การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีความสามารถสูงในการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์

Screening of Thermotolerant Methylotrophic Bacteria Capable of Formaldehyde Fixation

คำนำ

เมทานอลเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอมที่จุลินทรีย์ในกลุ่มเมทิลโลโทรฟสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากเมทานอลเป็นสารประกอบที่มีราคาถูก มีปริมาณมาก สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ละลายได้ดีในน้ำสะอาด เมทานอลจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การผลิตวิตามินและกรดอะมิโนบางชนิด เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารมัธยันตร์ที่สำคัญ ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์จะถูกสลายต่อไปเพื่อการสร้างพลังงานหรือถูกตรึงเพื่อนำไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียก็ได้ การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นทางเลือกหนึ่งของการกำจัดหรือลดพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเคมีหลายชนิดที่ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นตัวทำละลายและเป็นวัตถุดิบในการผลิตโพลีเมอร์ อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนและกรดนิวคลีอิกของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีผลที่ชัดเจนต่อมนุษย์ คือ ทำให้ตาบอดชั่วคราวหรือถ้าได้รับในปริมาณมากก็อาจทำให้ตาบอดอย่างถาวรได้

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อน มีอุณหภูมิเฉลี่ยค่อนข้างสูงตลอดทั้งปี จึงมีความเป็นไปได้มากที่จะแยกเชื้อและคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ซึ่งมีลักษณะเด่นที่สามารถคงกิจกรรมของเซลล์ไว้ได้ แม้อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงจะสูงขึ้นกว่าอุณหภูมิระดับปกติที่แบคทีเรียเจริญได้ดี ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะส่งผลดีต่อการผลิตเซลล์จำนวนมากในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นที่มีประสิทธิภาพสูงนัก จึงช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ นอกจากนี้ยัง

ส่งผลดีต่อการนำแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ด้วย เช่น การปล่อยให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนและคงความสามารถสูงของเซลล์ไว้ได้ แม้จะอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงก็ตาม

ดังนั้นการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สามารถตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีด้วย จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจพบปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติ หรือในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอล เพื่อการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง
2. ศึกษารูปแบบการเจริญ การใช้เมทานอล ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง
3. คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีกิจกรรมการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดี
4. จัดจำแนกเพื่อระบุชื่อเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การตรวจเอกสาร

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย คือ แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอมโดยใช้สารนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญของเซลล์ ซึ่งสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม ได้แก่ มีเทน เมทานอล ฟอร์มาลดีไฮด์ ฟอร์เมท คาร์บอนมอนนอกไซด์ เมทิลเอมีน เป็นต้น (Anthony, 1982) ซึ่งสารเหล่านี้มีสภาพรีดิวซ์มากกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ (Bratina and Richard, 1992)

การค้นพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1892 โดย Leow (Murrell and McDonald, 2000) ซึ่งพบแบคทีเรียสีชมพูที่สามารถเจริญได้ในเมทานอล เมทิลเอมีน ฟอร์มาลดีไฮด์ และสารประกอบคาร์บอนหลายอะตอมอีกหลายชนิด แบคทีเรียชนิดนี้ถูกเรียกในขณะนั้นว่า *Bacillus methylicus* โดยปัจจุบันรู้จักกันในนามของ pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) ซึ่งก็คือ *Methylobacterium extorquens* ในปัจจุบันนั่นเอง

อาจตรวจพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำ ดิน และพืช (Vorholt, 2002) ซึ่งสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม เช่น เมทานอล ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินั้นเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของมีเทนโดยเกิดการไฮโดรไลซิสเมทิลอีเทอร์และเอสเทอร์ที่มีอยู่ในเพกทินและลิกนิน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในโครงสร้างของพืช เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมักอาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรียที่สามารถใช้มีเทนได้ (methanotroph) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เมื่อใช้มีเทนแล้วจะปล่อยเมทานอลออกมา ซึ่งเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียก็จะนำเมทานอลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่อไป

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียแบ่งได้ 2 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบที่ใช้เป็นซับสเตรต ดังนี้

1. Obligate methylotrophic bacteria เป็นแบคทีเรียที่ใช้เฉพาะสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม แต่ไม่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม โดยใช้ได้เฉพาะเมทานอลหรือเมทิลเอ

มีนได้ แต่ไม่ใช้มีเทน ได้แก่ *Methylomonas methylovora*, *M. aminofaciens*, *M. methanolica*, *M. clara* และ *Methylophilus methylotrophus* เป็นต้น

2. Facultative methylotrophic bacteria เป็นแบคทีเรียที่นอกจากจะใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม เช่น เมทานอลหรือเมทิลเอมีน แต่ไม่ใช้มีเทนได้เช่นเดียวกับกลุ่มแรก แบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอม เช่น กลูโคส หรือ ฟรุคโตส ได้อีกด้วย ตัวอย่างของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่

- แบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพู (pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* เช่น *P. extorquens* (ปัจจุบันคือ *Methylobacterium extorquens*), *P. methylica* และ *P. rosea*

- แบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* ที่โคโลนีไม่มีสีชมพู (non pink-pigmented *Pseudomonas*) เช่น *P. aminovorans* และ *P. oleovorans*

- แบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และมีรูปร่างของเซลล์เป็นแท่ง เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Arthrobacter*

- แบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก เช่น *Bacillus cereus*, *Mycobacterium vaccae* และ *Brevibacterium fuscum*

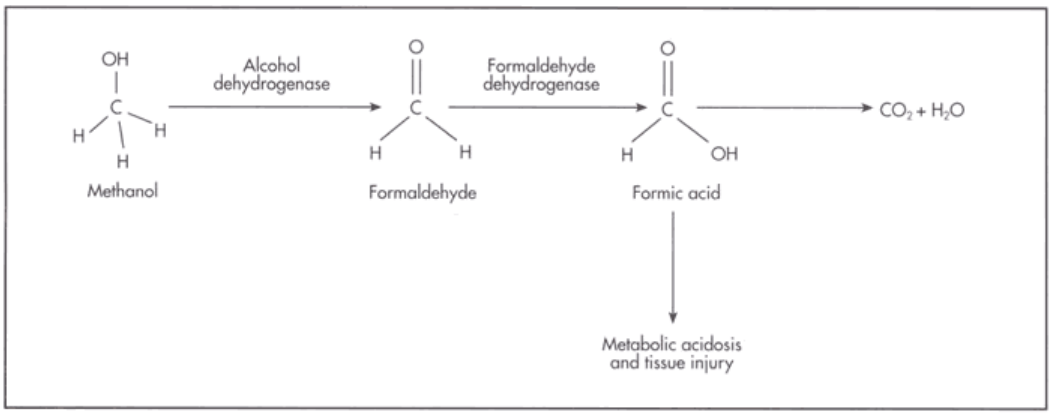
- แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม facultative autotrophs หรือ phototrophs ที่เจริญได้ในที่ ๆ มีเมทานอลหรือฟอร์เมต เช่น *Rhodopseudomonas palustris*, *R. acidophila*, *Thiobacillus novellas*, *Nitrobacter agilis*, *Alkaligenes eutrophus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas oxalaticus*, *P. gazotropha*, *Achromobacter* sp., *Mycrocyclus aquaticus*, *M. ebrunous*, *Blastobacter viscosus* และ *Mycobacterium* sp.

เมทานอล

เมทานอลหรือเมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) เดิมเรียกว่า แอลกอฮอล์จากไม้ (wood alcohol) เพราะเตรียมได้โดยการนำไม้มากลั่นภายใต้สภาวะไร้อากาศ ปัจจุบันเมทานอลเกือบทั้งหมดสังเคราะห์ขึ้นมาจากปฏิกิริยารีดักชันของแก๊สคาร์บอนมอนนอกไซด์กับแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตแก๊สมีเทน และใช้โลหะออกไซด์ผสมเป็นตัวเร่ง เมทานอลมีสมบัติดังนี้ สูตรโมเลกุลคือ CH_3OH มวลโมเลกุลเท่ากับ 32.04 มีลักษณะเป็นของเหลวใส ละลายได้ทุกส่วนในน้ำสะอาด มีจุดเดือดและจุดเยือกแข็งเท่ากับ 64.7 และ -97.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความหนาแน่นเท่ากับ 0.7915 กรัมต่อมิลลิลิตร

เมทานอลเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี ประโยชน์ของเมทานอล เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟอร์มาลดีไฮด์ (ใช้ผลิตเรซินและพลาสติก) กรดน้ำส้ม เมทิลเอมีน คลอโรมีเทน (chloromethane) เมทิลเมทาคริเลต (methylmethacrylate) สาร DMT (dimethyl terephthalate) และสาร MTBE (methyl-butyl ether) โดยใช้เป็นตัวทำละลาย สารป้องกันการแข็งตัว และส่วนผสมของน้ำมันเชื้อเพลิง (Weissermel and Arpe, 1994)

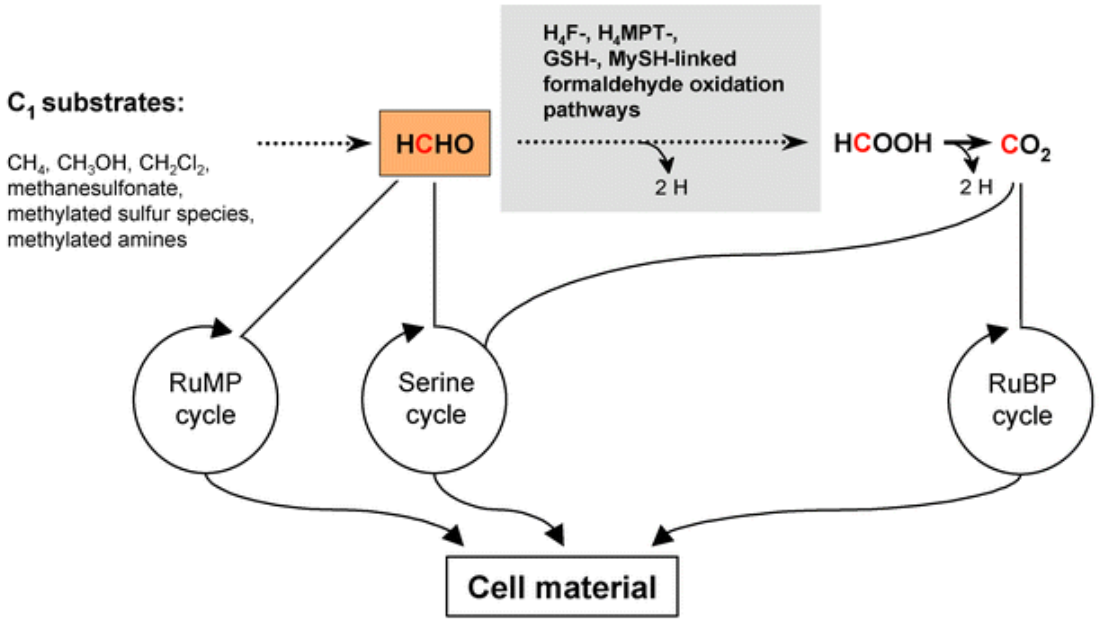
นอกจากนี้เมทานอลยังมีความเป็นพิษต่อมนุษย์โดยการดูดซึมเข้าทางผิวหนัง ลมหายใจ และดูดซึมได้เร็วในทางเดินอาหารแล้วกระจายเข้าสู่กระแสเลือด การกำจัดเมทานอลในร่างกายจะเกิดโดยการออกซิไดส์เมทานอลให้กลายเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ และสลายต่อไปเป็นกรดฟอร์มิก ซึ่งจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด (ภาพที่ 1) ถ้าร่างกายได้รับเมทานอลในปริมาณเพียงเล็กน้อย เมทานอลจะถูกขับออกทางลมหายใจ เหงื่อ และปัสสาวะ หรืออาจกระตุ้นให้อาเจียนออกมา ความเป็นพิษของเมทานอลเกิดจากกรดฟอร์มิกที่เกิดขึ้นไปทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดสูง (acidosis) จนมีผลทำให้เนื้อเยื่อตับอ่อนตาย (necrosis) นอกจากนี้ฟอร์มาลดีไฮด์ยังมีผลไปทำลายประสาทตาจนอาจเกิดอาการตาบอดชั่วคราวหรืออาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้



ภาพที่ 1 กระบวนการกำจัดเมทานอลในร่างกาย
ที่มา: Brandis (n.d.)

เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย

ลักษณะเด่นของเมแทบอลิซึมของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย คือ การเปลี่ยนคาร์บอนหนึ่งอะตอมให้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เป็นศูนย์กลางของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล (ภาพที่ 2) ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (Attwood and Quayle, 1984) ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญจากการรีดิวซ์คาร์บอนหนึ่งอะตอม เกี่ยวข้องทั้งในเมแทบอลิซึมการสร้างพลังงานหรือดิสซิมิเลชันและแอสซิมิเลชันของคาร์บอน ซึ่งเป็นการใช้พลังงาน และสร้างองค์ประกอบของเซลล์ ขั้นตอนแรกของเมแทบอลิซึมของเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลได้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ หลังจากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงส่วนนี้จะเกิดขึ้นในไซโทพลาซึมของเซลล์

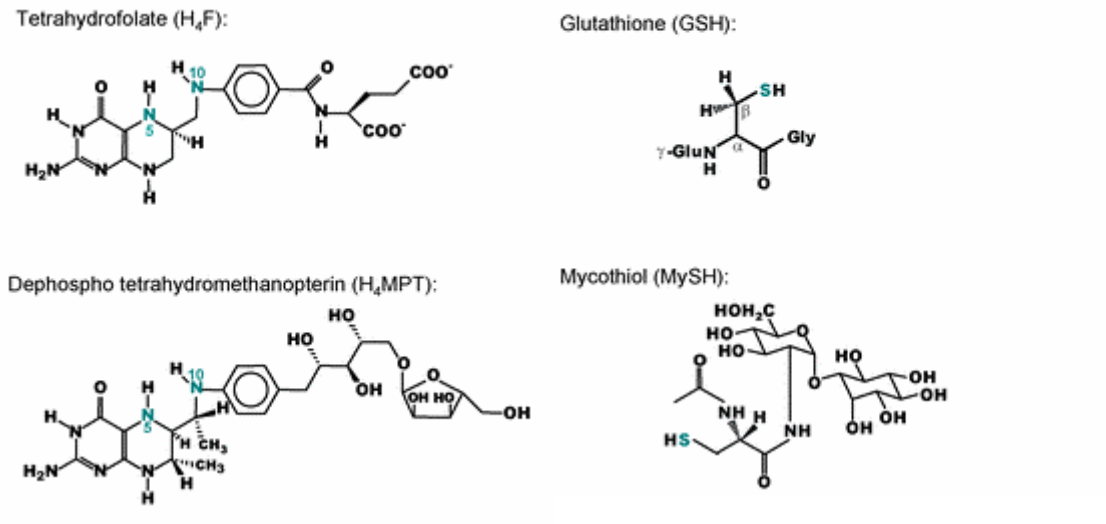


ภาพที่ 2 ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นศูนย์กลางการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย

ที่มา: Vorholt (2002)

ดิสซิมิเลชันของเมทานอล

ดิสซิมิเลชันของเมทานอลเป็นการสร้างพลังงานเพื่อสร้างองค์ประกอบของเซลล์ โดยการออกซิไดส์เมทานอลด้วยเอนไซม์ methanol dehydrogenase เกิดเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่มีความเป็นพิษสูง จากนั้นฟอร์มาลดีไฮด์จะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นกรดฟอร์มิก โดยกระบวนการออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์นั้นจะอาศัยโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (ภาพที่ 3) ขึ้นกับชนิดของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย วิถีการออกซิไดส์ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์ที่แตกต่างกัน แสดงในภาพที่ 4 หลังจากนั้นกรดฟอร์มิกจะถูกออกซิไดส์ต่อไป ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด

