ml)	H <sub>2</sub> (ml)	% H <sub>2</sub>	total gas (ml)	H <sub>2</sub> (ml)	% H <sub>2</sub>
25°C	3.5	2.5	71.42	3.3	2.7	81.81
35°C	5.4	4.0	74.07	5.2	3.8	73.07
45°C	1.4	1.2	85.71	1.8	1.5	83.34

หมายเหตุ ที่ 15°C และ 55°C เชื้อทั้ง 2 isolates ไม่สร้างก๊าซ

ตารางที่ 7 ปริมาณก๊าซที่เชื้อสร้างได้ในอาหาร NB pH 7 ปริมาตร 30 ml ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างก๊าซของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ในอาหาร NB pH7.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้ง 2 isolates สร้างก๊าซได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 35°C เหมือนกัน โดยมีปริมาตร 5.4 ml และ 5.2 ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนคิดเป็นเพียง 74.07% และ 73.07 % ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งเท่ากับ 740.7 และ 730.7 ml H<sub>2</sub>/l total gas formed ตามลำดับ และคิดเป็น 133.33 ml H<sub>2</sub>/l media และ 126.66 ml H<sub>2</sub>/l media ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์ก๊าซไฮโดรเจนที่เชื้อ KRS4B/5 และเชื้อ KRS4C/6 สร้างได้เมื่อเลี้ยงที่ 45°C ซึ่งคิดเป็น 85.71% และ 83.34 % ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับก๊าซที่ผลิตได้ที่ 45°C ซึ่งคิดเป็นเพียง 40 ml H<sub>2</sub>/l media และ 50 ml H<sub>2</sub>/l media

#### 4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

##### 1. KRS4B/5

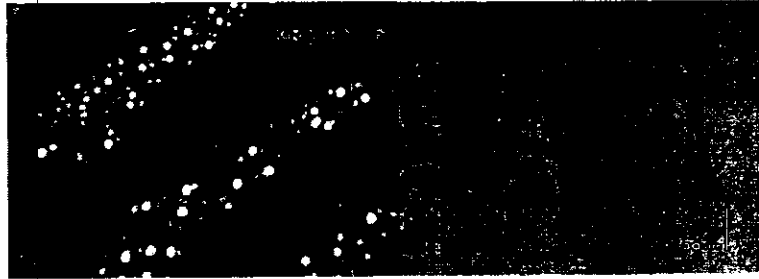
เชื้อรหัส KRS4B/5 เป็น Facultative Anaerobe ซึ่งคัดแยกได้ภายใต้ Anaerobic Condition ในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 mm สีขาวขุ่น ลักษณะเซลล์คือ Gram positive รูปร่างเซลล์ Long Rod ซึ่งมีขนาด 0.8-1.0 x 2-3.5 μm (ภาพที่ 3) อยู่ในลักษณะ Single Cell หรือ Pairs เชื้อมีการสร้าง Spore และ Motile



ภาพที่ 3 ลักษณะ โคโลนี และเซลล์ของเชื้อ KRS4B/5

## 2. KRS4C/6

เชื้อรหัสด KRS4C/6 เป็น Facultative Anaerobe ซึ่งคิดแยกภายใต้ Anaerobic Condition ในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคลอนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 mm สีขาวขุ่น เมื่อ sub-culture ลักษณะโคโลนีที่ได้จะเปลี่ยนไป คือ โคลอนีจะมีลักษณะแผ่ลาม ใส ลักษณะเซลล์ติดสี Gram positive รูปร่างเซลล์ Long Rod ซึ่งมีขนาด 1-1.2 x 3-4  $\mu\text{m}$  (ภาพที่4) อยู่ในลักษณะ Single Cell หรือ Pairs เชื้อมีการสร้าง spore และ Motile



ภาพที่4 ลักษณะโคโลนีและเซลล์ของเชื้อ KRS4C/6

## 5. ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ KRS 4B/5 และ KRS 4C/6

เชื้อ	Clear Zone (cm)		
	Penicillin	Streptomycin	Chloramphenicol
KRS4B/5	4.5	2.5	4.2
KRS4C/6	3.4	1.9	3.2

