



ความหลากหลายของแบคทีเรียที่ร้อนในน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย

สุริยา ดึงทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2556

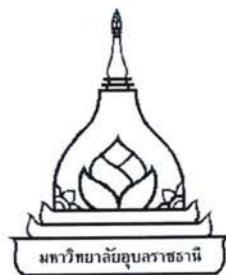
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**DIVERSITY OF THERMOTOLERANT BACTERIA IN HOT SPRINGS
IN SOUTHERN PART OF THAILAND**

SURIYA TINGTHONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
UBON RAJATHANEE UNIVERSITY
YEAR 2013
COPYRIGHT OF UBON RAJATHANEE UNIVERSITY**



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง ความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนในน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย

ผู้วิจัย นายสุริยา ดิ่งทอง

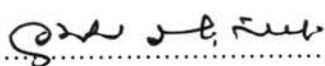
คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณ บุญถนอม	ประธานกรรมการ
ดร.สังวาลย์ แก่นโต	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์	กรรมการ
ดร.พิชญากรณ์ สุวรรณภู	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา



(ดร.สังวาลย์ แก่นโต)



(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์



(ดร.จุฑามาศ หงษ์ทอง)

รักษาราชการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความเอื้อเฟื้อจากบุคลากรหลายฝ่าย กระผมขอกราบขอบพระคุณ ดร. สว่างลัย แก่นโส ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสกระผมได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และคอยให้คำแนะนำช่วยเหลือ พร้อมทั้งช่วยแก้ไข ปัญหาทั้งด้านการเรียน การทำวิจัย และปัญหาอื่นๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิษารัตน์ สวาสติพันธ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และสารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัยบ่อยครั้ง อีกทั้งยังคอยให้แรงคิด และกระตุ้นให้มีความกระตือรือร้นในการทำงาน ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภณ บุญลือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชรีดา ปุกหุด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิษารัตน์ สวาสติพันธ์ และ ดร.พิชญภรณ์ สุวรรณภู เป็นอย่างสูงที่ได้เสียสละเวลามาเป็นคณะกรรมการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ แก้ไขคำผิด ตรวจสอบความเรียบร้อย และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เพื่อนำไปปรับปรุง เล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย อุบลราชธานีทุกท่าน อาทิ นางปทุมทิพย์ ผลโยธู นางสาวยุภารัตน์ เครือวงษา และ นางนงลักษณ์ หอมหวล ที่ได้คอยช่วยเหลือแนะนำเรื่องสารเคมี และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในภาควิชาวิทยาศาสตร์ ชีวภาพ ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่สอนกระผมให้มีความรู้ความสามารถที่จะนำไปใช้ในการ ประกอบอาชีพ ขอขอบพระคุณพี่ๆ ฝ่ายวิชาการคณะวิทยาศาสตร์ อาทิ นางเรไร กาพบุตร นางสาว ปรียากร พิมเงิน และนางอัญชลี มาจันทร์ ที่ช่วยดำเนินการเรื่องเอกสารวิชาการ และการดำเนินการ เรื่องทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์ให้เป็นไปด้วยความเรียบร้อย กระผมขอขอบพระคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ศึกษา ในหลักสูตรเดียวกัน อาทิ นางสาวปณิดดา เพชรล้วน นางสาวขวัญเรือน แก้วใส นายศรีสรรค์ ปุพบุญ และ นางสาวเขวมาลย์ อ่อนแก้ว ที่คอยให้กำลังใจซึ่งกันและกัน ส่งมอบรอยยิ้มเสียงหัวเราะ และเรื่องตลกให้แกกันไม่ให้เครียดจนเกินไป

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (ทุนเรียนดี วิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ระยะที่ 2 ที่สนับสนุนทุนการศึกษาในครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า และญาติทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ช่วยเหลือในด้านต่าง และสนับสนุนเรื่องค่าใช้จ่ายตลอดการศึกษาระดับปริญญาโท คอยมอบความรัก และความอบอุ่นให้กระผมเสมอมา

สุริยา ดังทอง
(นายสุริยา ดังทอง)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : ความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนในน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย
 โดย : สุรียา คังทอง
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
 สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ
 ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ดร. สัจฉลย์ แก่นโส

ศัพท์สำคัญ : แบคทีเรียทนร้อน น้ำพุร้อน 16S rRNA gene PCR-RFLP

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนจากน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำพุร้อนตานะแมเราะ น้ำพุร้อนโคกไทร น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อนโต๊ะงักระ ซึ่งพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 3.0×10^3 , 1.45×10^3 , 1.51×10^5 , 3.65×10^5 และ 4.61×10^5 CFU/ml ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้มีทั้งหมด 27 ไอโซเลต สามารถจัดกลุ่มได้ 11 กลุ่ม OTUs (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J และ K) ตามรูปแบบของการตัดจำเพาะของยีน 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*FI การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA บางส่วนของไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่ม OTU A ไอโซเลต KSII_1 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (ร้อยละ 99) กลุ่ม OTU B ไอโซเลต KAO_P4 มีความใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (ร้อยละ 97) กลุ่ม OTU C ไอโซเลต YTM5 มีความใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (ร้อยละ 98) กลุ่ม OTU D ไอโซเลต SROB45_5 มีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas taiwanensis* (ร้อยละ 98) กลุ่ม OTU F ไอโซเลต KAO_P2 มีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxidans* (ร้อยละ 99) กลุ่ม OTU H ไอโซเลต SROSL60_1 มีความใกล้เคียงกับ *Geobacillus stearothermophilus* (ร้อยละ 97) กลุ่ม OTU I ไอโซเลต KZO60_4 มีความใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus gonensis* strain A4 (ร้อยละ 99) กลุ่ม OTU J ไอโซเลต YTM2 มีความใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (ร้อยละ 97) กลุ่ม OTU K ไอโซเลต YTM4 มีความสัมพันธ์กับสมาชิกของยีน *Bacillus* และยีน *Geobacillus* แบคทีเรียทุกไอโซเลตที่ได้ทดสอบมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสที่ 50 °C ได้ดี แต่มีจำนวนเพียง 13 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ส่วนการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบเฉพาะในไอโซเลต YTM5 และ SRO45_1 เท่านั้น และแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเพียง 2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลส ในสภาวะที่ทดสอบ

ABSTRACT

TITLE : DIVERSITY OF THERMOTOLERANT BACTERIA IN HOT SPRINGS IN SOUTHERN PART OF THAILAND.

BY : SURIYA TINGTHONG

DEGREE : MASTER DEGREE

MAJOR : BIOTECHNOLOGY

CHAIR : SUNGWAN KANSO, Ph.D

KEYWORDS : THERMOTOLERANT/ THAI HOT SPRING/ 16S rRNA GENE/ PCR-RFLP

This project aimed to study the diversity of thermotolerant bacteria of five hot springs in southern part of Thailand, which were Tanoh Maroh hot spring, Lohjongkra hot spring, Bannampuron hot spring (Surat Thani), Kaochaison hot spring and Kogzai hot spring. Total number of bacteria in Tanoh Maroh, Kogzai, Bannampuron, Kaochaison and Lohjongkra hot springs were 30, 41.45×10^3 , 1.51×10^5 , 3.65×10^5 and 4.61×10^5 CFU/ml respectively. PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to analyze distinct restriction cutting profiles of 16S rRNA gene (1,500-1,600 bp.) There were 11 distinct restriction cutting profiles generated from restriction cutting with *Hinf*I, which were named OTUs A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, and K. From analysis of partial 16S rRNA gene sequence of nine group-representative isolates by BLASTn, it was found that OTU A (isolate KSII_1) had 99% similarity with *Bacillus subtilis*, OTU B (isolate KAO_P4) had 97% similarity with *Tepidimonas arfidensis*, OTU C (isolate YTM5) had 98% similarity with *Geobacillus thermoleovorans*, OUT D (isolate SROB45_5) had 98% similarity with *Caldimonas taiwanensis*, OTU F (isolate KAO_P2) had 99% similarity with *Caldimonas manganoxidans*, OTU H (isolate SROSL60_1) had 97% similarity with *Geobacillus stearothermophilus*, OTU I (isolate KZO60_4) had 99% similarity with *Anoxybacillus gonensis* strain A4, OTU J (isolate YTM2) had 97% similarity with *Thermus brockianus* and OTU K (isolate YTM4) was related to members of the genus *Bacillus* and genus *Geobacillus*. Most isolate had an ability to produce enzyme lipase at 50 °C. But there were only 13 isolates capable of producing enzyme cellulase under condition tested. The ability to produce enzyme amylase was found only in isolate YTM5 and SRO45_1. Moreover YTM5 and SRO45_1

were the only two isolates capable of producing all three enzymes (amylase, cellulase and lipase) under condition tested.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการทำงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	2
2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พลังงานความร้อนใต้พิภพและน้ำพุร้อน	3
2.1.1 พลังงานความร้อนใต้พิภพ	3
2.1.2 น้ำพุร้อน	4
2.1.3 นิเวศวิทยาของน้ำพุร้อน	5
2.2 จุลินทรีย์และการจัดกลุ่ม	6
2.2.1 หลักเกณฑ์ทั่วไปในการจัดจำแนกแบคทีเรีย	7
2.2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนมหรือสปีชีส์	9
2.2.3 การศึกษาและใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุ และสารเคมี	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
3.3 การเก็บตัวอย่าง	15
3.4 การคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) ในน้ำพุร้อน	16
3.5 การสกัด Chromosomal DNA ของแบคทีเรียทนร้อน ด้วยวิธี CTAB/NaCl	16
3.6 การตรวจสอบ Chromosomal DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis	17
3.7 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)	17
3.8 การจัดกลุ่ม OTUs แบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP	17
3.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	18
3.10 การทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase และ amylase โดยวิธี plate method	18
3.10.1 เอนไซม์ lipase	18
3.10.2 เอนไซม์ cellulase	18
3.10.3 เอนไซม์ amylase	19
3.11 การทดสอบการทนอุณหภูมิ 110 °C ของแบคทีเรีย ไฮโซเลต SROSL60_1	19
4 ผลการวิจัย	
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน	20
4.2 การตรวจสอบปริมาณ Chromosomal DNA	28
4.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)	29
4.4 การจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม BLASTn	34
4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อน	37
4.7 การทดสอบการทนอุณหภูมิ 110 °C ของแบคทีเรียไฮโซเลต SROSL60_1	39
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผล อภิปรายผล	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	
ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารเคมี	51
ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไฮโซเลต	56
ค ภาพผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase และ lipase ของแบคทีเรียแต่ละไฮโซเลต	61
ง งานวิจัยที่เผยแพร่	66
ประวัติผู้วิจัย	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะการดำรงชีวิตของแบคทีเรียที่แบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน	8
3.1	วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	14
4.1	แหล่งตัวอย่างน้ำพุร้อน อุณหภูมิของน้ำพุร้อน และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างน้ำพุร้อนที่ศึกษา	21
4.2	ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนแต่ละแหล่ง	21
4.3	ลักษณะเซลล์ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน โศกไทโร น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) น้ำพุร้อนโถ๊ะจังกระ และน้ำพุร้อนตานะแมเราะ	22
4.4	สรุปผลการจัดกลุ่มไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR-RFLP	33
4.5	การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank	35
4.6	ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย	39
4.7	การเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่บ่มที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	24
4.2	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	25
4.3	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	26
4.4	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	27
4.5	Chromosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรียทนร้อน 13 ไอโซเลต	28
4.6	Chromosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรียทนร้อน 19 ไอโซเลต	29
4.7	การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ 13 ไอโซเลต ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis	30
4.8	การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ 19 ไอโซเลต ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis	30
4.9	การตัดจำเพาะ PCR product ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทนร้อนทั้ง 27 ไอโซเลต	32
4.10	การกระจายตัวของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนทั้ง 5 แหล่ง	37
4.11	ตัวอย่างผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ด้วยวิธี plate method	38
4.12	ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการต้มเดือด 20 นาที	40
4.13	ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการ Autoclave ที่ 110 °C 20 นาที	41
4.14	ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการ Autoclave ที่ 121 °C 20 นาที	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	degree Celsius
pH	=	hydrogen ion concentration
%	=	percentage
mg/ml	=	milligram/milliliter
µg/ml	=	microgram/milliliter
l	=	liter
g	=	gram
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
kb	=	kilobase pair
bp	=	base pair
mM	=	millimolar
µM	=	micromolar
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume
OTU	=	operational taxonomic unit
CFU/ml	=	colony forming unit / milliliter
PCR	=	polymerase chain reaction
EPR	=	extracellular enzyme production ratios
PCR-RFLP	=	restriction fragment length polymorphism

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียชอบร้อน คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่ อุณหภูมิระหว่าง 45-70 °C หรือสูงกว่า สามารถพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้ในหลายแห่ง เช่น บ่อน้ำพุร้อน แหล่งพลังงานใต้พื้นดิน แหล่งขุดเจาะเหมืองแร่ (Bae et al., 2008) แบคทีเรียทนร้อนเป็น ที่น่าสนใจของนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การใช้เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ที่ได้จากแบคทีเรียชอบร้อนจีส *Bacillus* มาใช้ในอุตสาหกรรมแป้งและการผลิตสารให้ความหวาน การใช้ *Taq* DNA Polymerase ที่ได้จากแบคทีเรียชอบร้อน *Thermus aquaticus* ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Brock and Madigan, 1991) การใช้ *Caldimonas taiwanensis* ในการย่อยแป้งและแป้งมันสำปะหลัง ให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้ *Clostridium butyricum* CGS2 และ *C. pasteurianum* เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน (Wen-Ming et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ทนร้อนที่ได้จาก *Geobacillus thermoleovorans* ให้แสดงออกใน *Escherichia coli* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสทนร้อนไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง (Yasser et al., 2008) จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทนร้อนเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่า แต่การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อน โดยเฉพาะในน้ำพุร้อนตามแหล่งต่างๆของประเทศไทยปัจจุบันยังมีข้อมูลไม่มาก จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในน้ำพุร้อนเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่การศึกษาเพื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการทำงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนในน้ำพุร้อน 5 แห่งในภาคใต้ของประเทศไทย และระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนจาก น้ำพุร้อนตานะแมละและ น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อนสุราษฎร์ธานี (บ้านน้ำพุร้อน) น้ำพุร้อนไล่ะจังกระ และน้ำพุร้อนโคกไทร (บ้านนาทุ่งโพธิ์) โดยการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บมาจากแหล่งตัวอย่าง จัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP แล้วระบุชนิดแบคทีเรียตัวแทนกลุ่มด้วยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนที่ศึกษา และความเป็นไปได้ที่จะนำจุลินทรีย์เหล่านั้นไปใช้ประโยชน์

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานความร้อนใต้พิภพและน้ำพุร้อน

2.1.1 พลังงานความร้อนใต้พิภพ

พลังงานความร้อนใต้พิภพ คือ พลังงานธรรมชาติที่เกิดขึ้นอยู่ภายในโลก แหล่งพลังงานความร้อนใต้พิภพที่มีศักยภาพสูง พบในบริเวณที่มีการเคลื่อนที่ของเปลือกโลก หรือ บริเวณที่มีภูเขาไฟและแผ่นดินไหว หรือบริเวณที่มีหินหนืดร้อนอยู่ตื้นกว่าปกติ ทำให้ความร้อนภายในโลก ถูกนำพาและถ่ายเทขึ้นมาสู่ผิวโลก เมื่อน้ำฝนหรือน้ำตามแม่น้ำลำคลองไหลผ่านรอยเลื่อนและชั้นหินปูนที่มีรูพรุนลงไปสู่ชั้นหินระดับลึก และได้รับการถ่ายเทความร้อนจากหินหนืดร้อนข้างใต้โลก ทำให้น้ำนี้มีอุณหภูมิและความดันสูงขึ้น และเกิดแรงลอยตัวของน้ำร้อนไหลผ่านไปตามแนวแตก และรอยเลื่อนจากที่ระดับลึกเข้ามาใกล้เก็บในหินเนื้อฟาม (permeable rock) หรือหินเนื้อพรุน (porous rock) ที่มีความหนาแน่นมาก (ประวิทย์ พิทักษ์วาปี, 2533) กระบวนการไหลเวียนของความร้อนใต้พิภพซึ่งเกิดจากการไหลเวียนของน้ำร้อนเป็นส่วนใหญ่ เรียกว่า ระบบน้ำร้อน (hydrothermal system) สามารถแบ่งง่าย ๆ ออกเป็น 3 ระบบ ได้แก่

2.1.1.1 ระบบการพาของน้ำร้อน (hydrothermal convection system) การถ่ายเทความร้อนจากน้ำร้อนและไอน้ำร้อนเป็นแบบการไหลพา มากกว่าการนำความร้อน ผ่านชั้นหินต่างๆ การพาความร้อนเกิดในหินเนื้อฟาม เนื่องจากการลอยตัวของน้ำร้อน น้ำที่เย็นกว่าและหนาแน่นมากกว่าจะจมดิ่งลงสู่ที่ระดับลึก

2.1.1.2 ระบบหินร้อน (hot dry rock system) อุณหภูมิของโลกเพิ่มขึ้นตามความลึก โดยที่ค่าเฉลี่ยทั่วโลกมีการเพิ่มขึ้นประมาณ $30^{\circ}\text{C}/\text{km}$ แต่ในบางบริเวณการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อความลึกจะสูงกว่าค่าเฉลี่ยนี้ ซึ่งเป็นผลมาจากบริเวณนั้นๆมีสิ่งให้ความร้อน เช่น เปลือกโลกบาง รอยเลื่อน หรือสารกัมมันตรังสีอยู่ใกล้พื้นดิน

2.1.1.3 ระบบแรงดันธรณี (geopressured system) เกิดอยู่ในบริเวณที่ธรณีแอ่นตัว (geosyncline) ที่มีการทรุดตัวลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ความดันในชั้นหินเพิ่มมากขึ้น โดยปกติบริเวณเหล่านี้ มักเกิดอยู่ร่วมกับแก๊สธรรมชาติและแก๊สมีเทน

2.1.2 น้ำพุร้อน

น้ำพุร้อนเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดในบริเวณที่หินเกิดรอยเลื่อนและรอยแตก รอยเลื่อนรอยแตกเหล่านี้มีขนาดใหญ่และมีการเคลื่อนที่ ผลจากการเคลื่อนที่ของรอยเลื่อนคาดว่าทำให้เกิดการแผ่ความร้อนระหว่างรอยเลื่อนและรอยแตกของหิน น้ำพุร้อนมีต้นกำเนิดมาจากน้ำฝนที่ตกลงมา และมักจะเกิดในบริเวณที่น้ำจะต้องไหลออกมาตามธรรมชาติ จะมากน้อยต่างกันในแต่ละบริเวณ ปริมาณของน้ำที่ไหลออกมาจะสม่ำเสมอ ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล น้ำพุร้อนจะมี pH ทั้งเป็นกรดหรือด่าง มีสารบางชนิดละลายอยู่ เช่น carbonate ion (CO_3^{2-}), ferrous sulphide (FeS), bicarbonate (HCO_3^-), monohydrogen sulphide (HS^-), hydrogen sulphide (H_2S), silicon dioxide (SiO_2), thiosulphite ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulphite (SO_3^{2-}), thiosulphate ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$), sulphate ion (SO_4^{2-}), boron (B^{3-}), calcium (Ca^{2+}), chloride ion (Cl^-), fluoride ion (F^-), potassium (K^+), magnesium (Mg^{2+}), sodium ion (Na^+) และ sulphide ion (S^{2-}) ประเทศไทยได้เริ่มการศึกษาน้ำพุร้อนและเก็บตัวอย่างน้ำพุร้อนวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2489 ปัจจุบันพบแหล่งน้ำพุร้อนทั้งหมด 112 แห่ง (วรรณภา จาราช, 2546) วัตถุอุณหภูมิที่ผิวดินอยู่ในช่วง $40-100^\circ\text{C}$ กระจายอยู่ทั่วไปตั้งแต่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ แต่ไม่พบแหล่งน้ำพุร้อนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทยไม่ได้อยู่ในบริเวณที่พบภูเขาไฟมีพลัง (active volcano) และหินภูเขาไฟที่อายุน้อยที่สุดที่พบในประเทศไทยมีอายุมากกว่าหนึ่งแสนปี ดังนั้น แหล่งน้ำพุร้อนจะพบอยู่ในบริเวณหินภูเขาไฟที่ดับแล้ว การศึกษารูปแบบของน้ำพุร้อน ธรณีวิทยา อุทกธรณีวิทยา และการเจาะสำรวจ ทำให้สามารถจำแนกกำเนิดน้ำพุร้อนเป็น 2 ประเภท

