วารสาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 ปี 2552 เนื่องในสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ

วิทยาศาสตร์ก้าวไกล นำไทยก้าวหน้า

คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
ISSN : 1685-4829

การคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ทนร้อนจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่น
Screening and Isolation of Thermotolerant Microorganism from Various Sources in Local Communities

หัสลินดา บินมะแอ [1]

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ทนร้อนในท้องถิ่นจาก 18 ตัวอย่าง 4 แหล่ง ได้แก่ โรงงานยางพารา, เตาถ่าน, แกลบ และมูลสัตว์ต่างๆ พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 15 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท N9, N10 และ N13 เป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Thermus* sp. ส่วน ไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N11, N12, N14 และ N15 เป็นแบคทีเรียทนร้อนในสกุลของ *Bacillus* sp. และจากการศึกษาการคัดเลือกและแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่นครั้งนี้ พบว่าไม่พบเชื้อราทนร้อนจากทุกตัวอย่าง

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ทนร้อน, วัสดุเศษเหลือของท้องถิ่น, แบคทีเรียทนร้อน, เชื้อราทนร้อน

บทนำ

ประชากรส่วนใหญ่ของสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ในแต่ละปีมีผลผลิตทางการเกษตรสูง เพื่อบริโภคเองและเป็นสินค้าส่งออกไปยังจังหวัดต่างๆ นอกจากผลผลิตดังกล่าว จากสินค้าเหล่านี้ทำให้เกิดวัสดุเหลือใช้ ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหรือการบริโภคมากมาย เช่น ฟางข้าว เปลือกอ้อย แกลบ ขี้เลื่อย เป็นต้น โดยที่วัสดุเศษเหลือนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์น้อยมาก (1) และนอกจากนี้อาชีพสิ่งที่ขาดไม่ได้ของคนไทยอีกอย่างหนึ่ง คือ การเลี้ยงสัตว์ เช่น เป็ด ไก่ วัว ควาย เป็นต้น การเลี้ยงสัตว์เหล่านี้ทำรายได้ให้กับเกษตรกรได้เป็นอย่างดี ทำให้เพิ่มรายได้ให้กับครอบครัว และนิยมเลี้ยงกันเกือบทุกครัวเรือน ในมูลสัตว์เหล่านี้จะมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบสำคัญ เซลลูโลสจะไม่ถูกสลายด้วยกรดและจะไม่สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ยกเว้นสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือสัตว์ที่กินหญ้าเป็นอาหาร จะมีแบคทีเรีย รา ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้ (2) นอกจากนั้นประชากรในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ยังมีอาชีพกรีดยางเป็นส่วนใหญ่ ทำให้มีการปลูกยางพาราจำนวนมาก ทำให้มีโรงงานแปรรูปไม้ยางพารากระจายอยู่ทั่วไป ในการแปรรูปไม้ยางพารานั้นจะทำให้เกิดวัสดุเศษเหลือทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลวจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุเศษเหลือพวกขี้เลื่อย ซึ่งทับถมกันเป็นจำนวน

[1] *อาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อ.เมือง จ.ยะลา*

มาก การทับถมของขี้เลื่อยทำให้มีอุณหภูมิสูงและเกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ จึงน่าจะเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์ทนร้อนได้ ส่วนไม้ยางพาราที่เหลือจากการแปรรูป สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยการนำไปเผาเป็นถ่าน ซึ่งบริเวณที่มีการเผาถ่านนั้นจะมีความร้อนอยู่ตลอดเวลา น่าจะมีจุลินทรีย์ทนร้อนอาศัยอยู่เช่นกัน จากแหล่งดังกล่าวในท้องถิ่น น่าจะมีแนวโน้มที่จะสามารถคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ทนร้อนได้ หากสามารถคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ทนร้อนจากแหล่งดังกล่าวแล้ว ก็จะศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไปได้

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ จึงทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและผลิตเอนไซม์ในระดับสูงขึ้นต่อไป ตลอดจนเพื่อนำไปศึกษาการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

วิธีการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่น คือ

- เตาถ่าน ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อย, ด้านข้างของกองขี้เลื่อย, ด้านบนของกองขี้เลื่อย, ขี้เถ้าและเศษถ่าน ที่บ้านไร่ ต.ปากล่อ อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี
- โรงงานยางพารา ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน, ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตร จากพื้นดิน, ขี้เลื่อยสูง 2 เมตร จากพื้นดิน, ยอดกองขี้เลื่อย, น้ำในหม้อ, น้ำทิ้งตามทางเดิน, น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก, น้ำในท่อพักบำบัด, ขี้เถ้า + ดิน และ ขี้เถ้า ที่โรงงานยูเอ็น พาราวู้ด ต.สะเตง อ.เมือง จ.ยะลา
- แกลบ จากโรงสีข้าว จ.ยะลา
- เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ ได้แก่ มูลวัว และมูลไก่ ในอำเภอแว้ง จังหวัดนราธิวาส

2. ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อน

2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่เป็นของแข็งนำมาชั่ง 1 กรัม แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสังเกตความขุ่นทุกวัน

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ก็จะทำการถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลอดใหม่อีกครั้งหนึ่ง และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทุกประการ ยกเว้นมีการเติม Agar 20 กรัม ต่อลิตร ลงไปด้วย โดยใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่วๆ ผิวหน้าของอาหารบ่มจานเพาะเชื้อที่ 55 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วทำการเก็บเชื้อโดยเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาอย่างละ 1 โคโลนี เก็บรักษาบนหลอดอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar ปิดฝาให้แน่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการ subculture ใหม่ทุก ๆ เดือน

2.2 การคัดเลือกเชื้อรา

นำตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่เป็นของแข็งนำมาชั่ง 1 กรัม แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และสังเกตเส้นใยทุกวัน

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเส้นใย ก็จะทำการถ่ายเชื้อที่เจริญแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลอดใหม่อีกครั้งหนึ่ง และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเส้นใย แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทุกประการ ยกเว้นมีการเติม Agar 20 กรัม ต่อลิตร ลงไปด้วย โดยใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่วๆ ผิวหน้าของอาหารบ่มจานเพาะเชื้อที่ 55 องศาเซลเซียส และสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วทำการเก็บเชื้อโดยเลือกโคโลนีของราที่มีลักษณะแตกต่างกันมาอย่างละ 1 โคโลนี เก็บรักษาบนหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose agar ปิดฝาให้แน่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการ subculture ใหม่ทุกๆ เดือน

3. ศึกษาการแยกจุลินทรีย์ทนร้อน

3.1 การแยกแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรม แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะรูปร่างและการติดสี

3.2 การแยกรา

นำราที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อราโดยการใช้เทคนิค slide culture

4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

นำรายละเอียดทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาจากข้อ 3 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก ลักษณะที่ทำการศึกษาได้แก่ รูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และปฏิกิริยาการติดสีภายหลังจากการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบทางชีวเคมี แล้วไปเปรียบเทียบกับเอกสารทางด้านอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อน

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่น

จากตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด18 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่นจำนวน 4 แหล่ง คือ แหล่งแรกโรงงานยางพารา ได้แก่ ขี้เถ้า+ดิน, ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตรจากพื้นดิน, ยอดกองขี้เลื่อย, น้ำในหม้อ, น้ำทิ้งตามทางเดิน, น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก, ขี้เถ้า, น้ำในท่อพักบำบัด, ขี้เลื่อยบนพื้นดิน และ ขี้เลื่อยสูง 2 เมตร จากพื้นดิน สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลท ได้แก่ N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11 และ N12 แต่ไม่พบเชื้อรา ส่วนแหล่งที่ 2 คือ เตาถ่าน ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน, ด้านข้างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน, ด้านบนของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน, เศษถ่าน และ ขี้เถ้า พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ N13, N14 และ N15 นอกจากนี้มีตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน เศษถ่าน และขี้เถ้า ส่วนแหล่งที่ 3 คือ แกลบ และแหล่งที่ 4 คือ มูลวัว และมูลไก่ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเช่นกัน ดังตารางที่ 1