ตารางที่ 8 ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ KRS 4B/5 และ KRS 4C/6

## 6. ผลการทดสอบทางชีวเคมี

Biochemical test	KRS4B/5	KRS4C/6
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Citrate	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Phenol	+	+
Urea	-	-
Nitrate	+	+
TSI	Alk Alk	A G
Motility	+	+

## Utilisation of sugar

Glucose	+	+
Manitol	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Galactose	+	+
Raffinose	+	+
Arabinose	-	+
Xylose	-	+
Sucrose	-	+
Lactose	-	+

ตารางที่ 9 ผล Biochemical test ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

เชื้อ KRS4B/5 เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ มี Catalase activity แต่ไม่มี Oxidase activity ไม่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่ง Carbon ได้ ไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่ใช้น้ำตาลทุกชนิดที่ทดสอบเป็นแหล่งอาหารได้ ได้ยกเว้น Arabinose, Xylose, Sucrose และ Lactose ไม่สามารถใช้ urea ได้ รีดิวส์ nitrate เป็น nitrite ได้

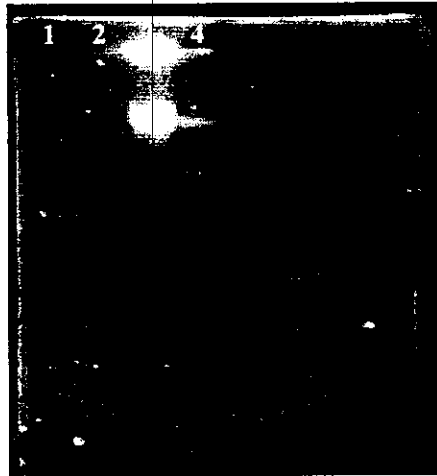
เชื้อ KRS4C/6 เป็นแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเหมือนกับเชื้อ KRS4B/5 ยกเว้นเชื้อ KRS4C/6 สามารถใช้ Arabinose, Xylose, Sucrose และ Lactose ได้



## 7. 16S rRNA Gene Analysis

### ผลการสกัด Genomic DNA โดยใช้วิธี CTAB/NaCl

เลี้ยงเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น สกัด Genomic DNA โดยใช้วิธี CTAB/NaCl จากนั้นนำมาตรวจดูว่ามีหรือไม่โดยการแยกด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เทียบกับ DNA Marker ผลปรากฏว่าพบ Genomic DNA ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 โดยพบในแถวที่ 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงว่าการสกัด Genomic DNA โดยวิธี CTAB/NaCl ประสบความสำเร็จ



แถวที่ 1 คือ DNA Marker

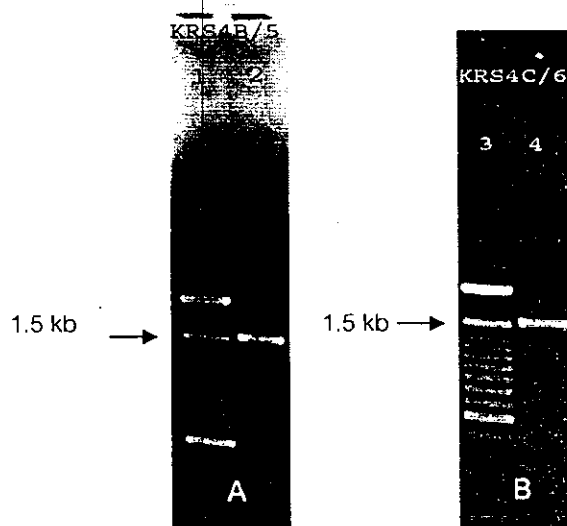
แถวที่ 2 คือ DNA ของเชื้อ KRS4B/5 ในปริมาณ 50µl

