ว.วิทย. มข. 40(2) 524-533 (2555) KKU Sci. J. 40(2) 524-533 (2012)

ความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนที่แยกได้จากน้ำพุร้อน

Diversity of Thermophilic Bacteria Isolated from Hot Springs

สุริยา ติ่งทอง[1] และ สังวาลย์ แก่นโส[1]*

บทคัดย่อ

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

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

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

ABSTRACT

This research aims to study the diversity of thermophilic bacteria of three hot springs in southern Thailand. Total bacteria number in Tanoh Maroh, Kaochaison and Ban Natungpo hot spring were 30, $3.6x10^5$ and $1.45x10^3$ CFU/ml, respectively. The 13 isolates were put into 6 groups according to their distinct restriction cutting profiles of 16S rRNA gene obtained from employing PCR-RFLP technique using restriction enzyme *Hinf*I. The 6 groups were named group a, b, c, d, e and f, and analysis of their partial 16S rRNA gene sequence showed that group a (isolate YTM2) had 97% similarity with *Thermus brockianus*, group b (isolate YTM4) is related to members of the genera *Bacillus* and *Geobacillus*, group c (isolate YTM5) is related to *G. thermoleovorans* (98%), group d (isolate KSII_1) is related to *B. subtilis* (99%), group e (isolate Kao_P2) is related to *Caldimonas manganoxidans* (99%) and group f (isolate Kao_P4) is related to *Tepidimonas arfidensis* (97%).

คำสำคัญ: แบคทีเรียทนร้อน น้ำพุร้อน 16S rRNA gene PCR-RFLP
Keywords: Thermophile, Hot spring, 16s rRNA gene, PCR-RFLP

บทนำ

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

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

Kanso 2003; Reda et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาแบคทีเรียทนร้อนจากน้ำพุร้อนซึ่งมีอยู่มากกว่า 112 แห่งในประเทศไทยนั้น ปัจจุบันยังมีไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในน้ำพุร้อนเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่การศึกษาเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทนร้อนในน้ำพุร้อนสามแห่งในภาคใต้ของประเทศไทยและระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การแยกเชื้อ

1.1 การเก็บตัวอย่าง

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

1.2 การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อนและการแยกเชื้อ

ทำการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีการ Spread plate โดยนำตัวอย่างที่ไม่เจือจาง เจือจาง 10 เท่า และเจือจาง 100 เท่า มาทำการกระจายเชื้อบนอาหาร 0.5X Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหาร 0.5X NA แล้วคำนวณ CFU/ml. พร้อมทั้งเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำการขีดบนอาหาร 0.5X NA จานใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

1.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน

นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.2 มาศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม ของเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมงตรวจสอบลักษณะเซลล์และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย

2.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA) ของแบคทีเรียด้วยวิธี CTAB/NaCl

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหาร 0.5X NB 30 ml. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer pH8 1 ml. โดยละลายเซลล์ใน TE แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 3 นาที ดูดของเหลวทิ้ง แล้วละลายก้อนเซลล์ใน TE buffer pH8 400µl. ผสมเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม 10 mg/ml Lysozyme 30 µl. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม 10%SDS (Sodium dodesyl sulfate) 30 µl. และ 20mg/ml Protienase K 6 µl. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเกลือให้เป็น 0.7 M NaCl ด้วย 5 M NaCl เติมสารละลาย CTAB/NaCl 0.1 เท่าของปริมาตรที่มี บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที เติม 25:24:1 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml. หลอดใหม่ หลีกเลี่ยงการดูดเศษตะกอนเซลล์ (cell

debris) ออกมาด้วย เติม 24:1 Chloroform: Isoamyl alcohol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml. หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลแช่เย็น ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล (70%) 500 µl. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH8 80 µl. เติม 10 mg/ml Dnase free Rnase 1 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

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

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA คือ Fd1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCAG3') และ Rd1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 12.5 µl 2X PCR Go Taq® Colorless Master Mix, 5µM Fd1 primer, 5µM Rd1 primer, 5 µl Nuclease free water และ 2.5 µl DNA template โดยมีโปรมแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ ดังนี้ Preheat ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วตามด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) เทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดมาตรฐาน (Lambda *Hind* III DNA size marker)

