

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงรหัส TB2 เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ มีขนาดยาวประมาณ 2 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.5 ไมโครเมตร สร้างเอนโดสปอร์ได้ โดยเอนโดสปอร์มีตำแหน่งตรงกลางเซลล์ และพบว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TB2 ต้องการอากาศเพื่อการเจริญ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ผลการทดสอบ V-P เป็นลบ ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส แลคโตส อะราบิโนส ซาโลส และแมนนิทอล ไม่สร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ย่อยแป้ง ไม่สามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ริคิวัชในเตรทเป็นไนโตรที่ได้อาจไม่เจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียสซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Brevibacillus* sp., *Brev. parabrevis*, *Brev. agri*, *Brev. brevis*, *Brev. formosus*, *Brev. choshiensis* และ *Brev. limnophilus* พบว่าแบคทีเรีย TB2 คล้ายกับ *Brev. choshiensis* มากที่สุด ซึ่งคล้ายกันถึง 22 ลักษณะ จาก 24 ลักษณะที่เปรียบเทียบได้ คิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย TB2 กับ *Brev. choshiensis* ที่มีความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการดัดสีแกรมลบของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรีย TB2 เป็นลักษณะซึ่งแตกต่างจากลักษณะทั่วไปของสมาชิกส่วนใหญ่ในจีนัส *Brevibacillus* แต่พบว่า *Brev. choshiensis* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวในจีนัสนี้ที่อาจดัดสีแกรมแปรผัน ดังนั้นจึงอาจเป็นการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียรหัส TB2 มีความใกล้เคียงกับ *Brev. choshiensis* มากที่สุด

Thomas (2005) แยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อเยื่อของงู ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Brevibacillus* เจริญเป็นโคโลนีสีครีม ลักษณะโคโลนีหนาราบหรือเป็นชั้น ๆ เซลล์เป็นรูปท่อน ดัดสีแกรมลบ สามารถสร้างสปอร์ได้ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว แต่สร้างเอนไซม์ได้น้อยมากเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและยูรีเอส ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้ง ไม่สามารถใช้ซิเตรท และทนต่อเอทานอลได้ จากลักษณะการดัดสีแกรมลบ และการสร้างเอนโดสปอร์ได้พบว่าเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียนี้ เนื่องจากส่วนใหญ่แล้วการสร้างสปอร์จะพบได้ในแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Clostridium*

## สรุป

การแยกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเพื่อการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน ดอกไม้ เปลือกไม้ จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยแยกเชื้อบนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ได้เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียจำนวน 76 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีเพียง 24 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีถึงดีมาก (+3 ถึง +4) คิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ในแบคทีเรีย 24 ไอโซเลทนี้ พบว่ามี 7 ไอโซเลท ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 50 องศาเซลเซียส แต่มีเพียง 2 ไอโซเลท ที่เจริญได้เล็กน้อยในอาหารเดียวกัน ที่ 55 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ทำโดยการพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 37 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลท ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียสอย่างชัดเจน จึงจัดว่าแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลทนี้เป็นเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถทนอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงได้สูงถึง 45 องศาเซลเซียส และในจำนวน 19 ไอโซเลทนี้มีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบแบคทีเรียที่เจริญได้ที่ 55 องศาเซลเซียสเลย

การศึกษาพื้นฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 19 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปท่อนจำนวน 17 ไอโซเลท ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มที่ดัดสีแกรมบวกจำนวน 11 ไอโซเลท คือ CM1 D5 D7 SB4 SD1 TA4 TB1 TB2 TB3 TD2 และ TE1 คิดเป็น 52.6 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ศึกษา โดยในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ 6 ไอโซเลท และไม่สร้างเอนโดสปอร์ 5 ไอโซเลท กลุ่มที่มีรูปร่างท่อนและดัดสีแกรมแปรผันจำนวน 2 ไอโซเลท คือ CM3 และ KA5 คิดเป็น 10.5 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ศึกษา และมีรูปร่างท่อนแต่ดัดสีแกรมลบจำนวน 4 ไอโซเลท คือ CM4 KA1 KB5 และ SB6 ซึ่งคิดเป็น 26.3 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ศึกษา ส่วนแบคทีเรียรูปร่างกลม ดัดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ มี 2 ไอโซเลท คือ D2 และ D4 คิดเป็น 10.5 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ศึกษา

การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง โดยพิจารณาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงสุด คือ 2.5 2.4 และ 1.9 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อนำเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ มาศึกษาค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเหลวที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงสุด 0.8 0.7 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ ใช้วิถี Ribulose Monophosphate (RuMP) สำหรับตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ภายในเซลล์ เนื่องจากตรวจพบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ hexulose phosphate synthase (HPS) และเอนไซม์ phosphohexulose isomerase (PHI) ภายในเซลล์ด้วย

การตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่ 45 องศาเซลเซียสของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวพบว่า แบคทีเรียรหัส TE1 สามารถตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีที่สุดโดยสามารถลดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 93 เปอร์เซ็นต์ และมีฟอร์มาลดีไฮด์สะสมภายในเซลล์น้อยที่สุด (0.374 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น และตรวจพบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของวิถี RuMP อยู่ในระดับสูงเมื่อเทียบกับค่าที่มีรายงานไว้สำหรับเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์อื่น

การจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ศึกษากับฐานข้อมูล GenBank ร่วมกับการพิจารณาคูสมบัติทางชีวเคมีบางประการและสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนีพบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสจำนวน 816 คู่เบสของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 และแบคทีเรีย *Bacillus sporothermodurans* (AF329476) มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทั้งสอง พบว่ามีความใกล้เคียงกัน 92 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะที่เปรียบเทียบ 24 ลักษณะ การเปรียบเทียบลำดับเบสจำนวน 814 คู่เบสของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TE1 และแบคทีเรีย *B.adius* (AY803745) มีความ

เหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ และการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทั้งสอง พบว่ามีความใกล้เคียงกัน 96 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะที่เปรียบเทียบ 24 ลักษณะ ส่วนการเปรียบเทียบลำดับเบสจำนวน 799 คู่เบสของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียรหัส TB2 และแบคทีเรีย *Brevibacillus choshinensis* (AB112713) มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ และการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทั้งสอง พบว่ามีความใกล้เคียงกัน 92 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะที่เปรียบเทียบ 24 ลักษณะ

### ข้อเสนอแนะ

1. การปรับสภาพแบคทีเรียให้คุ้นเคยกับฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง ๆ โดยเพิ่มความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เป็นขั้นตอน จากความเข้มข้นต่ำไปสูง อาจช่วยเพิ่มขีดความสามารถของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงให้ทนพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้สูงขึ้น แต่อาจต้องใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเพื่อคงระยะการเจริญของแบคทีเรียได้เป็นเวลานานเท่าที่ต้องการ และเพื่อให้แบคทีเรียตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด
2. การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์และการศึกษาชนิดของโคเอนไซม์ที่เข้าร่วมในปฏิกิริยาซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรานั้น อาจบ่งชี้สภาวะเมแทบอลิซึมของการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่จำเพาะกับเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงแต่ละไอโซเลทคัดเลือกได้
3. การหาลำดับเบสทั้งหมดของ 16S rDNA ของเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกไว้เปรียบเทียบกับลำดับเบสทั้งหมดของ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล จะทำให้มีความแม่นยำในการจัดจำแนกแบคทีเรามากขึ้น