แถวที่ 3 คือ DNA ของเชื้อ KRS4B/5 ในปริมาณ 100µl

แถวที่ 4 คือ DNA ของเชื้อ KRS4C/6 ในปริมาณ 50µl

ภาพที่ 5 ภาพ agarose gel electrophoresis ของ Genomic DNA สกัดจากเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 ด้วยวิธี CTAB/NaCl

### ผลการเพิ่มจำนวน 16s rRNA gene ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)



ภาพ A

แถวที่ 1 คือ DNA Marker

แถวที่ 2 คือ แถบ DNA ของเชื้อ KRS4B/5

ภาพ B

แถวที่ 3 คือ DNA Marker

แถวที่ 4 คือ แถบ DNA ของเชื้อ KRS4C/6

ภาพที่ 6 PCR product จากการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

ผลการอ่านลำดับเบส 16S rRNA gene บางส่วน (Partial Sequence) ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

ลำดับเบส 16S rRNA gene บางส่วนของเชื้อ KRS4B/5

TTAGAAGCTTGCTTCTAAATAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTG  
 CCCTCAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCCGATATATCCTTTTCCTGC  
 ATGGGAGAAGGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATT  
 GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
 TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAGTGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACCCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGA  
 TCGTAAAGCTCTGTTGNCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAACTGCTANCAAGAGTGAC  
 GGTACCTGAGAAGAGAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGG  
 GACAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGG  
 TGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAA  
 GAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACANCCA  
 GTGGCGAATGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGAACGCTGATGGCGC

ลำดับเบส 16S rRNA บางส่วนของเชื้อ KRS4C/6

TCATGTAGAAGCTTGCTTCTAAATGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA  
 CCTGCCACAAGACAGGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCCCGATACATCCTT  
 TTCTGCATGGGAGAAGGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGG  
 CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA  
 GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
 TAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG  
 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACTGCTCTCAA  
 GGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCGACAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAG  
 TCTGGTGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAAACTGGAGAGCTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGACTCTACTGGGCATGTAACCTGACGCTGA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6

หลังจากตรวจสอบแก้ไขลำดับเบสของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 โดยใช้โปรแกรม BioEdit เพื่อให้ได้ลำดับเบสที่มีความสมบูรณ์มากที่สุด นำลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลของ RDP โดยใช้โปรแกรม Blastn จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA กับฐานข้อมูลของ RDP เชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 มีความใกล้เคียงกับเชื้อดังต่อไปนี้

Isolate	เชื้อที่มีความใกล้เคียง	Identities
KRS4B/5	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain WY11016S ribosomal RNA gene, partial sequence	676/689 (98%)
	<i>Paenibacillus peoriae</i> partial 16S rRNA gene, strain DSM 8320T	676/689 (98%)
	Bacterium Te79A 16S ribosomal RNA gene	675/689 (97%)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain GBR-472 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	675/689 (97%)
	<i>Paenibacillus jamilae</i> partial 16S rRNA gene, strain CECT 5266	673/689 (97%)
	<i>Paenibacillus burgondia</i> 16S rRNA gene, isolate B2	672/689 (97%)
KRS4C/6	<i>Paenibacillus kribbensis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	694/702 (98%)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain KCTC3554 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681/697 (97%)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain KCTC1663 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	682/698 (97%)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	682/698 (97%)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain WY110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681/698 (97%)
	<i>Paenibacillus peoriae</i> partial 16S rRNA gene, strain DSM 8320T	681/698 (97%)

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA sequence ของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 กับฐานข้อมูลของ RDP

การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 กับเชื้อใน genus *Paenibacillus*

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8
Nitrate reduction	+	+	+	+	-	-	v	+
Casein hydrolysis	NT	NT	+	+	v	v	+	-
1 Starch hydrolysis	-	-	+	+	NT	NT	NT	+
Growth at 45	+	+	+	NT	NT	NT	NT	-
Acid produced from:								
Inositol	NT	NT	-	+	-	+	-	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Maltose	NT	NT	+	-	+	+	+	+
D-Ribose	NT	NT	+	+	+	+	+	+
2 D-Sucrose	-	+	+	-	+	+	+	+
3 D-Arabinose	-	+	-	-	+	+	-	+
4 D-Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+
5 D-Manitol	+	+	-	+	+	NT	NT	+
6 Lactose	-	+	+	-	+	+	+	+