2.1.2.1 น้ำพุร้อนที่เกิดอยู่ในหินแกรนิต น้ำร้อนมีอุณหภูมิประมาณ 250°C ไหลขึ้นมาตามรอยเลื่อน และรอยแตกในหินแกรนิตที่อยู่ที่มีความลึกมากกว่า 3 กิโลเมตร เกิดการถ่ายเทความร้อน หรือเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับหินข้างเคียง หรือเกิดการสัมผัสกับน้ำบาดาลที่ระดับตื้นทำให้อุณหภูมิลดต่ำลง แล้วไหลขึ้นสู่ผิวดินเป็นน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิใกล้เคียง เช่น น้ำพุร้อนที่เกิดในจังหวัดระนอง น้ำพุร้อนฝาง น้ำพุร้อนโป่งเดือด น้ำพุร้อนเมืองแปง น้ำพุร้อนคลองปลายพู่ น้ำพุร้อนบ้านบ่อบาดาล น้ำพุร้อนโล๊ะจังกระ น้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ และน้ำพุร้อนตานะแมเราะ เป็นต้น

2.1.2.2 น้ำพุร้อนที่อยู่ในหินตะกอนและหินแปร น้ำร้อนไหลขึ้นมาตามรอยเลื่อน และรอยแตกในหินแกรนิตที่มีหินตะกอน หรือหินแปรปิดทับอยู่บนหินแกรนิต อยู่ที่มีความลึกมากกว่า 3 กิโลเมตร น้ำร้อนไหลขึ้นมาตามรอยเลื่อนและรอยแตกในหินแกรนิตที่อยู่ระดับลึกขึ้นมาสะสมตัวในหินตะกอนที่มีความพรุนสูง จากนั้นน้ำร้อนจะเกิดการผสมกับน้ำบาดาลทำให้อุณหภูมิของน้ำร้อนลดต่ำลง แล้วไหลขึ้นสู่ผิวดินกลายเป็นน้ำพุร้อน ได้แก่ น้ำพุร้อนละแม จังหวัดชุมพร

น้ำพุร้อนในจังหวัดสุราษฎร์ธานี น้ำพุร้อนในจังหวัดกระบี่ น้ำพุร้อนอุทยานบ่อน้ำร้อน น้ำพุร้อนรมณีย์ จังหวัดพังงา น้ำพุร้อนในจังหวัดตรัง น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อน บ่อนระหว่างควน จังหวัดพัทลุง

2.1.3 นิเวศวิทยาของน้ำพุร้อน (ประวิทย์ พิทักษ์วารี, 2533)

น้ำพุร้อนเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดในบริเวณที่หินเกิดรอยเลื่อนและ รอยแตก รอยเลื่อนรอยแตกเหล่านี้มีขนาดใหญ่และมีการเคลื่อนที่ ผลจากการเคลื่อนที่ของรอยเลื่อน คาดว่าทำให้เกิดการแผ่ความร้อนระหว่างรอยเลื่อนและรอยแตกของหิน น้ำพุร้อนมีต้นกำเนิดมาจาก น้ำฝนที่ตกลงมา และมักจะเกิดในบริเวณที่น้ำจะต้องไหลออกมาตามธรรมชาติ จะมากน้อยต่างกัน ในแต่ละบริเวณ ปริมาณของน้ำที่ไหลออกมาจะสม่ำเสมอ ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล น้ำพุร้อนจะมี pH ทั้งเป็นกรดหรือด่าง มีสารบางชนิดละลายอยู่ เช่น carbonate ion (CO_3^{2-}), ferrous sulphide (FeS), bicarbonate (HCO_3^-), monohydrogen sulphide (HS^-), hydrogen sulphide (H_2S), silicon dioxide (SiO_2), thiosulphite ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulphite (SO_3^{2-}), thiosulphate ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$), sulphate ion (SO_4^{2-}), boron (B^{3-}), calcium (Ca^{2+}), chloride ion (Cl^-), fluoride ion (F^-), potassium (K^+), magnesium (Mg^{2+}), sodium ion (Na^+) และ sulphide ion (S^{2-}) น้ำพุร้อนจะมีการไหลของน้ำพุร้อนไปยังลำธารคลอง ทำให้มีระดับความร้อนที่แตกต่างกัน สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนจึงมีการปรับตัวให้สามารถ อยู่ในที่อุณหภูมิสูงๆ แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญได้ในน้ำพุร้อนซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจึงแตกต่างกันตามระดับของอุณหภูมิและปัจจัยด้านต่างๆอันได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

2.1.3.1 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน ได้แก่ แสงสว่าง อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ น้ำพุร้อนที่มีช่วง อุณหภูมิคงที่จะทำให้สิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้นสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และอุณหภูมิมีผลต่อการ กระจายของจุลินทรีย์ น้ำพุร้อนที่มีสภาพเป็นกรดแก่หรือด่างแก่จะจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ ในน้ำพุร้อนบ่อน้ำพุร้อนที่เป็นกรด จะมีการออกซิไดซ์ (oxidize) H_2S ให้กลายเป็นกำมะถัน น้ำพุร้อนที่เป็นกรดแก่จะจำกัดการกระจายของสิ่งมีชีวิตในสภาพเช่นนี้ จุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอด ได้ ได้แก่ *Thiobacillus* sp. (เป็นแบคทีเรียพวก chemolithotrophs ได้รับพลังงานจากขบวนการ ออกซิเดชันของ sulphide) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. และฟังไจ *Acontium valatum* ไม่มีสาหร่ายสีเขียว แกมน้ำเงิน มีแต่สาหร่ายสีแดง *Cyanidium caldarium* น้ำพุร้อนที่เป็นด่างมีการเปลี่ยนแปลงของ อุณหภูมิจากเดิมในช่วง 10°C จะพบสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *Synechococcus* ในลำธารที่เป็นด้วยซึ่ง มีอุณหภูมิระหว่าง $51-56^\circ\text{C}$ จะมี *Mastigocladus laminosus*, *Phormidium laminosum* และ

Synechococcus sp. สาหร่ายเหล่านี้จะปนอยู่กับแบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่งบิดเป็นเกลียว แบคทีเรียรูปแท่งและแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้

2.1.3.2 ปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน ได้แก่ ปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ละลายในน้ำพุร้อน และ ความเข้มข้นของอินทรีย์สาร ถ้ามีออกซิเจนละลายในน้ำน้อยจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตจะลดลง และออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดต่ำลงจนไม่พอต่อความต้องการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นก็ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ส่วนความเข้มข้นของอินทรีย์สารในน้ำพุร้อนส่วนใหญ่จะมีความเข้มข้นในปริมาณต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญ

2.1.3.3 ปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน ได้แก่ ความสมดุลทางชีวภาพ ในน้ำพุร้อนขนาดใหญ่จะมีความสมดุลทางชีวภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของสิ่งมีชีวิตอยู่เสมอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในภาวะคงตัว

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำพุร้อนหลายอย่าง เช่น เป็นแหล่งท่องเที่ยว หรือแหล่งอาบน้ำร้อน เป็นแหล่งพลังงานไฟฟ้า ความสำคัญของการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนนั้นมีมากมาย ได้แก่

- (1) เป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม
- (2) เป็นแหล่งของความหลากหลายทางปฏิกิริยาเคมี และชีวเคมี
- (3) เป็นแหล่งของความหลากหลายของสารเคมี

2.2 จุลินทรีย์และการจัดกลุ่ม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสภาพเลวร้ายยากที่สิ่งมีชีวิตใดอาศัยอยู่ได้ เพราะจุลินทรีย์เหล่านั้นเกิดการปรับตัวอย่างยาวนานทั้งทางด้านชีวเคมีและทางด้านพันธุกรรม จนกระทั่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่อาศัยให้อยู่รอดมาได้ ปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ได้แก่ ความร้อน แสง ความเย็น ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น แรงดันออสโมติก และแรงดันไฮโดรส

ชนิดของจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในสถานที่นั้นๆ จุลินทรีย์จะสามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงขึ้นลงนั่นเอง โดยมีสิ่งที่จำเป็นต้องทราบคือ

(1) minimum temperature คือค่าอุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและดำเนินกิจกรรมทางด้านเมตาบอลิซึมต่อไปได้

(2) maximum temperature คือค่าอุณหภูมิที่จุลินทรีย์สามารถเจริญและดำเนินกิจกรรมทางด้านเมตาบอลิซึมต่อไปได้ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นอีกเล็กน้อยการเจริญจะหยุดลงและถ้ายังสูงขึ้นอีก

เล็กน้อยการเจริญจะหยุดลงและถ้าอุณหภูมิยังสูงขึ้นอีกถึงจุดหนึ่งเอนไซม์ และ nucleic acid จะถูกทำให้สูญเสียกิจกรรมหรือเรียกว่า Inactivation อย่างถาวร และในที่สุดจุลินทรีย์จะตาย

(3) optimum temperature คือช่วงอุณหภูมิแคบๆ ซึ่งอยู่ระหว่าง minimum temperature และ maximum temperature เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญและมีอัตราเมตาบอลิซึมสูงสุด จุลินทรีย์จะแบ่งออกตามช่วงอุณหภูมิที่อาศัยอยู่ดังต่อไปนี้

(3.1) Psychrophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C สามารถเจริญได้ดีที่ 0°C และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 20°C เช่น กลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญบนทุ่งหิมะ น้ำแข็งใต้ทะเลลึก เป็นต้น

(3.2) Mesophile เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลาง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง $20-40^{\circ}\text{C}$ เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และบางชนิดเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร

(3.3) Thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า $45-80^{\circ}\text{C}$ บางชนิดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 250°C หลายชนิดเป็นจุลินทรีย์ประเภทสร้างสปอร์ (spore-forming bacteria) เช่น *Bacillus*, *Clostridium* เป็นต้น

2.2.1 หลักเกณฑ์ทั่วไปในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแบคทีเรียตามวิธีของ Bergey นั้นพยายามหารายละเอียดข้อแตกต่างระหว่างแบคทีเรียให้มากที่สุด ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2549)

2.2.1.1 คุณสมบัติความต้องการอาหาร (Nutritional requirement) แบคทีเรียมีความต้องการอาหารแตกต่างกันมาก บางชนิดต้องการอาหารที่ซับซ้อนแต่บางชนิดก็เจริญบนอาหารที่ง่าย ๆ ได้ สมาชิกของแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทุกรูปแบบ ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนได้เป็น 4 ประเภท ดังแสดงในตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่ศึกษามากในห้องปฏิบัติการ อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปประกอบด้วยธาตุอาหารที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีเพียงเกลี้อินนินทรีย์ แต่บางชนิดต้องมีการเติมสารสกัดจากเนื้อสัตว์หรือพืชหรือจุลินทรีย์ เช่น beef extract, malt extract และ yeast extract

ตารางที่ 2.1 ลักษณะการดำรงชีวิตของแบคทีเรียที่แบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน

Type	Energy source	Carbon source	Member
Photolithotroph (photoautotroph)	Light	CO ₂	Photosynthetic Sulfur bacteria
Photoheterotroph	Light	organic matter	Purple photosynthetic bacteria
Chemolithotroph (Chemoautotroph)	Inorganic matter	CO ₂	Hydrogen bacteria
Chemoheterotroph	organic matter	organic matter	Most of organism

2.2.1.2 ความต้องการทางด้านกายภาพ (Physical requirement) ได้แก่ อุณหภูมิ อากาศ แสง ความเป็นกรด ด่าง ความต้องการแก๊สบางชนิด เป็นต้น สภาพทางกายภาพสามารถใช้จัดหมู่ของแบคทีเรียได้ ถ้าดูจากอุณหภูมิก็สามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 พวก คือ พวกที่เจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria ถ้าชอบอุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าชอบอุณหภูมิต่ำ เรียกว่า psychrophilic bacteria

2.2.1.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (Cultural characteristic) จากการเจริญของแบคทีเรียเป็นกลุ่มก้อนที่เรียกว่าโคโลนี (colony) ทำให้สามารถศึกษาลักษณะเชื้อจากโคโลนี เช่น ความมัน ความด้าน สี ชุ่ม ทึบ ไห้รงควัตถุเป็นละออยหรือหยาบ ขอบเขตการเจริญกระจายออกหรือเป็นจุดเล็กๆ มีลักษณะขอบเรียบหรือขรุขระ เป็นเมือกหรือแห้ง หรือเป็นเกล็ด เป็นต้น นอกจากนี้ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งหน้าตัดตรง หรือในอาหารเหลว ก็สามารถนำมาช่วยในการจัดจำแนกได้

2.2.1.4 คุณลักษณะด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) เป็นคุณสมบัติที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ต้องส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดเล็กมากๆ ต้องใช้กำลังขยายประมาณ 1000 เท่า จึงจะเห็นรูปร่างได้ว่าเป็นแท่ง ทรงกลม หรือเกลียว มีการจัดเรียงตัวแบบไหนรวมทั้งศึกษาว่าแบคทีเรียมีการจัดสร้างสปอร์สร้างแคปซูล (capsule) หรือ เกราะ (cyst) หรือเปล่า และดูชนิดของแฟลกเจลลา (flagella)

2.3.1.5 คุณสมบัติของกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือคุณสมบัติทางชีวเคมี (Metabolic or biochemical characteristic) การศึกษาเมแทบอลิซึมยังนำมาใช้ในการแยกชนิดของแบคทีเรียด้วย เพราะว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายอาหารแตกต่างกันมาก การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใส่

สารอาหารบางอย่างลงไปแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถทราบปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้

2.2.1.6 คุณสมบัติของส่วนประกอบทางด้านเคมี (Chemical composition characteristic) ปัจจุบันเทคนิคใหม่ๆที่สามารถแยกโครงสร้างต่างๆของเซลล์ได้ และในแบคทีเรียมีการศึกษากันมาก เช่น พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์แตกต่างกัน ศึกษาสูตรพันธุกรรมและสารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์

2.2.1.7 คุณสมบัติการเป็นแอนติเจน ศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียเกี่ยวกับปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี โดยฉีดแบคทีเรียเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลองแล้วตรวจสอบดูว่ามีการสร้างแอนติบอดีขึ้นในซีรัมหรือไม่ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง มีประโยชน์ในการแยกแบคทีเรีย บางครั้งสามารถแยกละเอียดไปถึงสายพันธุ์ได้

2.2.1.8 คุณสมบัติทางด้านพันธุกรรม (Genetic characteristic) การจัดจำแนกที่ถือว่าสมบูรณ์ที่สุดควรจะศึกษาเกี่ยวกับสารพันธุกรรม เพื่อการจัดจำแนกแบคทีเรียให้เข้าใจระบบธรรมชาติมากที่สุด โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ วิเคราะห์หาปริมาณของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) โดยหาปริมาณ guanine และ cytosine ในเซลล์ และการหาความสัมพันธ์ปฏิกิริยาระหว่าง DNA กับ DNA หรือ ระหว่าง DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน ในการเกิด DNA hybridization หรือ DNA+RNA hybridization เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียชนิดกัน นอกจากนี้การศึกษาถึงขนาดของจีโนม (genome) ก็ช่วยในการจัดจำแนกได้

2.2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนมหรือสปีชีส์

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนมหรือสปีชีส์สามารถทำได้หลายวิธี โดย Towner และ Cockyne ได้แบ่งวิธีการจำแนกจุลินทรีย์เป็น 5 วิธี ดังนี้ (สุริยภา เทวิน, 2550)

2.2.2.1 Biotyping เป็นการทดสอบหรือจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ ซึ่งใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีซึ่งประกอบด้วย การทดสอบลักษณะโคโลนี การใช้สารเคมีในการเจริญเติบโต ความสามารถในการย่อยน้ำตาล ความสามารถในการใช้สารคาร์บอน และความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ในทางปฏิบัติจะมีปัญหาในการแปลผลเนื่องจากแม้ว่าจะมีชุดทดสอบทางการค้าให้ใช้ แต่พบว่าแต่ละยี่ห้อจะมีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้ผลที่อ่านได้ต่างกัน และอาจเกิดปัญหาความไม่เสถียรจาก metabolic function รวมทั้งปัญหาจากความแตกต่างของระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อ และปริมาณของเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับปัญหาความแปรปรวนของการคัดต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นการทดสอบที่ต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นการจำแนกสปีชีส์ในเบื้องต้น

2.2.2.2 Phage typing ใช้หลักการของการใช้ไวรัส (bacteriophage) ทำให้เซลล์แบคทีเรียติดเชื้อ แล้วปล่อยชิ้นส่วนของ phage ที่ติดเชื้อออกมา การทดสอบนี้อาศัยความไวในการตรวจพบ bacteriophage ที่จำเพาะกับแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นๆ โดยในจุลชีพสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน จะมี bacteriophage profile ที่คล้ายกัน แม้การทดสอบนี้จะมีความไว แต่มีกรรมวิธีที่ยุ่งยากมีข้อจำกัดหลายประการ รวมทั้งต้องใช้เวลาการควบคุมตัวแปรหลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าสภาพแวดล้อมและกลไกทางพันธุกรรม

2.2.2.3 Serotyping ใช้หลักการเกิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโครงสร้างที่เป็นแอนติเจนของแบคทีเรียต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถใช้ได้กับหลายจีโนส โดยซีโรไทป์ของแบคทีเรียจะค่อนข้างเสถียรและเป็นตัวบ่งชี้ที่น่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบนี้เป็นการทดสอบที่ซับซ้อน ทำได้ยาก และใช้เวลานาน รวมทั้งมักเกิดปัญหาในการผลิตแอนติบอดีและมาตรฐานของกรรมวิธีที่แตกต่างกัน

2.2.2.4 Bacteriocin typing แบคทีเรียโอซินเป็นสารซึ่งส่วนมากเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียชนิดหนึ่งผลิตออกมาและไปฆ่าเชื้อชนิดอื่น ดังนั้น bacteriocin typing จึงเป็นการทดสอบความไวของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ไม่ทราบต่อแบคทีเรียโอซิน ซึ่งผลิตจากสายพันธุ์ที่เป็นมาตรฐาน หรือทดสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ทราบในการผลิตแบคทีเรียโอซินต่อต้านที่เป็นชุดทดสอบ แม้ว่าการผลิตแบคทีเรียโอซิน และปฏิกิริยาความไวจะเป็นคุณสมบัติที่เสถียร แต่สามารถถูกรบกวนได้จากการส่ง R-plasmid ได้ รวมทั้งเป็นวิธีการทดสอบที่มีความยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน

2.2.2.5 Molecular approach เป็นการใช้ข้อมูลอณูวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย เป็นเทคนิคที่ไม่ขึ้นกับความแตกต่างในสถานะการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิดโดยแบ่งเป็น

- 1) การวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพโดยอาศัยจำนวนและขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่อาจมีข้อเสียจากความไม่เสถียรของพลาสมิดที่อาจเกิดขึ้นในระยะเวลายาว รวมทั้งไม่สามารถใช้ได้กับจุลชีพที่ไม่สร้างพลาสมิด

- 2) การวิเคราะห์โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) เป็นวิธีที่แยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอออกมา แล้ววิเคราะห์รูปแบบของโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยกระบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นวิธีที่สามารถใช้กับจุลชีพที่ไม่สามารถสร้างพลาสมิด หรือมีพลาสมิดที่ไม่เสถียรได้ แต่โครโมโซมอลดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อน เมื่อนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจะทำให้ส่วนของดีเอ็นเอแตกหักง่ายรวมทั้งเกิดขึ้นส่วนจำนวนมากทำให้การอ่านและแปลผลทำได้ยาก

3) เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization procedure) เป็นการระบุว่า มีหรือไม่มีของเชื้อจุลินทรีย์หนึ่งๆ ในตัวอย่างทางคลินิกหรือตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โดยใช้เทคนิค ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization analysis) และการใช้ restriction endonuclease analysis ซึ่งชิ้นส่วนของโครโมโซมอดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease จะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วถ่ายเทไปยังเมมเบรน (membrane) และถูกจับด้วย labeled probe ที่ประกอบไปด้วยโคลนดีเอ็นเอจากสปีชีส์เดียวกัน จำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตรวจพบจะขึ้นกับขนาดและความจำเพาะของ probe ที่ใช้ รวมทั้งธรรมชาติของตัวอย่างตรวจ

4) Amplification procedure และ sequencing technique เป็นการนำชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่จำเพาะมาทำการแทรกเข้าไปในพลาสมิดเวกเตอร์ (plasmid vectors) ด้วย recombinant DNA technique หลังจากนั้น RNA transcript จะถูกแยกและเรียงลำดับ แล้วลำดับของดีเอ็นเอเป้าหมายและเรียงลำดับเบส หลังจากนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล