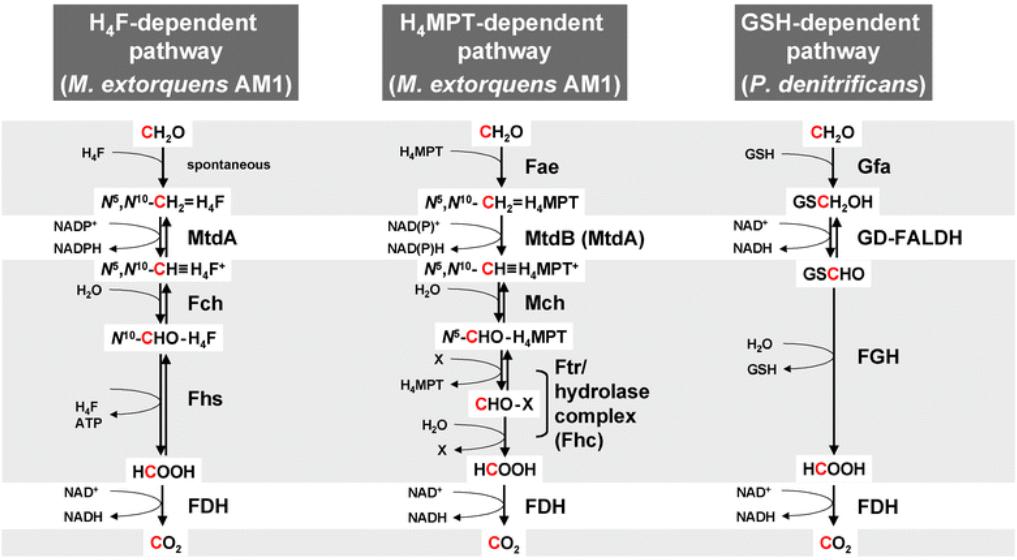


ภาพที่ 3 โครงสร้างของโคแฟกเตอร์และโคเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดส์ฟอร์มาลดีไฮด์

ที่มา: Vorholt (2002)

วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีดังนี้

- Tetrahydrofolate (H_4F)-dependent formaldehyde oxidation
- Tetrahydromethanopterin (H_4MPT)-dependent formaldehyde oxidation
- Glutathione (GSH)-dependent formaldehyde oxidation
- Mycothiol (MySH)-dependent formaldehyde oxidation (เกิดกระบวนการดังภาพที่ 4 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันกับ GSH-dependent formaldehyde oxidation)



ภาพที่ 4 วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ของ *Methylobacterium extorguens* AM1 และ *Paracoccus denitrificasn* เอนไซม์ : *MtdA* NADP-dependent methylene-H_4F dehydrogenase, *Fch* methenyl-H_4F cyclohydrolase, *Fhs* formyl-H_4F synthethase, *FDH* formate dehydrogenase, *Fae* H_4MPT-dependent formaldehyde activating enzyme, *MtdB* NAD(P)-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase, *Mch* methenyl-H_4MPT cyclohydrolase, *Ftr* formyltransferase, *Fhc* Ftr/htdorlase complex, *Gfa* glutathione-dependent formaldehyde activating enzyme, *GD-FALDH* NAD^+ and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, *FGH* S-formyl glutathione hydrolase

ที่มา: Vorholt (2002)

วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นกรดฟอร์มิกโดยอาศัย tetrahydrofolate เป็นโคแฟกเตอร์

การเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งเป็นคาร์บอนหนึ่งอะตอมที่จับกับ tetrahydrofolate (H_4F) ดังแสดงในภาพที่ 4 มีความสำคัญกับสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด พบว่าฟอร์มาลดีไฮด์ในส่วนนี้จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งในระหว่างกระบวนการออกซิเดชันนี้มีการสร้างพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เช่น purine และ thymidilate ฟอร์มาลดีไฮด์ในกระบวนการนี้จะมีการเคลื่อนย้ายหมู่ methyl และ formyl ได้

เป็น N^5-methyl-H_4F, N^5,N^{10}-methylene-H_4F, N^5,N^{10}-methenyl-H_4F และ N^{10}-formyl-H_4F ตามลำดับ (Maden, 2000) หลังจากเกิดกระบวนการในลักษณะนี้แล้วจะได้ ATP, NADPH และ NADH

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ชนิดที่มี H_4F เป็นโคแฟกเตอร์ทั้งหมดในวิถีการเปลี่ยนแปลงแบบแรกนี้จะมีการแสดงออกในระดับต่ำเพียงเพื่อให้มีการสร้างพลังงานได้เท่านั้น แต่ในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้วิถี Serine ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เช่น *Methylobacterium* และ *Hyphomicrobium* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่มี H_4F เป็นโคเอนไซม์ในระดับสูงโดยอาจถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการเจริญในเมทานอล (Marison *et al*., 1982) โดยเกิดขึ้นในขั้นตอนเริ่มต้นของวิถี Serine ซึ่ง H_4F จับกับฟอร์มาลดีไฮด์ได้เป็น N^5, N^{10}-methenyl-H_4F หลังจากนั้นจะรวมตัวกับ glycine แล้วได้ serine ต่อไป ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ที่ขึ้นอยู่กับ H_4F มีหน้าที่เบื้องต้นในการรักษาระดับของสารมัธยันตร์ให้อยู่ในระดับสูงเพื่อนำไปใช้ในวิถี Serine เอนไซม์เหล่านี้อาจมีการทำงานในทิศทางที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันขึ้นอยู่กับความต้องการของเซลล์ โดยพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ NAD-dependent methylene-H_4F dehydrogenase, methenyl-H_4F cyclohydrolase และ N^{10}-H_4F synthetase อาจเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้อย่างสมบูรณ์ดังแสดงในภาพที่ 4

<u>วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นฟอร์เมตชนิดที่อาศัย Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) เป็นโคเอนไซม์</u>

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ tetrahydromethanopterin (H_4MPT) ถูกค้นพบใน methanogenic bacteria และ sulfate-reducing archaea ซึ่งแรกเริ่มนั้นเชื่อว่าพบเฉพาะใน strict anaerobes เท่านั้น และ H_4MPT ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางกระบวนการสร้างพลังงาน (Thauer, 1998)

เมื่อไม่นานมานี้ พบว่ามีเอนไซม์ชนิดที่มี H_4MPT เป็นโคแฟกเตอร์ ใน archaea โดยพบใน *Methylobacterium extorquens* AM1 และยังพบแบคทีเรียที่มีโคแฟกเตอร์ H_4MPT ในรูปที่ไม่มีฟอสเฟต และขาด terminal α-hydroxyglutaryl phosphate คือ *Methanothermobacter marburgensis* (Chistoserdova *et al*.,1998; Vorholt *et al*., 1998; van Beelen *et al*., 1984)

การเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาศัย H_4MPT เป็นโคแฟกเตอร์ เริ่มต้นเหมือนกับวิถีออกซิเดชันที่ขึ้นอยู่กับH_4Fโดยการที่ฟอร์มาลดีไฮด์จับกับโคแฟกเตอร์ pterin ได้เป็นอนุพันธ์

N^5,N^{10}- methylene อาศัยเอนไซม์ชนิดที่ถูกกระตุ้นโดยฟอร์มาลดีไฮด์ (H_4MPT-dependent formaldehyde activating enzyme, Fae) และจะเร่งปฏิกิริยาโดยเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เอนไซม์ Fae นี้อาจมีปริมาณสูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนภายในเซลล์ พบได้ในเซลล์ของแบคทีเรียที่เจริญในเมทานอล พบว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ *M. extorquens* AM1 ที่ขาดเอนไซม์ Fae จะเจริญได้ใน succinate แต่ไม่เจริญในเมทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจะไวต่อเมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์มากกว่าเซลล์ปกติด้วย (Vorholt *et al*., 2000)

การเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาศัย H_4MPT เป็นโคแฟกเตอร์นี้ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ NAD(P)-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ซึ่ง N^5,N^{10}-methylene- H_4MPT ที่เกิดขึ้นมาจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็น N^5,N^{10}-methenyl-H_4MPT^+ โดยในแบคทีเรีย *M. extorquens* AM1 มีเอนไซม์ pyridine nucleotide dependent methylene- H_4MPT dehydrogenase ที่ต่างกันอยู่ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ NADP ชื่อ MtdA เอนไซม์นี้จะไปเร่งปฏิกิริยาการกำจัดไฮโดรเจนของ methylene- H_4F (Ermle*r et al*., 2002) ส่วนชนิดที่สอง คือ เอนไซม์ชนิดที่ต้องการ NAD(P) ชื่อ MtdB ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ methylene-H_4MPT และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เลย เมื่อมี methylene-H_4F (Hagemeier *et al*., 2000) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methylene-H_4MPT ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน MtdA / MtdB จัดเป็นปฏิกิริยาที่มีการคายพลังงาน (-13 KJ/mol) ดังนั้นจึงมักเกิดปฏิกิริยาในทิศทางที่ไม่ผันกลับ และเมื่อรวมกับเอนไซม์ Fae ก็จะช่วยให้การเปลี่ยนแปลงฟอร์มาลดีไฮด์เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ ขณะนี้ยังไม่พบรายงานว่ามีเอนไซม์ pyridine nucleotide dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ในสิ่งมีชีวิตอื่นเลย

ขั้นตอนต่อมาเป็นการทำงานของเอนไซม์ methenyl-H_4MPT cyclohydrolase (Mch) โดย methenyl-H_4MPT^+ ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็น N^5-formyl-H_4MPT (ภาพที่ 4) และการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนสุดท้ายอาศัยการทำงานของเอนไซม์ formyltransferase/hydrolase complex ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการเปลี่ยน N^5-formyl-H_4MPT ให้เป็นกรดฟอร์มิก โดยพบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรีย *M. extorquens* AM1 มีลักษณะเป็น 4 หน่วยย่อยที่ต่างกันคือ FhcD, FhcA, FhcB และ FhcC

สันนิษฐานว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาศัย H_4MPT เป็นโคแฟกเตอร์ เป็นปฏิกิริยาหลักในการออกซิไดส์ฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งเกิดขึ้นใน *M. extorquens* AM1 (Vorholt *et al*., 1998, 2000; Pomper *et al*., 1999) เพราะมีเอนไซม์ Fae และพบกิจกรรมของโปรตีน MtdA/MtdB และ Mch ในระดับสูง อุณหพลศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องมีส่วนทำให้วิถีการออกซิไดส์

ฟอร์มาลดีไฮด์มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะได้รวมเอาปฏิกิริยาการกำจัดไฮโดรเจนของ N^5,N^{10}-methylene- H_4MPT และการแยกสลายด้วยน้ำของโคแฟกเตอร์ที่จับกับคาร์บอนหนึ่งอะตอมเข้าไว้ด้วยกันแล้วจึงได้กรดฟอร์มิกเป็นผลิตภัณฑ์ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ไม่สามารถผันกลับได้ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ให้เป็นกรดฟอร์มิกนั้น จะเกิดโดยวิถีที่ใช้โคแฟกเตอร์ H_4MPT มากกว่าวิถีที่ใช้ H_4F โดยจะผลิต NADH ได้มากกว่า NADPH แต่อย่างไรก็ตามอาจพบการผลิต NADPH ได้จากวิถีแรกได้เช่นกัน ซึ่งจะนำไปใช้สำหรับกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่อไป

เอนไซม์ที่มี H_4MPT เป็นโคแฟกเตอร์ พบได้ในเมทิลโลโทรฟิกโปรทีโอแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้อาจจะมีบทบาทที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น โปรตีน Mch ของ *Methylobacillus flagellatus* KT พบได้ในระหว่างการเจริญในเมทานอล โดยนำไปใช้ในวิถี Ribulose Monophosphate Pathway (RuMP) สำหรับการออกซิไดส์ฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น (Chistoserdova *et al*., 2000)

<u>วิถีออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ชนิดที่อาศัย glutathione หรือ mycothiol เป็นโคเอนไซม์</u>

การออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกี่ยวข้องกับ glutathione (GSH) (ภาพที่ 4) พบได้ทั่วไป ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืช และยีสต์ และตรวจพบได้ในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียพวกที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Paracoccus denitrificans* และในแบคทีเรียสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria) เช่น *Rhodobacter sphaeroides* (Ras *et al*., 1995; Barber *et al*., 1996; Harm *et al*., 1996; Barber and Donohue, 1998; Goenrich *et al*., 2002)

ในแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดมีการใช้ mycothiol (MySH) แทน glutathione (สูตรโครงสร้างแสดงในภาพที่ 3) และเกิดกระบวนการออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์ดังภาพที่ 4 แทน glutathione (GSH)-dependent formaldehyde oxidation (Spies and Steenkamp, 1994) ในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก เช่น *Amycolatopsis methanolica* และแบคทีเรีย *Rhodococcus erythropolis* พบเอนไซม์ mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase ซึ่งมีการศึกษามาก่อนแล้วว่าเป็น NAD/factor - dependent formaldehyde dehydrogenase และพบว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของฟอร์มาลดีไฮด์ในแบคทีเรียเหล่านี้ โดยในแบคทีเรีย *A. methanolica* มีเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase ชนิดที่มี mycothiol (MD-FalDH) เป็นโคเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์ชนิดที่มี glutathione เป็นโคเอนไซม์

จะเห็นว่าทั้ง 4 วิถีที่กล่าวข้างต้นมีลักษณะที่เหมือนกัน คือ การรวมฟอร์มาลดีไฮด์เข้ากับโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งปฏิกิริยานี้อาจเกิดขึ้นได้เองหรือมีเอนไซม์มาเร่งปฏิกิริยาก็ได้ ต่อจากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบที่ได้จนกระทั่งเกิดเป็นกรดฟอร์มิก ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในการเกิดออกซิเดชันของฟอร์มาลดีไฮด์โดยอาศัยโคแฟกเตอร์หรือโคเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย (Vorholt, 2002) ดังนี้

- แบคทีเรียที่ใช้วิถี H_4F-dependent formaldehyde oxidation ได้แก่ *Methanospirillum*, *Methylobacterium* และ *Hyphomicrobium* บางสายพันธุ์ เป็นต้น

- แบคทีเรียที่ใช้วิถี H_4MPT-dependent formaldehyde oxidation ได้แก่ *Methylobacterium, Hyphomicrobium*, *Methylosinus*, *Xanthobacter, Methylobacillus, Methylophilus*, *Methylococcus Methylomicrobium, Methylomonas* เป็นต้น

- แบคทีเรียที่ใช้วิถี GSH-dependent formaldehyde oxidation ได้แก่ *Paracoccus* เป็นต้น

- แบคทีเรียที่ใช้วิถี MySH-dependent formaldehyde oxidation ได้แก่ *Amycolatopsis* เป็นต้น

<u>แอสซิมิเลชันของเมทานอล</u>

เมื่อเมทานอลถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์ methanol dehydroganase (MDH) ได้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์แล้ว ฟอร์มาลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์หรืออาจถูกนำไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ (Zahn *et al*., 2001) ซึ่งการสร้างองค์ประกอบของเซลล์จะเกิดขึ้นได้โดยการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์เข้าสู่วัฏจักรต่าง ๆ โดยเกิดขึ้นได้ 3 วิถี คือ (Anthony, 1982)

1. Ribulose monophosphate cycle (RuMP)
2. Serine cycle
3. Ribulose bisphosphate cycle (RuBP)

Ribulose monophosphate cycle (RuMP)

การตรึงฟอร์มาลดีไฮด์เข้าวัฏจักรนี้ แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (ภาพที่ 5) คือ

ระยะที่ 1 เป็นการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งเกี่ยวข้องกับ 2 ปฏิกิริยา คือ การรวมฟอร์มาลดีไฮด์กับ ribulose 5-phosphate ได้เป็น hexulose 6-phosphate (hexulose phosphate) แล้วเกิดปฏิกิริยา isomerization ได้เป็น fructose 6-phosphate (FMP)