Strains: 1, isolate KRS4B/5; 2, isolate KRS4C/6; 3, *P. polymyxa*; 4, *P. amylolyticus*; 5, *P. lautus*; 6, *P. pabuli*; 7, *P. peoriae*; 8, *P. macerans*; +, Positive; -, negative; v, variable reaction; NT, not tested; NR, no reaction;

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบลักษณะเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 กับเชื้อที่ทราบชนิดแล้วใน genus *Paenibacillus*

จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูล Biochem test (ตารางที่ 7) และการวิเคราะห์ลำดับเบส และพบว่าเชื้อทั้ง 2 isolates สามารถเทียบเคียงชนิดได้กับ Genus *Paenibacillus* โดยเชื้อ KRS4C/6 มีลำดับเบสเทียบเคียงชนิดได้กับเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* ถึง 98% และลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีก็สอดคล้อง ส่วนเชื้อ KRS4B/5 ถึงแม้จะมีลำดับเบสเทียบเคียงชนิดได้กับเชื้อ *P. polymyxa* ถึง 97% แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างจาก *P. polymyxa*

### สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างแม่น้ำโขงและน้ำพุร้อน สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 47 isolates เป็นเชื้อที่สร้างก๊าซได้ 10 isolates (คัดแยกจากตัวอย่างแม่น้ำโขงทั้ง 10 isolates) และเป็นเชื้อที่สร้างก๊าซได้คมี 2 isolates คือ KRS4B/5 และ KRS4C/6 สร้างก๊าซได้ 2.5 ml และ 4.0 ml ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 เจริญได้ในช่วง pH4.0-8.0 (pH growth range) และช่วงอุณหภูมิ 20-50°C (temperature growth range) (ที่ 15°C และ 55°C เชื้อไม่เจริญและไม่สร้างก๊าซ) ส่วนสภาวะที่เชื้อทั้ง 2 isolate สร้างก๊าซได้ปริมาณมากที่สุดคือ ที่ pH7.0 และที่อุณหภูมิ 35°C โดยเชื้อ KRS4B/5 สร้างได้ 5.4 ml และ KRS4C/6 สร้างได้ 5.2 ml ในอาหาร NB 30 ml อย่างไรก็ตาม สัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้นั้น คิดเป็นเพียง 74.07% และ 73.07% ตามลำดับ

เชื้อ KRS4B/5 เป็นเชื้อประเภท Facultative anaerobe เซลล์มีลักษณะเป็น rod-shape, motile ขนาดเซลล์กว้าง 0.8-1.0  $\mu\text{m}$  ยาว 2.0-3.5  $\mu\text{m}$  เซลล์ติดสี Gram-positive สปอร์มีลักษณะรี และอยู่กึ่งกลางเซลล์ (central) ลักษณะการเจริญใน NA โคโลนีมีขนาด 2-5 mm สีขาวขุ่น โคโลนีเรียบนูนแบบ umbonate ผลการทดสอบทางชีวเคมีคือ Catalase positive, Oxidase negative รีดิวิสต์ nitrate ไปเป็น nitrite ได้ ไม่สามารถย่อยแป้งหรือใช้น้ำตาล Xylose, Arabinose, Sucrose และ Lactose ได้ แต่ใช้น้ำตาล Glucose, Mannitol, Fructose, Mannose, Galactose และ Raffinose ได้ ส่วนประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ พบว่าในช่วง pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ pH 6.0 สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.9 ml จากปริมาณก๊าซรวม 2.2 ml คิดเป็น 86.36% และทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7.0 มีประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C คือสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.2 ml จากก๊าซรวม 1.4 ml คิดเป็น 85.71%