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากการศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่างลักษณะของเซลล์ โดยการนำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth และ Nutrient Agar พบว่า แบคทีเรียมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ได้แก่ สีขาวขุ่น สีครีม มีทั้งขอบเรียบและขอบไม่เรียบ ผิวเรียบและผิวไม่เรียบ สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากโรงงานยางพาราได้เป็น 5 กลุ่ม ดังตารางที่ 2 และจากเตาถ่านได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 3 ลักษณะรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรมมีหลายแบบ คือ มีแบคทีเรีย แกรมบวก (Gram positive Bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative Bacteria) และเป็นรูปท่อน (Bacilli) เกลียว (Spirillum) มีบางสายพันธุ์สร้างเอนโดสปอร์แบบรูปไข่ อยู่กลางเซลล์ (Central spores) และรูปไข่อยู่ส่วนเกือบปลายของเซลล์ (Subterminal spores) ดังตารางที่ 4 และตารางที่ 5 และนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบทางชีวเคมี ดังตารางที่ 6

จากจำนวนแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในท้องถิ่น จากข้อ 1 สามารถจำแนกเชื้อออกได้เป็น 2 สกุล คือ *Thermus* sp. ได้แก่ ไอโซเลท N9, N10 และ N13 ดังรูปที่ 1 ส่วน *Bacillus* sp. ได้แก่ ไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N11, N12, N14 และ N15 ดังรูปที่ 2

ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างและแบคทีเรียที่แยกได้

ประเภทของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	
	Fungi	Bacteria
โรงงานยางพารา		
ขี้เถ้า + ดิน	N1, N2	NF
ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตร จากพื้นดิน	N3, N4	NF
ยอดกองขี้เลื่อย	N5	
น้ำในหม้อ	N6, N7	NF
น้ำทิ้งตามทางเดิน	N8	NF
น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก	N9	NF
ขี้เถ้า	N10, N11	NF
น้ำในท่อพักบำบัด	N12	NF
ขี้เลื่อยบนพื้นดิน	NF	NF
ขี้เลื่อยสูง 2 เมตร จากพื้นดิน	NF	NF
เตาถ่าน		NF
ด้านล่างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน	N13	NF
ด้านข้างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน	N14	NF
ด้านบนของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน	N15	NF
เศษถ่าน	NF	NF
ขี้เถ้า	NF	NF
แกลบ	NF	NF
มูลสัตว์		
มูลวัว	NF	NF
มูลไก่	NF	NF

หมายเหตุ : NF (Not found) หมายความว่า ไม่พบ

ตารางที่ 2 ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานยางพารา

ไอโซเลท	ลักษณะที่ปรากฏ
N1. N7. N8. N10. N12	1. โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบเรียบ
N2. N3. N4. N6	2. โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ
N11	3. โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวไม่เรียบ ขอบไม่เรียบ
N9	4. โคโลนีมีสีครีม ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ
N5	5. โคโลนีมีใส ขอบไม่เรียบ

ตารางที่ 3 ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากเตาถ่าน

ไอโซเลท	ลักษณะที่ปรากฏ
N13	1. โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ ขอบไม่เรียบ
N14	2. โคโลนีมีสีครีม ผิวเรียบ ขอบเรียบ
N15	3. โคโลนีมีสีครีม ขอบไม่เรียบ แตกกิ่งก้าน

ตารางที่ 4 ลักษณะรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรมจากโรงงานยางพารา

การติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	ลักษณะของเอนโดสปอร์	รหัสเชื้อ
แกรมบวก	รูปท่อน	รูปไข่ อยู่กลางเซลล์ (central spores)	N5. N7. N11. N12
แกรมบวก	รูปท่อน	รูปไข่อยู่ส่วนเกือบปลายเซลล์ (subterminal spores)	N1. N2. N3. N4. N6. N8
แกรมลบ	รูปท่อน	-	N9. N10