5) 16S rRNA PCR-RFLP (สุริยญา เทวิน, 2550) เป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้สำหรับศึกษาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมในตำแหน่ง 16S rRNA gene ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อนุรักษ์และมีความสำคัญกับการทำงานของเซลล์ รวมทั้งเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะกับสปีชีส์ของแบคทีเรียโดยเอนไซม์ endonuclease สามารถจดจำกับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอ และสามารถตัดสายดีเอ็นเอทั้งสองสาย ทำให้ดีเอ็นเอถูกแยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งจำนวนและขนาดของชิ้นส่วนที่ได้จะขึ้นอยู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับเอนไซม์ และส่วนประกอบของดีเอ็นเอนั้นๆ ดีเอ็นเอของเชื้อเมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) แล้วสายดีเอ็นเอที่ได้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ endonuclease หลังจากนั้นชิ้นส่วนที่ได้จะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเทคนิคการวิเคราะห์ RFLPs มีข้อดีคือ สามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง และสามารถใช้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อและระบุความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี ยีน 16S rRNA เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีในการศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นโมเลกุลที่พบในทุกสิ่งมีชีวิต มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต โดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวางพบโดยทั่วไปและมีลำดับเบสที่มีความอนุรักษ์ปานกลาง นิยมนำมาใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย เพราะยีน 16S rRNA พบในแบคทีเรียทุกชนิด มีขนาดประมาณ 1,500-1,600 เบส และมีความแตกต่างมากพอที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกันของลำดับเบสของยีน 16S rRNA การนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียชนิดก่อโรคหรือที่แยกได้จากทางการแพทย์

และสิ่งแวดล้อมมีประสิทธิภาพสูงและประสบความสำเร็จมาแล้ว โดยนักวิจัยหลายกลุ่ม (Weisburg et al., 2000; Petti et al., 2005)

6) การวิเคราะห์หาโปรตีน (protein analysis) เป็นการวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยอาศัยการเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ ซึ่งโปรตีนหลักที่สร้างจากแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกันจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน แต่ในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนเล็กน้อย การวิเคราะห์โปรตีนจะเป็นการทดสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ซึ่งจะถูกรวบรวมโดยลักษณะทางจีโนไทป์และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

7) การวิเคราะห์ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เป็นการวิเคราะห์ไลโปโพลีแซคคาไรด์หรือเ็นโดทอกซิน (endotoxin) ซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ โดยการวิเคราะห์นี้อาศัยความแตกต่างในความสามารถในการเคลื่อนตัวในกระแสไฟฟ้า หรือความสามารถในการเป็นแอนติเจน ซึ่งจะสัมพันธ์กับส่วนประกอบของโมเลกุลไลโปโพลีแซคคาไรด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งขนาดของ lipopolysaccharide side chain

2.2.3 การศึกษาและใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน

การแยกเชื้อเพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียมีดังนี้ Gillian et al., 2001 ได้ศึกษาประชากรของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนในประเทศอินโดนีเซีย โดยทำการคัดแยกเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ ใช้เทคนิค PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในการจัดกลุ่มแบคทีเรีย และใช้ข้อมูล 16S rRNA ของแบคทีเรียในการระบุชนิดของเชื้อ จากการศึกษาสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในน้ำพุร้อนออกได้ 3 กลุ่ม คือ Proteobacteria, *Flavobacteria* และ *Bacillus* จุลินทรีย์ที่แยกได้ เช่น *Frateriuria auranti*, *Pantoea ananas*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* และ *Bacillus thermoleovorans* ส่วน Haouari et al., 2008 สามารถแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ คือ *Thermodesulfovibrio hydrogeniophilus* จากบ่อน้ำร้อน Tunisian ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างโค้ง ไม่สร้างสปอร์สามารถเคลื่อนที่ได้เพราะมี polar flagella เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 50-70 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 °C pH 7.1 Adiguzel et al., 2009 จำแนกแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศตุรกี โดยใช้ลักษณะ phenotype และ genotype ซึ่งประกอบไปด้วย fatty acid methyl ester, REP PCR profile และ 16S rRNA sequencing สามารถจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ไว้ในกลุ่ม *Geobacillus*, *Anoxybacillus* และ *Bacillus* spp. Vick et al., 2010 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในบ่อน้ำพุร้อน Long Valley Caldera พบว่าแบคทีเรียที่สำรวจพบส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัม *Archeoglobles* และ *Desulfurococcales* นอกจากนี้ Kublanov et al., 2009 ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ร้อนที่สามารถผลิต

hydrolyase enzyme จากบ่อน้ำร้อน Uzon Caldera ในประเทศรัสเซีย โดยเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำร้อน แล้วแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต hydrolytic enzyme โดยมีการเติม substrate ชนิดต่างๆ ได้แก่ albumin, casein, chitin และ agarose เป็นต้น พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างสามารถจัดเข้าอยู่ในกลุ่ม *Caldicellulosiruptor* และ *Dictyoglomus* และสามารถจำแนก Archaea ที่ผลิต hydrolytic enzyme ที่แยกได้ให้อยู่ในไฟลัม *Crearchaeota*

การศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนไปใช้ประโยชน์นั้น Zhao et al., 2010 ศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนและเอทานอลในสภาวะ extreme thermophilic โดยใช้เชื้อผสมได้ หัวเชื้อมาจากถังหมักไฮโดรเจน ศึกษาปัจจัยของ glucose, peptone, FeSO_4 , N_2HCO_3 , yeast extract, trace mineral salt, vitamin และ pH เริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนและเอทานอล พบว่าการผลิตไฮโดรเจนและเอทานอลขึ้นอยู่กับ pH และองค์ประกอบของอาหาร glucose, initial pH, mineral salt และ FeSO_4 มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ขณะที่การผลิตเอทานอล initial pH, glucose และ mineral salt มีผลต่อการผลิตเอทานอล จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักจัดอยู่ในกลุ่ม *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* และ *Caldanaerobacter* O-Tong et al., 2009 ศึกษาการเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง 5 วิธี ได้แก่การใช้ base, acid, 2-bromoethanesulfonic acid (BESA), load shock และ heat shock ในสภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจน โดยดูการผลิตไฮโดรเจนเทียบกับประชากรของแบคทีเรีย พบว่า การใช้วิธี load shock treatment เป็นวิธีที่ดีสำหรับการแยกประชากรของแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนออกมาจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถกำจัดพวก methanogen ได้ ทำให้ได้ไฮโดรเจนในกระบวนการหมักสูง ($1.96 \text{ mol H}_2/\text{hexose}$) แบคทีเรียที่พบในวิธี load shock และ heat shock สามารถจัดอยู่ในกลุ่ม *Thermoanaerobacterium*, *Thermosaccharolyticus* ส่วน base และ acid treat meat สามารถพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. และ วิธี base treatment สามารถพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จากการเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการหมักด้วยหัวเชื้อที่คัดเลือกด้วยวิธีต่างๆ พบว่า วิธี load shock สามารถแยกหัวเชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ Koskinen et al., 2007 ใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดที่แยกได้จากบ่อน้ำร้อนของประเทศไอซ์แลนด์ มาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักเอทานอล และไฮโดรเจน พบว่าเชื้อที่แยกได้คือ *Clostridium uzoni* และ *Thermoanaerobacterium aciditolerans* ซึ่ง *Clostridium uzoni* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากการหมัก glucose และ xylose ส่วน *T.aciditolerans* สามารถผลิตเอทานอลได้จากการหมัก glucose และ xylose ได้ผลผลิตมากถึง $1.6 \text{ mol-EtOH/mol-glucose}$ และ $1.1 \text{ mol-EtOH/mol-xylose}$

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ และสารเคมี

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Carlo erba
Beef extract	Italmar
Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	-
Chloroform	Fluka
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Glycerol	Carlo erba
Isopropanol	Carlo erba
Peptone	Italmar
Phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1	-
Sodium chloride	Carlo erba
Sodium dodecyl sulphate	Sigma
Agarose	Vivantis
Ethidium bromide	Fluka
Fd1 primer (5'AGAGTTTGATCCTGGCAG3')	-
<i>Hinf</i> I	Toyobo
Lambda <i>Hind</i> III DNA size marker	Biolabs
Lysozyme	AMRESCO
Proteinase K	AMRESCO
PCR Master Mix	Promega

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Rd1primer (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3')	-
Ribonuclease A	AMRESCO
100 bp DNA ladder	Promega
TAE buffer	-
Tris-hydrocholic acid	-

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 3.2.2 กล้องจุลทรรศน์
- 3.2.3 เครื่องวัดพีเอช รุ่น metrohm 713
- 3.2.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง
- 3.2.5 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR
- 3.2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.2.7 automatic pipette
- 3.2.8 Gel electrophoresis set
- 3.2.9 hot air oven
- 3.2.10 incubator
- 3.2.11 autoclave
- 3.2.12 UV-light transilluminator

3.3 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำพุร้อนที่ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย

- แหล่งที่ 1 บ่อน้ำพุร้อนตานะเมเราะ จังหวัดยะลา
- แหล่งที่ 2 บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง
- แหล่งที่ 3 บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร จังหวัดพัทลุง
- แหล่งที่ 4 บ่อน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

แหล่งที่ 5 บ่อน้ำพุร้อน โถ๊ะจังกระ จังหวัดพัทลุง
เก็บตัวอย่างน้ำและดินจากบ่อน้ำพุร้อนแหล่งต่างๆ โดยเลือกเก็บตัวอย่างดินและน้ำลงขวด
ปลอดเชื้อ แล้วนำกลับมาล้างห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดลองต่อไป

3.4 การคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) ในน้ำพุร้อน

นำตัวอย่างน้ำพุร้อนมาเจือจางแบบ serial dilution ถึงระดับความเจือจาง 10^{-10} แล้วนำมา
ทำการกระจายเชื้อบนอาหาร 0.5X Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา
24-48 ชั่วโมง ดังนี้ ตัวอย่างน้ำพุร้อนตานะแมเราะ บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C ตัวอย่างน้ำพุร้อนเขาชัยสน
บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ตัวอย่างน้ำพุร้อนโคกไทร บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ตัวอย่างน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน
บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C และตัวอย่างน้ำพุร้อน โถ๊ะจังกระ บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน
มีชีดบนอาหาร 0.5XNA งานใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.5 การสกัด Chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยวิธี CTAB/NaCl

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหาร 0.5X NB 30 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่
ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer
(pH 8.0) 1 ml โดยละลายเซลล์ใน TE buffer (pH 8.0) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 3 นาที
ดูดของเหลวทิ้ง แล้วละลายก้อนเซลล์ใน TE buffer (pH 8.0) 400 µl ผสมเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
เติม 10 mg/ml Lysozyme 30 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง เติม 10% SDS (Sodium dodesyl
sulfate) 30 µl และ 20 mg/ml Protienase K 6 µl ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C 1 ชั่วโมง จากนั้น
ปรับความเข้มข้นของเกลือให้เป็น 0.7 M NaCl ด้วย 5 M NaCl เติมสารละลาย CTAB/NaCl 0.1 เท่า
ของปริมาตรที่มี บ่มที่ 65 °C 15 นาที เติม 25:24:1 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol ที่แช่เย็น
ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันเบาๆปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml หลอดใหม่หลีกเลี่ยงการดูดเศษตะกอนเซลล์
(cell debris) ออกมาด้วย เติม 24:1 Chloroform : Isoamyl alcohol ที่แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง
ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่
ในหลอด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง
ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งล้างตะกอน DNA
ด้วย 70% Ethanol 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ปล่อยให้
DNA แห้งโดยการเปิดฝา Eppendorf ที่ 45 °C ประมาณ 15 นาที ละลาย DNA ด้วย TE buffer (pH 8.0)

80 μ l เดิม 10mg/ml DNase free RNase 1 μ l ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 37 °C 20 นาที เก็บ Chromosomal-DNA ที่ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.6 การตรวจสอบ Chromosomal DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

นำ Chromosomal DNA ที่ได้จากข้อ 2 มาตรวจสอบความเข้มข้นโดยการเตรียม agarose ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TAE buffer (pH 8.0) นำไปหลอมด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 °C แล้วเทลงในถาดเจล (gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลาย ดีเอ็นเอกับ 10X Loading buffer ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยใช้ Lambda Hind III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 80 โวลต์ ให้สีของ Loading buffer เคลื่อนที่ได้ 2 ใน 3 ของเจล ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 μ g/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเปล่าเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง UV transilluminator

3.7 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCAG-3') และ Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') เทคนิคพีซีอาร์ 1 ปฏิกริยา ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย 12.5 μ l 2X PCR Go Taq® Colorless Master Mix, 2.5 μ l 50 μ M Fd1 primer, 2.5 μ l 50 μ M Rd1 primer, 5 μ l Nuclease free water และ 2.5 μ l DNA template สภาวะที่ใช้ในการขยายสารพันธุกรรม (PCR condition) ดังนี้ Preheat ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที ถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดมาตรฐาน (Lambda Hind III)

3.8 การจัดกลุ่ม OTUs แบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP

นำผลผลิต PCR จากข้อ 4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HinfI โดยปฏิกริยาของการตัด ปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วย 13.3 μ l Deionized water, 0.2 μ l 10 μ g/ μ l Acetylated BSA, 2 μ l 10X buffer, 0.5 μ l 10 U/ μ l HinfI และ 4 μ l ผลิตภัณฑ์ PCR บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมง ตรวจสอบ

ผลการตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) แล้วจัดกลุ่ม OTUs ของแต่ละไอโซเลตตามรูปแบบการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยจัดไอโซเลตที่มีรูปแบบการตัดจำเพาะของผลผลิต PCR ที่เหมือนกันให้อยู่กลุ่มเดียวกัน

3.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำไอโซเลตตัวแทนที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP แล้วส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) แล้วระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลตมากที่สุด

3.10 การทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียในการสร้างเอ็นไซม์ lipase, cellulase และ amylase โดยวิธี plate method

การทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในการสร้างเอ็นไซม์ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหาร 0.5X nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละชนิด ปริมาตร 5 μ l. หยดลงบนอาหารที่ใช้ทดสอบในการสร้างเอ็นไซม์แต่ละชนิดดังนี้

3.10.1 เอ็นไซม์ lipase

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tributyrin agar ที่เติม tributyrin ความเข้มข้น 1.0% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต clear zone รอบโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามี clear zone แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นไซม์ lipase ได้

3.10.2 เอ็นไซม์ cellulase

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร CMC agar ที่เติม carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นราดด้วยสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 5 นาที สังเกต clear zone รอบโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามี clear zone แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นไซม์ cellulase ได้

3.10.3 เอนไซม์ amylase

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร starch agar ที่เติม soluble starch ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นรดด้วยสารละลายไอโอดีน สังเกต clear zone รอบโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามี clear zone แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้

3.11 การทดสอบการทนอุณหภูมิ 110 °C ของแบคทีเรียไอโซเลต SROSL60_1

ทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิ 110 °C ของไอโซเลต SROSL60_1 โดยเลี้ยงเชื้อใน 0.5X nutrient broth บ่มที่ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเชื้อ 1 ml เติกลงใน 200 ml 0.5X nutrient agar ที่หลอมแล้วอุณหภูมิ 50 °C จำนวน 3 ชุด โดยที่ชุดแรก นำขวดอาหารที่เติมเชื้อและไม่เติมเชื้อไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ชุดที่สอง นำขวดอาหารที่เติมเชื้อและไม่เติมเชื้อไป autoclave ที่ 110 °C 20 นาที และชุดที่สามนำขวดอาหารที่เติมเชื้อและไม่เติมเชื้อไปให้ autoclave ที่ 121 °C 20 นาที นำอาหารที่ให้ความร้อนต่างกันมาเทลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ 45 °C แล้วดูผลการรอดชีวิตของไอโซเลต SROSL60_1

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

น้ำพุร้อน 5 แหล่งที่ศึกษา ได้แก่ น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) น้ำพุร้อนตานะแมเราะ น้ำพุร้อนโล๊ะจังกระ น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อนโคกไทร ที่ตั้ง อุณหภูมิ และค่าความเป็น กรด-ด่าง แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำพุร้อนอยู่ในช่วงระหว่าง 7.7-8.0 และอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำพุร้อน อยู่ในช่วงระหว่าง 45-80 °C การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ร้อนทั้งหมดในบ่อน้ำพุร้อนแต่ละแห่งด้วยอาหาร nutrient agar ที่มีความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นปกติ (0.5X nutrient agar) บ่มที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำพุร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 4.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้ใน น้ำพุร้อนโล๊ะจังกระ น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน น้ำพุร้อนโคกไทร และน้ำพุร้อนตานะแมเราะเท่ากับ 4.61×10^5 , 3.65×10^5 , 1.51×10^5 , 1.45×10^3 และ 30 CFU/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้ แปรผกผันกับอุณหภูมิของแหล่งตัวอย่าง เมื่ออุณหภูมิของแหล่งตัวอย่างน้ำพุร้อนสูงขึ้น จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้มีปริมาณลดน้อยลง แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดหลังจากนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การติดสีของเซลล์ (Gram's stain) รูปร่างเซลล์แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ในบ่อน้ำพุร้อนส่วนมากติดสีแกรมบวก (Gram's positive) และเซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (bacilli) ภาพลักษณะเซลล์และการติดสีของเซลล์แต่ละไอโซเลต ซึ่งย้อมเซลล์ด้วยวิธี Gram's stain และถ่ายภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า แสดงในภาพที่ 4.1-4.4

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างน้ำพุร้อน อุณหภูมิของน้ำพุร้อน และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างน้ำพุร้อนที่ศึกษา

ลำดับ	ชื่อน้ำพุร้อน	ที่ตั้ง			อุณหภูมิ (°C)	pH
		หมู่บ้าน	อำเภอ	จังหวัด		
1	ตานะเมเราะ	บ่อน้ำร้อน	เบตง	ยะลา	80	7.8
2	โล๊ะจังกระ	โล๊ะจังกระ	กงหรา	พัทลุง	46	8.0
3	เขาชัยสน	เขาชัยสน	เขาชัยสน	พัทลุง	57	7.7
4	โคกไทร	นาทุ่งโพธิ์	กงหรา	พัทลุง	50	8.0
5	บ้านน้ำพุร้อน	น้ำพุร้อน	ไชยา	สุราษฎร์ธานี	45	7.7

ตารางที่ 4.2 ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนแต่ละแหล่ง

ชื่อแหล่งน้ำพุร้อน	อุณหภูมิ ของแหล่งตัวอย่าง (°C)	อุณหภูมิที่บ่ม (°C)	จำนวน แบคทีเรีย (CFU/ml)
ตานะเมเราะ	80	70	30
เขาชัยสน	55	55	3.65×10^5
โคกไทร	50	50	1.45×10^3
โล๊ะจังกระ	46	45	4.61×10^5
บ้านน้ำพุร้อน	45	45	1.51×10^5

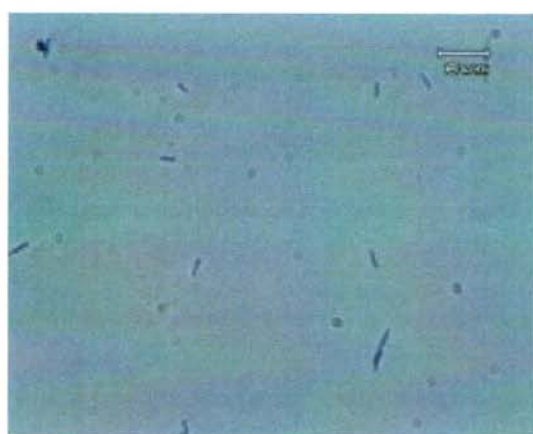
ตารางที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนโคกไทร น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อน
บ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) น้ำพุร้อนโถ๊ะจังกระ และน้ำพุร้อนตานะแมเราะ

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะของเซลล์		
		การติดสี ย้อมแกรม	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์ (μm)
1	KZT_7	Positive	Bacilli	1×3-4
2	KZO60_4	Positive	Bacilli	1×4
3	KZO45_5	Positive	Bacilli	1×4-5
4	KC45	Positive	Short rod	1×3
5	KC50_G	Positive	Bacilli	0.8×3
6	SROB45_5	Positive	Bacilli	1.5×4
7	SROSL50_1	Positive	Bacilli	1.5×4
8	SROSL60_1	Positive	Rod	1×5
9	SRO45_1	Positive	Rods in chain	1×7-9
10	SRO50_2	Positive	Bacilli	0.8×3
11	SRTBF45_1	Positive	Bacilli	0.8×4
12	LJ45_1	Positive	Bacilli	1×5
13	LJ50_2	Positive	Bacilli	0.8×3
14	STW45_5	Positive	Bacilli	1×3-4
15	STW60_3	Positive	Bacilli	0.8×4-5
16	YTM1	Positive	Bacilli	1×4
17	YTM2	Positive	Bacilli	1×5
18	YTM3	Positive	Bacilli	0.8×5
19	YTM4	Positive	Bacilli	0.8×4
20	YTM5	Positive	Bacilli	0.8×4-6
21	KA0_P1	Positive	Bacilli	1×3-4
22	KA0_P2	Positive	Bacilli	1×3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน โลกไทร น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) น้ำพุร้อนโล๊ะจังกระ และน้ำพุร้อนตานะแมเราะ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะของเซลล์		
		การติดสี ย้อมแกรม	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์ (μm)
23	KA0_P3	Positive	Bacilli	0.8×4-5
24	KA0_P4	Positive	Bacilli	1×3
25	KSII_1	Positive	Bacilli	1×4-5
26	KSII_2	Positive	Bacilli	1×4
27	KSII_3	Positive	Bacilli	0.8×3
28	KSII_4	Positive	Bacilli	1×5

กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสเชื้อ บอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาของไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KC=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน KZ=บ่อน้ำพุร้อนโลกไทร SR=บ่อน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) LJ=บ่อน้ำพุร้อนโล๊ะจังกระ YT=บ่อน้ำพุร้อนตานะแมเราะ KS=บ่อน้ำพุร้อนโลกไทร KA=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน และ ST=บ่อน้ำพุร้อนสมอทอง



YTM1



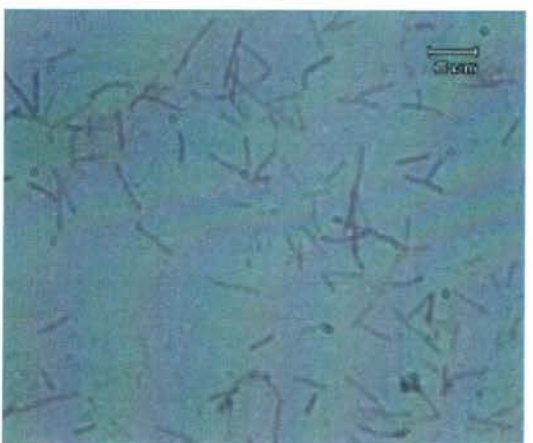
YTM2



YTM3



YTM4

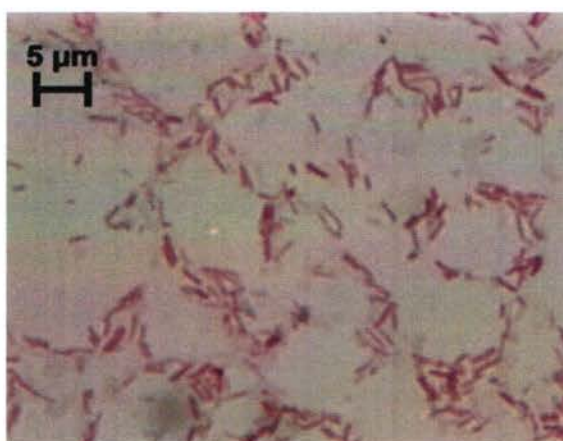


YTM5

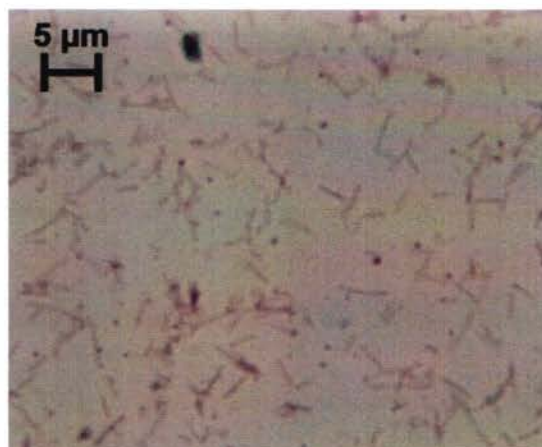


KAO_P1

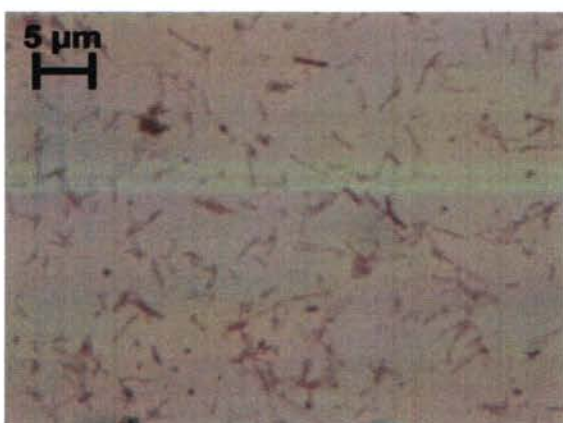
ภาพที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสเชื้อ บอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาของไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KA=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน YT=บ่อน้ำพุร้อนตานะแมเราะ)



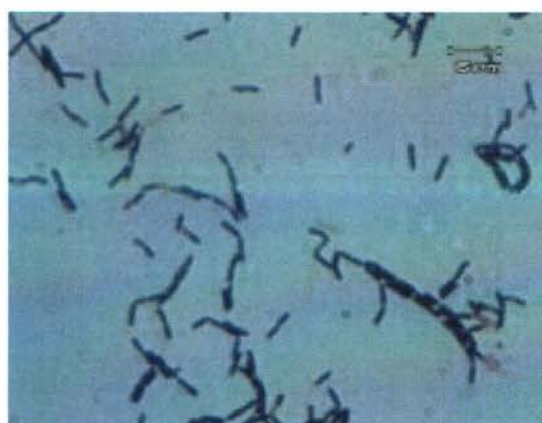
KAO_P2



KAO_P3



KAO_P4



KSII_1

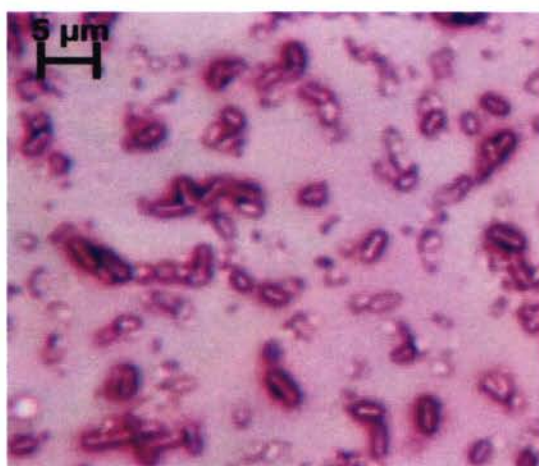


KSII_2



KSII_3

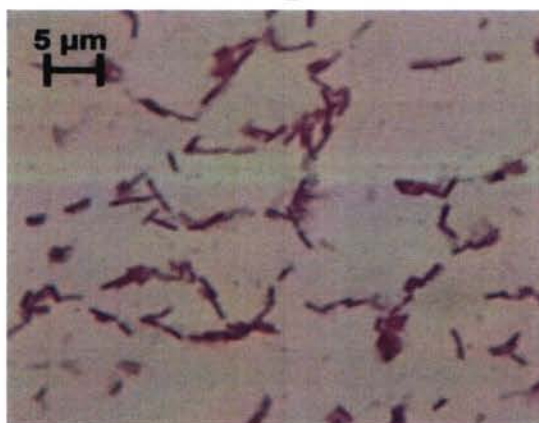
ภาพที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสชื่อ บอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาของไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KS=บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร และ KA=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน



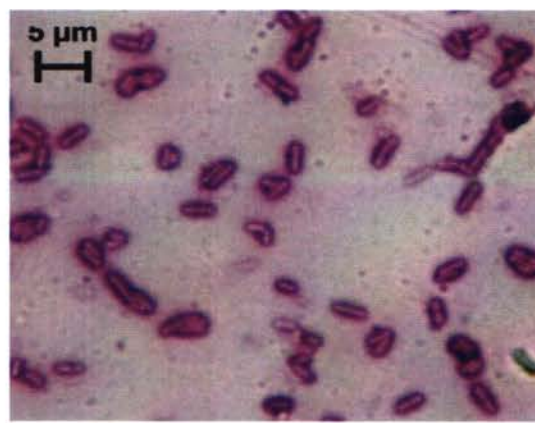
KSII_4



KC45



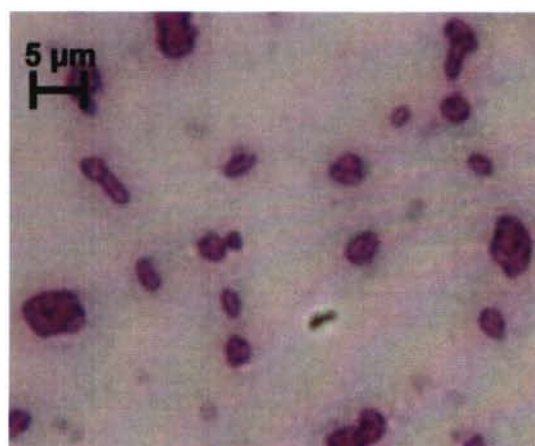
KZO45_5



KZO60_4

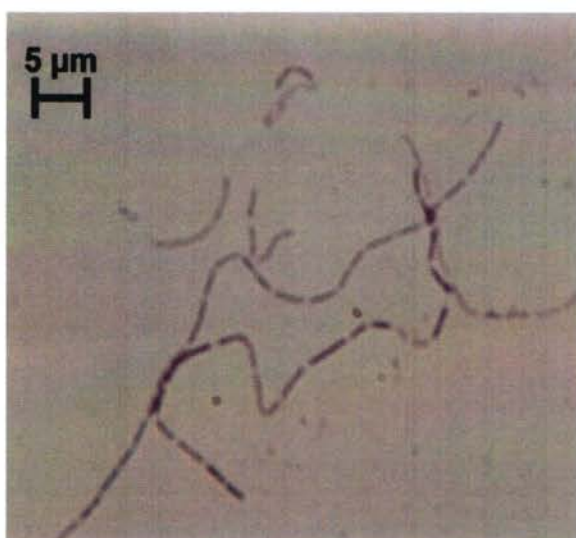


SROSL50_1

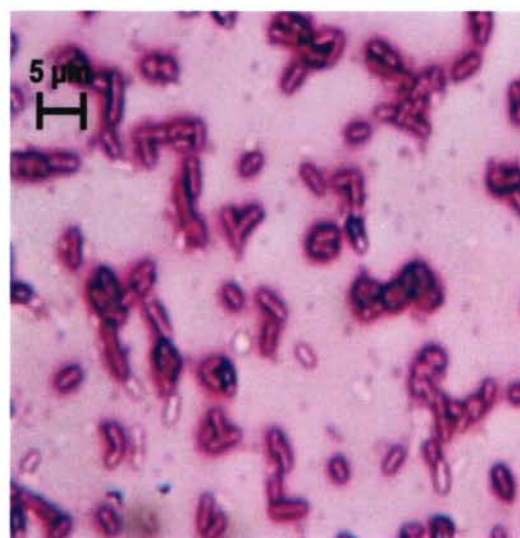


SROB45_5

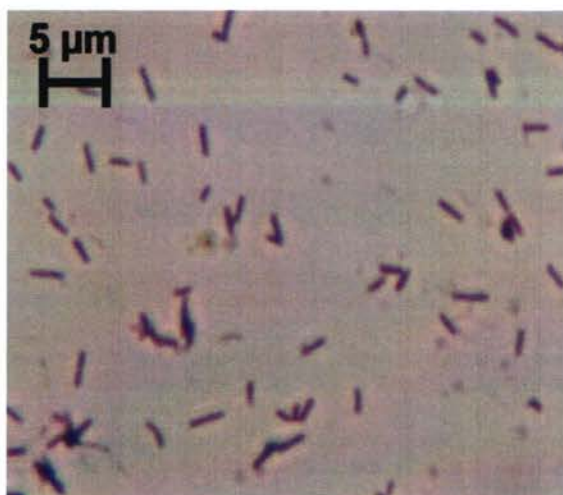
ภาพที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสเชื่อบอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาของไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KZ=บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร KC=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน SR=บ่อน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) และ KS=บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร



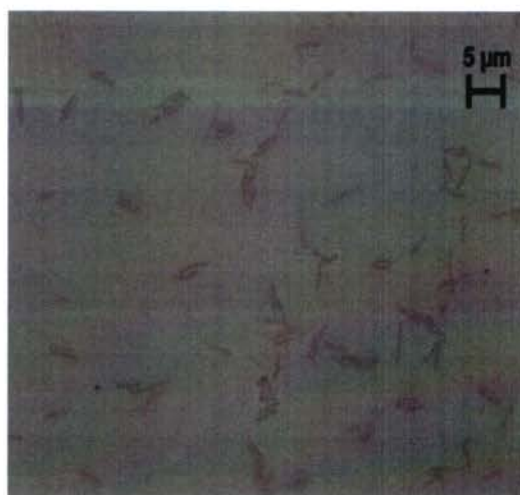
STS50_1



STW45_5



KZT11



SROSL60_1

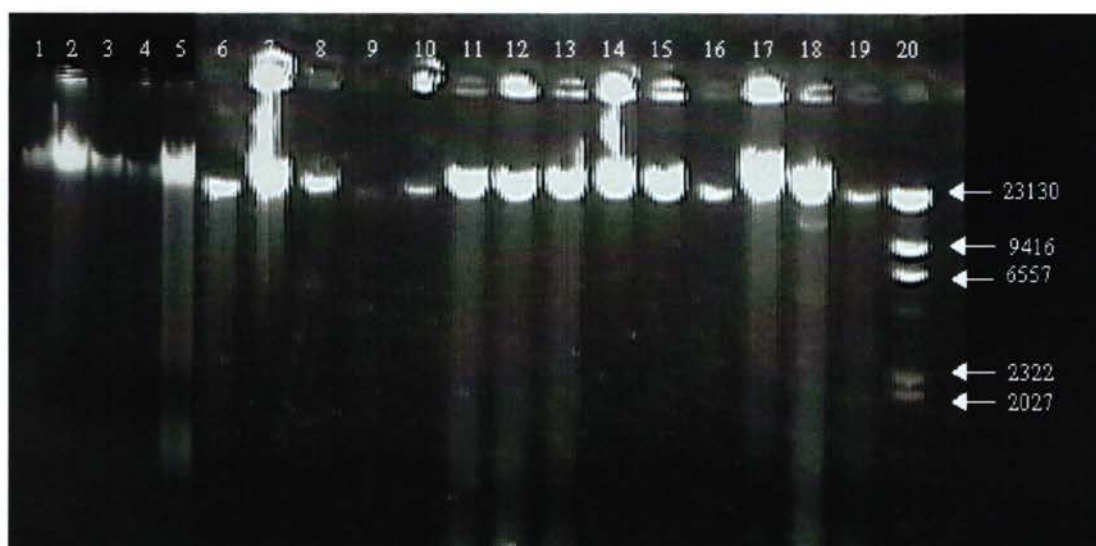
ภาพที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสเชื้อ บอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาของไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KZ=บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร ST=บ่อน้ำพุร้อนสมอทอง และ SR=บ่อน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี)

4.2 การตรวจสอบปริมาณ Chromosomal DNA

เมื่อนำ Chromosomal DNA ไปตรวจสอบปริมาณที่สกัดได้บน 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า Chromosomal DNA ที่ได้มี 1 แถบ เคลื่อนที่ใน agarose gel ได้ระยะทางเท่ากับแถบขนาด 23,130 bp ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda Hind III) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6 Chromosomal DNA ที่สกัดได้มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละไอโซเลต และปริมาณของเซลล์ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ จึงอาจส่งผลให้ได้ปริมาณของ Chromosomal DNA ที่ได้มีปริมาณมากน้อยไม่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ Chromosomal DNA ที่ได้มีปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.5 Chromosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรียทนร้อน 13 ไอโซเลต โดยเลนที่ 1=YTM1, 2=YTM2, 3=YTM3, 4=YTM4, 5=YTM5, 6=KSII_1, 7=KSII_2, 8=KSII_3, 9=KSII_4, 10=KAO_P1, 11=KAO_P2, 12=KAO_P3, 13=KAO_P4, 14=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda HindIII)



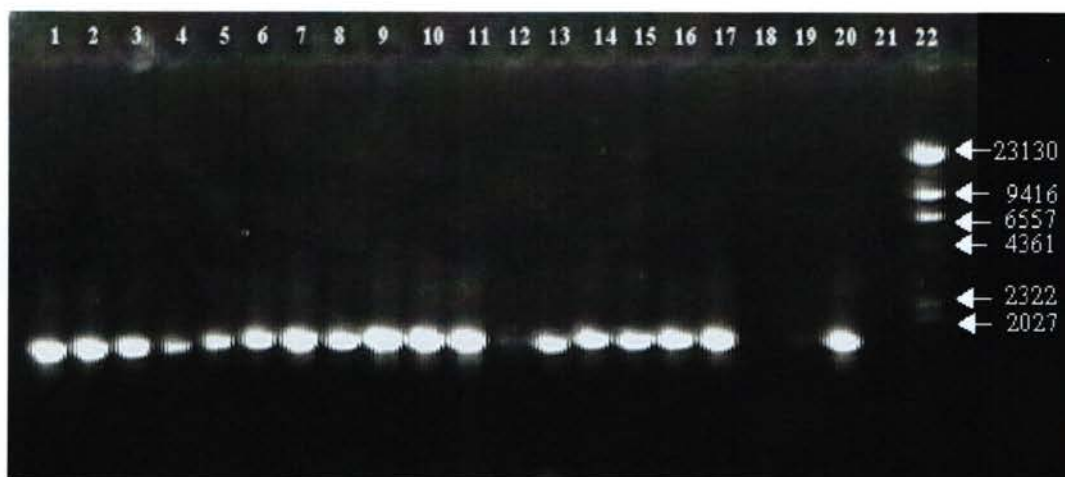
ภาพที่ 4.6 Chromosomal DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่รื้อน 19 ไอโซเลตโดยเลนที่ 1=STS50_1, 2=KZT11, 3=KZT7, 4=SRO50_2, 5=SRTBF45_1, 6=KC50_G, 7=STW60_3, 8=STW45_5, 9=SROSL50_1, 10=SROSL60_1, 11=KZO60_4, 12=KZO45_5, 13=LJ45_2, 14=LJ50_2, 15=SROB45_6, 16=SROB45_5, 17=KZT11, 18=STS50_1, 19=KC45, 20=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda Hind III)

4.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ Chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนเป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ Fd1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCAG3') และ Rd1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บน 0.8% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda Hind III) ภาพที่ 4.7 และ 4.8 แสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp และมีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามมี Nonspecific Product ขนาดประมาณ 700-800 bp เกิดขึ้นในการทำ PCR ของไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 ดังปรากฏในภาพที่ 4.7 เลนที่ 2-4 และมี 3 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.8 เลนที่ 12, 18 และ 19) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rRNA ได้เพียงพอ คือ ไอโซเลต SROB45_6, SRO50_2 และ SRTBF45_5 ตามลำดับ



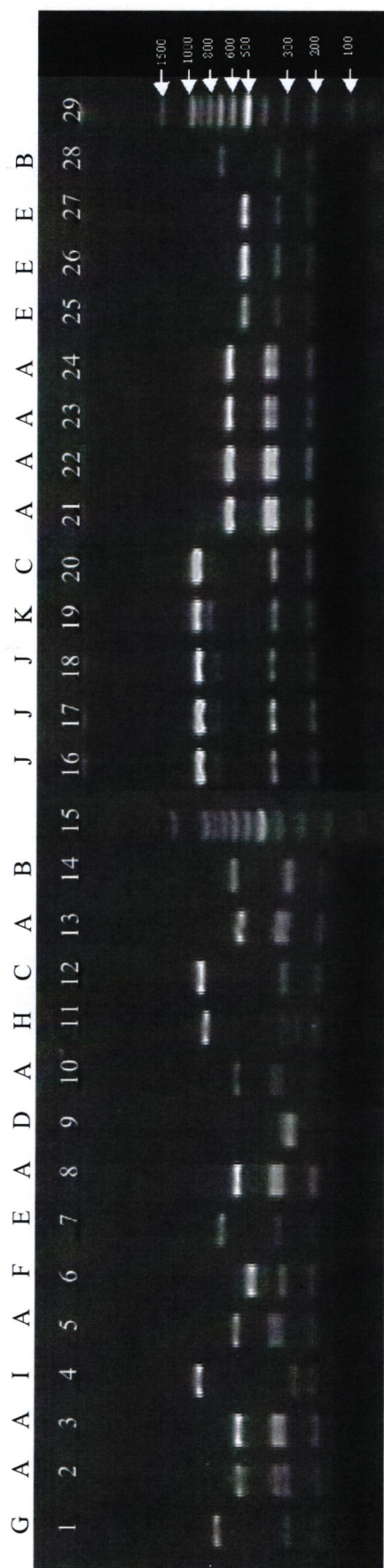
ภาพที่ 4.7 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ 13 ไอโซเลต ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดย
เลนที่ 1=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda *Hind* III), 2=YTM1, 3=YTM2, 4=YTM3,
5=YTM4, 6=YTM5, 7=KSII_1, 8=KSII_2, 9=KSII_3, 10=KSII_4, 11=KAO_P1,
12=KAO_P2, 13=KAO_P3 และ 14=KAO_P4