เชื้อ KRS4C/6 เป็นเชื้อประเภท Facultative anaerobe เซลล์มีลักษณะเป็น rod-shape, motile, ขนาด กว้าง 1.0-1.2  $\mu\text{m}$  ยาว 3.0-4.5  $\mu\text{m}$  เซลล์ติดสี Gram-positive สปอร์มีลักษณะรี ลักษณะการเจริญใน NA โคโลนีขนาด 1-2 mm สีขาวขุ่น โคโลนีเรียบนูนแบบ umbonate เมื่อ sub-culture โคโลนีจะเปลี่ยนรูปร่างจากโคโลนีเดี่ยวๆเป็นโคโลนีแบบแผ่ลาม ใส ผลการทดสอบทางชีวเคมีคือ Catalase positive, Oxidase negative รีดิวิสต์ nitrate ไปเป็น nitrite ได้ ไม่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่ง carbon ได้ ไม่สามารถใช้ urea ได้ ไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่ใช้น้ำตาล Glucose, Mannitol, Fructose, Mannose, Galactose, Raffinose, Xylose, Arabinose, Sucrose และ Lactose ได้ ส่วนประสิทธิภาพในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะต่างๆ พบว่าในช่วง pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ pH 6.0 และ 7.5 สร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 3.0 ml จากปริมาณก๊าซรวม 3.7 ml คิดเป็น 81.08% และทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7.0 มีประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C คือสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.5 ml จากก๊าซรวม 1.8 ml คิดเป็น 83.34%

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ KRS4B/5 และ KRS4C/6 จัดอยู่ใน Genus *Paenibacillus* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16s rRNA พบว่าเชื้อ KRS4C/6 มีลำดับเบสเทียบเคียงได้กับเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* ถึง 98% และลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีก็สอดคล้อง ส่วนเชื้อ KRS4B/5 ถึงแม้จะมีลำดับเบสเทียบเคียงได้กับเชื้อ *P. polymyxa* ถึง 97% แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างจาก *P. polymyxa* อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทั้งสองยังต้องการข้อมูลเพิ่มอีกสองส่วน คือ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีน 16s rRNA และ ค่า % G+C ของทั้งสอง Strain ในการยืนยันผลการจัดจำแนกเบื้องต้นนี้

### ข้อวิจารณ์

สรุปท้ายสุด งานวิจัยนี้บรรลุจุดประสงค์ของโครงการตามที่ได้วางไว้ทั้ง 3 ข้อ นอกจากนี้จากผลการศึกษาที่ได้ ยังพบว่ามีความเป็นไปได้สูง ที่แบคทีเรียที่แยกได้จะเป็นสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Strains KRS4B/5 และ KRS4C/6 ยังไม่สมบูรณ์นัก หากยังต้องการข้อมูลจำเป็นอีกสองส่วนในการยืนยันผลการจัดจำแนกเบื้องต้นนี้คือ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีน 16s rRNA และ ค่า % G+C ของทั้งสอง Strains นอกจากนี้แล้วยังต้องมีการตีพิมพ์เผยแพร่ผลการศึกษาในวารสารนานาชาติ พร้อมทั้งต้องส่งเชื้อเข้าไปเก็บในธนาคารเก็บเชื้อ (Deposition in Culture Collection) อย่างน้อยสองแห่งอีกด้วย จึงจะถือว่าการจัดจำแนกเชื้อที่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มนักวิจัยอย่างสมบูรณ์ ซึ่งงานดังกล่าวนี้จะถูกดำเนินการต่อไป

### ข้อเสนอแนะ (Suggestion and Future Direction)

1. ควรมีการศึกษากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขนาด (Scale) ที่ใหญ่ขึ้น เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม
2. ควรทำการอ่านลำดับเบสของยีน 16s rRNA ให้สมบูรณ์ และหาค่า % G+C ของทั้งสอง Strains เพื่อให้ได้ข้อมูลมากพอในการจัดจำแนกเชื้ออย่างถูกต้อง
3. ควรทำการตีพิมพ์เผยแพร่ผลการศึกษาในวารสารนานาชาติ พร้อมทั้งต้องส่งเชื้อเข้าไปเก็บในธนาคารเก็บเชื้อ (Deposition in Culture Collection) เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในกลุ่มนักวิจัยอย่างสมบูรณ์ และเป็นข้อมูลให้กับนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ นำไปใช้