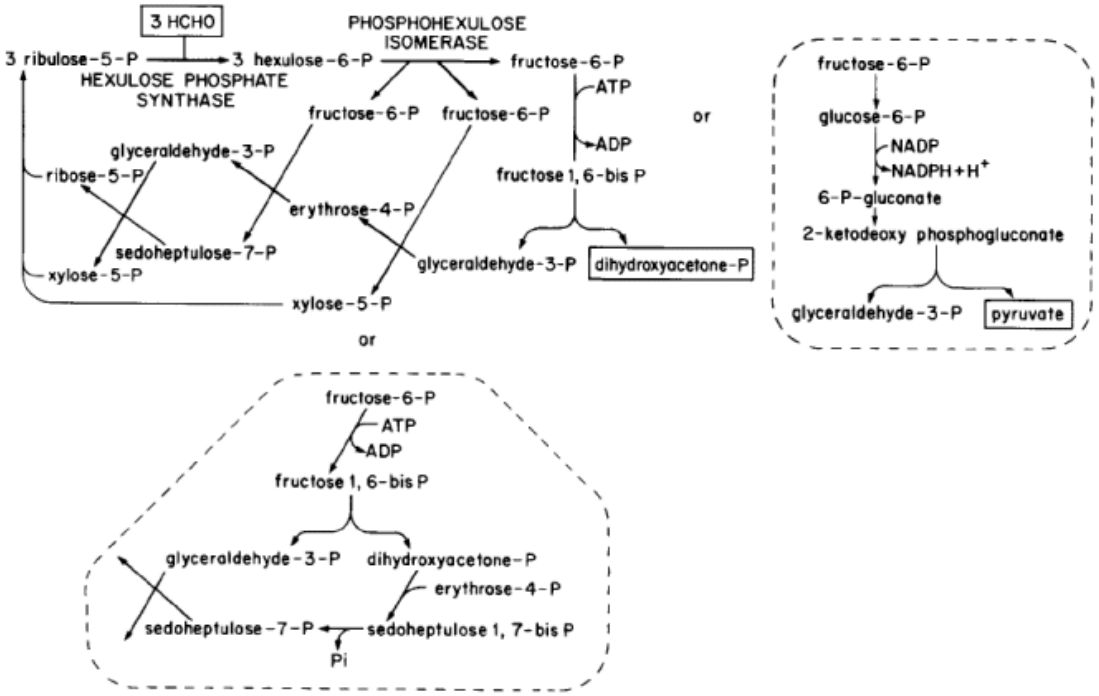
ระยะที่ 2 เป็นการแยกสลาย โดย fructose 6-phosphate (FMP) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยเอนไซม์ phosphofructokinase หรืออาจถูกเปลี่ยนไปเป็น 2-keto 3-deoxy 6-phosphogluconate (KDPG) (ภาพที่ 5) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียดังนี้

- เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียกลุ่ม facultative methylotroph เช่น *Arthrobacter*, *Streptomyces* sp. และ *Pseudomonas oleovorans* จะเกิดปฏิกิริยาในทิศทางที่ FMP เปลี่ยนไปเป็น fructose 1,6-bisphosphate (FBP) โดยเอนไซม์ phosphofructokinase แล้วได้ glyceraldehyde-3-phosphate(GAP) และ dihydroxyacetone-P

- ส่วนเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียกลุ่ม obligate methylotroph เช่น *Methylophilus methylotrophus* และ *Pseudomonas* เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เกิด KDPG หลังจากนั้น KDPG จึงถูกแยกออกเป็น GAP และ pyruvate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบางชนิดที่เกิดปฏิกิริยาไปในทิศทางที่ FBP เปลี่ยนไปเป็น sedoheptulose 1, 7-bisphosphate เช่น *Bacillus* สายพันธุ์ PM6 และ S2A1, *Arthrobacter globiformis* สายพันธุ์ B-175, *Brevibacterium fuscum*, *Mycobacterium vaccae* และ *Arthrobacter* สายพันธุ์ P1

ระยะที่ 3 เป็นการกลับเข้าสู่วัฏจักรอีกครั้ง โดย FMP เข้ารวมกับ glyceraldehyde-3-phosphateแล้วเกิด xylose-5-phosphate ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และเกิด erythrose-4-phosphate ซึ่งเซลล์นำไปสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างวงแหวน ซึ่ง erythrose-4-phosphate ที่เกิดขึ้น อาจถูกเร่งโดยเอนไซม์ transaldolase เข้ารวมกับ FMP อีก 1 โมเลกุล ได้เป็น

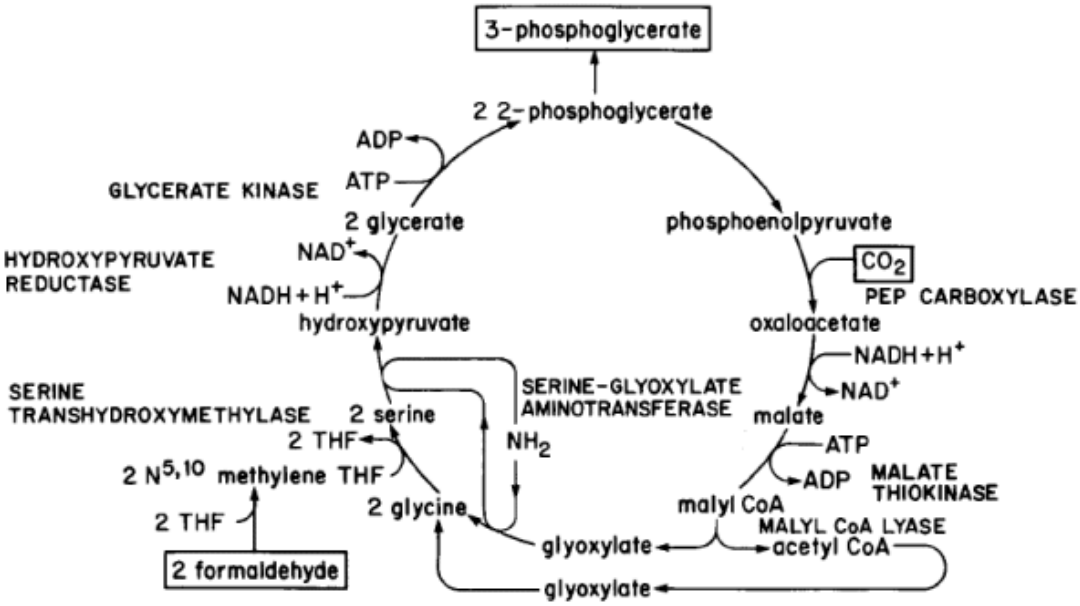
glyceraldehyde-3-phosphate และ sedoheptulose-7-P ซึ่งจะถูกเร่งโดยเอนไซม์ transketolase ได้ ribulose 5-phosphate 3 โมเลกุล



ภาพที่ 5 วิถี Ribulose monophosphate (RuMP)
ที่มา: Lidstrom (1990)

Serine cycle

วัฏจักรหรือวิถี Serine แตกต่างจากวิถีแอสซิมิเลชันฟอร์มาลดีไฮด์วิถีอื่น ๆ โดยวิถีนี้มีสารมัธยันตร์ที่เป็น carboxylic acid และกรดอะมิโนมากกว่าที่จะเป็นคาร์โบไฮเดรต และเอนไซม์ที่สำคัญในการแอสซิมิเลทฟอร์มาลดีไฮด์ คือ เอนไซม์ serine transhydroxymethylase ซึ่งจะเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็น glycine หลังจากนั้นจะได้สารมัธยันตร์ที่สำคัญสำหรับวิถีนี้คือ serine วิถี Serine เกี่ยวข้องในการเจริญของแบคทีเรียที่มีสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมชนิดต่าง ๆ วิถี Serine เป็นการสังเคราะห์ phosphoglycerate จากฟอร์มาลดีไฮด์ 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล (ภาพที่ 6)



<u>ภาพที่ 6</u> วิถี Serine

ที่มา: Lidstrom (1990)

วิถีนี้แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 เป็นการสังเคราะห์ phosphoglycerate โดยฟอร์มาลดีไฮด์ 2 โมเลกุลจับกับ tetrahydrofolate (H_4F หรือ THF) ได้เป็น N^5,N^{10}-methenyl-H_4F ซึ่งจะรวมตัวกับ glycine 2 โมเลกุล แล้วได้ serine 2 โมเลกุล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปจนกระทั่งได้ 2- phosphoglycerate 2 โมเลกุล ซึ่ง 1 โมเลกุลนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น 3-phosphoglycerate เพื่อใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ต่อไป

ระยะที่ 2 โมเลกุลที่เหลือของ 2- phosphoglycerate เปลี่ยนไปเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) แล้วเกิดปฏิกิริยา carboxylation ซึ่งรวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ (ที่ได้จากระบวนการออกซิเดชันของกรดฟอร์มิก) ได้เป็น oxaloacetate ที่จะถูกเปลี่ยนเป็น malyl-CoA ต่อไป

ระยะที่ 3 malyl-CoA ถูกแยกออกเป็น glyoxylate 1 โมเลกุล และ acetyl-CoA ซึ่ง acetyl Co-A จะถูกเปลี่ยนไปเป็น glyoxylate อีก 1 โมเลกุล หลังจากนั้น glyoxylate ทั้ง 2 โมเลกุล รวมกัน

เป็น glycine 2 โมเลกุล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสารหนึ่งของระยะที่ 1 ของวิถีนี้ จึงถือว่าเกิดวัฏจักรโดยสมบูรณ์

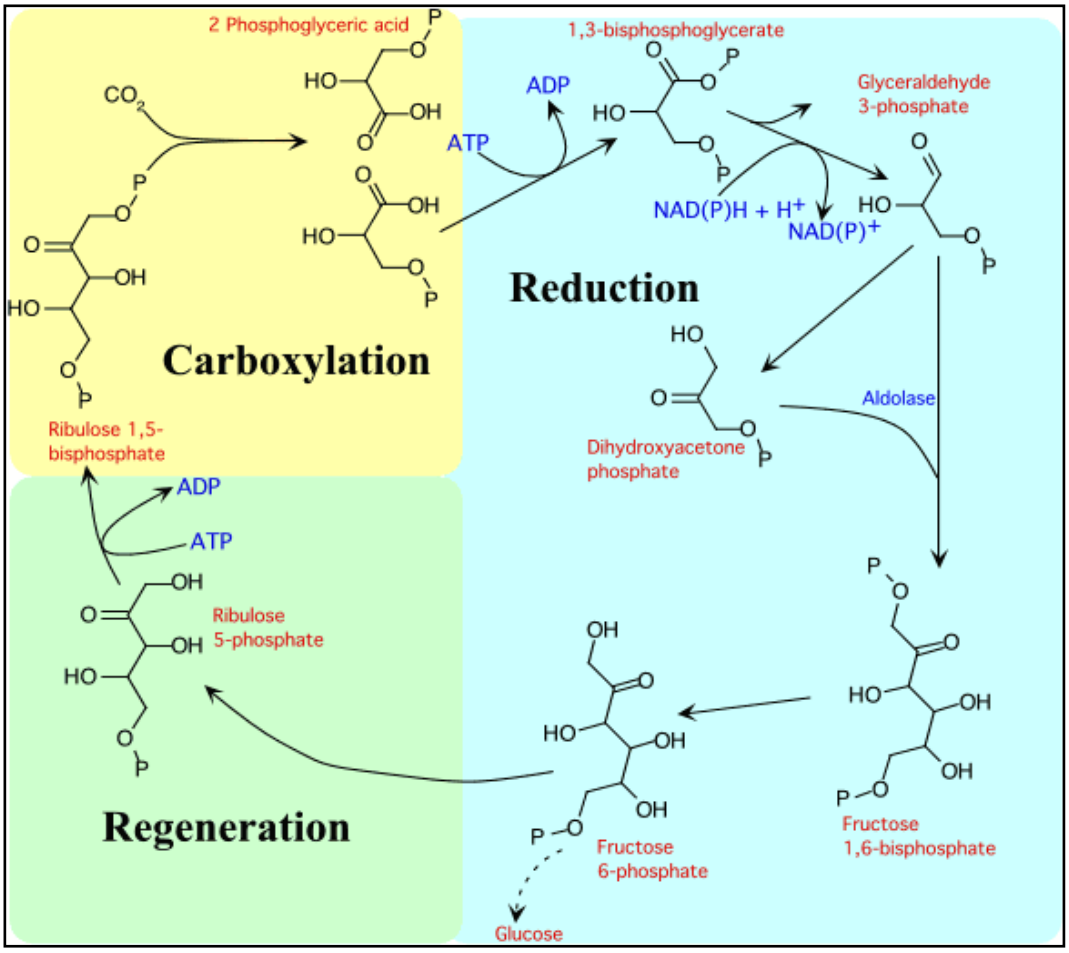
ตัวอย่างเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้วิถี Serine เป็นวิถีหลักในกระบวนการแอสซิมิเลชันของเมทานอล ได้แก่ เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียในกลุ่ม pink-pigmented facultative methylotroph เช่น *Methylobacterium extorquens* AM1 และ *Pseudomonas methylica* เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียในกลุ่ม non pink-pigmented facultative methylotroph เช่น *Arthrobacter*, *Hyphomicrobium*, *Streptomyces* สายพันธุ์ 239, *Pseudomonas aminovorans*, *Pseudomonas* สายพันธุ์ MA และ *Pseudomonas* สายพันธุ์ MS เป็นต้น

Ribulose bisphosphate cycle (RuBP)

วิถี RuBP หรือวัฏจักร Calvin เป็นวิถีที่แตกต่างจากวิถีอื่น คือ ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากกระบวนการดิสซิมิเลชันของเมทานอลมาใช้เป็นสารมัธยันตร์ในวิถีนี้ โดยจะถูกแอสซิมิเลทโดยออกซิเดชันของคาร์บอนไดออกไซด์

ปฏิกิริยาทั้งหมดที่เกิดขึ้นในวัฏจักรนี้ทำให้เกิดการสังเคราะห์ glyceraldehyde 3-phosphate 1 โมเลกุลที่เริ่มต้นจากคาร์บอนไดออกไซด์ 3 โมเลกุล โดยปฏิกิริยาสรุปได้ดังต่อไปนี้

$$3\ CO_2 + 6\ NAD(P)H + 6\ H^+ + 9\ ATP \longrightarrow \text{glyceraldehyde 3-phosphate} + 6\ NAD(P)^+ + 9\ ADP + 8\ Pi$$



ภาพที่ 7 วิถี Ribulose bisphosphate (RuBP)

ที่มา: Lidstrom (1990)

วิถี RuBP แบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 เป็นการตรึง (fixation) คือ เกิดปฏิกิริยา carboxylation ของคาร์บอนไดออกไซด์กับ ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) ผลที่ได้ คือ phosphoglyceric acid (PGA) จำนวน 2 โมเลกุล หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปอีก 1 หมู่ได้เป็น 1,3-bisphosphoglycerate

ระยะที่ 2 เป็นปฏิกิริยารีดักชันของ 1,3-bisphosphoglycerate ได้เป็น glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) แล้วเปลี่ยนไปเป็น fructose 6-phosphate เพื่อใช้ในการสร้างกลูโคส และจะถูกนำไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ต่อไป

ระยะที่ 3 เป็นการ regeneration โดย fructose 6-phosphate เปลี่ยนเป็น ribulose 5-phosphate ที่จะได้รับหมู่ฟอสเฟตอีก 1 หมู่ ได้เป็น ribulose 1,5-bisphosphate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสารหนึ่งของระยะที่ 1 ของวิถีนี้ จึงเป็นการกลับเข้าสู่วัฏจักรอีกครั้ง (ภาพที่ 7)

ตัวอย่างเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้ RuBP เป็นวิถีหลักในการแอสซิมิเลชันของเมทานอล ได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodopseudomonas acidophila* (ใช้เมทานอลหรือฟอร์เมตเป็นซับสเตรต), *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodospirillum tenue* (ใช้เมทานอลเป็นซับสเตรต) และ *Rhodopseudomonas palustris* (ใช้ฟอร์เมตเป็นซับสเตรต) และแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่มีการสังเคราะห์แสง (Non-photosynthetic bacteria) เช่น *Pseudomonas oxalaticus* (ใช้ฟอร์เมตเป็นซับสเตรต), *Paracoccus denitrificans* (*Micrococcus denitrificans*) (ใช้เมทานอล เมทิลลามีน หรือ ฟอร์เมตเป็นซับสเตรต), *Thaiobacillus novella* (ใช้เมทานอล ฟอร์เมต หรือฟอร์มาลดีไฮด์เป็นซับสเตรต), *Hydrogenomonas eutropha* และ *Bacterium formoxidans* (ใช้ฟอร์เมตเป็นซับสเตรต), *Microcyclus aquaticus* (ใช้เมทานอลหรือฟอร์เมทเป็นซับสเตรต) และ *Blastobacter viscosus* (ใช้เมทานอลเป็นซับสเตรต) (Anthony, 1982)