ภาพที่ 4.8 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ของ 19 ไอโซเลต ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดย
เลนที่ 1=KZT11, 2=KZT7, 3=STW60_3, 4=STW45_5, 5=SROSL50_1,
6=SROSL60_1, 7=STS50_1, 8=KC45, 9=KZO60_4, 10=KZO45_5, 11=KC45_G,
12=SROB45_6, 13=SROB45_5, 14=LJ45_2, 15=LJ50_2, 16=SRO45_1,
17=SRO50_2, 18=SRO50_2, 19=SRTBF45_5, 20=Positive control, 21=Negative
control, 22=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda *Hind* III)

4.4 การจัดกลุ่มแบคทีเรียที่เรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP

เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำพุร้อนมาศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RFLP ยีน 16S rRNA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อทั้งหมด 27 ไอโซเลต (ตามรูปแบบการตัดจำเพาะที่เหมือนกัน) ได้เป็น 11 กลุ่ม (OTUs) คือ กลุ่ม A, B, C, D, E, F, G, H, I, J และ K (ภาพที่ 4.9) โดยกลุ่ม OTU A ประกอบด้วยไอโซเลต KC50_G, KZT_7, KZO45_5, STS50_1, SROSL50_1, LJ45_2, KSII_1, KSII_2, KSII_3 และ KSII_4 กลุ่ม OTU B ประกอบด้วยไอโซเลต LJ50_2 และ KAO_P4 กลุ่ม OTU C ได้แก่ไอโซเลต SRO45_1 และ YTM5 กลุ่ม OTU D ประกอบด้วยไอโซเลต SROB45_5 กลุ่ม OTU E ประกอบด้วยไอโซเลต STW45_5 กลุ่ม OTU F ประกอบด้วยไอโซเลต STW60_3, KAO_P1, KAO_P2 และ KAO_P3 กลุ่ม OTU G ประกอบด้วยไอโซเลต KC45 กลุ่ม OTU H ประกอบด้วยไอโซเลต SROSL60_1 กลุ่ม OTU I ประกอบด้วยไอโซเลต KZO60_4 กลุ่ม OTU J ประกอบด้วยไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 และ กลุ่ม OTU K ประกอบด้วยไอโซเลต YTM4 (แสดงดังตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.9 การตัดจำเพาะ PCR product ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่เรียนรู้นทั้ง 27 ไอโซเลตด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I โดยเลนที่ 1=KC45, 2=KC50_G, 3=KZT_7, 4=KZO60_4, 5=KZO45_5, 6=STW60_3, 7=STW45_5, 8=STS50_1, 9=SROB45_5, 10=SROSL50_1, 11=SROSL60_1, 12=SRO45_1, 13=LJ_45, 14=LJ50_2, 16=YTM1, 17=YTM2, 18=YTM3, 19=YTM4, 20=YTM5, 21=KSII_1, 22=KSII_2, 23=KSII_3, 24=KSII_4, 25=KAO_P1, 26=KAO_P2, 27=KAO_P3, 28=KAO_P4, 15 และ 29 =100 bp DNA marker

อักษร A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K คือ กลุ่มของไอโซเลตที่ถูกจัดขึ้นโดยใช้เทคนิค PCR RFLP

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการจัดกลุ่มไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR-RFLP

กลุ่ม (OTUs)	ไอโซเลต	แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงมากที่สุด (% Similarity)
A	KSII_1, KC50_G, KZT_7, KZO45_5, STS50_1, SROSL50_1, LJ45_2, KSII_2, KSII_3 และ KSII_4	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)
B	KAO_P4 และ LJ50_2	<i>Tepidimonas arfidensis</i> (97%)
C	YTM5 และ SRO45_1	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (97%)
D	SROB45_5	<i>Caldimonas taiwanensis</i> (98%)
E	STW45_5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ ยังมีคุณภาพไม่ดีพอ
F	KAO_P2, STW60_3, KAO_P1 และ KAO_P3	<i>Caldimonas manganoxidans</i> (98%)
G	KC45	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ ยังมีคุณภาพไม่ดีพอ
H	SROSL60_1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (97%)
I	KZO60_4	<i>Anoxybacillus gonensis</i> (99%)
J	YTM2, YTM1 และ YTM3	<i>Thermus brockianus</i> (97%)
K	YTM4	เป็นเชื้อผสม

หมายเหตุ ไอโซเลตที่ทำตัวหนาเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ กำหนดให้อักษรสองตัวแรกในรหัสชื่อ บอกถึงแหล่งน้ำพุร้อนที่มาจากไอโซเลตต่างๆ โดยที่ KC=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน KZ=บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร SR=บ่อน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน (สุราษฎร์ธานี) LJ=บ่อน้ำพุร้อนลิ๊ะจิงกระ YT=บ่อน้ำพุร้อนตานะแมเราะ KS= บ่อน้ำพุร้อนโคกไทร KA=บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน และ ST=บ่อน้ำพุร้อนสมอทอง

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย 5 แหล่ง ซึ่งมีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 45-80 °C และ pH 7.7-8.0 ตามลำดับ สามารถแยกเชื้อที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต และจัดกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้ตามรูปแบบการตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ 11 กลุ่ม OTUs ตารางที่ 4.4 โดย OTU A ประกอบด้วย 10 ไอโซเลต คือ KSII_1, KC50_G, KZT_7, KZO45_5, STS50_1, SROSL50_1, LJ45_2, KSII_2,

KSII_3 และ KSII_4 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่ม (KSII_1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) แบคทีเรียชนิดนี้พบในน้ำพุร้อน บ้านน้ำพุร้อน น้ำพุร้อนโตะจังกระ น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อนโคกไทร น้ำพุร้อน 4 แหล่งนี้มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 45-57 °C ความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 7.7-8.0 OTU B ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต คือ KAO_P4 และ LJ50_2 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่ม (KAO_P4) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนโตะจังกระ และน้ำพุร้อนเขาชัยสน OTU C ประกอบด้วย 2 ไอโซเลต คือ YTM5 และ SRO45_1 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่ม (YTM5) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนโตะจังกระ และน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน OTU D ประกอบด้วยไอโซเลต SROB45_5 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Caldimonas taiwanensis* (98%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน OTU F ประกอบด้วย 4 ไอโซเลต คือ KAO_P2, STW60_3, KAO_P1 และ KAO_P3 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่ม (KAO_P2) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) พบการกระจายตัวของแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนเขาชัยสนเพียงแห่งเดียว OTU H ประกอบด้วยไอโซเลต SROSL60_1 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus stearothermophilus* (97%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน จังหวัดสุราษฎร์ธานี OTU I ประกอบด้วยไอโซเลต KZO60_4 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus gonensis* (99%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ ในน้ำพุร้อนโคกไทร และ OTU J ประกอบด้วย 3 ไอโซเลต คือ YTM2, YTM1 และ YTM3 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่ม (YTM2) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำพุร้อนตานะมะแระจังหวัดยะลา

4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม BLASTn

การศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ดำเนินการโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในแต่ละไอโซเลต แล้วนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*FI จัดกลุ่มไอโซเลตให้อยู่ในกลุ่ม OUT เดียวกันตามรูปแบบการตัดจำเพาะ แล้วส่งผลผลิต PCR ตัวแทนของแต่ละกลุ่ม OUT ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

(<http://www.ncbi.nlm.gov/>) แล้วระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลตมากที่สุด 3 อันดับแรกผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลต เปรียบเทียบกับ
ฐานข้อมูล GenBank

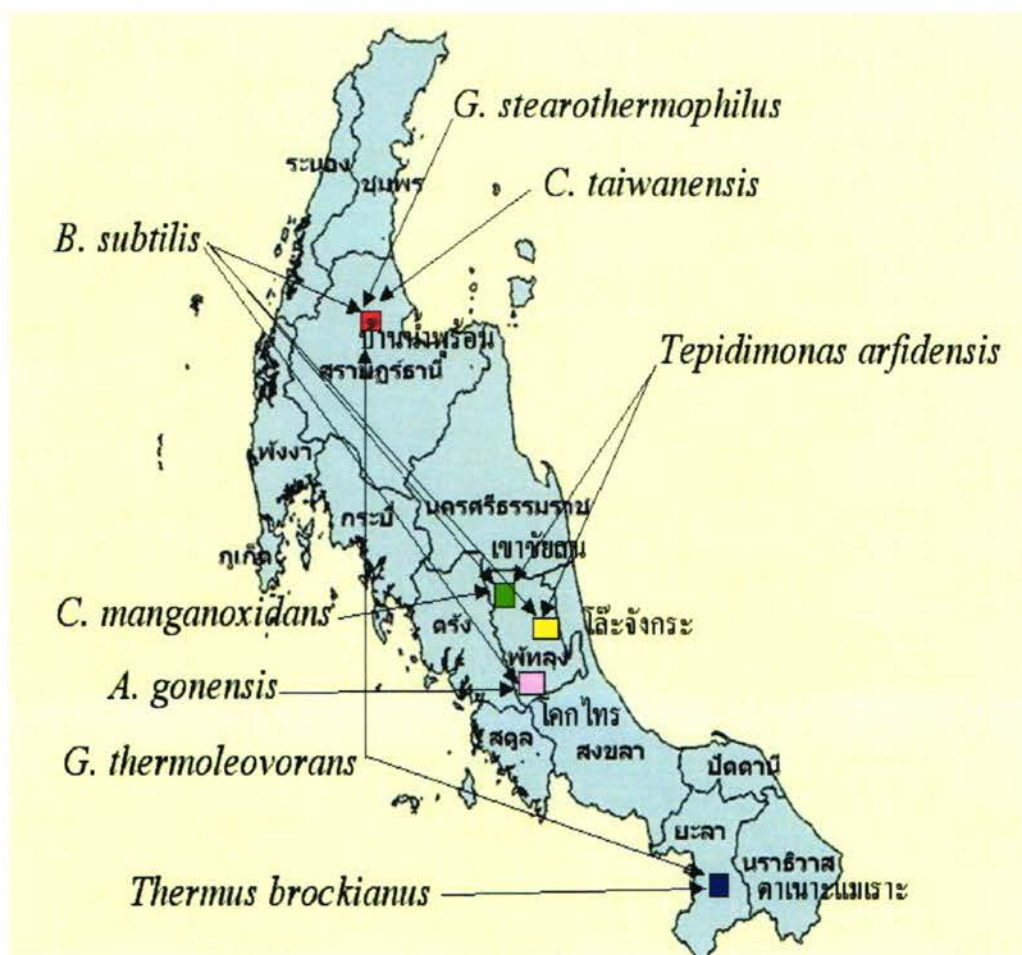
OTUs / ไอโซเลต	Accession number	แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ใกล้เคียงมากที่สุด	% Similarity	ความยาวลำดับเบส ที่ใช้เปรียบเทียบ
OTU A KSII_1	EU982528.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain 1245	99	513/517
	AB311020.1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	513/517
	KC921218.1	<i>Bacillus subtilis</i> CLBI-LB	99	513/517
OTU B KAO_P4	AY594193.1	<i>Tepidimonas arfidensis</i>	97	521/535
	NR109514.1	<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	97	521/535
	NR025755.1	<i>Tepidimonas aquatica</i>	95	501/526
OTU C YTM5	JN871595.1	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	97	541/555
	CP003125.1	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB US3	97	541/555
	CP002050.1	<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3	97	541/555
OTU D SROB45_5	AB682175.1	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	98	509/522
	AM283038.1	<i>Caldimonas hydrothermale</i>	98	509/522
	NR040787.1	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	98	509/522
OTU F KAO_P2	NR040787.1	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	98	552/561
	AB682175.1	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	98	552/561
	NR040787.1	<i>Caldimonas taiwanensis</i> On1	98	552/561

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลต เปรียบเทียบกับ
ฐานข้อมูล GenBank

OTUs / ไอโซเลต	Accession number	แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ใกล้เคียงมากที่สุด	% Similarity	ความยาวลำดับเบส ที่ใช้เปรียบเทียบ
OTU H SROSL60_1	AY491497.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	97	527/545
	KC252989.1	<i>G. stearothermophilus</i> strain Da7	97	526/545
	KC252988.1	<i>G. stearothermophilus</i> strain Da6	97	526/545
OTU I KZO60_4	AY248707.1	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A4	99	543/550
	KC895925.1	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	99	542/550
	KC310456.1	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A5	99	542/550
OTU J YTM2	NR036983.1	<i>Thermus brockianus</i>	97	520/537
	EU330195.1	<i>Thermus scotoductus</i>	92	496/538
	FR749951.1	<i>Thermus filiformis</i>	92	494/537
*YTM4	AB234284.1	Uncultured bacterium	80	109/205

ผลการวิเคราะห์ ยีน 16S rRNA ของ YTM4 โดยใช้โปรแกรม Blastn ที่ให้ค่า Similarity ก่อนข้างต่ำ
มากนี้ แท้จริงแล้วมีสาเหตุมาจาก YTM4 เป็นเชื้อที่ยังไม่บริสุทธิ์ ซึ่งยืนยันได้จาก Sequence trace
และผลการตัดจำเพาะ

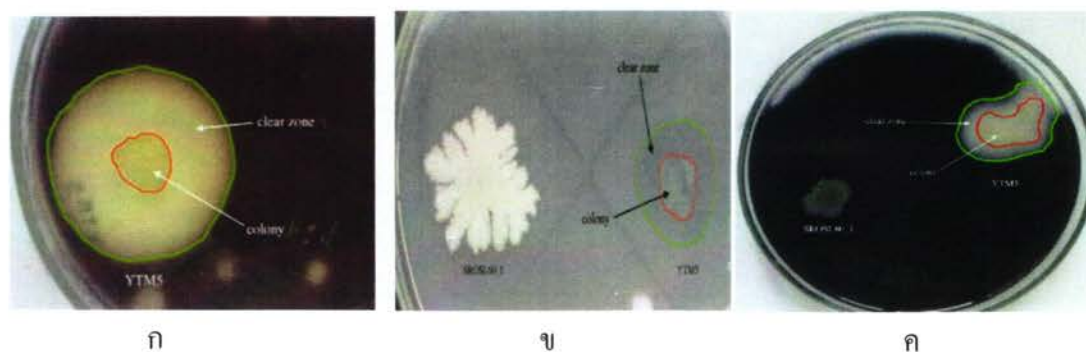
การกระจายตัวของแบคทีเรียที่แยกได้แสดงดังภาพที่ 4.10 *Bacillus subtilis* พบกระจาย
ตัวเป็นวงกว้าง พบในน้ำพุร้อน 4 แห่งที่ศึกษาแต่ไม่พบ *B. subtilis* ในบ่อน้ำพุร้อนตานะเมะเราะ
น้ำพุร้อนบ่อนี้มีอุณหภูมิ 80 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงอาจจะสูงเกินที่ *B. subtilis* จะสามารถ
เจริญได้ ส่วน *Thermus brockianus* จะพบที่น้ำพุร้อนตานะเมะเราะเท่านั้น ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้
สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 70-75 °C สอดคล้องกับอุณหภูมิของน้ำในแหล่ง
ตัวอย่างน้ำพุร้อนที่พบจำนวนชนิดของแบคทีเรียมากที่สุดคือ น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน ซึ่งพบ
Bacillus subtilis, *Caldimonas taiwanensis*, *Geobacillus stearothermophilus* และ *Geobacillus*
thermoleovorans



ภาพที่ 4.10 การกระจายตัวของแบคทีเรียในน้ำพุร้อนทั้ง 5 แหล่ง

4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อน

การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase, lipase และ amylase ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถตรวจสอบได้ ดังนี้ เอนไซม์ cellulase เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร CMC agar ราบสารละลาย iodine ลงบนอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้จะมี clear zone รอบโคโลนียดังภาพที่ 4.11 ก ส่วนการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tributyrin agar เมื่อแบคทีเรียเจริญ ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้จะมี clear zone รอบโคโลนียดังภาพที่ 4.11 ข และการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ amylase ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตบนอาหาร starch agar แล้วรดด้วยสารละลาย iodine ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้จะมี clear zone รอบโคโลนียดังภาพที่ 4.11 ค



ภาพที่ 4.11 ตัวอย่างผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ด้วยวิธี plate method (ก) แบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร CMC agar เพื่อทดสอบเอนไซม์ cellulase (ข) แบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร tributyrin agar เพื่อทดสอบเอนไซม์ lipase (ค) แบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร starch agar เพื่อทดสอบเอนไซม์ amylase (ภาคผนวก ก)

ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแต่ละไอโซเลต จะรายงานเป็นค่า Extracellular enzyme production ratios (EPR) คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย ซึ่งประสิทธิภาพของการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดของไอโซเลตต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.6

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ amylase ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนพบว่า มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้ คือ ไอโซเลต YTM5 และ SRO45_1 ซึ่งมีค่า EPR เท่ากับ 1.25 และ 1.36 ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase พบว่า ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้แก่ KSII_1, KSII_3, KSII_4, SRO45_1, STS50_1, STW45_5, KC50_G, KC45_C, KZO45_5, KZT50_7, LJ45_2, LJ50_2 และ YTM5 ไอโซเลตที่มีค่า EPR มากที่สุดคือ KC 45 (EPR=5.46) รองลงมาคือ ไอโซเลต YTM5 (EPR=4.12)

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase พบว่าไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้คือ ไอโซเลต KSII_1, KSII_3, KSII_4, SRO45_1, SROSL60_1, SROB45_5, STS50_1, STW45_5, KC50_G, KC45_C, KZO45_5, KZT50_7, LJ45_2, LJ50_2, KZO60_4, KAO_P1 และ YTM5 ไอโซเลตที่มีค่า EPR มากที่สุดคือ YTM5 (EPR=3.33)

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

ไอโซเลต	ค่า EPR (Enzyme production ratios)		
	amylase	cellulase	lipase
KSII_1	-	1.24	1.37
KSII_3	-	1.62	1.18
KSII_4	-	1.39	1.27
SRO45_1	1.36	1.95	1.53
SROSL60_1	-	-	1.69
SROB45_5	-	-	1.26
STS50_1	-	2.12	1.23
STW45_5	-	2.93	1.43
KC50_G	-	1.24	1.37
KC45_C	-	5.46	1.94
KZO45_5	-	1.76	1.73
KZO60_4	-	-	1.50
KZT50_7	-	1.46	1.21
KA0_P1	-	-	1.33
LJ45_2	-	1.43	1.20
LJ50_2	-	1.08	1.65
YTMS	1.25	4.12	3.33

หมายเหตุ - คือ ไม่มี clear zone

4.7 การทดสอบการทนอุณหภูมิ 110 °C ของแบคทีเรียไอโซเลต SROSL60_1

เนื่องจากไอโซเลต SROSL60_1 มีผลการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA แล้วเทียบเคียงได้กับ *Geobacillus stearothermophilus* (97%) และมีรายงานการใช้ *G. stearothermophilus* เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเพราะสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 110 °C จึงต้องการทดสอบว่าไอโซเลต SROSL60_1 มีความสามารถดังกล่าวหรือไม่ ผลการทดสอบความสามารถทนอุณหภูมิของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 110 °C พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต SROSL60_1 ไม่สามารถทนอุณหภูมิ

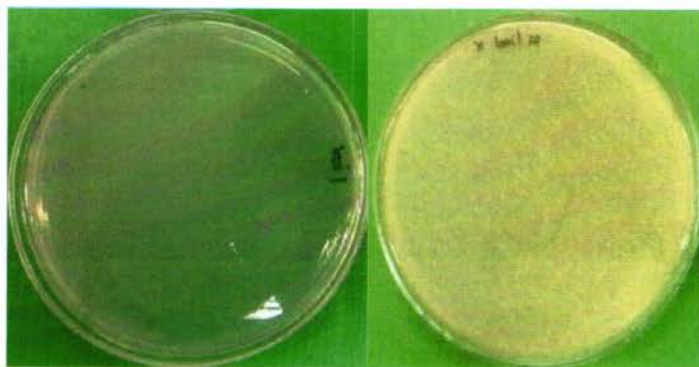
110 °C ได้ แต่สามารถทนต่อการต้มในน้ำเดือด (99 °C) เป็นเวลา 20 นาทีได้ เนื่องจากหลังการต้มเดือด 20 นาที เชื้อยังมีชีวิตรอดและสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 45 °C ได้ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่บ่มที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

การเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 หลังการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ					
ต้มเดือด (99 °C) 20 นาที		Autoclave ที่ 110 °C 20 นาที		Autoclave ที่ 121 °C 20 นาที	
ชุดควบคุม	ชุดที่เติมเชื้อ	ชุดควบคุม	ชุดที่เติมเชื้อ	ชุดควบคุม	ชุดที่เติมเชื้อ
-	+	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ + คือ มีการเจริญของเชื้อ