บรรณานุกรม

- ดวงพร คันธโชติ. (2545).นิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์, โอ.เอส. พรินต์ติ้ง เฮ้าส์, โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.
- ดวงพร คันธโชติ. (2537). อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ, โอ.เอส. พรินต์ติ้ง เฮ้าส์, โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.
- วราพรรณ ปานอยู่. (2545). การแยกและการหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบางแหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Elo, S., I. Suominen, P. Kampf, J. Juhanoja, M. Salkinoja-Salonen and K. Haahtela. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 535–545
- Enright, M., McInerney, J. and Griffin, T. (2003). Characterization of endospore-forming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov.. International journal of Systematic and evolutionary microbiology. 53, 435-441
- Heyndrickx, M. et al. (1996). A polyphasic reassessment of the Genus *Paenibacillus*, Reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended description of *P. lautus* and of *P. peoriae*. International journal of Systematic bacteriology. vol. 46, no. 4, 988-1003
- Kanso, S. (2004). Molecular Studies of Bacterial Communities in the Great Artesian Basin Aquifers. School of Biomolecular and Biomedical Science Faculty of Science and Technology Griffith University, Nathan Campus Queensland, Australia
- Tanisho, S. and T. Shimazaki. (2003). Hydrogen Production from Palm Oil Mill Effluent by Fermentation. Yokohama National University Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan
- Ren, N., Wang, X., Xiang, W., Guo, W. (2003). Effects of Iron on H<sub>2</sub> Production Capacity and Hydrogenosomal Activities of a Novel Fermentative H<sub>2</sub>-Producing Bacterial strain B49. Pro. of 1st European Hydrogen Energy Conf., Grenoble, France
- Schäfer, L., Sackretz, M., Rechenberg, I. (2002). " Three-Step Microbial Hydrogen-Producing System – First Results", Posterpräsentation im Rahmen der „Biohydrogen 2002“-Conference,

Ede-Wageningen, Niederlande

- Suellen, V.O., Yue, P.H., Beer, S. (2002). *Thermotoga neapolitana*: A microaerophile producing hydrogen in the presence of oxygen. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 98, no. 1-3, pp. 177-190(14)
- Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., and Chang, B.V. (2003). Sequential Production of Hydrogen and Methane from Wastewater Sludge Using Anaerobic Fermentation. *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, Vol. 34, No. 6, 683-687
- Sung, S., Dennis, A. and Bazylnski, L.R. (2003). Biohydrogen Production from Renewable Organic Wastes. hydrogen, fuel cells, and infrastructure technologies.
- Van Ginkel, S. and Sung, S. (2000). Anaerobic Biohydrogen production using different bacterial seed sources. Iowa State University.
- Van Ginkel, S., Sung, S. and Lay, J.J. (2001). Biohydrogen Production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35(24): 4726
-



**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี**

**1. Nutrient Broth (NB)**

**Peptone from soymeal** **5.0g**

**Yeast Extract** **3.0g**

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1L ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

**2. NB thermophile**

**Peptone from soymeal** **2.5g**

**Yeast Extract** **1.5g**

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรเป็น 1L ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

**3. Tris-Cl pH8 ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 1 ลิตร**

ชั่ง Tris base มา 121.1 g ละลายในน้ำ (dH<sub>2</sub>O water) ปริมาตร 800 ml ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบหนึ่งลิตร จากนั้นจึงปรับความเป็นกรด่างภายใน Hood ด้วย concentrated HCl นึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