ฟอร์มาลดีไฮด์

ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่แล้วฟอร์มาลดีไฮด์เกิดจากการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรม และฟอร์มาลดีไฮด์ยังเป็นสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล โดยเป็นสารมัธยันตร์ที่เป็นศูนย์กลางในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในกลุ่มเมทิลโลโทรฟทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทนต่อความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ และได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านชีวเทคโนโลยี และการบำบัดทางชีวภาพทำให้สามารถกำจัดหรือลดความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้ เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดี เช่น *Methylobacterium extorq*uens*, Methylococcus capsulatus*, *Methylomonas methaica*, *Methylobacterium organophilum*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylophilus methylotrophus*, *Pseudomonas extorquens*, *Hyphomicrobium vulgare*, *Paracoccus denitrificans* และ*Rhodopseudomonas acidophila* (Anthony, 1982; Chongcharoen *et al*., 2005)

<u>สมบัติของฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde)</u>

ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นก๊าซที่มีกลิ่นฉุน ในทางการค้ามักอยู่ในรูปของสารละลายที่ประกอบด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ 37-50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูตรโครงสร้างคือ HCHO มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30.03 ฟอร์มาลดีไฮด์ผลิตขึ้นจากการออกซิเดชันของเมทานอลกับออกซิเจนในบรรยากาศหรือการออกซิเดชันของมีเทน

การใช้ประโยชน์ฟอร์มาลดีไฮด์ในด้านต่าง ๆ มีดังนี้

1. ด้านอุตสาหกรรม
   1.1 ในการผลิตเรซินและพลาสติก เช่น urea - formaldehyde, melamine-formaldehyde, phenol - formaldehyde และอื่น ๆ
   1.2 ในการสังเคราะห์ urotropine, propyl alcohol ยา วัตถุระเบิด และสีต่าง ๆ เช่น สีคราม สีแดง สีอะคริลิก รวมถึงการฟอกหนังและสีตกแต่งอาหาร
   1.3 ในการย้อมเพื่อปรับปรุงให้สีย้อมติดแน่นขึ้น
   1.4 ในการฟอกสีและการพิมพ์
   1.5 ในอุตสาหกรรมกระดาษ เพื่อให้กระดาษลื่นและกันน้ำได้
   1.6 ในการผสมโลหะ เพื่อระงับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน
   1.7 ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เพื่อผลิตผงที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะน้ำหนัก และความแข็งแรงของไหมสังเคราะห์
   1.8 ใช้สำหรับภาพถ่าย ทำให้เก็บได้นาน

2. ด้านการเกษตร
   2.1 ใช้สำหรับการทำลายและป้องกันจุลินทรีย์ในต้นไม้ที่เป็นโรค
   2.2 ป้องกันผลิตผลการเกษตรจากการเสียหายระหว่างการขนส่ง และการเก็บรักษา
   2.3 ใช้ฆ่าเชื้อโรคในดิน
   2.4 ใช้ทำความสะอาดสถานที่เก็บอุปกรณ์ เช่น ลังไม้
   2.5 เป็นส่วนผสมของสารละลายที่ใช้เคลือบผัก ผลไม้จำพวกส้ม ระหว่างการเก็บเกี่ยวเพื่อชะลอการเน่าเสีย
   2.6 ใช้เป็นปุ๋ย (urea formaldehyde)

3. ด้านการแพทย์

3.1 ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางสรีระร่างกาย ดองศพ

3.2 ใช้ทำความสะอาดห้องผู้ป่วย เครื่องมือเครื่องใช้ในการเตรียม และสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยา วัคซีน

4.เครื่องสำอาง

4.1 ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อระงับเหงื่อ

4.2 ใช้ในยาสีฟัน ยาบ้วนปาก สบู่ ครีมโกนหนวด เพื่อฆ่าเชื้อ

4.3 ใช้ในน้ำยาดับกลิ่นตัว

การนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์

1. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

Anthony (1982) กล่าวว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมีค่าผลผลิต (yield) อัตราการเจริญ และส่วนประกอบของโปรตีนที่สูงกว่ายีสต์ จึงมีการนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมาพัฒนาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวโดยบริษัท ICI (Imperial Chemical Industries) ประเทศอังกฤษ ได้สายพันธุ์แบคทีเรีย *Methylophilus methylotrophus* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญค่อนข้างสูง (40 องศาเซลเซียส) สามารถเจริญได้เร็วในเมทานอล (μ_{max} ประมาณ 0.55 ต่อชั่วโมง) และให้ค่าผลผลิตสูง จึงใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นการค้าต่อมา

2. การผลิตวิตามินบี 12

มีรายงานการผลิตวิตามินบี 12 โดยกระบวนการหมัก ซึ่งใช้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต แต่ได้มีการพัฒนามาใช้สารอาหารที่มีราคาถูกกว่าคือ เมทานอล ซึ่ง Tanaka *et al*. (1974) พบว่า *Protaminobacter rubber* ซึ่งเป็น pink-pigmented facultative methylotroph ที่คัดแยกได้สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. <u>การผลิต poly-β-hydroxybutyrate (PHB)</u>

poly-β-hydroxybutyrate (PHB) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และพบว่าอาจสะสมอยู่ในเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม PHB จะถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพลีเมอร์ทางด้านเคมีเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก

เนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่มีราคาถูกจึงได้นำมาใช้ในการผลิต PHB ซึ่งในการควบคุมระดับของเมทานอลและออกซิเจนที่เติมลงไปมีความสำคัญมาก Bourqur *et al*. (1995) แสดงให้เห็นว่าต้องมีการควบคุมให้มีเมทานอลอยู่ในระดับต่ำเสมอ (0.01 กรัมต่อลิตร) ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียผลิต PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ถึง 900-1800 กิโลดาลตัน

4. <u>การผลิตกรดอะมิโน</u>

ไลซีนเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ ปัจจุบันไลซีนที่ผลิตเพื่อใช้ในทางการค้าผลิตโดยกระบวนการหมักโดยใช้แบคทีเรียที่เจริญในน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตามสิ่งที่จำเป็นสำหรับกระบวนการผลิต คือ การหาปัจจัยที่สามารถช่วยลดต้นทุนทางเศรษฐกิจลง จึงได้มีการใช้สารประกอบที่เป็นคาร์บอนหนึ่งอะตอม เช่น เมทานอล ซึ่งมีราคาถูกและมีความบริสุทธิ์สูงมาพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตไลซีน Lee *et al*. (1996) รายงานการผลิตไลซีนจากเมทานอลโดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus methanolicus* ที่อุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส และช่วยลดต้นทุนในการใช้ระบบหล่อเย็นได้ถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์

5. <u>การผลิตฮอร์โมนพืช</u>

มีรายงานว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย *Methylobacterium* ซึ่งพบได้ทั่วไปในดิน และผิวของใบไม้อาจผลิตฮอร์โมนพืชบางชนิดได้ (Corpe and Basile, 1982; Lidstrom and Chistoserdova, 2002) เนื่องจากสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชและช่วยในการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียชนิดนี้บางสายพันธุ์สามารถผลิตฮอร์โมนพืชชนิด cytokinin zeatin (Ivanova *et al*., 2000) ได้ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถผลิต indole acetic acid ได้ (Ivanova *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า *Methylobacterium* อาจมีส่วนในการสร้างกลิ่นรสของสตรอเบอรี่ด้วย (Zabetakis, 1997)

6. <u>การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation)</u>

ได้มีการทดลองย่อยสลายสารพิษประเภท aromatic 2, 4D และแคดเมียม ในดินที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยสารเหล่านี้ พบว่าการย่อยสลายของมลภาวะเกิดได้มากขึ้นโดยการเติมแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ ชนิดที่ย่อย 2, 4 D ได้แต่ไวต่อแคดเมียม และชนิดที่ทนต่อแคดเมียมแต่ไม่สามารถย่อย 2, 4 D ได้ (Roane *et al*., 2001; de Marco *et al*., 2004) ได้มีรายงานว่าสามารถแยกได้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อสารพิษ เพื่อนำมาใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ การแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและตะกอนดินโดยใช้สภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความผันแปรทั้งลักษณะที่ปรากฏและอนุกรมวิธานค่อนข้างมาก โดยมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถทนต่อโลหะหนักอาร์เซนิกและสารพิษที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่ถูกจัดให้เป็น super-bugs เนื่องจากสามารถทนต่อสารพิษหลายชนิดที่ความเข้มข้นสูง

มีรายงานว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสารประกอบเมทิลเลทซัลเฟอร์ (methylated sulfur) ซึ่งจะพบสารประกอบชนิดนี้ได้ในน้ำเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานผลิตกระดาษ เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียสามารถย่อยอะลิฟาติกซัลฟอร์เมท (aliphatic sulformate) ได้ จึงมีการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ในการย่อยสลายสารดังกล่าว (Murrell and McDonald, 2000)

<u>แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง</u>

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญแตกต่างกัน อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญได้อยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด(minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ แบคทีเรียจะไม่เจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเรียกว่า อุณหภูมิเหมาะสม (optimum temperature) อุณหภูมิทั้งสามชนิดนี้เรียกว่า อุณหภูมิคาร์ดินัล (cardinal temperature) ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน (ตารางผนวกที่ ค1) จึงสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophile)

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นไซโครไฟล์ที่แท้จริง (obligate psychrophile) อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญ คือ 30 องศาเซลเซียส แต่บางพวกมีช่วงอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญ คือ 35 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็น facultative psychrophile หรือ psychrotroph ตัวอย่าง psychrophilic bacteria เช่น *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium* และ *Micrococcus*

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile)

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิปานกลาง คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 5-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 43 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง mesophilic bacteria เช่น *Neisseria, Salmonella* และ *Vibrio*

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophile)

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 45-60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 60-85 องศาเซลเซียส ตัวอย่างthermophilic bacteria เช่น *Bacillus, Clostridium, Thermoactinomyces* และ *Methanobacterium* เทอร์โมไฟล์บางพวกเจริญมากในช่วงมีโซไฟล์ จึงเรียกว่า facultative thermophile หรือ eurithermophileบางพวกเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เรียกว่า เทอร์โมไฟล์แท้จริง หรือstenothermophile แต่มีแบคทีเรียบางพวกที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิมีโซไฟล์ (20-43 องศาเซลเซียส) และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่เป็นเทอร์โมไฟล์ (45-65 องศาเซลเซียส) เรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant bacteria) เช่น *Bacillus methanolicus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 35-60 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 55 องศาเซลเซียส (Arfman *et al*., 1992) และ *Bacillus brevis* S1 (Yurimoto *et al*., 2002) ซึ่งแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ได้ยกตัวอย่างไปข้างต้นเป็นแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ (methylotrophic bacteria) ซึ่ง

สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Anthony, 1982) การผลิตวิตามินบี 12 และ rivoflavin (Tanaka, 1974) การผลิต poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (Bourqur *et al*., 1995) การใช้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงในการผลิตระดับอุตสาหกรรมน่าจะมีข้อได้เปรียบทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตดีขึ้น และไม่จำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นที่มีประสิทธิภาพสูงมากนัก ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนของการผลิตได้มาก ช่วยลดโอกาสการปนเปื้อน และป้องกันการผลิตหยุดชะงักเมื่อมีความร้อนสูงเกินไป

อนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

อนุกรมวิธาน (Taxonomy) เป็นวิชาที่ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกประเภทของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกประเภทของแบคทีเรียก็เป็นงานด้านหนึ่งทางอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ (Microbial taxonomy หรือ Systematics arrangement of microorganisms) หลักการสำคัญของอนุกรมวิธาน คือ การจำแนกประเภท การตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ และการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (ดวงพร, 2537)

การจำแนกประเภท (Classification)

การจำแนกประเภท หมายถึง การจัดระเบียบของแต่ละสิ่งเข้าเป็นหน่วย ซึ่งประกอบด้วยลักษณะเหมือน ๆ กันที่แตกต่างจากหน่วยอื่น ๆ

สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย นิยมใช้หนังสือ Bergey ’s Manual of Determinative Bacteriology ซึ่งฉบับที่ใช้ปัจจุบันเป็นฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 ปี ค.ศ. 1994 (Holt, 1994) เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งจัดแบคทีเรียอยู่ในอาณาจักรโมเนอรา ตามที่ Whittaker จัดแบ่งสิ่งมีชีวิตไว้ 5 อาณาจักรตามความต้องการสารอาหารและการสร้างพลังงาน แต่เปลี่ยนชื่อเรียกอาณาจักรโมเนอราว่า โปรคารีโอตี (Procaryotae) เนื่องจากเป็นอาณาจักรของสิ่งมีชีวิตที่มีเซลล์เป็นแบบโปรคารีโอท

การตั้งชื่อสิ่งมีชีวิต (Nomenclature)

การตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) ของสิ่งมีชีวิตให้เป็นที่ยอมรับกันทั่วโลก มีข้อตกลงระหว่างประเทศโดยกำหนดเป็นรหัสนานาชาติ ซึ่งมีการตั้งกฎของการตั้งชื่อแบคทีเรียและ

ไวรัสออกมาเป็นรหัส เรียกว่า The International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses ต่อมาแยกเป็น The International Code of Bacteria ในปี ค.ศ. 1974

หลักเกณฑ์ของการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ (Principles of Nomenclature) สรุปได้ดังนี้

1. สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่แตกต่างกันจัดว่าเป็นชนิด (species) หนึ่ง

2. ใช้หลักลำดับก่อนหลัง (priority) คือ ต้องสืบค้นหลักฐานคนที่พบ และตั้งชื่อไว้ก่อน ชื่อที่ถูกต้องเรียกว่า วาลิด (valid) ซึ่งต้องมีการตีพิมพ์อธิบายลักษณะของชนิดเป็นภาษาละตินที่เรียกว่า Latin diagnosis

3. การกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ระดับชนิด แบคทีเรียใช้หลักเกณฑ์เดียวกับพืชและสัตว์ คือ ใช้ระบบไบโนเมียล (Binomial system หรือ Binomial nomenclature) ซึ่งประกอบด้วยคำที่เป็นภาษาละติน 2 คำ คำแรกเป็นชื่อสกุล คำหลังเป็นคำคุณศัพท์ขยายคำหน้าที่เรียกว่า specific epithet เป็นคำที่แสดงคุณสมบัติหรือลักษณะบางประการของสิ่งมีชีวิตนั้น ผู้นำหลักเกณฑ์นี้มาใช้เป็นคนแรกคือ Carolus Linnaeus

4. ชื่อวิทยาศาสตร์ระดับสกุลให้เขียนเป็นตัวเอน (italic) หรือถ้าไม่มีตัวเอนให้ขีดเส้นใต้ และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่

5. specific epithet ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก เป็นตัวเอนหรือขีดเส้นใต้ เขียนแยกจากชื่อสกุล และจะเขียนเดี่ยว ๆ ไม่ได้ ต้องเขียนคู่ชื่อสกุลเสมอ

6. ชื่อที่นำไปใช้ต้องเป็นไปตามกฎที่ตั้งไว้จึงจะถูกต้อง

ชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียใช้ระบบการตั้งชื่อแบบไบโนเมียล เช่นเดียวกับพืชและสัตว์ คือ ชื่อหน้าเป็นสกุล (genus) ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ใช้ตัวเอนหรือขีดเส้นใต้แทน คำที่ใช้จะเป็นภาษาละตินหรือกรีก ถ้าเป็นคำที่บัญญัติใหม่ให้ใช้คำประสมที่มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินหรือกรีก

ในแบคทีเรียบางชนิดมีความแตกต่างระดับชนิดได้ จึงแบ่งออกเป็น varieties หรือสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ เช่น *Streptococcus lactis* สายพันธุ์ที่มีกลิ่นเหมือนข้าวมอลต์ คือ *S. lactis* var. *maltigens* และพวกที่ย่อยเจลาตินได้คือ *S. faecalis* var. *liquefaciens*

การจัดจำแนก (Identification)

เมื่อแยกแบคทีเรียได้จากตัวอย่างแล้ว ในทางปฏิบัติต้องทำให้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วศึกษาสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแกรมเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้น จากนั้นทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เช่น ความสามารถในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน การสร้างเอนไซม์บางชนิด ความสัมพันธ์กับออกซิเจน และอื่น ๆ เท่าที่จำเป็น แล้วนำสมบัติที่ทดสอบได้ของแบคทีเรียที่ไม่ทราบชนิดไปเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้ว ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้มีการบรรยายลักษณะต่าง ๆ ไว้อย่างครบถ้วนในหนังสือคู่มือ เช่น Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