- คือ ไม่มีการเจริญ

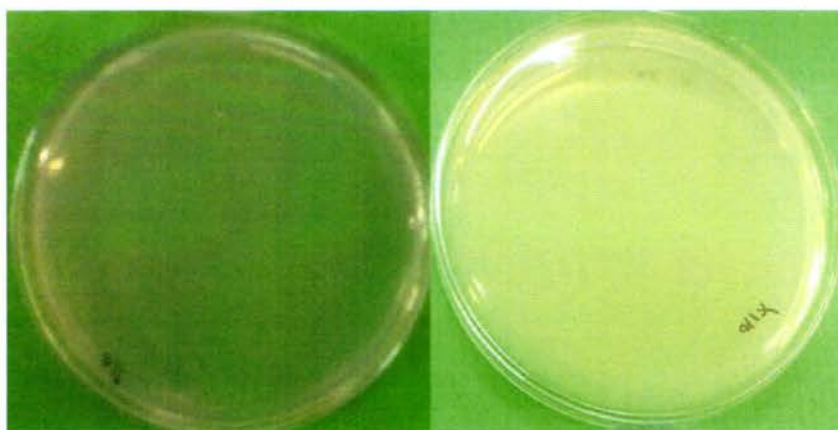


ก

ข

ภาพที่ 4.12 ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการต้มเดือด 20 นาที

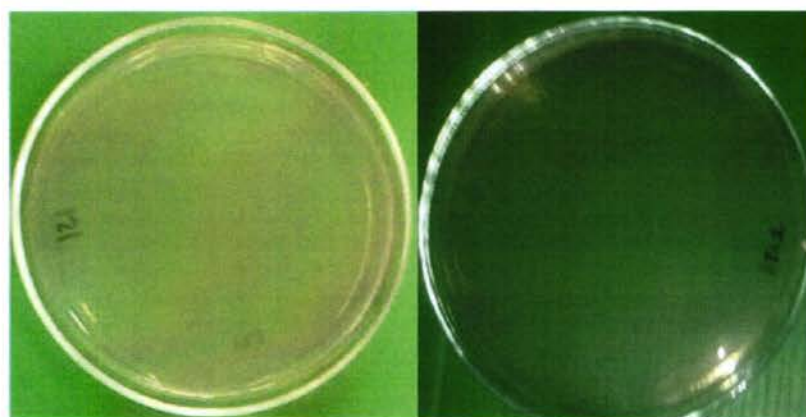
(ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่เติมเชื้อไอโซเลต SROSL60_1



ก

ข

ภาพที่ 4.13 ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการ Autoclave ที่ 110 °C 20 นาที (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่เติมเชื้อไอโซเลต SROSL60_1



ก

ข

ภาพที่ 4.14 ผลการเจริญของไอโซเลต SROSL60_1 ที่ 45 °C 24 ชั่วโมง หลังการ Autoclave ที่ 121 °C 20 นาที (ก) ชุดควบคุม (ข) ชุดที่เติมเชื้อไอโซเลต SROSL60_1

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล อภิปรายผล

ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำพุร้อน 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำพุร้อน ตาเนาะแมเราะ น้ำพุร้อนเขาชัยสน น้ำพุร้อนบ้านน้ำพุร้อน น้ำพุร้อนโตะจังกระ และน้ำพุร้อนโคกไทร พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต คือ KC50_G, KZT_7, KZO45_5, SROSL50_1, LJ45_2, KSII_1, SRTBF45_1, KSII_2, KSII_3, KSII_4, LJ50_2, KAO_P4, SRO45_1, YTM5, SROB45_5, STW45_5, STW60_3, KAO_P1, KAO_P2, KAO_P3, KC45, SROSL60_1, KZO60_4, YTM1, YTM2, YTM3 และ YTM4 สามารถจัดกลุ่ม OTUs เชื้อทั้งหมด 27 ไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในการวิเคราะห์ชิ้น 16S rRNA ได้เป็น 11 OTUs ตามรูปแบบการตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I คือ กลุ่ม OTUs A, B, C, D, E, F, G, H, I, J และ K โดย OTU A ประกอบด้วยไอโซเลต KC50_G, KZT_7, KZO45_5, STS50_1, SROSL50_1, LJ45_2, KSII_1, KSII_2, KSII_3 และ KSII_4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KSII_1 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) กลุ่ม OTU B ประกอบด้วย ไอโซเลต LJ50_2 และ KAO_P4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KAO_P4 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มมีความใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%) กลุ่ม OTU C ประกอบด้วยไอโซเลต SRO45_1 และ YTM5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ YTM5 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มมีความใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (97%) กลุ่ม OTU D ประกอบด้วยไอโซเลต SROB45_5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SROB45_5 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas taiwanensis* (98%) กลุ่ม OTU E และ G ประกอบด้วย STW45_5 และ KC50 ตามลำดับ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ยังมีคุณภาพไม่ดีพอที่จะเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลได้จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ชนิดใดในฐานข้อมูล ส่วนกลุ่ม OTU F ประกอบด้วยไอโซเลต KAO_P1, KAO_P2, KAO_P3 และ STW60_3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KAO_P2 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มมีความใกล้เคียงกับ *Caldimona manganoxidans* (98%) กลุ่ม OTU H ประกอบด้วยไอโซเลต SROSL60_1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี ความใกล้เคียงกับ *Geobacillus stearothermophilus* (97%), กลุ่ม OTU I ประกอบด้วยไอโซเลต

KZO60_4 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus gonensis* strain A4 (99%) กลุ่ม OTU J ประกอบด้วยไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ YTM2 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มมีความใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) ส่วนกลุ่ม OTU K ประกอบด้วยไอโซเลต YTM4 ซึ่งยังคงเป็นเชื้อผสม

ตัวแทนกลุ่ม OTU A คือ KSII_1 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) แบคทีเรียชนิดนี้พบในบ่อน้ำพุร้อนโถะจังกระ เขาชัยสน โคกไทร และบ่อน้ำพุร้อนสุราษฎร์ธานี แต่ไม่พบ *B. subtilis* ในบ่อน้ำพุร้อนตานะแมเราะ การใช้ประโยชน์จาก *B. subtilis* นั้นมีรายงานการนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD 3-1 มาใช้เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ โดยผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จที่มีรูปแบบเป็นแกรนูลละลายน้ำสำหรับพ่น พบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPDD 3-1 มีผลยับยั้งเส้นใยเชื้อรา และให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ (วานิด รอดเนียม, 2552) ส่วนเกตุการ ดาจินทา (2553) ใช้ *B. subtilis* TN51 ในการผลิตถั่วเน่าแล้วพบว่า ถั่วเน่าที่หมักจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ มีลักษณะพิเศษคือ มีเมือกเหนียวและมีกลิ่นหอม ปราศจากกลิ่นเหม็นของแอมโมเนีย มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม โดยมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด และกรดอะมิโนที่จำเป็นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Dagmar et al., 2001 ใช้ *B. subtilis* DSM675 เป็นจุลินทรีย์ควบคุมที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของการทำให้ปลอดเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียนี้สามารถสร้างสปอร์ที่สามารถทนต่อสภาพร้อนแห้ง และต้านทานต่อ Ethylene oxide ส่วนตัวแทนกลุ่ม OTU B (KAO_P4) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถังน้ำร้อน (hot water tank) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50 °C pH 7.5-8 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น (short-rod) ขนาด 0.5-1.0 $\mu\text{m} \times 1.0-2.0 \mu\text{m}$ ดิคส์แกรมลบ เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้เพราะมี polar flagella (Mariana et al., 2003) ตัวแทนกลุ่ม OTU C (YTM5) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (97%) Muhammad et al., 2011 แยกแบคทีเรียชนิดนี้จากน้ำพุร้อนในประเทศปากีสถาน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 °C เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) ดิคส์แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) รูปร่างรี เซลล์มักอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นสายสั้นๆ สามารถเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria หรือ facultative anaerobic bacteria) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 37-75°C และเจริญได้ในช่วง pH 6.0-8.5 (Nazina et al., 2001; Muhammad et al., 2011) ตัวแทนกลุ่ม OTUs E และ G ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ยังมีคุณภาพไม่ดีพอที่จะเปรียบเทียบกับ

ฐานข้อมูลได้ ตัวแทนกลุ่ม OTU F คือไอโซเลต KAO_P2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxydans* (99%) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญแยกได้จากน้ำพุร้อน เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง (rod) ขนาดเฉลี่ย $0.6 \times 2.6 \mu\text{m}$ เซลล์ติดสีแกรมบวก เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 50°C และ pH 8.0-9.0 สามารถเคลื่อนที่ได้ และแบคทีเรียชนิดนี้สามารถ ออกซิไดซ์แมงกานีส (manganese) ได้ (Minoru et al., 2002) ตัวแทนกลุ่ม OTU H คือไอโซเลต SROSL60_1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus stearothermophilus* (97%) เป็นเชื้อที่แยกได้จากข้าวโพด กระป๋องที่เน่าเสีย เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ หรือต้องการอากาศในการเจริญเล็กน้อย เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งขนาดใหญ่อยู่เดี่ยวๆ ขนาด $0.8\text{-}3.5 \mu\text{m}$ เซลล์ติดสีแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50°C (Donk and Bacteriol, 1920) ตัวแทนกลุ่ม OTU I คือ KZO60_4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus gonensis* strain A4 เป็นแบคทีเรียพวกที่ต้องการอากาศ ในการเจริญเพียงเล็กน้อย แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำจากน้ำพุร้อน เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง ติดสี แกรมบวก สามารถสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ $55\text{-}60^\circ\text{C}$ (Ali et al., 2003) ตัวแทนกลุ่ม OTU J คือไอโซเลต YTM2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีที่ 70°C (Ralph et al., 1995) ได้มีการทดลองใช้ *Thermus brockianus* ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Vicki et al., 2003) จากการศึกษาได้เอนไซม์อะไมเลสที่ทนความร้อน และ pH สูง กว่าเอนไซม์อะไมเลสตัวอื่นๆ ที่เคยมีการตีพิมพ์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ใน อุตสาหกรรมสิ่งทอและ ตัวแทนกลุ่ม OTU K คือ YTM4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ Uncultured bacterium ทั้งนี้ค่า 80% Similarity ที่ค่อนข้างต่ำมากนี้ ไม่ได้แสดงว่า YTM4 เป็นสปีชีส์ ใหม่แต่อย่างใด หากแต่ข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกชัดเจนว่า YTM4 เป็นเชื้อผสม เนื่องจากดีเอ็นเอแม่แบบ ที่สกัดได้น่าจะเป็นดีเอ็นเอผสมที่มาจากเชื้อมากกว่าหนึ่งสปีชีส์ ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจาก Sequence trace ที่มีหลาย Peak ในตำแหน่งเดียวกัน (ไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้)

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อตัวแทนกลุ่มแต่ละ OTUs ให้ สมบูรณ์ เพื่อให้ได้ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลตตัวแทนกลุ่ม ที่น่าเชื่อถือ มากขึ้น

จากรายงานผลการวิจัยของ Sheu et al. 2009 พบว่า *Caldimonas taiwanensis* สามารถ สะสม Polyhydroxybutyrate (PHB) ไว้ในเซลล์ได้จากการใช้ gluconate, fructose, maltose และ glycerol ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด ซึ่ง PHB นี้มีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกันกับ

เทอร์โมพลาสติก สามารถนำมาทำเป็นฟิล์มห่อของ เส้นใยและแผ่น หรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่างๆ ได้ ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการเพิ่มขึ้นของขยะพลาสติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KAO_P2 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *C. taiwanensis* (98%) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาว่า ไอโซเลต KAO_P2 สามารถที่จะสะสม PHB ไว้ในเซลล์ได้หรือไม่

แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อน 2 ไอโซเลต คือ YTM5 และ SRO45_1 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งสามชนิดคือ amylase, cellulase และ lipase จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ไปศึกษาศักยภาพในการเป็นหัวเชื้อปุ๋ยหมัก โดยศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเศษอาหารจากครัวเรือน (ซึ่งมักมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักและมีไขมันปะปนอยู่ด้วย) และเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว หญ้า ใบไม้ เปลือกผลไม้ และกิ่งไม้ ที่มี cellulose เป็นองค์ประกอบหลัก หาก YTM5 และ SRO45_1 สามารถย่อยสลายเศษขยะเหล่านี้ได้อย่างรวดเร็ว ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรรมในประเทศไทยซึ่งมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมากมหาศาลที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำปุ๋ยอินทรีย์ และจะเป็นคำตอบในการแก้ปัญหาปริมาณขยะเกินความสามารถในการกำจัด ที่ชุมชนเมืองขนาดใหญ่กำลังเผชิญอยู่ในสภาวะปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- เกตุการ ดาจินทา. การผลิตถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาคุฎิบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2553.
- ประวิทย์ พิทักษ์วาปี. นิเวศวิทยาของสาหร่ายบริเวณน้ำพุร้อนบ้านโป่งส่อม อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2533.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณ พินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
- นันทนา อรุณฤกษ์. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบ. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2549.
- วรรณภา จำราช. คุณลักษณะทางเคมีแหล่งน้ำพุร้อนในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมทรัพยากรธรณี, 2546.
- วานิด รอดเนียม. การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria lengipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.
- สุริยภา เทวิน. การจำแนกชนิดและลักษณะของยีนของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำลายแม่และลูกด้วยเทคนิค 16S rRNA RFLP-PCR และ AP-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2550.
- Adiguzel A, and et al. "Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey", Microbiological Methods. 79: 321-328, 2009.
- Ahmad A, Van N. "Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars", International journal of hydrogen energy. 34: 4524-4528, 2009
- Ali O, Sabriye D and Zihni D. "Anoxybacillus gonensis sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium", Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1315-1320, 2003
- Altschul SF, and et al. "Basic local alignment search tool", Mol Biol. 215(3):403-10, 1990

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Dagmar F and Rudiger P. "Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*", Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 35-37, 2001.
- Gillian CB, and et al. "Bacterial community analysis of Indonesian hot springs", FEMS Microbiology Letters. 200: 103-109, 2001
- Koskinen PEP., Beck SR, and Puhakka JA. "Ethanol and Hydrogen Production by Two Thermophilic, Anaerobic Bacteria Isolated From Icelandic Geothermal Areas", Biotechnology and Bioengineering. 101: 679-690, 2007.
- Kublanov I V. and et al., "Biodiversity of Thermophilic Prokaryotes with Hydrolytic Activities in Hot Springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia)", Applied and Enviromental Microbiology. 105: 286-291, 2009.
- Haouari O, and et al., "*Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring", Systematic and Applied Microbiology. 31: 38-42, 2008.
- Mariana F, and et al., "*Tepidimonas aquatica* sp. nov., A New Slightly Thermophilic β -Proteobacterium Isolated from a Hot Water Tank", Systematic and Evolutionary Microbiology. 26: 376-381, 2003.
- Minoru T, and et al., "*Caldimonas manganoxidans* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate) degrading, manganese-oxidizing thermophile", Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 895-900, 2002.
- Nazina T, and et al., "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 433-446, 2001.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- O-Tong S, Prasertsan P, Birkeland N. "Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis", Bioresource Technology. 100: 909-918, 2009.
- Ralpa A, and et al. "DNA Relatedness of *Thermus* Strains, Description of *Thermus brockianus* sp. nov., and Proposal To Reestablish *Thermus thermophilus*", International Journal of Systematic Bacteriology. 45: 495-499, 1995.
- Sato T, and et al., "Identification of mutants streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes", Oral Microbiol Immunol. 18(5): 323-326, 2003.
- Shang-Kai T, and et al., "Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater", Extremophiles. 8: 345-349, 2004.
- Temmerman R, Huys G and Swings J. "Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent method", Trends Food Sci & Tech. 15(7-8): 348-359, 2004.
- Vict TJ, and et al. "Microbiology and geochemistry of Little Hot Creek, a hot spring environment in the Long Valley Caldera", Geobiology. 8: 148-154, 2010.
- Vicki, S., Kastli, D., and William A. "Purification and Characterization of a Novel Thermo Alkali-Stable Catalase from *Thermus brockianus*", Biotechnol. Prog. 19: 1292-1299, 2003.
- Wen-Ming, C., and et al. "*Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring", Systematic and Applied Microbiology. 28: 415-420, 2005.
- Yasser, R., and Ahmed A. "Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*", Microbiological Research. 163: 13-20, 2008
- Zhao c., Karakashev D., and Wenjing L. "Xylose fermentation to biofuels (hydrogen and ethanol) by extreme thermophilic (70 °C) mixed culture", International Journal of Hydrogen Energy. 35: 3415-3422, 2010.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารเคมี

การเตรียม 0.5x Nutrient agar ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

peptone	2.5 g
meat extract	1.5 g
agar	15 g

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนจนละลายหมด บรรจุใส่ขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C 20 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม 0.5x Nutrient broth ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

peptone	2.5 g
meat extract	1.5 g

ผสมให้เข้ากันจนละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C 20 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม Tributyrin agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

peptone	5.0 g
yeast extract	3.0 g
agar	15 g
tributyrin	10 ml

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C 20 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม CMC agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

peptone	0.5 g
yeast extract	0.1 g
agar	15 g
carboxymethylcellulose	5 g

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C 20 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม Soluble starch agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

peptone	0.5 g
yeast extract	0.1 g
soluble starch	20 g
agar	15 g

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C 20 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารละลาย iodine ใน potassium iodide (KI)

ประกอบด้วย iodine 1 g, potassium iodide (KI) 2 g และน้ำกลั่น 300 ml เตรียมโดยผสมคลุกเคล้า iodine และ potassium iodide ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น

การเตรียม 20% SDS (Sodium dodecyl sulfate)

ละลาย SDS 200 g ในน้ำกลั่น 900 ml นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 68 °C คนให้ละลายดี แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 5 M NaCl

ละลาย NaCl 292 g ในน้ำกลั่น 800 ml คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 ml บรรจุใส่ขวดแล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อ เก็บสารละลาย NaCl ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม CTAB/NaCl 200 ml

NaCl	16.36 g
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	4 g
2M Tris-HCL (pH8.0)	10 ml
0.5M EDTA	8 ml
PVP-40	2 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 200 ml

การเตรียม 20 mg/ml Proteinase K

ละลายผง Proteinase K ที่ต้องการเตรียมความเข้มข้น 20 mg/ml ใน 50 mM Tris (pH 8.0) และ 1.5 mM calcium acetate ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ eppendorf เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอการใช้งาน

การเตรียม 10mg/ml Dnase free RNase

ละลายผง lysozyme ที่ต้องการเตรียมความเข้มข้น 10 mg/ml ใน 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) ผสมให้เข้ากันก่อนใช้ ต้องมั่นใจว่าสารละลาย Tris มี pH 8.0 เพราะ lysozyme จะมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 8.0

การเตรียม 1 mg/ml RNase

ละลาย pancreatic RNase I 2 mg ใน 2 ml TE buffer (pH 7.6) เก็บไว้ที่ -20°C

การเตรียม TAE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 50x TAE buffer (stock solution) 20 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

การเตรียม 10X Loading buffer เตรียม 10 ml

bromophenol blue	0.025 g
xylene cyanol	0.025 g
10% (w/v) SDS	500 μl
0.5M EDTA	200 μl

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 10 ml

การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 1 ลิตร

ชั่ง EDTA $\cdot$ 2H₂O 186.1 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้เป็น 8 ด้วย NaOH ประมาณ 20 g ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร (EDTA จะไม่ละลายจนกว่าสารละลายจะมี pH ประมาณ 8) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียม 1M Tris-HCl (pH 8.0) 250 ml

ละลาย Tris-base 30.275 g ในน้ำกลั่น 250 ml ปรับ pH ให้เป็น 8 ด้วย HCl ประมาณ 10.5 ml ปล่อยให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียม TE buffer (pH 8.0) ประกอบด้วย

1 mM EDTA (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

เตรียม TE buffer ปริมาตร 100 ml

1 M EDTA (pH 8.0) 100 μ l

1 M Tris-base 1 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

การเตรียม 10 mg/ml Ethidium Bromide

ละลาย Ethidium Bromide 1g ในน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายเก็บในขวดสีชาห่อด้วย aluminum foil แล้วเก็บไว้ในที่มืดไม่ให้โดนแสง

การเตรียม 50x TAE buffer (stock solution) ปริมาตร 1 ลิตร

ละลาย Tris-base 242 g ในน้ำกลั่น 500 ml เติม 57.1 ml glacial acetic acid และ 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวกสิโหดของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต KAO_P2

GTCCTTCGGGATGCCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCATCGGAAC
GTACCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGACCTG
AGGGTGAAAGCGGGGGACCGCAAGGCCTCGCGCGATTTGGAGCGGCCGATGTCGGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG
GACGGCCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTGGACAAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGA
AGGCCTTCGGGTGTAAACCGCTTTTGTAGGGAANAAAAGCTCTGGGCTAATACCTC
GGAGTGATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCG
GTTGGTGCCAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTTACCTGGGGAACCTTGCAAT

ไอโซเลต KAO_P4

GCCTCAGTCACGGTACAGGCCTTCGGGTGCTGACGAGTGGCGAACGGGTG
AGTAATGCATCGGAACGTGCCCAGAGGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAA
TACCGCATGTGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCAAGCAGCAATGTTTGGNCCTCG
CGCCCTTTGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAA
GCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAAGCC
TGATCCACAATTGCCGCGTGCGGGAAAGAAGGCCTTCGGGTTTGTAAACCGCTTTTGT
ACGGAACGAAAAGGCTCTGGCTTATTCTGGGGCTGATGACGGTACCGTAAGAATAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCGAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGCGGTCT

ไอโซเลต YTM2

AGACTGCAGTCGGGCGGGCACGGGGTTTTACTCTGTGGTCAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACGCGTGGGTGACTACCCGGAAGTGTCGGGACAACCCGGGGAAACTCG
GGCTAATCCCGCATGTGGTCATGTCCTGTGGGGCATGATTAAAGGGCCGAGTGGTCTG
CTTCCGGATGGGCCCCGCTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGC

GACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGG
 CCCCCTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGAC
 GGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTTCGGGGTGTAACCTCCTGAACTGGGGA
 CGAAAGCCCATGATGAGGGGGATGACGGTACCCAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTA
 AGGGCGTTAGCGGCATTGGGGCGT

ไฮโซเลต SROSI60_1

AGTCGNAGCGGACGAATCAGGAGCTTGCTCTGTATTGGGTCAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTTCGGGAAACCG
 GAGCTAATACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGCGGCCTTTG
 GCTGTCCTTGCGGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACAGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAAGACTCCTACGGGAGGCAGCAAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCG
 AAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCT
 GTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAACAAGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACG
 AGAAAGCCCCGGCTAACTACGTTGCCGCCGCCGCGGTTAATACCGTAGGGGCGAGCG
 TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGC

ไฮโซเลต KSII_1

CAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
 TAACACGTGGGTACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAACCGGGGCTAAT
 ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACT
 TACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA
 CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG
 AACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACG

GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGT

ไอโซเลต YTM5

TAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAGATCGGAGCTTGCTCTGGTTTGGTCA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCGAAGACCGGGATAACTCCG
GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGG
CGGCCTTTTTGGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTCTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
GTAACCTCACGAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTNCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAA
GGGG

ไอโซเลต KZO60_4

ATACATGCAAGTCGAGCGGACGATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGC
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAAACGGGGATAACACCGAG
AAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGCCGCATGGTCTTTCGTTGAAAGGCG
GCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGANAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGCAGTCACTGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA
CGAGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCCAGCGGTTCC

SROB45_1

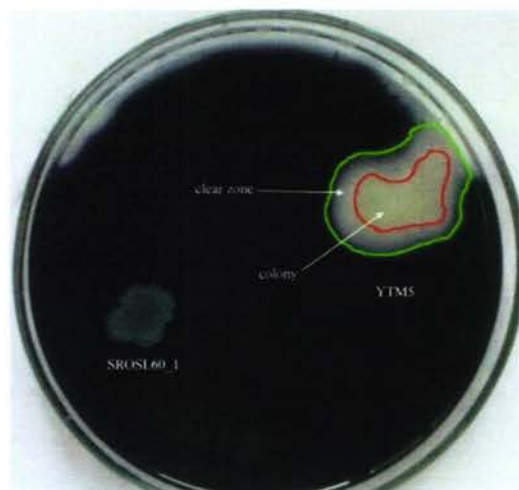
CTTTACACATGCAAGTCCGAACGGCAGCGGGTCCTTCGGGATGCCGGCGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTACCCAGTCGTGGGGGATAACTACTC
GAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGCAAGCC
TCNCGCCATTGGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTTTA
CCCAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAG
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGTC
AGGGAAGAAAAGCTCTGGGCTTAATACCTCGGGGTGATGACGGTACCTGAAGAATAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGGTGCGAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGC

ไฮโซเลด YTM4

TATACTTGCAAGTCGATGCGGACCTGGATCGGCAGACCTCTGCTCTGGTTT
GGTCTAGACGTGCGCGCACGTGGTGTAGNCTATACACCGNTGGAGCTANGCCTGCCC
GCCACAGGACCGAGGACTAACTCCGGGTCACACACCGGGATCTACACTCACCGGCAA
TAAGCACCGAGAGAACCGCATGGCTCTTTGNGGTTTGAACAGGGCNGCCTTCTGGGC
TTGCTCACTTGCTGGATGGGTCCCGGCTGCGCGATTGAGCTAGTTGGTGAGGTAATCG
GCTCATCCTAGAAAGGACGACTGATGCCGTAGACCGGGCCTGAGTANGGTGACCGGCC
ACACTTGGGACGTGAGACACGGCCCAGAAATCCCTACNNGGAGGCAGCAATAGGGA
ATCTTCCNCAATGGGCGAAAGCCTGAAGGACCGACGCCGNGTGAGCGAATGAAGGCC
TTCGGGTACGTACCCAGCTCTGTGTGTGCANGGACGAACCGAGCGCACGTAA

ภาคผนวก ก
ภาพผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ amylase, cellulase และ lipase
ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต

1. เอนไซม์ amylase

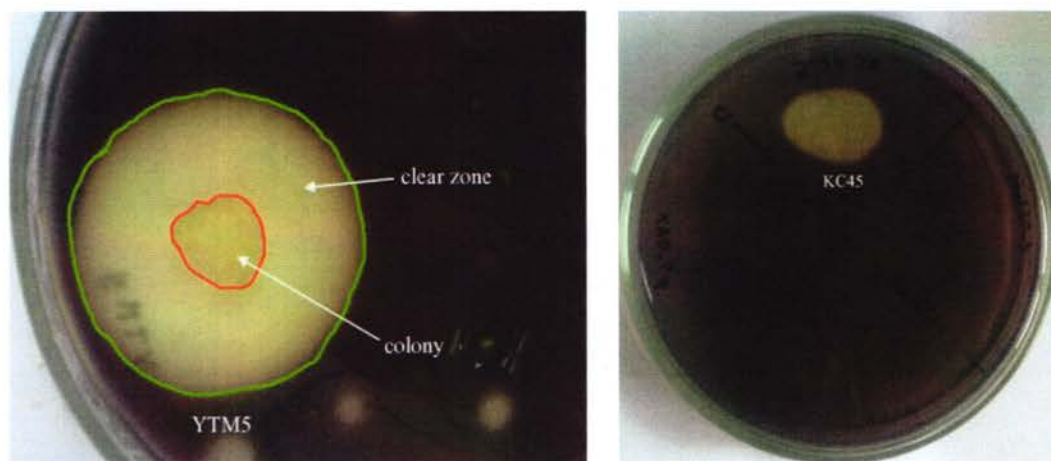


ภาพที่ ค 1 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ amylase ไอโซเลต YTM5 ซึ่งให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone ชัดเจน ส่วนไอโซเลต SROSL60_1 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้

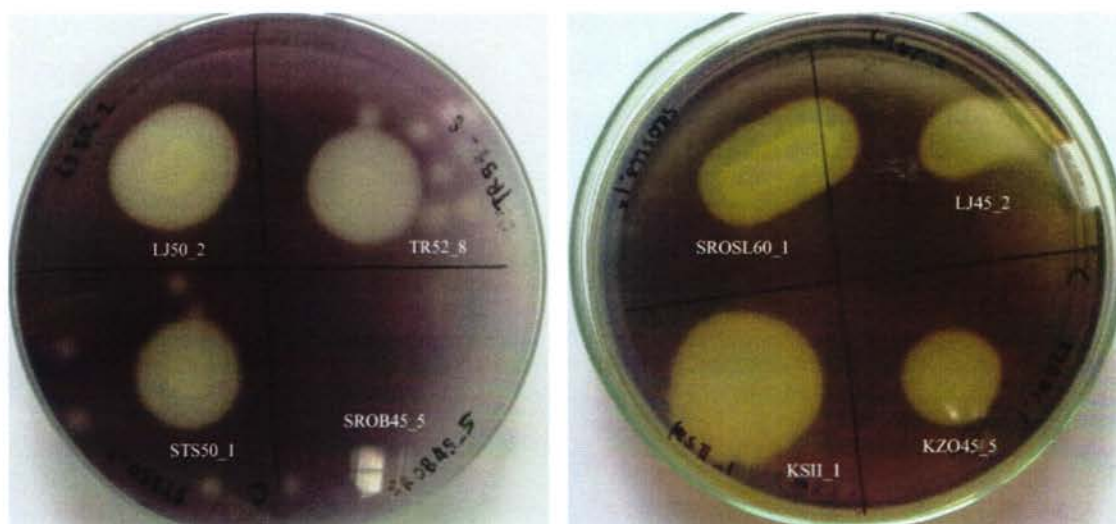


ภาพที่ ค 2 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ amylase ไอโซเลต SRO45_1 ซึ่งให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone ชัดเจน ส่วนไอโซเลต KSII_4, KSII_3 และ STW45_5 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase ได้

2. เอนไซม์ cellulase

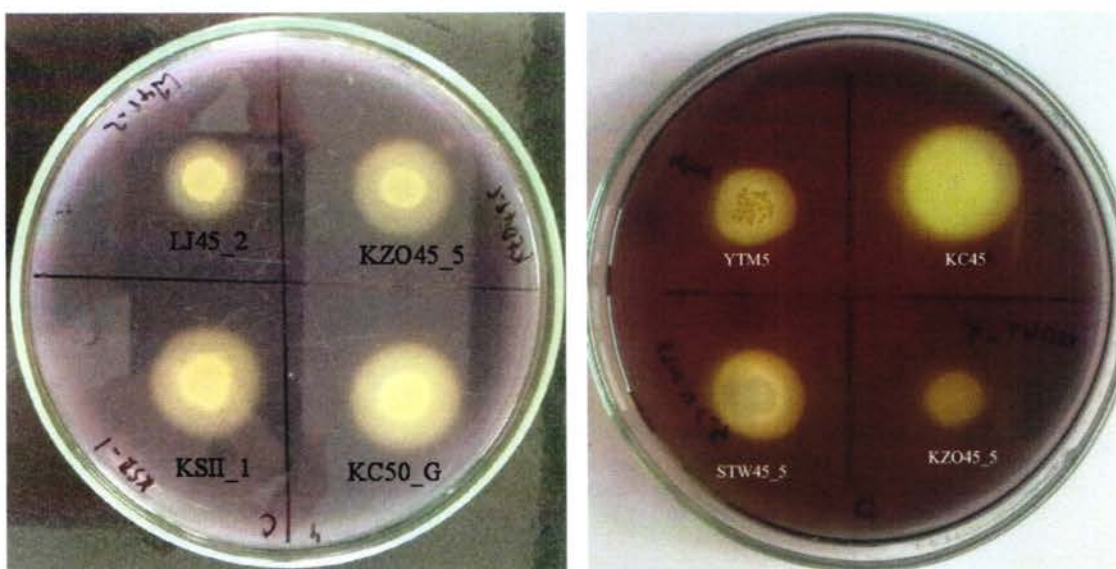


ภาพที่ ค 3 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ไอโซเลต YTM5 และ KC45 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone ได้ชัดเจน



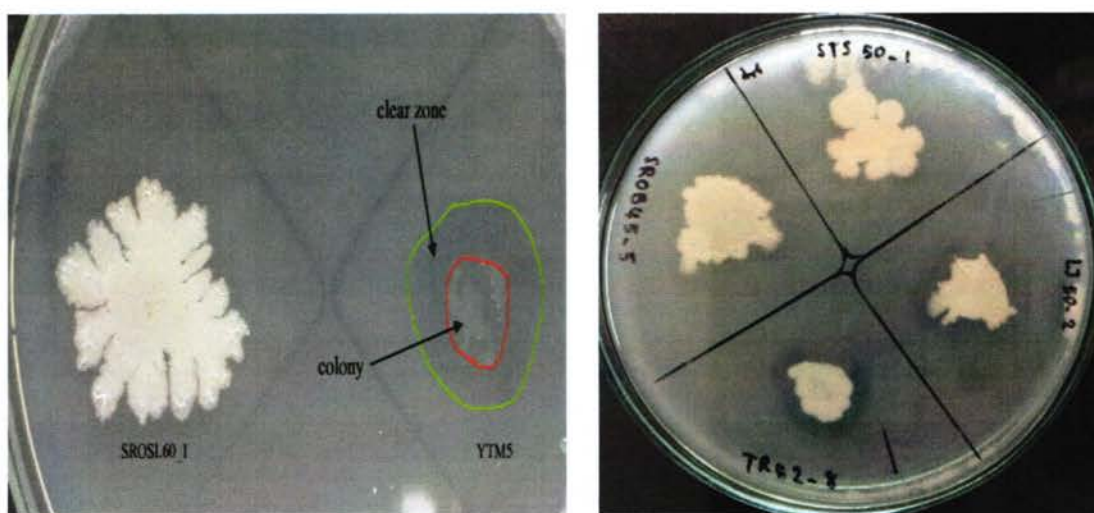
ภาพที่ ค 4 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ไอโซเลต LJ50_2, TR52_8, STS50_1, SROSL60_1, LJ45_2 และ KSII_1 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone ได้ชัดเจน ส่วนไอโซล SROB45_5 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้

หมายเหตุ ไอโซเลตที่ปรากฏชื่อมากกว่า 1 ครั้ง เป็นผลการทดลองซ้ำ

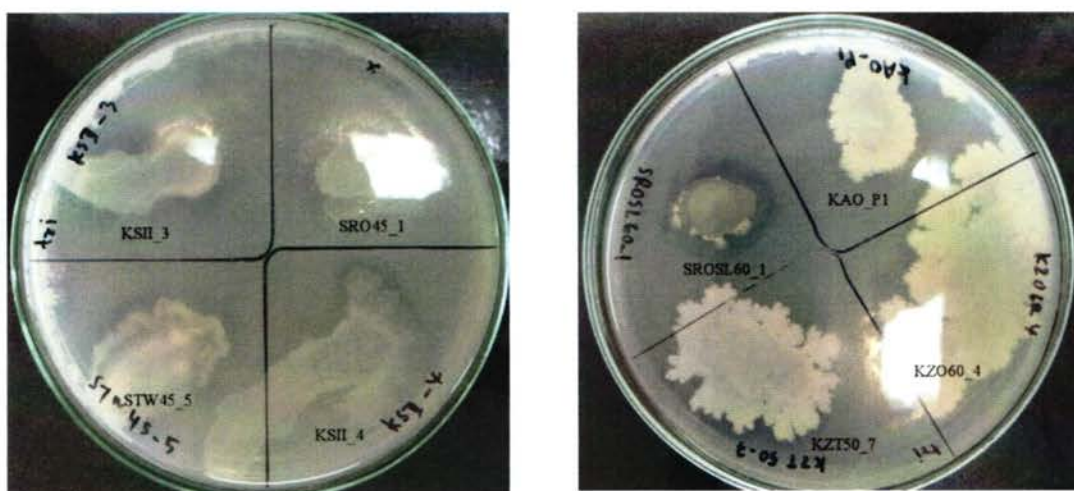


ภาพที่ ค 5 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ไอโซเลต LJ45_2, KSII_1, KC50_G, YTM5, KC45, STW45_5 และ KZO45_5 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone ได้ชัดเจน

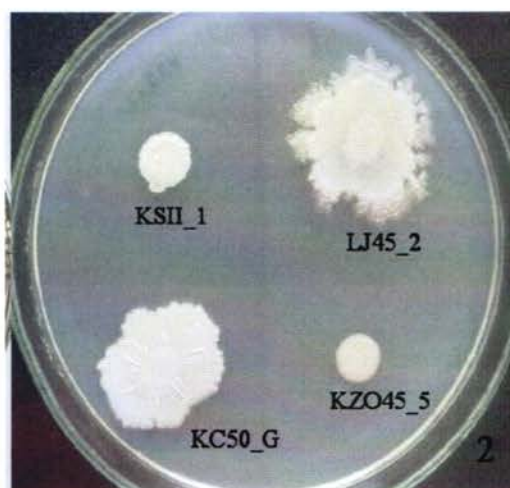
3. เอนไซม์ lipase



ภาพที่ ค 6 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ของไอโซเลต YTM5, SROSL60_1, STS50_2, SROB45_5, TR52_8 และ LJ50_2 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone



ภาพที่ ๗ ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ของไอโซเลต KSII_1, STW45_5, SRO45_1, KSII_3, SROSL60_1, KAO_P1, KZO60_4 และ KZT50_7 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone



ภาพที่ ๘ ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ของไอโซเลต KSII_1, LJ50_2, KC50_G และ KZO45_5 ให้ผลเป็นบวก สังเกตเห็น clear zone

ภาคผนวก ง
กายวิจัยที่เผยแพร่



ความหลากหลายของแบคทีเรียเทอร์มอฟิลที่แยกได้จากน้ำพุร้อน Diversity of Thermophilic Bacteria Isolated from Hot Springs

สุรียา ดึงทอง¹ และ สัมภามิต์ แก่นโส^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียเทอร์มอฟิลในน้ำพุร้อนในภาคใต้ของประเทศไทย 3 แห่ง ได้แก่ น้ำพุร้อนตานาเนาะแมเราะ น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร) บ่อน้ำพุร้อนทั้ง 3 แห่ง มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 30 , 3.65×10^5 และ 1.45×10^3 CFU/ml ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้มีทั้งหมด 13 ไอโซเลต จัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม (a, b, c, d, e และ f) ตามรูปแบบของการตัดจำเพาะผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ขนาด 1.5 kb ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA บางส่วนของไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่ม a (ไอโซเลต YTM2) มีความใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) กลุ่ม b (ไอโซเลต YTM4) มีความสัมพันธ์กับสมาชิกของยีนส์ *Bacillus* และยีนส์ *Geobacillus* กลุ่ม c (ไอโซเลต YTM5) มีความใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) กลุ่ม d (ไอโซเลต KSII_1) มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) กลุ่ม e (ไอโซเลต Kao_P2) มีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) และ กลุ่ม f (ไอโซเลต Kao_P4) มีความใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%)

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

*Corresponding Author, E-Mail: scsungka@mail2.ubu.ac.th, samghamit@hotmail.com

ABSTRACT

This research aims to study the diversity of thermophilic bacteria of three hot springs in southern Thailand. Total bacteria number in Tanoh Maroh, Kaochaison and Ban Natungpo hot spring were 30 , 3.6×10^5 and 1.45×10^3 CFU/ml, respectively. The 13 isolates were put into 6 groups according to their distinct restriction cutting profiles of 16S rRNA gene obtained from employing PCR-RFLP technique using restriction enzyme *HinfI*. The 6 groups were named group a, b, c, d, e and f, and analysis of their partial 16S rRNA gene sequence showed that group a (isolate YTM2) had 97% similarity with *Thermus Brockianus*, group b (isolate YTM4) is related to members of the genera *Bacillus* and *Geobacillus*, group c (isolate YTM5) is related to *G. thermoleovorans* (98%), group d (isolate KSI1_1) is related to *B. subtilis* (99%), group e (isolate Kao_P2) is related to *Caldimonas manganoxidans* (99%) and group f (isolate Kao_P4) is related to *Tepidimonas arfidensis* (97%).

คำสำคัญ: แบคทีเรียทนร้อน น้ำพุร้อน 16S rRNA gene PCR-RFLP

Keywords: Thermophile, Hot spring, 16s rRNA gene, PCR-RFLP

บทนำ

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในระดับที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า โดยทั่วไปมักไม่ทราบบทบาท คุณค่า และความสำคัญของทรัพยากรจุลินทรีย์ได้อย่างเป็นรูปธรรม ต่างจากทรัพยากรธรรมชาติด้านอื่น เช่น ป่าไม้ พืชพรรณ และสัตว์ต่างๆ ซึ่งสามารถสัมผัส รับทราบ และเข้าใจถึงความสำคัญได้ง่าย แม้ในความเป็นจริง จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญมากต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตอื่นบนโลก เป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีจำนวน และคุณค่ามหาศาล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ ได้อีกมากมาย การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์มีความสำคัญมาก เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นแหล่งของปฏิกิริยาเคมีและชีวเคมีหลากหลายรูปแบบ และเป็นแหล่งที่มาของสารเคมีต่าง ๆ เป็นต้น (สุเทพ, 2553)

แบคทีเรียชอบร้อน คือ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 45-70 องศาเซลเซียส สามารถพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้หลายแห่ง เช่น บ่อน้ำพุร้อน แหล่งพลังงานใต้พื้นดิน แหล่งขุดเจาะเหมืองแร่ (Bae et al., 2008) แบคทีเรียทนร้อนเป็นที่น่าสนใจของนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้มากมาย เช่น การนำเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนจีโนส *Bocillus* มาใช้ในอุตสาหกรรมแป้งและการผลิตสารให้ความหวาน การใช้ *Taq* DNA Polymerase ที่ได้จากแบคทีเรียชอบร้อน *Thermus aquaticus* ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Brock and Madigan, 1991) ในต่างประเทศมีการศึกษาแบคทีเรียทนร้อนอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในน้ำพุร้อน (Brock and Madigan, 1991; Abdelnasser et al., 2007; Adiguzel et al., 2009; Elnasser et al., 2007;

Kanso 2003; Reda et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาแบคทีเรียทนร้อนจากน้ำพุร้อนซึ่งมีอยู่ มากกว่า 112 แห่งในประเทศไทยนั้น ปัจจุบันยังมีไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาความหลากหลาย ของประชากรแบคทีเรียในน้ำพุร้อนเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่ การศึกษาเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อน ในน้ำพุร้อนสามแห่งในภาคใต้ของประเทศไทยและระบุ ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การแยกเชื้อ

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำและดินจากบ่อน้ำพุร้อน ตาเนาะแมเราะ (บ้านบ่อน้ำร้อน หมู่ 2 ตำบลตาเนาะแมเราะ อำเภอ เบตง จังหวัดยะลา) บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน (บ้านเขาชัยสน หมู่ 3 ตำบลเขาชัยสน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง) และบ่อน้ำพุร้อนนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร) (บ้านนาทุ่งโพธิ์ ตำบลนาทุ่งโพธิ์ อำเภอกาหลง จังหวัดพัทลุง) โดยเลือกเก็บตัวอย่างดินและน้ำลงขวดปลอดเชื้อ แล้วนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดลองต่อไป

1.2 การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อน และการแยกเชื้อ

ทำการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีการ Spread plate โดยนำตัวอย่างที่ไม่เจือจาง เจือจาง 10 เท่า และเจือจาง 100 เท่า มาทำการกระจาย เชื้อบนอาหาร 0.5X Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวน เชื้อที่เจริญบนอาหาร 0.5X NA แล้วคำนวณ CFU/ml.