**4. Ethidium Bromide (10mg/ml)**

ชั่ง Ethidium Bromide จำนวน 1 g ใส่ใน Flask ซึ่งเติมน้ำ dH<sub>2</sub>O จำนวน 100 ml จากนั้นคนด้วย Magnetic Stirrer เป็นเวลาหลายชั่วโมง จนแน่ใจว่า Ethidium Bromide ละลายหมด เทใส่ขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่จำเป็นต้องมีการฆ่าเชื้อ

**5. 10% SDS (Sodium Dodesyl Sulfate)**

ชั่ง Electrophoresis – Grade จำนวน 100 g เทลง Flask ที่บรรจุน้ำ (dH<sub>2</sub>O water) จำนวน 900 ml แล้วให้นำไปต้มที่อุณหภูมิ 68°C และคนด้วย Magnetic Stirrer ให้ละลาย จากนั้นปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็น 7.2 ด้วย concentrated HCl แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายเป็นหนึ่งลิตรด้วยน้ำ (dH<sub>2</sub>O water) และแบ่งใส่ขวดฝาเกลียวสีน้ำตาลไว้ โดยไม่ต้องมีการฆ่าเชื้อ

**ภาคผนวก ข**  
**Biochemical Test**

**1. Phenol red glucose broth**

1. เพาะเชื้อลงบน Phenol red glucose broth
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน Gas Pak anaerobic jar

ผลบวก : อาหารขุ่น และเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

**2. Nitrate broth**

1. เพาะเชื้อลงบน Nitrate broth
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทดสอบ Nitrite โดยการเติม 0.25 มิลลิลิตร nitrite test reagent A และ reagent C

ผลบวก : เกิดสีส้ม ภายใน 10 นาที

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

**3. Modified VP medium**

1. เพาะเชื้อลงบน Modified VP medium
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ทดสอบการผลิต acetylmethyl- carbinol ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงบนหลอดทดลอง จากนั้นเติม 0.6 มิลลิลิตร alphaltol solution และเติม 0.2 มิลลิลิตร 40 % Potassium hydroxide เขย่า และเติม crystals of creatine ปริมาณเล็กน้อย
4. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

ผลบวก : เกิดสีชมพู หรือสีม่วง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

**4. Catalase test**

1. แคะเชื้อจาก โคโลนี ที่ต้องการทดสอบ ลงบนแผ่น Slide
2. หยด 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1-2 หยด

ผลบวก : เกิดฟอง

ผลลบ : ไม่เกิดฟอง

### 5. TSI agar

1. เพาะเชื้อลงบน TSI agar โดยแทงลงไปให้อาหาร และ Streak ลงบนผิวหน้า
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อ่านผล

- ส่วนเอียงสีแดง คือ ไม่หมัก ซูโครส และ แล็คโตส
- ส่วนก้นสีเหลือง คือ หมัก กลูโคส
- ฟู้น มีรอยแตก คือ สามารถผลิตก๊าซ
- มีสีดำ คือ สามารถผลิต H<sub>2</sub>S

### 6. Urease test

1. เพาะเชื้อลงบน Urea broth โดยการ Stab
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

### 7. MR – VP broth

VP test

1. เพาะเชื้อลงบน MR – VP broth
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เติม 0.6 มิลลิลิตร alpha-naphol เขย่า จากนั้น เติม 0.2 มิลลิลิตร 40 % Potassium hydroxide และเติม crystals of creatine ปริมาณเล็กน้อย อ่านผลหลังจาก 4 ชั่วโมง

ผลบวก : ให้สีชมพูถึงแดง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

MR test

1. ใช้ 5.0 มิลลิลิตร ของ 96 ชั่วโมง MR – VP broth
2. เติม 5-6 หยด Methyl red indicator

ผลบวก : ให้สีแดง

ผลลบ : ให้สีเหลือง

### 8. Lactose gellatine medium

1. Stab เชื้อลงบน Lactose gellatine medium
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลือง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

#### 9. Motility –nitrate medium

1. Stab เชื้อลงบน Motility –nitrate medium
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เติม 0.5 มิลลิลิตร reagent A และ 0.2 มิลลิลิตร reagent B ลงใน Motility –nitrate medium

