



วิทยานิพนธ์

การคัดเลือกเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มี
ความสามารถสูงในการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์

**SCREENING OF THERMOTOLERANT METHYLOTROPHIC
BACTERIA CAPABLE OF FORMALDEHYDE FIXATION**

นางสาวอุบลพรรณ เหลืองอุบล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีความสามารถสูงในการตรึง
ฟอร์มาลดีไฮด์

Screening of Thermotolerant Methylophilic Bacteria Capable of Formaldehyde Fixation

นามผู้วิจัย นางสาวอุบลพรรณ เหลืองอุบล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีความสามารถสูง
ในการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์

Screening of Thermotolerant Methylophilic Bacteria Capable of
Formaldehyde Fixation

โดย

นางสาวอุบลพรรณ เหลืองอุบล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2550

อุบลพรรณ เหลืองอุบล 2550: การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีความสามารถสูงในการตรึงฟอสฟอรัส ประชุมวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. 165 หน้า

ทำการแยกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอลในอาหารแข็งเพื่อการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ได้ทั้งสิ้น 76 ไอโซเลทจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจำนวน 20 ตัวอย่าง แต่พบว่ามีเพียง 24 ไอโซเลทที่สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีเมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่ 45 องศาเซลเซียส โดยในจำนวนนี้มี 19 ไอโซเลทที่จัดเป็นเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง การศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์เมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 19 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปท่อน 17 ไอโซเลท แบ่งเป็นกลุ่มที่ติดสีแกรมบวกจำนวน 11 ไอโซเลท ซึ่งสร้างเอนโดสปอร์จำนวน 6 ไอโซเลทและไม่สร้างเอนโดสปอร์จำนวน 5 ไอโซเลท กลุ่มที่ติดสีแกรมแปรผันจำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งสร้างเอนโดสปอร์ได้ทั้ง 2 ไอโซเลท และกลุ่มที่ติดสีแกรมลบจำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งสร้างเอนโดสปอร์ได้จำนวน 3 ไอโซเลทและไม่สร้างเอนโดสปอร์ 1 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปร่างเป็นทรงกลมมี 2 ไอโซเลท ซึ่งพบว่าติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนโดสปอร์ทั้งสอง ไอโซเลท การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสความเข้มข้นสูง ทำโดยการพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของฟอสฟอรัสที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ทนต่อฟอสฟอรัสในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ได้สูงที่สุด คือ 2.5 2.4 และ 1.9 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีฟอสฟอรัสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักพบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีค่า MIC ของฟอสฟอรัส เท่ากับ 0.8 0.7 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จึงทำการศึกษาการตรึงฟอสฟอรัสของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.8 0.7 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียรหัส TE1 ตรึงฟอสฟอรัสได้ดีที่สุดโดยสามารถลดฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 93 เปอร์เซ็นต์และมีฟอสฟอรัสสะสมภายในเซลล์น้อยที่สุด (0.374 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทซึ่งทดสอบแล้วว่าใช้วิถี RuMP สำหรับตรึงฟอสฟอรัสนั้น มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของวิถี RuMP อยู่ในระดับสูงเมื่อเทียบกับค่าที่มีรายงานไว้สำหรับเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์อื่น การจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ศึกษากับลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank ร่วมกับการพิจารณาสมบัติทางชีวเคมีบางประการและพื้นฐานวิทยาของเซลล์และโคไลนีพบว่า เมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus badius* และ *Brevibacillus choshimensis* มากที่สุด ตามลำดับ

Ubonphan Laungubon 2007: Screening of Thermotolerant Methylotrophic Bacteria Capable of Formaldehyde Fixation. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Mrs. Nantana Srisuk, Ph.D. 165 pages.

Seventy-six isolates of methylotrophic bacteria were isolated on methanol agar medium from 20 natural samples but only 24 isolates exhibited growth in methanol broth at 45°C. Among these, 19 isolates were found to be thermotolerant methylotrophic bacteria capable of methanol utilization for growth. Morphological study of bacterial cells showed that 17 isolates possessed rod-shaped cells whereas the other 2 isolates were cocci, gram positive and non-endospore forming bacteria. Among the rod-shaped cells group, 6 isolates were found to be gram positive and endospore former whereas 5 isolates were also gram positive but non-endospore former. The other 2 isolates were gram variable and endospore forming bacteria. The last 4 isolates of this group were gram negative of which 3 isolates were endospore former and a single isolate was non-endospore former. Screening for thermotolerant methylotrophic bacteria capable of formaldehyde fixation at 45°C was performed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of formaldehyde to the bacterial growth in methanol broth. Results indicated that the methylotrophic bacteria isolate SB4, TE1 and TB2 possessed the highest MIC as 2.5, 2.4 and 1.9 mM, respectively. MICs of formaldehyde to the respective bacterial growth under the condition that formaldehyde was the sole carbon and energy source were found to be 0.8, 0.7 and 0.5 mM, respectively. Capability of the bacterial isolates SB4, TE1 and TB2 were therefore assessed under those MICs mentioned. The isolate TE1 was found to be superior on formaldehyde fixation as indicated by 93% reduction of formaldehyde in the culture medium and less accumulation of intracellular formaldehyde (0.374 mmol per gram dry weight) compared to the other two isolates. However, high level of specific activity of HPS and PHI, the key enzymes for the RuMP pathway of formaldehyde fixation was observed among the three bacterial isolates studied. Identification of those three thermotolerant methylotrophic bacteria was performed by conventional method as well as molecular biological method. Results indicated that the isolate SB4, TE1 and TB2 are closely related to the bacteria *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus badius* and *Brevibacillus choshiensis*, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. นันทนา สีสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ให้คำแนะนำ ปรึกษา และปรับปรุงในการวิจัย การเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในทุกเรื่องเป็นอย่างดีมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สาวิตรี ลีมทอง กรรมการสาขาวิชาเอก และ ผศ. ดร. อมรรัตน์ พรหมบุญ กรรมการสาขาวิชารอง ที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย และข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ภกมน จิตประเสริฐ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิเชียร ขงมานิตชัย ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการใช้อุปกรณ์ในการวิจัย เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และอบรมสั่งสอนให้แก่ข้าพเจ้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ และน้องทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

อุบลพรรณ เหลืองอุบล

พฤษภาคม 2550