2.3 การจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วย เทคนิค PCR-RFLP

นำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ของแต่ละไอโซเลต มาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI โดยใช้สารเคมีในปริมาตรดังต่อไปนี้ 13.3 µl Deionized water, 0.2 µl 10 µg/ µl Acetylated BSA, 2 µl 10X buffer, 0.5 µl 10 U/ µl *Hin*fI และ 4 µl PCR product บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาดมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ตัวแทนไอโซเลตของกลุ่มที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค PCR-RFLP ถูกส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.hlm.gov/) แล้วระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลตมากที่สุด 3 อันดับแรก

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อและการนับจำนวนแบคทีเรียทนร้อน

ผลการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทนร้อนในบ่อน้ำพุร้อน 3 แห่ง ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนตาเนาะแมเราะ บ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน และบ่อน้ำพุร้อนนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร) แสดงดังตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อ แยกทั้งหมดได้ 13 ไอโซเลต เป็นเชื้อจากบ่อน้ำพุร้อนตาเนาะแมเราะ 5 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 2 จากบ่อน้ำพุร้อน

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

ตารางที่ 1 ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนสามแห่งในภาคใต้ของประเทศไทย

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

[a]ตัวอย่างจากน้ำพุร้อนตาเนาะแมเราะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีข้อจำกัดที่รุ้นที่ใช้ทำอาหาร NA ไม่สามารถทนความร้อนได้สูงกว่านี้

ตารางที่ 2 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนตาเนาะแมเราะ

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

ตารางที่ 3 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนเขาชัยสน

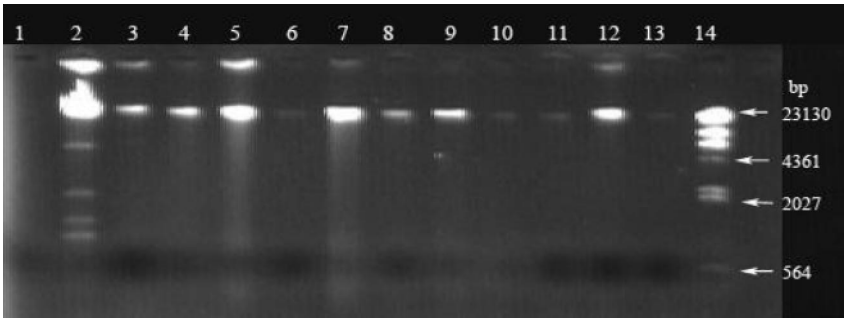
ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การติดสีย้อมแกรม	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์ (µm)
		ขอบ	ขนาด (mm)	สี	ผิวหน้า			
1	Kao_P1	เรียบ	2-3	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
2	Kao_P2	เรียบ	1-2	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
3	Kao_P3	เรียบ	1-2	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
4	Kao_P4	เรียบ	1	ขาว	นูน	Positive	Bacilli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

ตารางที่ 4 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ (โคกไทร)

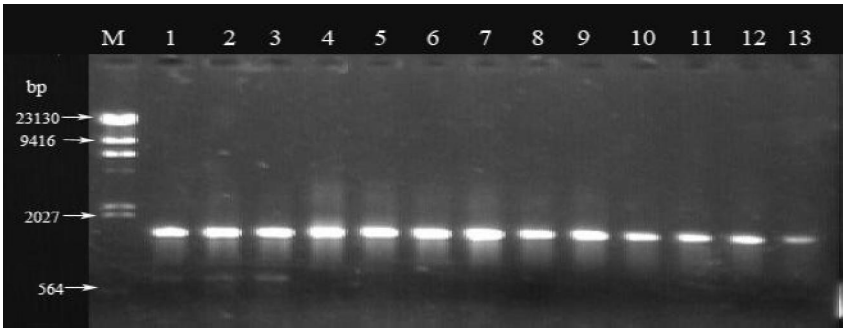
ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี				การติดสีย้อมแกรม	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์ (µm)
		ขอบ	ขนาด (mm)	สี	ผิวหน้า			
1	KSII_1	หยัก	2-4	ขาวครีม	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-4
2	KSII_2	เรียบ	2-4	ขาว	แบนราบ	Positive	Bacilli	0.5x1-4
3	KSII_3	หยัก	2-3	ขาว	นูน	Positive	Bacilli	0.5x1-3
4	KSII_4	เรียบ	2-3	ขาว	นูน	Positive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

2. การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยวิธี PCR-RFLP

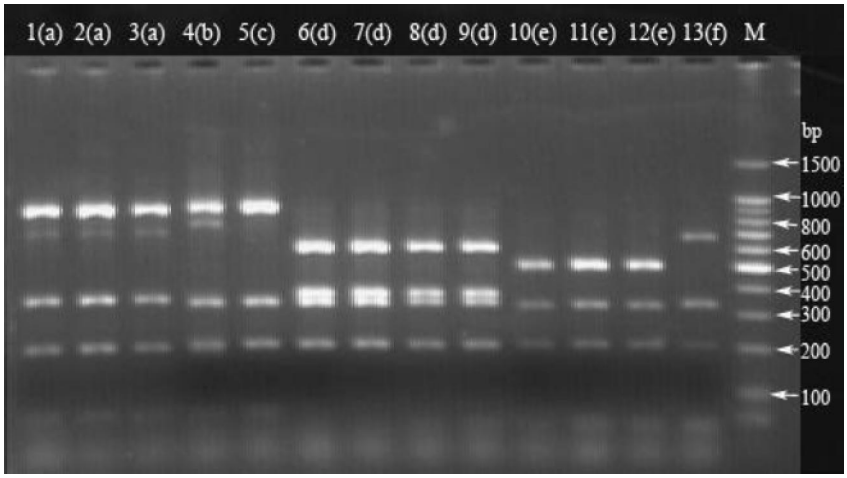
เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลตที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสแล้วปรากฏผลดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA โดยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Fd1 และ Rd1 (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า สามารถที่จะเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp และมีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามมี Non-specific Product ขนาดประมาณ 700-800 bp เกิดขึ้นในการทำพีซีอาร์ ของไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 ดังปรากฏในภาพที่ 2 เลนที่ 1-3 ผลการจัดกลุ่มไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถจัดกลุ่มไอโซเลตทั้งหมด 13 ไอโซเลตเป็น 6 กลุ่มคือ กลุ่ม a, b, c, d, e และ f ตามรูปแบบการตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI (ภาพที่ 3) กลุ่ม a ได้แก่ ไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 กลุ่ม b ได้แก่ไอโซเลต YTM4 กลุ่ม c ได้แก่ไอโซเลต YTM5 กลุ่ม d ได้แก่ไอโซเลต KSII_1, KSII_2, KSII_3 และ KSII_ กลุ่ม e ได้แก่ ไอโซเลต Kao_P1, Kao_P2 และ Kao_P3 และกลุ่ม f ได้แก่ไอโซเลต Kao_P4



ภาพที่ 1 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทนร้อนทั้ง13 ไอโซเลต โดยเลน1 = YTM1, 2 =YTM2, 3 = YTM3, 4 =YTM4, 5 = YTM5, 6 = KSII_1, 7 = KSII_2, 8 = KSII_3, 9 = KSII_4, 10 = Kao_P1, 11 = Kao_P2, 12 = Kao_P3, 13 = Kao_P4, 14 = Lambda *Hind* III DNA marker



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



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

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแต่ละไอโซเลต เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

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

[a] ผลการวิเคราะห์ ยีน16S rRNA ของ YTM4 ที่ให้ค่า Similarity ค่อนข้างต่ำมากนี้ แท้จริงแล้วเพราะ YTM4 เป็นเชื้อที่ยังไม่บริสุทธิ์

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม BLASTn

จากการจัดกลุ่มไอโซเลตของแบคทีเรียทนร้อนตามรูปแบบการตัดจำเพาะดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลตด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI แล้วส่งตัวแทนของแต่ละกลุ่มไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 5 ตัวแทนกลุ่ม a คือ YTM2 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) ตัวแทนกลุ่ม b คือ YTM4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับจีนัส *Bacillu* และ *Geobacillus* ทั้งนี้ค่า 80% Similarity ที่ค่อนข้างต่ำมากนี้ ไม่ได้แสดงว่า YTM4 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่แต่อย่างใด หากแต่ข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกชัดเจนว่า YTM4 เป็นเชื้อผสม เนื่องจากดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้น่าจะเป็นดีเอ็นเอผสมที่มาจากเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจาก Sequence trace ที่มีหลาย Peak ในตำแหน่งเดียวกัน(ไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้) นอกจากนั้น ผลการตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 3 เลนที่ 4) ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งแถบที่เมื่อรวมขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ทั้งหมดแล้วจะเกินขนาดของ 16S rRNA (1.5 kb) ซึ่งเป็นไปไม่ได้ ตัวแทนกลุ่ม c คือ YTM5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) ตัวแทนกลุ่ม d คือ KSII_1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* (99%) ตัวแทนของกลุ่ม e คือ Kao_P2 ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้ว มีความใกล้เคียงกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) และตัวแทนกลุ่ม f คือ Kao_P4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%) เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

สรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อจากน้ำพุร้อน 3 แห่ง ได้แก่ น้ำพุร้อนตาเนาะแมเราะ น้ำพุร้อนเขาชัยสน และน้ำพุร้อนบ้านนาทุ่งโพธิ์ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต คือ YTM1, YTM2, YTM3, YTM4, YTM5, KSII_1, KSII_2, KSII_3, KSII_4, Kao_P1, Kao_P2, Kao_P3 และ Kao_P4 ถูกจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้ 6 กลุ่ม ตามรูปแบบการตัดจำเพาะผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI กลุ่ม *a* ประกอบด้วยไอโซเลต YTM1, YTM2 และ YTM3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ YTM2 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มพบว่าใกล้เคียงกับ *Thermus brockianus* (97%) กลุ่ม b ประกอบด้วย YTM4 ซึ่งยังเป็นเชื้อผสมอยู่ กลุ่ม c ประกอบด้วยไอโซเลต YTM5 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Geobacillus thermoleovorans* (98%) กลุ่ม d ประกอบด้วย KSII_1, KSII_2 และ KSII_3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ KSII_1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus subtilis* (99%) กลุ่ม e ประกอบด้วยไอโซเลต Kao_P1, Kao_P2 และ Kao_P3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Kao_P2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Caldimonas manganoxidans* (99%) กลุ่ม f ประกอบด้วยไอโซเลต Kao_P4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Tepidimonas arfidensis* (97%)

มีรายงานการนำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อน ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น การใช้ *Caldimonas taiwanensis* ในการย่อยแป้ง และแป้งมันสำปะหลัง ให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* CGS2 และ *C. pasteurianum* (Wen-Ming et al., 2005) การสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก *Geobacillus thermoleovorans* T4 เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ

และ การผลิตอาหารสัตว์ (Shang-Kai et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสทนร้อนที่ได้จาก *Geobacillus thermoleovorans* ใน *Escherichia coli* เพื่อผลิตเอ็นไซม์ไลเปสทนร้อนสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง (Yasser et al., 2008) นอกจากนั้นยังมีรายงานการผลิตเอ็นไซม์คะตะเลสชนิดใหม่จาก *Thermus brockianus* (Vicki et al., 2003) เอ็นไซม์คะตะเลสที่สกัดได้ทนความร้อนและ pH สูง กว่าเอ็นไซม์คะตะเลสอื่นๆ ที่เคยมีการตีพิมพ์ จึงมีความเป็นไปได้มากที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ดังนั้นจากการศึกษาทั้งหมดเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่แยกได้ ไปศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

สุเทพ ไวครุทธา. (30 ตุลาคม 2553). การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์. 1 หน้า. URL://www.sa.ac.th/biodiversity/contents/articles/sutep1_01.html.

Abdelnasser S.S.I and El-diwany. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. Aust. J. Basic &Appl. Sci. 1(4): 473-478.

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M. and Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated form hot spring in Turkey. Journal of Microbiological method. 79(3): 321-328.

Bae, S. S., Lee. J. H., Kim, S. J. (2005). *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. Int. J. Syst. Evol. Microbial. 55: 1211-1215.

Brock, D. T. and Madigan, T. M. (1991). Biology of microorganism. 6th ed. Prentice Hall, Engwood cliffs, NJ. New York.

Elnasser, Z., Maraqa, A., Owais, W. et al. (2007). Isolation and characterization of new thermophilic bacteria in Jordan. Int. J. Microbial 3. 1-13.

Kanso, S. (2003). Molecular studies of bacteria communities in the Great Artesian Basin Aquifers. Ph. D. Thesis. Griffith University.

Reda ,A. I., Aou – Shanab. (2007). Characterization and 16S rRNA identification of thermotolerant bacteria isolated from hot spring. J. Appl. Sci. Res. 3(10), 994-1000.

Tai, SK., Lin, HP., Kuo, J. and Liu, JK. (2004). Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. Extremophiles 8(5): 345–349.

Vicki, S., Kastli, D., and William A. (2003). Purification and Characterization of a Novel Thermo-Alkali-Stable Catalase

from *Thermus brockianus*. Biotechnol. Prog. 19: 1292-1299.

Chen, WM., Chang, JS., Chiu, CH., Chang, SC., Chen, WC. And Jiang, CM. (2005). *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. Systematic and Applied Microbiology 28: 415–420.

Yasser, R., and Ahmed A. (2008). Identification and over-expression of a thermo stable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *E.coli*. Microbiological Research 163: 13-20.

❑❑❑❑❑