หลักเกณฑ์การจัดจำแนกแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแบคทีเรียตามวิธีของ Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 ปี ค.ศ. 1994 (Holt, 1994) อาศัยการพิจารณาสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรีย ดังนี้

1. ความต้องการสารอาหาร (Nutritional requirement)

แบคทีเรียมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดต้องการอาหารที่ซับซ้อนแต่บางชนิดก็เจริญได้ในอาหารที่ง่าย ๆ แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทุกรูปแบบ ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ได้เป็น 4 ประเภท แสดงดังตารางผนวกที่ ค2 แบคทีเรียที่ศึกษามากในห้องปฏิบัติการทั่วไปเป็นพวกที่มีการดำรงชีวิตแบบchemoheterotroph

อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) ทั่วไป ประกอบด้วยธาตุอาหารที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีเพียงเกลืออนินทรีย์ แต่บางชนิดต้องเติมสารสกัดจากเนื้อสัตว์ เช่น beef extract หรือสารสกัดจากพืช เช่น malt extract หรือสารสกัดจากจุลินทรีย์ เช่น yeast extract

2. ความต้องการทางกายภาพ (Physical requirement)

สภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ อากาศ แสง ความเป็นกรด-ด่าง ความต้องการแก๊สบางชนิด สภาพทางกายภาพ สามารถนำมาใช้เพื่อการจำแนกประเภทของแบคทีเรียได้ เช่น แบคทีเรียที่เจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจนเรียกว่า aerobic bacteria แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนได้เรียกว่า anaerobic bacteria หรือแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนเรียกว่า facultative anaerobic bacteria หรือแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนเล็กน้อยเรียกว่า microaerophilic bacteria นอกจากนี้อาจแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม ตามการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ แบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงเรียกว่า thermophilic bacteria แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำเรียกว่า psychrophilic bacteria

3. ลักษณะเฉพาะเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristic)

เซลล์หนึ่งของแบคทีเรียจะเจริญขึ้นรวมเป็นกลุ่มก้อนที่เรียกว่า โคโลนี จนสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ทำให้สามารถศึกษาลักษณะของเชื้อจากโคโลนี เช่น ความด้าน ใส ขุ่นทึบ ให้รงควัตถุ เป็นเม็ดละเอียดหรือหยาบ ขอบเขตการเจริญกระจายออกหรือเป็นจุดเล็ก ๆ มีลักษณะขอบเรียบหรือขรุขระ เป็นเมือกหรือแห้ง หรือเป็นเกล็ด นอกจากนี้ลักษณะการเจริญในอาหารแข็งหน้าตัดตรง (stab culture) หรือในอาหารเหลว (broth culture) สามารถช่วยในการจำแนกได้

4. ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

ลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย เป็นคุณสมบัติที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และแบคทีเรียโดยทั่วไปที่ศึกษากันมากที่สุด อยู่ในอันดับ Eubacteriales มีขนาดเป็นไมครอน ต้องใช้กำลังขยายประมาณ 1000 เท่า โดยใช้เลนส์หัวน้ำมัน (oil immersion len) จึงจะเห็นรูปร่างเป็นท่อน กลม หรือเกลียว การจัดเรียงตัว รวมทั้งศึกษาว่าแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ สร้างแคปซูล (capsule) หรือเกราะ (cyst) และดูชนิดของแฟลกเจลลา (flagella) ถ้าต้องการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

5. ลักษณะเฉพาะของเมแทบอลิซึมและลักษณะทางชีวเคมี (Metabolic or biochemical characteristic)

การศึกษาเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย นอกจากดูว่าจุลินทรีย์ให้ประโยชน์หรือให้โทษแล้ว ยังอาจนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วย เพราะแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสารอาหารต่างกัน การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ธาตุอาหารบางชนิดลงไป แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด เกิดแก๊ส เกิดสารบางชนิด ทำให้ทราบถึงปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แต่ละขั้นตอนได้

การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test) การทดสอบ MR (methyl red test) การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) การทดสอบอินโดล (indole test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบการใช้อะซิเตต (acetate utilization test) การทดสอบการใช้มาโลเนต (malonate utilization test) การทดสอบการย่อยอาร์จินิน (arginine dihydrolase test) การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test) การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test) การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction test) การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase test) การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test) การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (oxidation-fermentation test) เป็นต้น

6. ลักษณะเฉพาะของส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition characteristic)

โครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์แบคทีเรีย อาจมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน ซึ่งปัจจุบันมีเทคนิคทันสมัยที่ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แตกต่างกัน รวมทั้งความแตกต่างกันของสารพันธุกรรมและสารที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์

7. การเป็นแอนติเจน

การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียเกี่ยวกับปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี เป็นการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นแอนติเจน โดยฉีดแบคทีเรียเข้าไปในสัตว์ทดลองแล้วตรวจสอบดูว่าสัตว์ทดลองมีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหรือไม่ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง และมีประโยชน์มากในการแยกแบคทีเรีย ซึ่งอาจแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

8. ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม (Genetic characteristic)

การจำแนกประเภทแบคทีเรียที่สมบูรณ์ที่สุด ควรศึกษาเกี่ยวกับสารพันธุกรรม เพื่อการจำแนกประเภทแบคทีเรียให้เข้าใกล้ระบบธรรมชาติมากที่สุด โดยทั่วไปใช้การศึกษา 2 วิธี คือ การวิเคราะห์หาปริมาณกรดนิวคลีอิก โดยหาปริมาณของ guanine และ cytosine ในเซลล์ และการหาความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาระหว่าง DNA กับ DNA หรือระหว่าง DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน ในการเกิด DNA-DNA hybridization หรือ DNA-RNA hybridization เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกัน นอกจากนี้การศึกษาถึงขนาดของจีโนม (genome) ก็สามารถช่วยในการจำแนกประเภทได้

สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษาเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียน้อยมากทั้งในด้านการแยกเชื้อ ความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รวมถึงพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากธรรมชาติ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อน จึงคาดว่าจะสามารถแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้ในปริมาณมาก เพื่อนำมาคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีที่อุณหภูมิสูง และศึกษาเอนไซม์สำคัญในวิถีการเปลี่ยนแปลงเมทานอลและการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ รวมทั้งการจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ได้แก่ ดิน เปลือกไม้ ใบไม้ และดอกไม้ เป็นต้น

2. <u>การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส</u>

2.1 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) (ภาคผนวก ก) ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

2.2 ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากข้อ 2.1 ลงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แล้ว streak เชื้อจาก Erlenmeyer flask เดิมที่บ่มครบ 3 วัน จากข้อ 2.1 ลงบนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (เหมือนอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ใส่วุ้น 15 กรัมต่อลิตร) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย

2.3 ทำซ้ำข้อ 2.2 อีก 2 ครั้ง

2.4 รวบรวมเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่พบว่าเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน แล้วเขี่ยเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA

2.5 เก็บเชื้อที่รวบรวมได้ไว้บนอาหาร NA ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูง (45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส)</u>

3.1 นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่รวบรวมได้จากข้อ 2 มาคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่ 45 50 55และ60 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 3 วัน และตรวจการเจริญโดยการดูความขุ่นผ่านเส้นดำที่มีความหนา 0.1 มิลลิเมตร รายงานผลการเจริญ ดังนี้

- \- หมายถึง ไม่มีการเจริญ
- +1 หมายถึง มีการเจริญน้อยมาก
- +2 หมายถึง มีการเจริญน้อย
- +3 หมายถึง มีการเจริญดี
- +4 หมายถึง มีการเจริญดีมาก

3.2 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่มีการเจริญดีและดีมากเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

4. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง</u>

4.1 เพาะเชื้อเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่รวบรวมไว้ ลงบนอาหาร NA (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.2 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.3 เพาะกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) เท่ากับ 0.1 โดยการคำนวณจากสูตร

$N_1V_1 = N_2V_2$ เมื่อ

N_1 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของกล้าเชื้อ

N_2 = ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยในอาหารสำหรับหมัก

V_1 = ปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมัก

4.4 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่ 37 45 50 และ55 องศาเซลเซียส ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

4.5 ตรวจการเจริญโดยวัดค่า OD_{610} ทุก ๆ 2 ชั่วโมง

4.6 นำค่า OD_{610} มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{610} กับเวลา จากนั้นคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ในช่วง exponential phase ของการเจริญ ซึ่งคือ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของจุลินทรีย์ ณ สภาวะที่ศึกษา

4.7 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง จากเกณฑ์การพิจารณา คือ ต้องมีค่า μ_{max} ที่ 37 องศาเซลเซียสมากกว่าค่า μ_{max} ที่อุณหภูมิสูงกว่า (45-60 องศาเซลเซียส)

4.8 เก็บแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

5. <u>การศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

ศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.8 โดยดูลักษณะการเจริญที่ปรากฏบนหรือในอาหาร NA (ภาคผนวก ก) เช่น รูปร่างของโคโลนี ขนาด สี โดยเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ขณะเดียวกัน ศึกษาลักษณะของเซลล์ เช่น รูปร่าง ขนาด การติดสีแกรม (ภาคผนวก ก) และศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์โดยการย้อมเอนโดสปอร์ (ภาคผนวก ก)

6. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง</u>

การคัดเลือกทำโดยการทดสอบการเจริญในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) และเติมฟอร์มาลดีไฮด์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.01-2.5 มิลลิโมลาร์

6.1 เตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 4.1-4.2

6.2 เพาะกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมฟอร์มาลดีไฮด์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีค่า OD_{610} เท่ากับ 0.1 โดยการคำนวณจากสูตรในข้อ 4.3

6.3 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.4 ตรวจการเจริญโดยวัดค่า OD_{610} ทุก ๆ 2 ชั่วโมง

6.5 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้นข้นสูงโดยใช้เกณฑ์ในการพิจารณา คือ ต้องมีค่า OD_{610} เพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นเป็นสองเท่า จึงจะถือว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้

7. <u>การศึกษารูปแบบการเจริญ การใช้เมทานอล และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส</u>

เตรียมกล้าเชื้อของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 ตามวิธีในข้อ 4.1-4.2 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3-4.5 แต่บ่มเชื้อที่ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อตรวจวิเคราะห์ดังนี้

7.1 ค่า OD_{610} ที่เวลาต่าง ๆ

7.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ ตามวิธีของ Bradford (1976)

7.3 กิจกรรมของเอนไซม์ methanol dehydrogenase (MDH) ตามวิธีของ Arfman *et al.* (1990)

7.4 ปริมาณเมแทบอไลท์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ได้แก่ เมทานอล ตามวิธีของ Murdanoto *et al.* (1997) และฟอร์มาลดีไฮด์ ตามวิธีของ Nash (1953)

8. <u>การตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่ 45 องศาเซลเซียส โดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง</u>

เตรียมกล้าเชื้อของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 ตามวิธีในข้อ 4.1-4.2 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3-4.5 แต่บ่มเชื้อที่ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงมาทำการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

8.1 ค่า OD_{610} ที่เวลาต่าง ๆ

8.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ ตามวิธีของ Bradford (1976)

8.3 กิจกรรมของเอนไซม์ 3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS) ตามวิธีของ Arfman *et al.* (1992)

8.4 กิจกรรมของเอนไซม์ 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI) ตามวิธีของ Arfman *et al.* (1992)

8.5 ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และภายในเซลล์ ตามวิธีของ Nash (1953)

9. <u>การจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

9.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนีและการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

ใช้วิธีการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนีร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การเจริญในสภาพไร้ออกซิเจน การทดสอบคะตะเลส (catalase test) การทดสอบVP (Voges-Proskauer test) การทดสอบอินโดล (indole test) การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization test) การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test) การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction test) การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test) การเจริญที่สภาวะที่มีเกลือ 5 และ10 เปอร์เซ็นต์ และการเจริญที่ 5 และ10 องศาเซลเซียส

9.2 การจัดจำแนกทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA แล้วเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกไปวิเคราะห์หาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการจัดจำแนกแบคทีเรีย หน่วยปฏิบัติการ KU Vector คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และจัดจำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้กับลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn จาก www. ncbi. nlm. nih. gov

หลักการของการหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA คือ การหาลำดับเบสของ 16S rDNA ซึ่งถูกเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 27F : (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1389R : (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') และ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบสคือ 520F (5'-ATTGGATCCCAGCMGCCGCGGTAA-3') แทน M ด้วย A หรือ C ซึ่งความยาวของลำดับเบสที่อ่านได้ประมาณ 700 คู่เบส ทำปฏิกิริยาเพื่อหาลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Cycles Sequencing Ready Reaction Kit โดยใช้ 2', 3'-dideoxyribonucleotide (ddNTP) 4 ชนิด (ddATP ddTTP ddGTP และ ddCTP) ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรนต์ 4 สีที่ต่างกันและหลังจากที่ทำ DNA ให้บริสุทธิ์ หลังจากปฏิกิริยาของการหาลำดับเบสแล้ว นำไปทำอิเลกโทรโฟรีซีสด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (DNA sequencer, ABI 377) ตรวจสอบลำดับเบส

และแก้ไขให้ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม DNASIS V3.7 นำลำดับเบสในส่วนของ variable ความยาวประมาณ 700 ถึง 800 เบส ไปใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA จากฐานข้อมูล

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส

การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียในการทดลองนี้ใช้ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 45 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกให้ได้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยสามารถแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้จำนวน 76 ไอโซเลท จากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) บ่มนาน 3 วัน

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	รหัสเชื้อที่แยกได้
1	ดินบริเวณป่าเต็งรัง	นครราชสีมา	4	TE1, TE2, TE3, TE4
2	ดินบริเวณป่าสะแกราช	นครราชสีมา	9	SA1, SA2, SA3, SA4, SA5, SA6, SA7, SA8, SA9
3	ดินบริเวณป่าเต็งรัง2	นครราชสีมา	3	TB1, TB2, TB3
4	ดินบริเวณต้นไม้ A70068 ของป่าเต็งรัง	นครราชสีมา	9	SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9
5	ดินบริเวณป่าเต็งรัง 1	นครราชสีมา	7	TA1, TA2, TA3, TA4, TA5, TA6 , TA7
6	ดินบริเวณวัดเขื่อนลำพระเพลิง	นครราชสีมา	1	SC1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	รหัสเชื้อที่แยกได้
7	ดินบริเวณป่าเต็งรัง 4	นครราชสีมา	5	TD1, TD2, TD3, TD4, TD5
8	ดินบริเวณต้นไม้ HO177 ป่าสะแกราช	นครราชสีมา	3	SD1, SD2, SD3
9	ดินบริเวณต้นไม้ A40112 ป่าสะแกราช	นครราชสีมา	10	SE1, SE2, SE3, SE4, SE5, SE6, SE7, SE8, SE9, SE10
10	ดินบริเวณป่าเต็งรัง 3	นครราชสีมา	2	TC1, TC2
11	ดินนา	กรุงเทพมหานคร	-	-
12	ดินบริเวณ 1 เขาใหญ่	นครนายก	5	KA1, KA2, KA3, KA4, KA5
13	ดินบริเวณ 2 เขาใหญ่	นครนายก	5	KB1, KB2, KB3, KB4, KB5
14	ดินบริเวณ 3 เขาใหญ่	นครนายก	2	KC1, KC2
15	ดินบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	เชียงใหม่	4	CM1, CM2, CM3, CM4
16	ดอกเข็ม	กรุงเทพมหานคร	-	-
17	ดอกพุด	นนทบุรี	7	D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7
18	ใบมะม่วง	กรุงเทพมหานคร	-	-
19	เปลือกต้นมะม่วง	กรุงเทพมหานคร	-	-
20	เปลือกต้นชมพู่	กรุงเทพมหานคร	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย

การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจำนวน 20 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 นั้น สามารถแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้จำนวนทั้งสิ้น 76 ไอโซเลท โดยพบว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจำนวนมากแยกได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินเป็นแหล่งอุดมสมบูรณ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ในดินมีทั้งเศษไม้ เศษหญ้าที่มีลิกนินและเพกทินอยู่ ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีสารเมทิลเอสเทอร์และเอสเทอร์ ที่จะถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็นเมทานอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย ดังนั้นจึงทำให้ตรวจพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในตัวอย่างดิน