ผลบวก : เกิดสีม่วงภายใน 5 นาที

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

#### 10. Indole production

1. เพาะเชื้อลงบน Tryptone broth
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. หยด 0.2- 0.3 มิลลิลิตร Kovac reagent เขย่า

ผลบวก : ปรากฏชั้นสีแดงลอยที่ผิวของอาหาร

ผลลบ : ให้สีส้ม

#### 11. Citrate test

1. เพาะเชื้อลงบน Simmon citrate agar
2. บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 9 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนแปลง

---

## ประวัตินักวิจัย

## Curriculum Vitae

Name: Miss Sungwan Kanso

Position: Lecturer

Contact Details: Biological Science Department, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University,  
Warinchamrap, Ubon Ratchathani, Thailand. 34190

Tel: 01-8789032, 66-45-288400 ext. 4493, Fax: 66-45-288380

E-mail: [kansosungwan@hotmail.com](mailto:kansosungwan@hotmail.com), [ksungwan@sci.ubu.ac.th](mailto:ksungwan@sci.ubu.ac.th)

## Education:

Degrees	Year completed	Institute
Bachelor of Science in Biotechnology	1995	Griffith University, Queensland, Australia
Bachelor of Science with Honors (First class)	1996	Griffith University, Queensland, Australia
Ph.D (Molecular Microbiology)	2003	Griffith University, Queensland, Australia

## Thesis:

Bachelor of Science with Honours: Studies of recombinant enzymes amylase and pullulanase and their genes from bacterial isolate AB47.

Ph.D: Molecular studies of bacterial communities in the Great Artesian Basin aquifers.

Research Area: 16S rRNA Gene Analysis, Bacterial Phylogeny, Bacterial Diversity, Thermophiles, Waste Utilisation.

## Teaching experience:

1. Bioinformatics
2. Genetic Engineering in Microorganism
3. Microbial Genetics
4. Microbial Ecology
5. Introduction to Microbiology
6. Principle of Research in Science
7. Man and Environment

## Publication:

1. Kanso, S and Siriwong, S. (2005). Isolation and Characterization of Hydrogen Producing Bacteria from Thai Noodle Factory Waste Water. The 31<sup>st</sup> Science and Technology Symposium of Thailand. Nakornratchasima, Thailand. October 18-20.
  2. Dasri, K and Kanso, S. (2005). Isolation and Characterization of Hydrogen-producing Bacteria and Optimization of Hydrogen bio-production. The 31<sup>st</sup> Science and Technology Symposium of Thailand. Nakornratchasima, Thailand. October 18-20.
  3. Kanso, S and Patel, B.K.C. (2004). *Phenylobacterium lituiforme* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a subsurface aquifer, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54, 2141-2146. Impact factor 3.907 (2000).
  4. Kanso, S and Patel, B.K.C. (2003). *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 401-406. Impact factor 3.907 (2000).
  5. Kanso, S. (2003). Molecular studies of bacterial communities in the Great Artesian Basin aquifers. Griffith University, Brisbane Queensland Australia. Ph.D Thesis.
  6. Kanso, S, Greene, A. C. and Patel, B.K.C. (2002). *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacteria from a deep subsurface Australian thermal aquifer. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, 869-874. Impact factor 3.907 (2000).
  7. Kanso, S and Patel, B.K.C. (2001). Studies of Molecular Microbial Ecology of the Great Artesian Basin Aquifer. The 27<sup>th</sup> Science and Technology Symposium of Thailand. Had-Yai, Thailand. October 16-19.
  8. Dowhan, D., Kanso, S., Woo, H., and Patel, B.K.C. (1998). New thermostable amylopullulanases and amylases from the thermoanaerobe *Caloramator* strain AB39, an isolate from the subterranean Great Artesian Basin of Australia aquifer: Cloning, sequencing and sequence analysis. International Conference on Frontiers in Biotechnology. Trivandrum, India, November 26-29.
-