พร้อมทั้งเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำการขีดบนอาหาร 0.5X NA จานใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

1.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน

นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.2 มาศึกษา ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม ของเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมงตรวจสอบลักษณะเซลล์และการติดสีภายใต้ กล้องจุลทรรศน์

2. การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย

2.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA) ของแบคทีเรียด้วยวิธี CTAB/NaCl

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหาร 0.5X NB 30 ml. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 15 นาที ดูดสารละลาย ส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer pH8 1 ml. โดยละลายเซลล์ใน TE แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 3 นาที ดูดของเหลวทิ้ง แล้วละลายก้อน เซลล์ใน TE buffer pH8 400 μ l. ผสมเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม 10 mg/ml Lysozyme 30 μ l. ผสม ให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม 10%SDS (Sodium dodecyl sulfate) 30 μ l. และ 20mg/ml Protienase K 6 μ l. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ อุณหภูมิ 50 °C 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของ เกลือให้เป็น 0.7 M NaCl ด้วย 5 M NaCl เติม สารละลาย CTAB/NaCl 0.1 เท่าของปริมาตรที่มี บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที เติม 25:24:1 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol แซ่เย็น ปริมาตร เท่ากับตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml. หลอดใหม่ หลีกเลี่ยงการดูดเศษตะกอนเซลล์ (cell

debris) ออกมาด้วย เติมน้ำ 24:1 Chloroform: Isoamyl alcohol แชนจ์ ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบนใสในหลอด 1.5 ml. หลอดใหม่ เติมน้ำไอโซโพรพานอลแชนจ์ ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล (70%) 500 μ l. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ปลอ่ยให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝา หลอดทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH8 80 μ l. เติมน้ำ 10 mg/ml Dnase free Rnase 1 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพียูเออาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA คือ Fd1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCAG3') และ Rd1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพียูเออาร์ปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 12.5 μ l 2X PCR Go Taq® Colorless Master Mix, 5 μ M Fd1 primer, 5 μ M Rd1 primer, 5 μ l Nuclease free water และ 2.5 μ l DNA template โดยมีโปรแกรมปฏิกิริยาพียูเออาร์ที่ใช้ ดังนี้ Preheat ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel elec-

trophoresis) เทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดมาตรฐาน (Lambda Hind III DNA size marker)

2.3 การจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-RFLP

นำผลผลิตพียูเออาร์ (PCR product) ของแต่ละไอโซเลต มาตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I โดยใช้สารเคมีในปริมาตรดังต่อไปนี้ 13.3 μ l Deionized water, 0.2 μ l 10 μ g/ μ l Acetylated BSA, 2 μ l 10X buffer, 0.5 μ l 10 U/ μ l *Hinf*I และ 4 μ l PCR product บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดจำเพาะของเอนไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ตัวแทนไอโซเลตของกลุ่มที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP ถูกส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) แล้วระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลตมากที่สุด 3 อันดับแรก

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อและการนับจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร

ผลการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร น้ำพุร้อน 3 แห่ง ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนตานาเนาะแมเราะ บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน และบ่อน้ำพุร้อนนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร) แสดงดังตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อ แยกทั้งหมดได้ 13 ไอโซเลต เป็นเชื้อจากบ่อน้ำพุร้อนตานาเนาะแมเราะ 5 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 2 จากบ่อน้ำพุร้อน

เขาชัยสน 4 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 3 และจากบ่อน้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ ดังตารางที่ 4
น้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ แยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลต แสดง

ตารางที่ 1 ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนสามแห่งในภาคใต้ของประเทศไทย

ชื่อตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งตัวอย่าง (°C)	อุณหภูมิที่บ่ม (°C)	จำนวนแบคทีเรีย(CFU/ml)
ตานะแม่เราะ	80	70 ^a	30
เขาชัยสน	55	55	3.65×10^5
บ้านนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร)	50	50	1.45×10^3

^aตัวอย่างจากน้ำพุร้อนตานะแม่เราะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีข้อจำกัดที่วันที่ใช้ทำอาหาร NA ไม่สามารถทนความร้อนได้สูงกว่านี้

ตารางที่ 2 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนตานะแม่เราะ

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การติดสี ย้อมแกรม	รูปร่าง เซลล์	ขนาดเซลล์ (µm)
		ขอบ	ขนาด (mm)	สี	ผิวหน้า			
1	YTM1	เรียบ	1-3	เหลือง	โค้งนูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
2	YTM2	เรียบ	2-4	เหลือง	โค้งนูน	Positive	Bacilli	0.5x3-5
3	YTM3	เรียบ	2-3	เหลืองอ่อน	โค้งนูน	Positive	Bacilli	0.5x3-6
4	YTM4	เรียบ	1	เหลือง	โค้งนูน	Positive	Bacilli	0.5x2-6
5	YTM5	หยัก	3-5	ขาวขุ่น	แบนราบ	Positive	Bacilli	0.5x2-6

ตารางที่ 3 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การติดสี ย้อมแกรม	รูปร่าง เซลล์	ขนาดเซลล์ (µm)
		ขอบ	ขนาด (mm)	สี	ผิวหน้า			
1	Kao_P1	เรียบ	2-3	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
2	Kao_P2	เรียบ	1-2	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
3	Kao_P3	เรียบ	1-2	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
4	Kao_P4	เรียบ	1	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-2

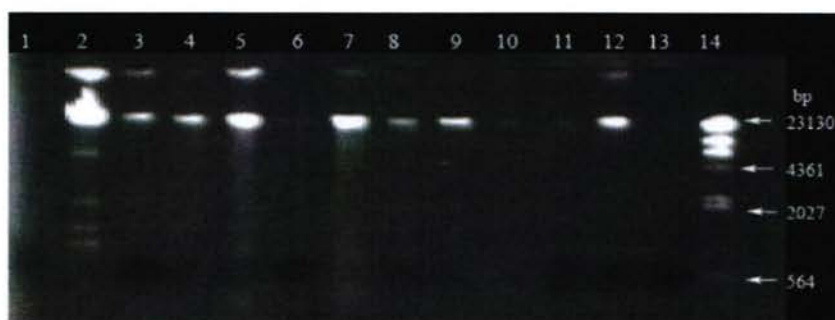
ตารางที่ 4 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การติดสี ย้อมแกรม	รูปร่าง เซลล์	ขนาดเซลล์ (µm)
		ขอบ	ขนาด (mm)	สี	ผิวหน้า			
1	KSII_1	หยัก	2-4	ขาวครีม	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-4
2	KSII_2	เรียบ	2-4	ขาว	แบนราบ	Positive	Bacilli	0.5x1-4
3	KSII_3	หยัก	2-3	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
4	KSII_4	เรียบ	2-3	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3

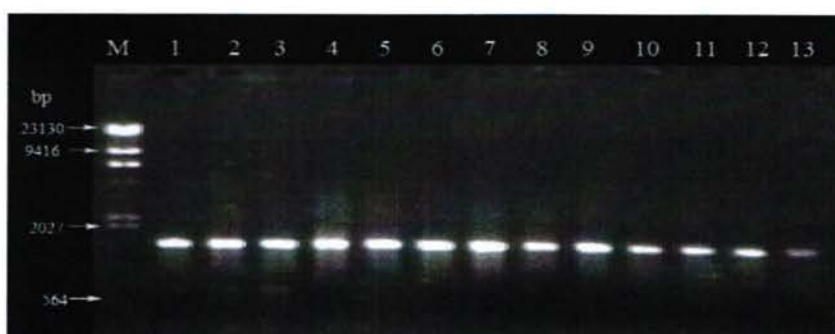
2. การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยวิธี PCR-RFLP

เมื่อนำโครโมโซมอติเอ็นเอของเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลตที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วปรากฏผลดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA โดยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Fd1 และ Rd1 (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า สามารถที่จะเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp และมีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามมี Non-specific Product ขนาดประมาณ 700-800 bp เกิดขึ้นในการ

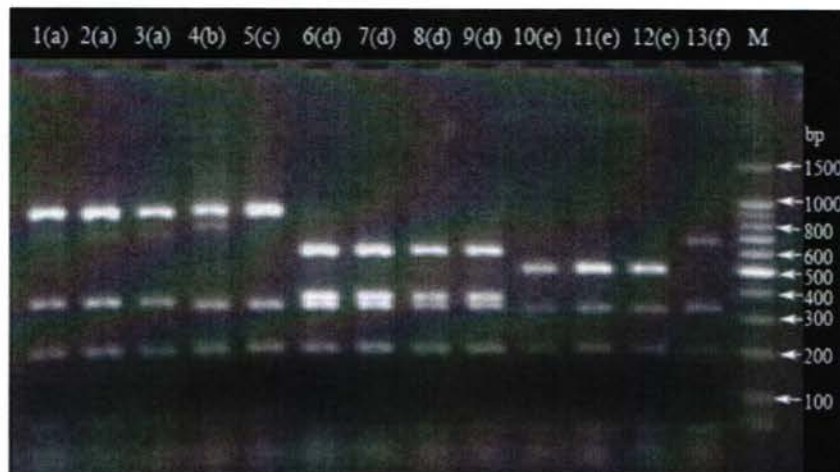
ทำพีซีอาร์ ของไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 ดังปรากฏในภาพที่ 2 เลนที่ 1-3 ผลการจัดกลุ่มไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถจัดกลุ่มไอโซเลตทั้งหมด 13 ไอโซเลตเป็น 6 กลุ่มคือ กลุ่ม a, b, c, d, e และ f ตามรูปแบบการตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* (ภาพที่ 3) กลุ่ม a ได้แก่ ไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 กลุ่ม b ได้แก่ไอโซเลต YTM4 กลุ่ม c ได้แก่ไอโซเลต YTM5 กลุ่ม d ได้แก่ไอโซเลต KSII_1, KSII_2, KSII_3 และ KSII_ กลุ่ม e ได้แก่ ไอโซเลต Kao_P1, Kao_P2 และ Kao_P3 และกลุ่ม f ได้แก่ไอโซเลต Kao_P4



ภาพที่ 1 โครโมโซมอติเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารทั้ง 13 ไอโซเลต โดยเลน 1 = YTM1, 2 = YTM2, 3 = YTM3, 4 = YTM4, 5 = YTM5, 6 = KSII_1, 7 = KSII_2, 8 = KSII_3, 9 = KSII_4, 10 = Kao_P1, 11 = Kao_P2, 12 = Kao_P3, 13 = Kao_P4, 14 = Lambda *Hind* III DNA marker



ภาพที่ 2 ผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารทั้ง 13 ไอโซเลต โดยเลน M = Lambda *Hind* III DNA marker, 1 = YTM1, 2 = YTM2, 3 = YTM3, 4 = YTM4, 5 = YTM5, 6 = KSII_1, 7 = KSII_2, 8 = KSII_3, 9 = KSII_4, 10 = Kao_P1, 11 = Kao_P2, 12 = Kao_P3, 13 = Kao_P4



ภาพที่ 3 ผลการตัดจำเพาะผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I โดยเลน 1 = YTM1, 2 = YTM2, 3 = YTM3, 4 = YTM4, 5 = YTM5, 6 = KSII_1, 7 = KSII_2, 8 = KSII_3, 9 = KSII_4, 10 = Kao_P1, 11 = Kao_P2, 12 = Kao_P3, 13 = Kao_P4, M = 100 bp DNA marker, ตัวอักษร a, b, c, d, e และ f แสดงรูปแบบการตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลต เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลต	แบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงมากที่สุด	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Similarity)	ความยาวลำดับเบสที่ใช้เปรียบเทียบ
YTM2	<i>Thermus brockianus</i>	97	491/503
	<i>Thermus scotoductus</i>	94	451/447
	<i>Thermus filiformis</i>	93	468/477
^a YTM4	<i>Bacillus caldovelox</i>	80	395/488
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	80	395/448
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	80	395/488
YTM5	<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3, <i>Geobacillus thermoleovorans</i>	98	502/511
	<i>Geobacillus</i> sp. A27	98	502/511
	<i>Geobacillus</i> sp. A27	98	502/511
KSII_1	<i>Bacillus subtilis</i> strain 1245	99	497/500
	<i>Bacillus subtilis</i>	99	497/500
	<i>Bacillus subtilis</i> IS13	99	495/501
Kao_P2	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	99	497/501
	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	99	497/501
	<i>Caldimonas</i> sp.	98	497/501
Kao_P4	<i>Tepidimonas arfidensis</i>	97	440/451
	<i>Tepidimonas aquatica</i>	94	441/456
	<i>Tepidicella xavieri</i>	92	441/453

^a ผลการวิเคราะห์ ยีน 16S rRNA ของ YTM4 ที่ให้ค่า Similarity ค่อนข้างต่ำมากนี้ แท้จริงแล้ว เพราะ YTM4 เป็นเชื้อที่ยังไม่บริสุทธิ์

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม BLASTn

จากการจัดกลุ่มไอโซเลตของแบคทีเรียที่เลี้ยง ร้อนตามรูปแบบการตัดจำเพาะดีเอ็นเอของแต่ละ ไอโซเลตด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* แล้วส่งตัวแทน ของแต่ละกลุ่มไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการ วิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 5 ตัวแทนกลุ่ม a คือ YTM2 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) ตัวแทนกลุ่ม b คือ YTM4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Bacillus* และ *Geobacillus* ทั้งนี้ค่า 80% Similarity ที่ ค่อนข้างต่ำมากนี้ ไม่ได้แสดงว่า YTM4 เป็นแบคทีเรีย สายพันธุ์ใหม่แต่อย่างใด หากแต่ข้อมูลดังกล่าวบ่งบอก ชัดเจนว่า YTM4 เป็นเชื้อผสม เนื่องจากดีเอ็นเอ ต้นแบบที่สกัดได้นั้นจะเป็นดีเอ็นเอผสมที่มาจากเชื้อ มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งเห็นได้ชัดจาก Sequence trace ที่มีหลาย Peak ในตำแหน่งเดียวกัน(ไม่ได้แสดง ไว้ในที่นี้) นอกจากนั้น ผลการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 3 เลนที่ 4) ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอ เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งแถบที่เมื่อรวมขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ทั้ง หมดแล้วจะเกินขนาดของ 16S rRNA (1.5 kb) ซึ่ง เป็นไปไม่ได้ ตัวแทนกลุ่ม c คือ YTM5 มีลำดับนิวคลีโอ ไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) ตัวแทนกลุ่ม d คือ KSII_1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) ตัวแทนของ กลุ่ม e คือ Kao_P2 ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้ว มีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) และตัวแทน กลุ่ม f คือ Kao_P4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความ ใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%) เมื่อ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

สรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อจากน้ำพุร้อน 3 แห่ง ได้แก่ น้ำพุ ร้อนตานะแมเราะ น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อน บ้านนาทุ่งโพธิ์ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงร้อนได้ ทั้งหมด 13 ไอโซเลต คือ YTM1, YTM2, YTM3, YTM4, YTM5, KSII_1, KSII_2, KSII_3, KSII_4, Kao_P1, Kao_P2, Kao_P3 และ Kao_P4 ถูกจัดกลุ่ม โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้ 6 กลุ่ม ตามรูปแบบการ ตัดจำเพาะผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* กลุ่ม o ประกอบด้วยไอโซ เลต YTM1, YTM2 และ YTM3 การวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ YTM2 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มพบว่า ใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) กลุ่ม b ประกอบด้วย YTM4 ซึ่งยังเป็นเชื้อผสมอยู่ กลุ่ม c ประกอบด้วยไอโซเลต YTM5 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) กลุ่ม d ประกอบด้วย KSII_1, KSII_2 และ KSII_3 ลำดับนิวคลี ไอ์ของ KSII_1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus subtilis* (99%) กลุ่ม e ประกอบด้วยไอโซ เลต Kao_P1, Kao_P2 และ Kao_P3 ลำดับนิวคลีไ อ์ของ Kao_P2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) กลุ่ม f ประกอบด้วยไอโซเลต Kao_P4 มีลำดับนิวคลีไ อ์ใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%)

มีรายงานการนำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุ ร้อน ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น การใช้ *Caldimonas taiwanensis* ในการย่อยแป้ง และแป้ง มันสำปะหลัง ให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* CGS2 และ *C. pasteurianum* (Wen-Ming et al., 2005) การสกัดเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Geobacillus thermoleovorans* T4 เพื่อใช้ ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ

และ การผลิตอาหารสัตว์ (Shang-Kai et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสทนร้อนที่ได้จาก *Geobacillus thermoleovorans* ใน *Escherichia coli* เพื่อผลิตเอ็นไซม์ไลเปสทนร้อนสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง (Yasser et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตเอ็นไซม์ คตะเลสชนิดใหม่จาก *Thermus brockianus* (Vicki et al., 2003) เอ็นไซม์คตะเลสที่สกัดได้ทนความร้อน และ pH สูงกว่าเอ็นไซม์คตะเลสอื่นๆ ที่เคยมีการตีพิมพ์ จึงมีความเป็นไปได้มากที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ดังนั้นจากการศึกษาทั้งหมดเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่แยกได้ไปศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- สุเทพ ไวกฤทธา. (30 ตุลาคม 2553). การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์. 1 หน้า. URL://www.sa.ac.th/biodiversity/contents/articles/suteap1_01.html.
- Abdelnasser S.S.I and EL-diwany. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. Aust. J. Basic & Appl. Sci. 1(4): 473-478.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M. and Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot spring in Turkey. Journal of Microbiological method. 79(3): 321-328.
- Bae, S. S., Lee, J. H., Kim, S. J. (2005). *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. Int. J. Syst. Evol. Microbial. 55: 1211-1215.
- Brock, D. T. and Madigan, T. M. (1991). Biology of microorganism. 6th ed. Prentice Hall, Engwood cliffs, NJ. New York.
- Elnasser, Z., Maraqa, A., Owais, W. et al. (2007). Isolation and characterization of new thermophilic bacteria in Jordan. Int. J. Microbial 3. 1-13.
- Kanso, S. (2003). Molecular studies of bacteria communities in the Great Artesian Basin Aquifers. Ph. D. Thesis. Griffith University.
- Reda, A. I., Aou – Shanab. (2007). Characterization and 16S rRNA identification of thermotolerant bacteria isolated from hot spring. J. Appl. Sci. Res. 3(10), 994-1000.
- Tai, SK., Lin, HP., Kuo, J. and Liu, JK. (2004). Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. Extremophiles 8(5): 345-349.
- Vicki, S., Kastli, D., and William A. (2003). Purification and Characterization of a Novel Thermo-Alkali-Stable Catalase

- from *Thermus brockianus*. Biotechnol. Prog. 19: 1292-1299.
- Chen, WM., Chang, JS., Chiu, CH., Chang, SC., Chen, WC. And Jiang, CM. (2005). *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. Systematic and Applied Microbiology 28: 415-420.
- Yasser, R., and Ahmed A. (2008). Identification and over-expression of a thermo stable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *E.coli*. Microbiological Research 163: 13-20.

□□□□□

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นาย สุริยา ตั้งทอง
ประวัติการศึกษา	โรงเรียนคำเขื่อนแก้วชนูปถัมภ์, พ.ศ. 2544–2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ. 2547–2550
ประวัติการวิจัย	“ความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนที่แยกได้จากน้ำพุร้อน”, วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 40(2) : 524-533 ; เมษายน-มิถุนายน, 2555.
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 6 หมู่ 7 บ้านแหล่งหนู ตำบลคงเจริญ อำเภอคำเขื่อนแก้ว จังหวัดยโสธร 35110 โทรศัพท์ 088-041-841-5