

เมื่อเลี้ยงเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 3 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นต่างกัน โดยแบคทีเรียหัส SB4 เลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ 0.8 มิลลิโมลาร์ ส่วนแบคทีเรียหัส TE1 และ TB2 เลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ 0.7 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่า ถึงแม้จะเจริญในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นที่ต่างกัน แต่แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าการเจริญในรูป OD₆₁₀ สูงสุด อยู่ในช่วง 0.599-0.631 หน่วย แต่สังเกตได้ว่าแบคทีเรียหัส SB4 ใช้เวลานานกว่าในการเจริญถึงจุดสูงสุด และจากภาพที่ 28 ก็พบว่า แบคทีเรียหัส SB4 มีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ก่อนข้างช้ากว่าไอโซเลทอื่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียหัส SB4 ต้องปรับตัวเข้ากับการเจริญในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่น

เมื่อพิจารณาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากตารางที่ 7 พบว่าแบคทีเรียหัส SB4 ใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ไปน้อยกว่าแบคทีเรียอีก 2 ไอโซเลทที่ศึกษา โดยใช้ไปเพียง 77.5 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แบคทีเรียหัส TE1 และ TB2 ใช้ไป 93 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ไว้ในเซลล์ พบว่าแบคทีเรียหัส TE1 มีค่าสูงสุดของฟอร์มาลดีไฮด์ภายในเซลล์ต่ำกว่าแบคทีเรียหัส SB4 และ TB2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียหัส TE1 น่าจะมีกลไกการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าแบคทีเรียหัส SB4 และ TB2 เพราะถึงแม้จะเจริญในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นค่อนข้างสูง (0.7 มิลลิโมลาร์) แต่ก็สามารถกำจัดไปได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ และสะสมไว้ในเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น สำหรับแบคทีเรียหัส TB2 นั้น การที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือน้อย อาจส่งผลให้ฟอร์มาลดีไฮด์ภายในเซลล์ลดลงตามไปด้วย และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง HPS และ PHI ก็ลดลงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เพียงพอที่เซลล์จะนำเข้าสู่วิถี RuMP เพื่อสร้างองค์ประกอบของเซลล์ ทำให้ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ไปเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ (Orita *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 7 พบว่า เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ศึกษา จัดได้ว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของวิถี RuMP อยู่ในระดับสูง เมื่อเทียบกับค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้ใน *Bacillus brevis* S1 ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงเช่นกัน (Yurimoto *et al.*, 2002) ดังนั้นจึงคาดว่าเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงหัส SB4 TE1 และ TB2 จะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ต่อไป

8. การจัดจำแนกเมทิลโดโทโรฟิแบคทีเรียที่เรี่ยทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

การจัดจำแนกเมทิลโดโทโรฟิแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทำโดยการศึกษาฐานวิธานของ โคลิไนและเซลล์ และสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ร่วมกับการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16s rDNA ที่เพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 27F : (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1389R : (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') และ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส คือ 520F (5'-ATTGGATCCCAGCMGCCGCGGTAA-3') แทน M ด้วย A หรือ C นำลำดับเบสในส่วน of variable ความยาวประมาณ 700 ถึง 800 เบส ไปใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA จากฐานข้อมูล GenBank ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8-13

ตารางที่ 8 ค่าความเหมือน (% Identities) ของลำดับเบสจำนวน 816 คู่เบส ของ 16s rDNA ของ เมทิลโดโทโรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

Accession Number	Species	% Identities
AF329476	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	99
AY988598	<i>Bacillus oleronius</i>	97
AJ627210	<i>Bacillus humi</i>	97
AF547209	<i>Bacillus acidicola</i>	97

การเปรียบเทียบลำดับเบสจำนวน 816 คู่เบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรีย SB4 กับลำดับเบสของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าแบคทีเรีย SB4 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus sporothermodurans* (AF329476) 99 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ *B. oleronius* (AY988598) *B. humi* (AJ627210) และ *B. acidicola* (AF547209) 97 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการเปรียบเทียบในครั้งนี้ใช้ลำดับเบสที่มีความยาวเพียง 816 คู่เบส จาก 1542 คู่เบสของ 16S rDNA ทั้งหมด จึงอาจทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ในทันที ซึ่งถ้ามีการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของ 16S rDNA แล้วนำมาเปรียบเทียบ ก็อาจจะทำให้เห็นผลชัดเจนขึ้น ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลักษณะฐานวิธานของโคลิไนและเซลล์ รวมทั้งสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ของแบคทีเรียรหัส SB4 และแบคทีเรียอ้างอิงจากตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 9

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์เมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงรหัส SB4 พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ดิสก์แกรมบวก ขนาดของเซลล์ยาวประมาณ 4 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.5 ไมโครเมตร มีเอนโดสปอร์อยู่ปลายเซลล์ (ภาพที่ 18) และเมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่า แบคทีเรีย SB4 ต้องการอากาศเพื่อการเจริญ สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ผลการทดสอบ V-P เป็นลบ ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส แลคโตส อะราบิโนส ไซโลส และแมนนิทอล ไม่สร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้ง ไม่สามารถใช้ซีเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ริดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้แต่ค่อนข้างน้อย ไม่เจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และไม่เจริญที่อุณหภูมิค่า 5 และ 10 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียรหัส SB4 กับ *Bacillus sporothermodurans* ซึ่งค้นพบโดย Pettersson *et al.* (1996) ที่พบว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่สร้างสปอร์และทนอุณหภูมิสูงได้ โดยพบปนเปื้อนในน้ำนม UHT ที่ผ่านการให้ความร้อนสูง แบคทีเรียมนี้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง 22 ลักษณะ ซึ่งคิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ ของลักษณะที่เปรียบเทียบได้ทั้งหมด 24 ลักษณะ และเมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียรหัส SB4 กับ แบคทีเรีย *B. oleronius* *B. humi* และ *B. acidicola* พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 84 84 และ 53 เปอร์เซ็นต์ของ 24 ลักษณะที่เปรียบเทียบได้ ตามลำดับ ซึ่งผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA จึงพอสรุปได้ว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียรหัส SB4 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus sporothermodurans* มากที่สุด