Kato and Miyamoto (1988) แยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน โดยจัดจำแนกเป็น *Mycobacterium gastri* ซึ่งจัดเป็น facultative methylotroph ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเมทานอล เอทานอล กลีเซอรอล ซัคซิเนต และกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีมีเทน

Dijkhuizen *et al*. (1988) แยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย *Bacillus methanolicus* จากตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และน้ำพุร้อน และพบว่าเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ซึ่งใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้

de Marco *et al*. (2004) นำตัวอย่าง ดิน จากแม่น้ำ ทะเลสาบ โรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี และเหมืองแร่ มาทำการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้ 31 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Arthrobacter*, *Mycobacterium, Rhodococcus, Methylobacterium, Methylophilus, Ancylobacter, Pseudomonas, Xanthobacter* และ *Hyphomicrobium*

Mitsui *et al*. (2005) แยกได้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. MF1 จากตัวอย่างดิน เมื่อแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอน

Chongcharoen *et al*. (2005) ศึกษาการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์โดยเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย *Methylobacterium* สายพันธุ์ BIP ซึ่งแยกได้จากน้ำทิ้งจากการผลิตฟอร์มาลดีไฮด์ของบริษัท BIP ในประเทศอังกฤษ และ *Methylobacterium* สายพันธุ์ ROS1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการว่าใช้เมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์ได้ โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญได้ในอาหาร

nitrate mineral salt และอาหาร ammonium mineral salts ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้นสูง 58 มิลลิโมลาร์ ที่ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าอาจแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียได้จากตัวอย่างธรรมชาติชนิดอื่นนอกจากดิน เช่น ดอกไม้ แต่พบเป็นจำนวนน้อย ส่วนใบไม้และเปลือกไม้ที่นำมาแยกนั้น ไม่พบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นเพราะใบไม้และเปลือกไม้มีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจำนวนน้อยกว่าในตัวอย่างดิน และการเก็บตัวอย่างธรรมชาติเพื่อการศึกษาครั้งนี้ทำในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ เมื่อนำตัวอย่างมาแยกเชื้อที่ 45 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิสูง จึงไม่พบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ต้องการ มีรายงานการแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจากใบไม้ เช่น *Methylobacterium extorquens* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียชนิดแรกที่ได้มีการค้นพบ (Bratina and Richard, 1992) เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีชมพู สามารถเจริญในเมทานอล เมทิลเอมีน และสารประกอบคาร์บอนอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณผิวใบไม้ คือ *M. mesophylicum* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และจัดเป็น Pink-Pigmented Facultative Methylotroph (PPFM) ที่มีความสัมพันธ์กับพืช โดยสามารถผลิต cytokinin ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชได้ (Lidstrom and Chistoserdova, 2002)

การแยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นเพียงการยืนยันเบื้องต้นเท่านั้นว่าแบคทีเรียที่รวบรวมได้สามารถเจริญโดยใช้เมทานอลได้จริง ซึ่งการศึกษาเมแทบอลิซึมของการใช้เมทานอลและการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียนั้น จำเป็นต้องทำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารเหลวที่มีเมทานอลต่อไป

2. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูง (45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส)</u>

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 76 ไอโซเลท ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิสูง (45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส) โดยเลี้ยงใน Erlenmeyer flaskและให้อากาศโดยการเขย่า เก็บตัวอย่างเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 วัน ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูง (45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส) ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)			
	45	50	55	60
TE1	+4	+2	-	-
TE2	+4	+3	+2	-
TE3	+1	-	-	-
TE4	-	-	-	-
SA1	-	-	-	-
SA2	+1	-	-	-
SA3	-	-	-	-
SA4	+2	-	-	-
SA5	+1	-	-	-
SA6	-	-	-	-
SA7	+2	-	-	-
SA8	-	-	-	-
SA9	-	-	-	-
TB1	+4	-	-	-
TB2	+3	-	-	-
TB3	+4	-	-	-
SB1	-	-	-	-
SB2	+4	-	-	-
SB3	-	-	-	-
SB4	+4	-	-	-
SB5	+1	-	-	-
SB6	+4	-	-	-
SB7	+1	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)			
	45	50	55	60
SB8	-	-	-	-
SB9	+1	-	-	-
TA1	-	-	-	-
TA2	-	-	-	-
TA3	+1	-	-	-
TA4	+3	+1	-	-
TA5	+1	-	-	-
TA6	+1	-	-	-
TA7	+1	-	-	-
SC1	+1	-	-	-
TD1	-	-	-	-
TD2	+3	+2	-	-
TD3	+2	-	-	-
TD4	-	-	-	-
TD5	+1	-	-	-
SD1	+4	-	-	-
SD2	+4	+2	-	-
SD3	+2	-	-	-
SE1	-	-	-	-
SE2	-	-	-	-
SE3	-	-	-	-
SE4	+2	-	-	-
SE5	-	-	-	-
SE6	-	-	-	-
SE7	+1	-	-	-
SE8	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)			
	45	50	55	60
SE9	+2	-	-	-
SE10	-	-	-	-
TC1	+2	-	-	-
TC2	+1	-	-	-
D1	-	-	-	-
D2	+3	-	-	-
D3	-	-	-	-
D4	+4	-	-	-
D5	+3	+3	+1	-
D6	+4	-	-	-
D7	+3	-	-	-
KC1	-	-	-	-
TD2	+3	+2	-	-
KA5	+3	-	-	-
KB1	+2	-	-	-
KB2	+2	-	-	-
KB3	-	-	-	-
KB4	-	-	-	-
KB5	+3	+1	-	-
CM1	+4	-	-	-
CM2	-	-	-	-
CM3	+4	-	-	-
CM4	+4	-	-	-
KC2	+2	-	-	-
KA1	+4	-	-	-
KA2	+3	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)			
	45	50	55	60
KA3	+2	-	-	-

หมายเหตุ ตรวจการเจริญโดยพิจารณาความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญผ่านเส้นดำที่มีความหนา 0.1 มิลลิเมตร รายงานผลดังนี้

- หมายถึง ไม่มีการเจริญ
+1 หมายถึง มีการเจริญน้อยมาก
+2 หมายถึง มีการเจริญน้อย
+3 หมายถึง มีการเจริญดี
+4 หมายถึง มีการเจริญดีมาก

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 76 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิสูง (45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส) พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีถึงดีมากที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 24 ไอโซเลท คือ TE1, TE2, TB1, TB2, TB3, SB2, SB4, SB6, TA4, TD2, SD1, SD2, D2, D4, D5, D6, KA1, KA2, KA5, KB5, CM1, CM3, CM4 และ D7

สำหรับการเจริญที่ 50 องศาเซลเซียสนั้น พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ TE2 และ D5 ที่เจริญได้ดี และมี 3 ไอโซเลท คือ TE1, TD2 และ SD2 ที่เจริญได้น้อย และมี 2 ไอโซเลท คือ TA4 และ KB5 ที่เจริญได้น้อยมาก ส่วนการเจริญที่ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เจริญได้น้อย 1 ไอโซเลท คือ TE2 และอีก 1 ไอโซเลท คือ D5 ที่เจริญได้น้อยมาก ส่วนที่ 60 องศาเซลเซียสนั้น ตรวจไม่พบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเลย

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจากตารางที่ 1 และ 2 พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) จำนวนมากกว่าไอโซเลทที่เจริญได้ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่จำกัดการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยออกซิเจนมีความจำเป็นสำหรับการสร้างพลังงานในขั้นตอนของ electron transport system ซึ่งออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย พลังงานที่ได้นี้แบคทีเรียก็จะนำไปใช้สำหรับการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ การสร้างเอนโดสปอร์ การขนส่งอาหารและกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ซึ่งเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียมีความต้องการออกซิเจนในการเจริญที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่นกรณีของ *Bacillus methanolicus* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตไลซีน เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vol/vol · min (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารในถังหมักต่อนาที) อัตราการกวน 900 รอบต่อนาทีนั้น ต้องควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวอย่างน้อย 30 เปอร์เซ็นต์ และการเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนของการเตรียมกล้าเชื้อยังต้องใช้ฟลาสก์ที่มีลักษณะพิเศษคือ baffled flask ซึ่งทำให้มีการผสมของอากาศในอาหารเหลวได้ดี เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ซึ่งสภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบ (Lee *et al.*, 1996) ส่วนในการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิสูง ได้ทำการเลี้ยงเชื้อใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบหมุนและใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเพียง 170 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะทั่วไปที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ จึงอาจส่งผลให้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียบางไอโซเลทที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณมาก ๆ ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญได้

นอกจากนี้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจำนวน 27 ไอโซเลท ที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยเมทานอลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เคยเจริญได้ในอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์นั้น (ตารางที่ 1) อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมอาหารแข็งนั้น จะเติมเมทานอลก่อนเทอาหารซึ่งอุณหภูมิขณะนั้นประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เมทานอลจึงอาจระเหยไปบ้าง ทำให้ความเข้มข้นของเมทานอลต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ ตัวอย่างแบคทีเรียที่อาจถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่ำ ๆ เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C1 ต้องการเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเจริญเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งหากความเข้มข้นของเมทานอลสูงกว่านี้ เมทานอลอาจยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ (Hektor *et al*., 2000)

จากเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย 49 ไอโซเลทที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) พบว่ามีเพียง 24 ไอโซเลทที่มีการเจริญดีถึงดีมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ ทำให้เมทานอลถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดี ส่วนแบคทีเรียอีก 25 ไอโซเลทที่มีการเจริญได้น้อยถึงน้อยมากนั้น อาจถูกยับยั้งการเจริญโดยเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองในขั้นตอนนี้จึงคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีถึงดีมาก (มีการเจริญในระดับ +3 และ +4) ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส ไว้ทั้งสิ้น 24 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมดที่พบว่าเจริญได้บนอาหารแข็งที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และบางไอโซเลทที่คัดเลือกไว้นี้ยังมีความสามารถในการเจริญได้ที่ 55 องศาเซลเซียสด้วย

การตรวจการเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาความขุ่นผ่านเส้นดำที่มีความหนา 0.1 มิลลิเมตรนั้น ใช้เพื่อการคัดเลือกเบื้องต้นกรณีที่มีแบคทีเรียที่ศึกษาจำนวนมาก จากนั้นจึงนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นต้นนี้ไปศึกษาการเจริญในอาหารเหลว โดยวิธีการวัดค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงต่อไป

3. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง</u>

การทดลองนี้เป็นการศึกษารูปแบบการเจริญ และการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่สามารถทนอุณหภูมิสูง จากเกณฑ์การพิจารณา คือ ต้องมีค่า μ_{max} ที่ 37 องศาเซลเซียสมากกว่าค่า μ_{max} ที่อุณหภูมิสูงกว่า (45-60 องศาเซลเซียส) อาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองนี้จะเติมเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ซึ่งได้ทดสอบอย่างคร่าว ๆ แล้วว่าเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้เจริญได้มากขึ้น และทำให้พิจารณารูปแบบการเจริญได้ชัดเจนกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมเมทานอลเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ดังที่ใช้ในการทดลองข้อ 1 และ 2

เมื่อนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 24 ไอโซเลทที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 2 ว่าสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว 0.5% methanol ที่ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 37 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่

ความเร็ว 170 รอบต่อนาที แล้วติดตามค่าการเจริญทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยการวัดค่า OD_{610} เพื่อคำนวณค่า μ_{max} (ภาคผนวก ค) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	μ_{max} ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อชั่วโมง)			
	37 °C	45 °C	50 °C	55 °C
CM1	0.521	0.472	-	-
CM3	0.404	0.370	-	-
CM4	0.302	0.282	-	-
D2	0.168	0.046	-	-
D4	0.385	0.320	-	-
D5	0.432	0.295	-	-
D6	0.130	0.281	-	-
D7	0.340	0.136	-	-
KA1	0.461	0.204	-	-
KA2	0.188	0.400	-	-
KA5	0.424	0.192	-	-
KB5	0.398	0.373	-	-
SB2	0.270	0.262	-	-
SB4	0.352	0.134	-	-
SB6	0.440	0.346	0.179	-
SD1	0.345	0.330	0.276	-
SD2	0.175	0.232	0.250	0.374
TA4	0.284	0.108	-	-
TB1	0.345	0.316	-	-
TB2	0.407	0.369	0.202	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	μ_{max} ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อชั่วโมง)			
	37 °C	45 °C	50 °C	55 °C
TB3	0.444	0.167	-	-
TD2	0.515	0.240	0.193	-
TE1	0.321	0.210	0.112	-
TE2	0.292	0.284	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการเจริญ

จากการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 24 ไอโซเลท ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง พบว่ามีแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท ที่มีค่า μ_{max} ที่ 37 องศาเซลเซียส มากกว่าค่า μ_{max} ที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส คือ CM1 CM3 CM4 D2 D4 D5 D7 KA1 KA5 KB5 SB4 SB6 SD1 TA4 TB1 TB2 TB3 TD2 และ TE1 จึงจัดเป็นเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง โดยในจำนวนนี้มี 5 ไอโซเลท คือ SB6 SD1 TB2 TD2 และ TE1 เจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียสด้วย มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ SB2 และ TE2 ที่มีค่า μ_{max} ที่ทั้งสองอุณหภูมิใกล้เคียงกัน และมีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ D6 KA2 และ SD2 ที่มีค่า μ_{max} ที่ 45 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงจัดเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง โดย SD2 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส

ในการคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงนี้ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในช่วงอุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส เนื่องจากแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิมีโซไฟล์ คือ 20-43 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่เป็นเทอร์โมไฟล์ คือ 45-65 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

Arfman *et. al.* (1992) แยกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงได้ที่ 35-60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเจริญได้ที่ 55 องศาเซลเซียส สร้างเอนโดสปอร์ได้ ต่อมาจัดจำแนกและตั้งชื่อเป็น *Bacillus methanolicus* และมีรายงาน

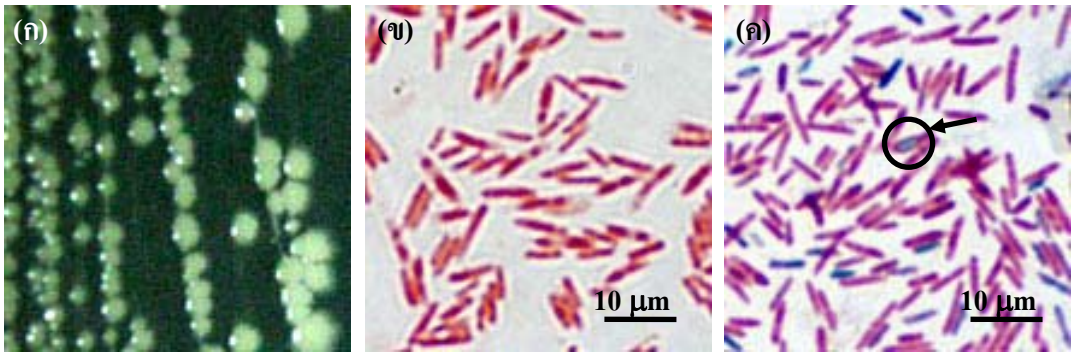
การค้นพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงอีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *B. brevis* S1 ซึ่งเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส (Yurimoto *et al*., 2002)

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ต่างจากเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียในกลุ่มอื่น คือ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (Arfman *et al*., 1992) และยังได้รับความสนใจที่จะนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปผลิตสารที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมเพราะ แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง สามารถช่วยลดต้นทุนของระบบหล่อเย็นในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ถึง 18-40 เปอร์เซ็นต์ เช่น การผลิตไลซีน เป็นต้น (Lee *et al*., 1996) ส่วนเมทิลโลโทรฟิกในกลุ่มอื่นที่มีการศึกษากันค่อนข้างมาก ทั้งในแง่ของเมแทบอลิซึมและการปรับแต่งพันธุกรรม ได้แก่ *Methylobacterium extorquens* AM1 เจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 28-37 องศาเซลเซียส แต่พบว่าไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส (Marx *et al*., 2003)

การแยกและคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน อากาศของประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงตลอดปี จึงมีความเป็นไปได้มากที่จะแยกได้เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง

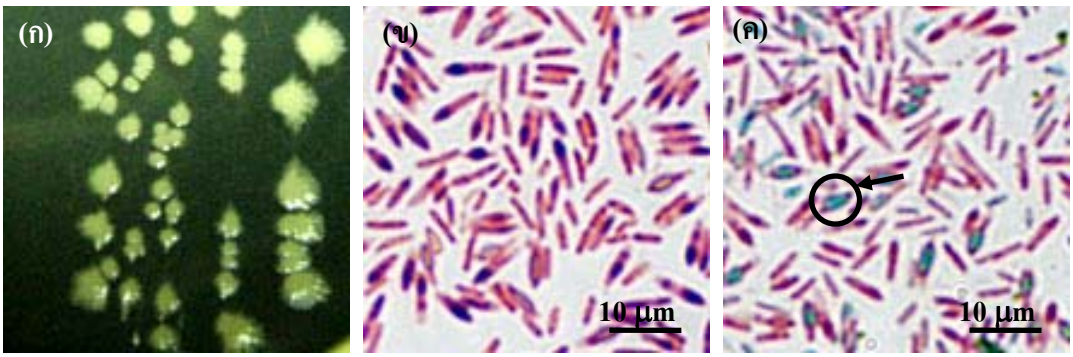
4. <u>การศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

นำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 19 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้ มาศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ โดยพิจารณา รูปร่าง ขนาด การติดสีแกรม และตำแหน่งของเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8-26



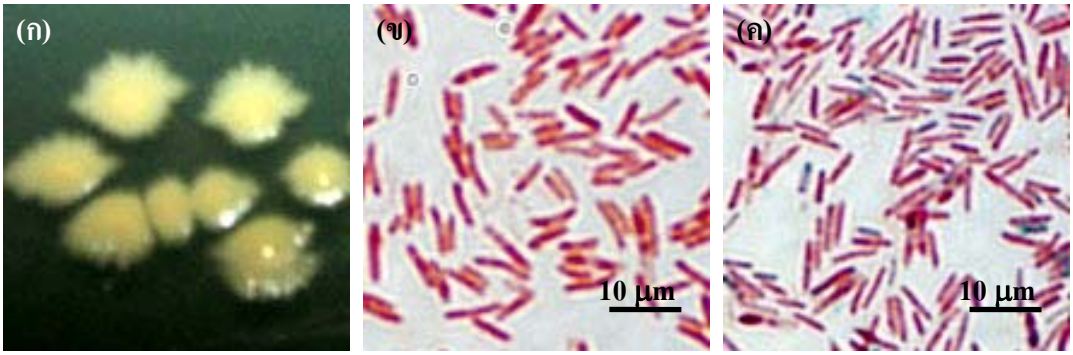
<u>ภาพที่ 8</u> สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ภาพที่ 8 แสดงสัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM1 ซึ่งโคโลนีรูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีครีม ขอบเป็นริ้ว (undulate) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ที่ปลายเซลล์ (terminal)



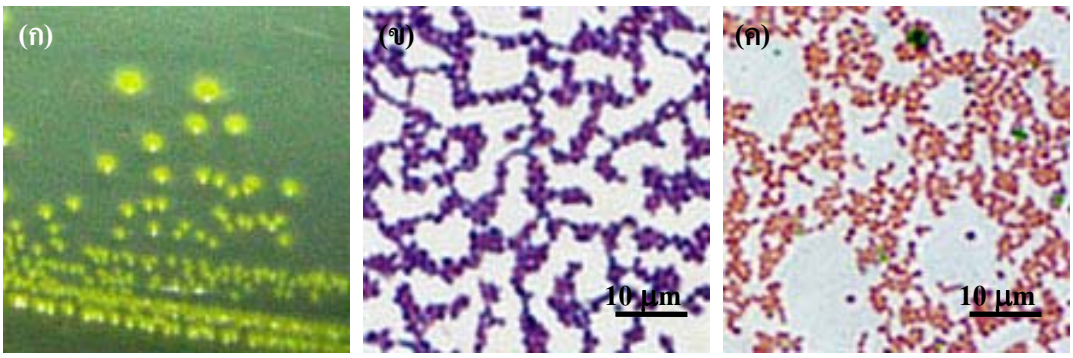
ภาพที่ 9 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM3 จากภาพที่ 9 พบว่า รูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีครีม ขอบโคโลนีคล้ายหนามยื่นออกไปรอบ ๆ (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 2 ไมโครเมตร ติดสีแกรมแปรผัน (variable) พบเอนโดสปอร์กลางเซลล์ (central)



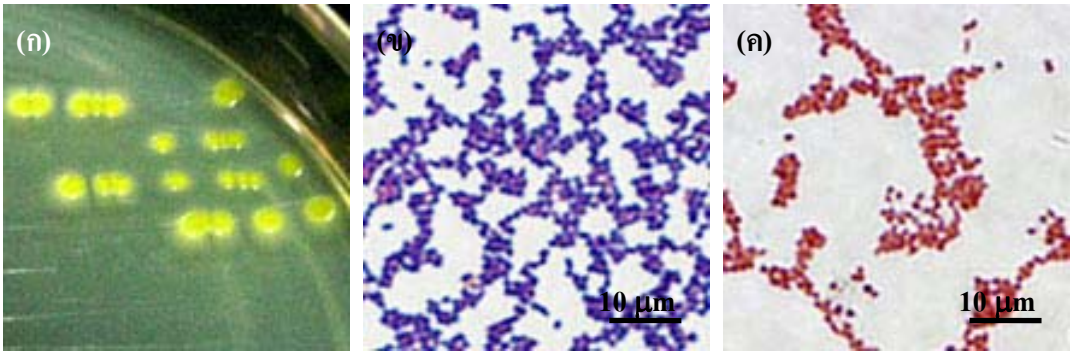
ภาพที่ 10 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส CM4 รูปร่างสูงโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) สีครีม ขอบเป็นริ้ว (undulate) ตัวเซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 10)



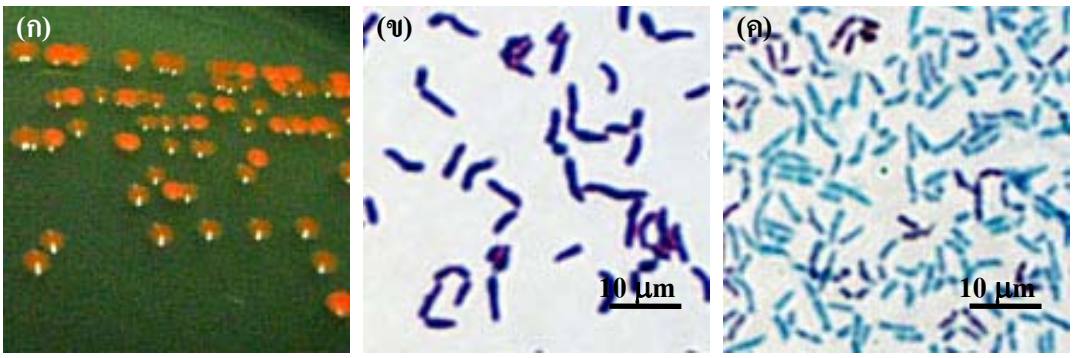
ภาพที่ 11 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D2 มีโคโลนีรูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีเหลือง ขอบโคโลนีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกไปรอบ ๆ (erose) เซลล์รูปกลม (coccus) เส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่า 0.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 11)



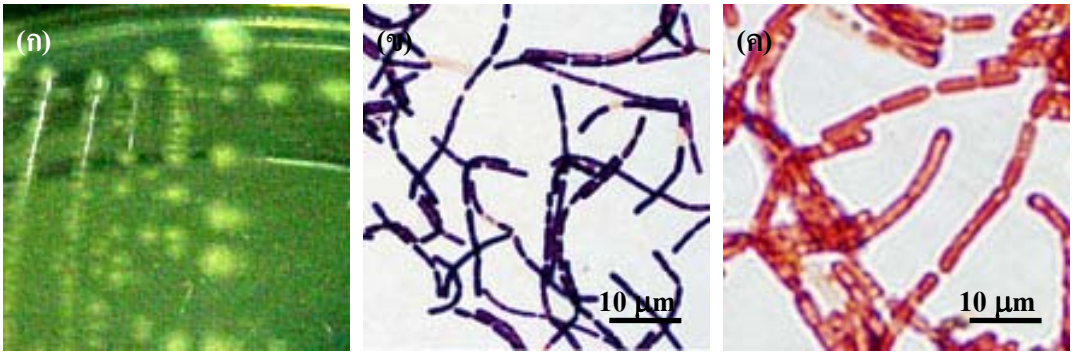
ภาพที่ 12 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D4 พบว่ารูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีเหลือง ขอบโคโลนีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกไปรอบโคโลนี (erose) ตัวเซลล์รูปกลม (coccus) เส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่า 0.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 12)



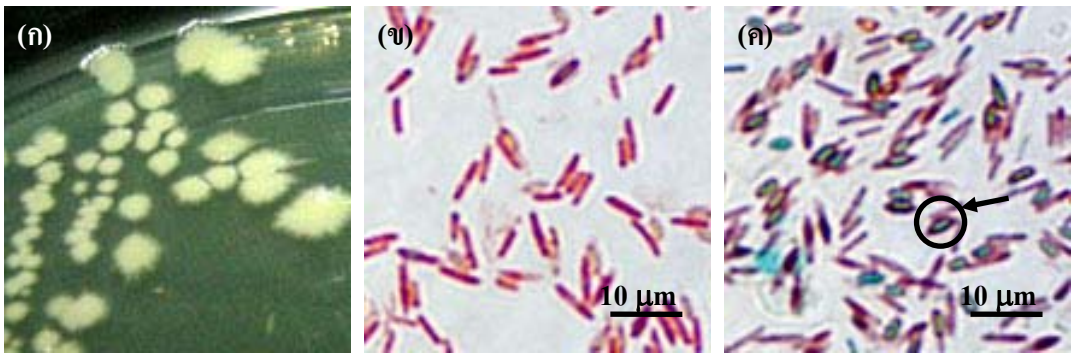
ภาพที่ 13 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D5 รูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีแดงอมชมพู ขอบเรียบ (entire) ตัวเซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 1 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 13)



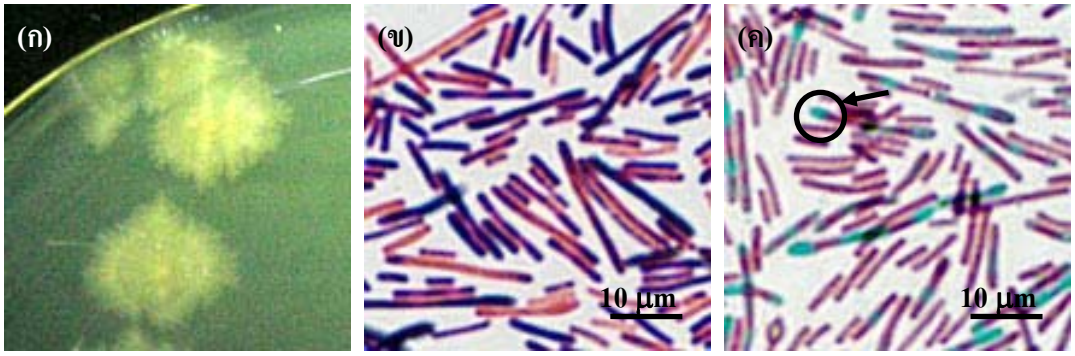
ภาพที่ 14 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส D7 พบว่า โคโลนีแบนราบ (flat) สีครีม ขอบโคโลนีเป็นเส้นยื่นออกไปโดยรอบ (filamentous) ตัวเซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.7 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 14)



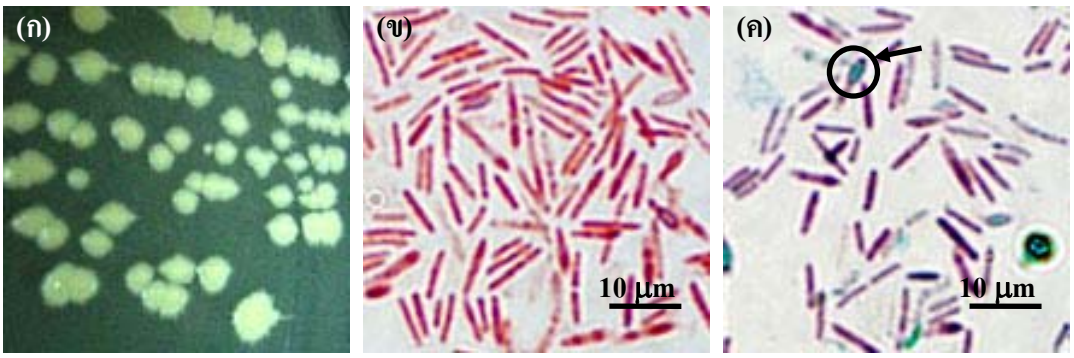
ภาพที่ 15 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KA1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KA1 จากภาพที่ 15 รูปร่างสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีครีม ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นริ้ว (undulate) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 2 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ พบเอนโดสปอร์กลางเซลล์ (central)



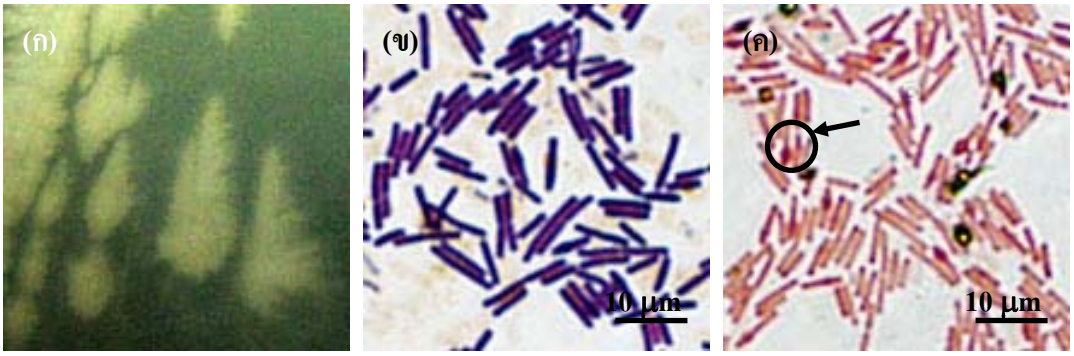
ภาพที่ 16 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KA5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KA5 ลักษณะแบนราบ (flat) สีครีม ขอบโคโลนีเป็นริ้ว (undulate) ตัวเซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 4 ไมโครเมตร ติดสีแกรมแปรผัน (variable) พบเอนโดสปอร์ที่ปลายเซลล์ (terminal) ดังแสดงในภาพที่ 16



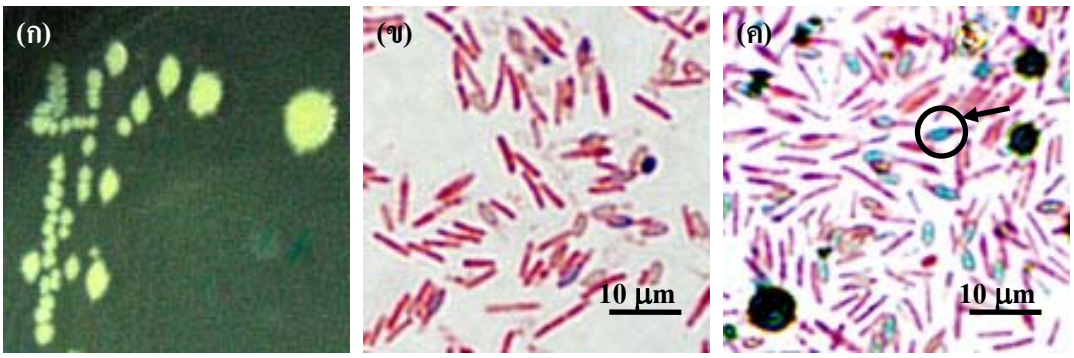
ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KB5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส KB5 จากภาพที่ 17 พบว่าโคโลนีสูงโค้งคล้ายกระจกนูน (convex) สีครีม ขอบโคโลนีเป็นริ้ว (undulate) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 3.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ พบเอนโดสปอร์ที่ปลายเซลล์ (terminal)



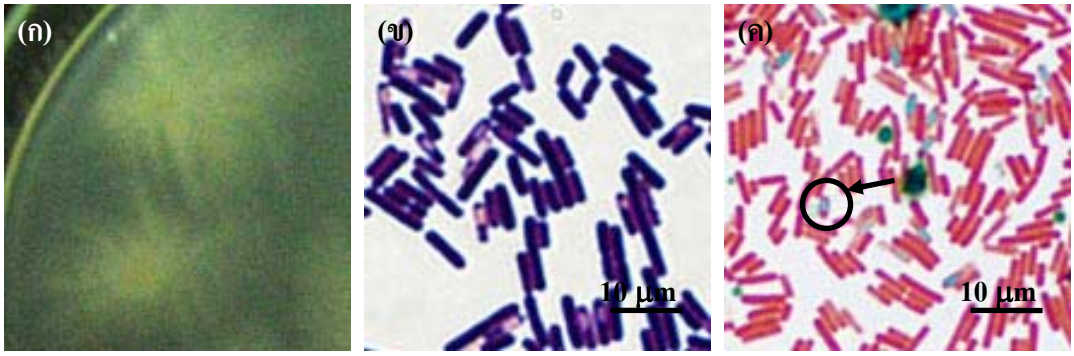
ภาพที่ 18 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SB4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ภาพที่ 18 แสดงโคโลนีสีครีมของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SB4 รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน (irregular) ขอบคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 4 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ที่ปลายเซลล์ (terminal)



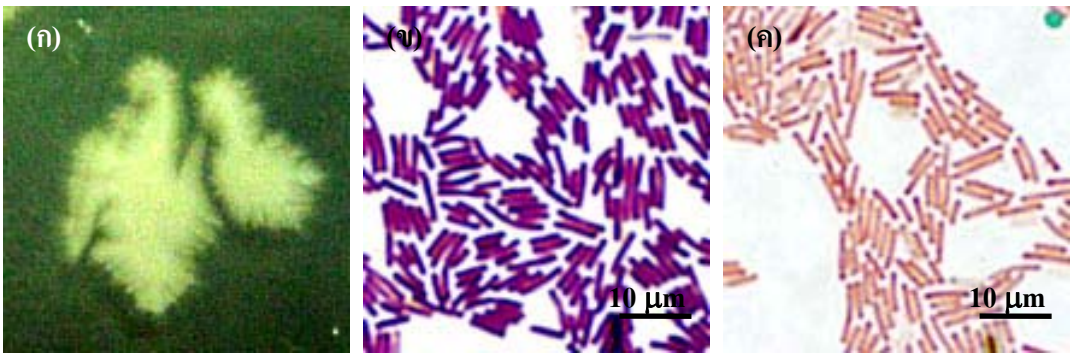
ภาพที่ 19 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SB6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SB6 รูปร่างแบนราบ (flat) สีครีมออกเหลือง ขอบโคโลนีเป็นริ้ว (undulate) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 3.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ พบเอนโดสปอร์ตรงปลายเซลล์ (terminal) ดังแสดงในภาพที่ 19



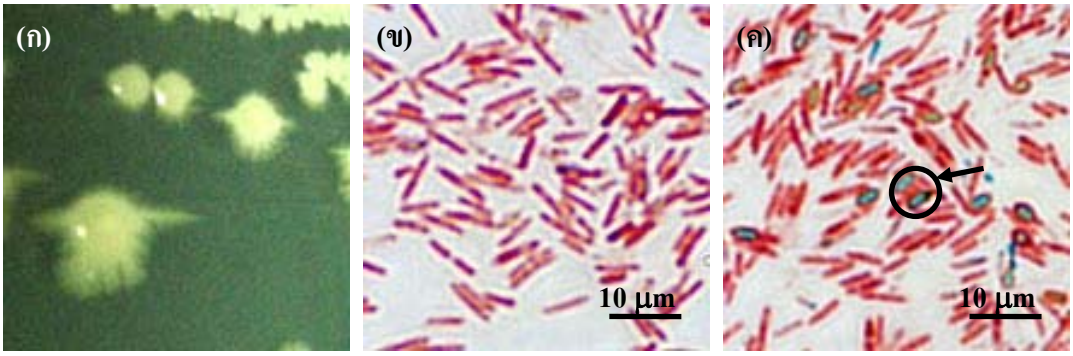
ภาพที่ 20 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SD1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SD1 แสดงดังภาพที่ 20 พบว่าโคโลนีสีครีมออกเหลือง รูปร่างแบนราบ (flat) ขอบโคโลนีเป็นเส้นแผ่กระจายออก (filamentous) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 3.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ตรงกลางค่อนมาทางปลายเซลล์ (subterminal)



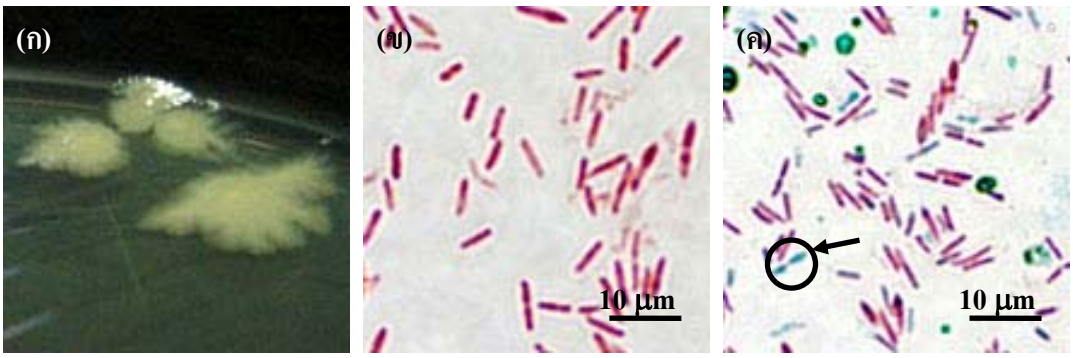
ภาพที่ 21 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TA4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TA4 พบว่า รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) สีครีม ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.4 ไมโครเมตร ยาว 2.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 21)



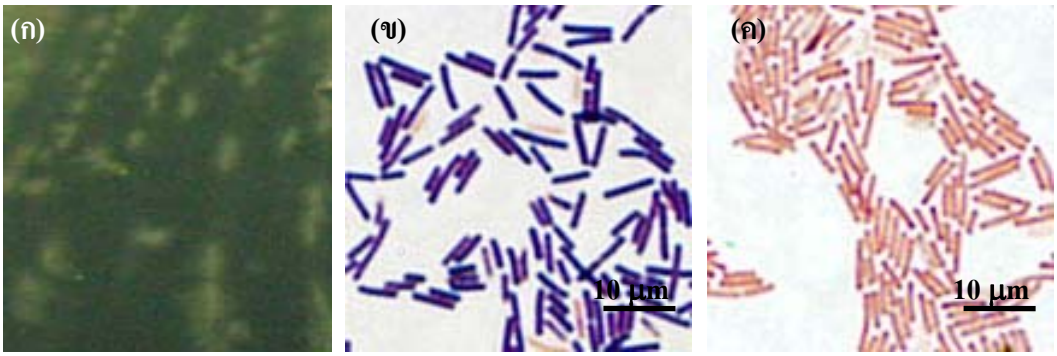
ภาพที่ 22 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB1 (ภาพที่ 22) รูปร่างสูงโค้งตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง (umbonate) สีครีม ขอบแตกออกคล้ายรากไม้ (rhizoid) ตัวเซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 2.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ตรงกลางเซลล์ (central)



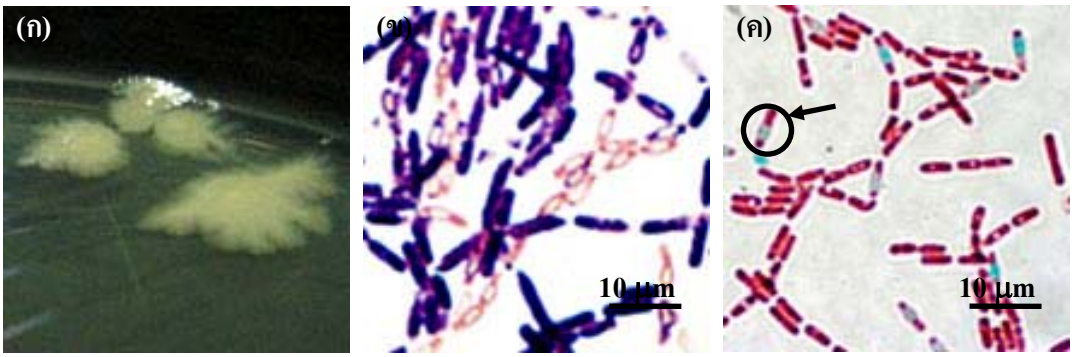
ภาพที่ 23 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB2 จากภาพที่ 23 พบว่าโคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) สีครีม ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 2 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ที่ปลายเซลล์ (terminal)



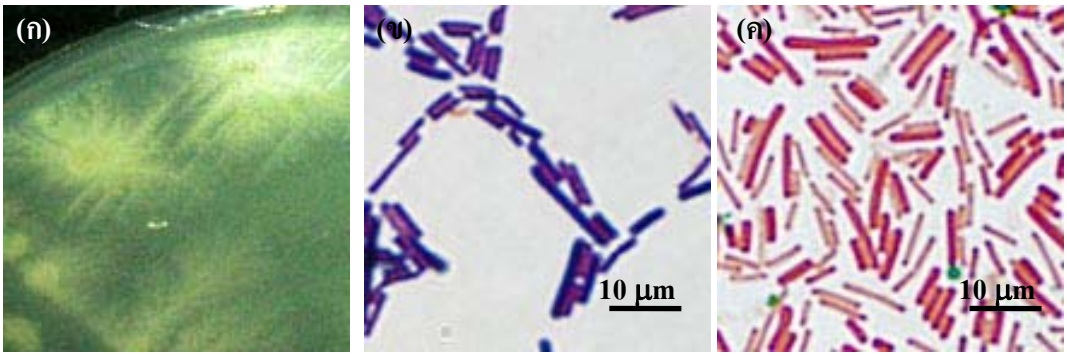
ภาพที่ 24 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของโคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TB3 พบว่ารูปร่างไม่แน่นอน (irregular) สีครีม ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 25 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TD2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

โคโลนีของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TD2 แสดงในภาพที่ 25 พบว่ารูปร่างไม่แน่นอน (irregular) สีครีม ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป (erose) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก พบเอนโดสปอร์ตรงกลางค่อนมาทางปลายเซลล์ (subterminal)



ภาพที่ 26 สัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเจริญบนอาหาร NA เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ก) รูปร่าง ขนาด และการติดสีแกรม (ข) และตำแหน่งเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ค) ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TE1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

สัณฐานวิทยาของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส TE1 ดังภาพที่ 26 พบว่าโคโลนีรูปร่างแบนราบ (flat) สีครีมออกเหลือง ขอบโคโลนีเป็นเส้นแผ่กระจายออก (filamentous) เซลล์รูปท่อน (rod) กว้าง 0.6 ไมโครเมตร ยาว 3.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ไม่พบเอนโดสปอร์

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่า เมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 19 ไอโซเลท ติดสีแกรมบวกจำนวน 12 ไอโซเลท คือ CM1, D2, D4, D5, D7, SB4, SD1, TA4, TB1, TB3, TD2 และ TE1 คิดเป็น 63 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด ติดสีแกรมแปรผันจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ CM3 และ KA5 คิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์และติดสีแกรมลบจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ CM4,KA1, KB5, SB6 และ TB2 คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด จะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่แล้วเมทิลโลโทรฟิกที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปท่อน ขนาดประมาณ 0.3-0.5 x 2-4 ไมโครเมตร พบไอโซเลทที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ คิดเป็น 63 เปอร์เซ็นต์และไม่สร้างเอนโดสปอร์ คิดเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทั้งหมด และในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ พบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 7 ไอโซเลท แกรมแปรผัน 2 ไอโซเลท และแกรมลบจำนวน 4 ไอโซเลท เป็นที่น่าสังเกตว่ามีแบคทีเรียติดสีแกรมลบและสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้มักเป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก ตำแหน่งของเอนโดสปอร์ภายในเซลล์แบคทีเรียที่ศึกษาพบได้หลายตำแหน่งเช่น ตรงกลาง ปลาย หรือตรงกลางค่อนมาทางปลายเซลล์ เป็นต้น

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นการศึกษาขั้นตอนแรกในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยการศึกษาลักษณะของโคโลนี เซลล์ ตำแหน่งเอนโดสปอร์ จากการย้อมสีแบบแกรมสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่ค้นพบครั้งแรก เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวกคือ *Bacillus methylicus* (Murrell and McDonald, 2000) ซึ่งภายหลังจัดจำแนกเป็น *Methylobacterium extorquens* หลังจากนั้นมีรายงานการค้นพบเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียหลายชนิดทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อาทิเช่น *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter* และ *Nocardia* และเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียแกรมลบ อาทิเช่น *Methylobacillus* (Bratina and Richard, 1992), *Methylobacterium, Hyphomicrobium* , *Acetobacter*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Microcyclus* , *Thiobacillus* และ *Rhodopseudomonas* (Anthony, 1982)

การศึกษาในขั้นตอนต่อไปเป็นการนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 19 ไอโซเลท ไปศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์

5. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง</u>

การทดลองส่วนนี้เป็นการศึกษาความสามารถของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงและมีฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) และเติมฟอร์มาลดีไฮด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.01-2.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4 และตารางผนวกที่ ง25)

<u>ตารางที่ 4</u> ค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง 19 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่เติมฟอร์มาลดีไฮด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.01-2.5 มิลลิโมลาร์ บ่ม ที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิโมลาร์)	
	45 °C	50 °C
SB4	2.5	ND
TE1	2.4	0.5
TB2	1.9	0.1
KA1	1.2	0.1
SB6	1.2	0.1
CM1	1.0	ND
TB1	1.0	ND
D7	1.0	ND
CM4	0.9	ND
SD1	0.8	1.0
KB5	0.7	0.01
D5	0.7	ND

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิโมลาร์)	
	45 °C	50 °C
TD2	0.6	0.08
D4	0.6	ND
KA5	0.6	ND
CM3	0.5	ND
TA4	0.3	ND
D2	0.02	ND
TB3	0.01	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

จากตารางที่ 4 พบว่า ค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลทที่เจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียสนั้น มีค่าตั้งแต่ 0.01 มิลลิโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์สูงกว่า 0.1 มิลลิโมลาร์แทบทั้งสิ้น (ยกเว้น 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียรหัส D2 และ TB3 ที่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียเมื่อมีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 45 องศาเซลเซียสแล้ว อาจแบ่งเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ทดสอบ ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ต่ำกว่า 1.9 มิลลิโมลาร์ มีจำนวน 16 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 มีค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ 45 องศาเซลเซียส สูงกว่าหรือเท่ากับ 1.9 มิลลิโมลาร์ มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ SB4 TE1 และ TB2 โดยพบว่าแบคทีเรียรหัส TE1 และ TB2 เจริญได้ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ที่ 50 องศาเซลเซียส ด้วย โดยมีค่า MIC ที่ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SB4 นั้น ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถเจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียส แต่ก็พบว่ามีค่า MIC ที่ 45 องศาเซลเซียส สูงที่สุด คือ 2.5 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าไอโซเลท SB4 สามารถทนต่อฟอร์มาลดีไฮด์ที่ 45 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมด จึงได้คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ไว้เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญ การ

ใช้เมทานอล และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ 45 องศาเซลเซียสต่อไป

Marx *et al*. (2003) พบว่าค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Methylobacterium extorquens* AM1 มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร minimal salt ที่เติม succinate ที่ 30 องศาเซลเซียส

6. <u>การศึกษารูปแบบการเจริญ การใช้เมทานอล และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส</u>

การศึกษารูปแบบการเจริญ การใช้เมทานอล และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาเมทานอลออกซิเดชันของเมทิลโลโทรฟิกแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เติมฟอร์มาลดีไฮด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ได้จากข้อ 5 บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัว อย่าง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อตรวจการเจริญ ปริมาณเมทานอล ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ methanol dehydrogenase ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 27