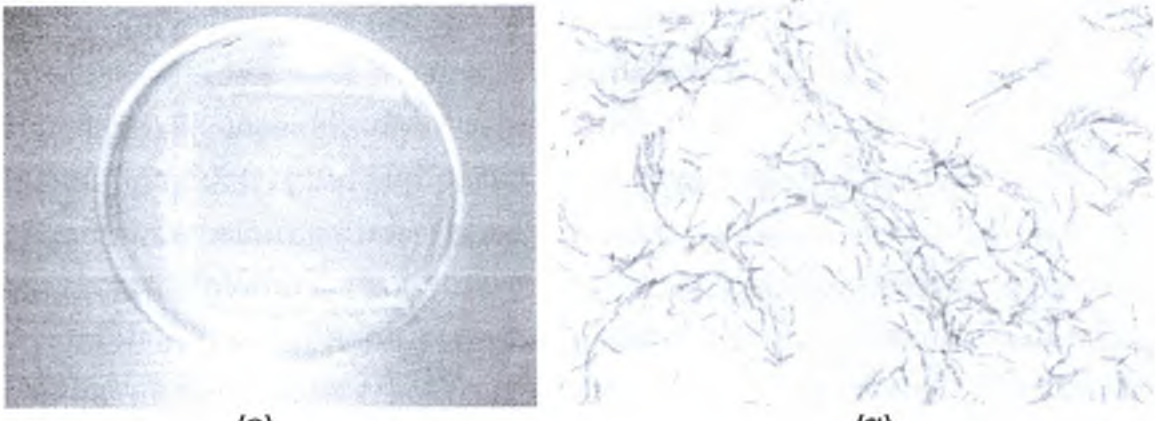
ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรมจากเตาถ่าน

การติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	ลักษณะของเอนโดสปอร์	รหัสเชื้อ
แกรมบวก	รูปท่อน	รูปไข่อยู่ส่วนเกือบปลายเซลล์ (subterminal spores)	N14
แกรมบวก	รูปแท่งไม่ตรง	-	N15
แกรมลบ	รูปท่อน	-	N13

ตารางที่ 6 การศึกษาทางชีวเคมีเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Nutrient Agar

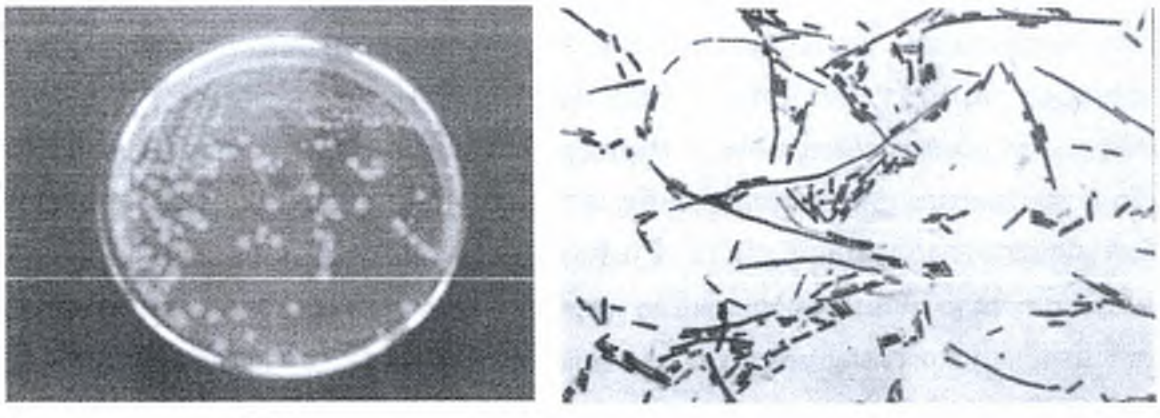
รหัสเชื้อ	การย่อยแป้ง	การสร้างอินโดล	การทดสอบ Methyl red test	การทดสอบ Oxidase test	การทดสอบคะตะเลส	การทดสอบ Motile
N1	+	-	-	+	+	motile
N2	+	-	+	+	+	motile
N3	+	-	-	-	+	No motile
N4	+	-	+	+	+	motile
N5	+	-	-	-	+	No motile
N6	+	-	+	-	+	No motile
N7	+	-	+	-	+	motile
N8	+	-	+	+	+	motile
N9	-	-	+	-	-	No motile
N10	-	-	+	-	+	No motile
N11	+	-	+	+	+	No motile
N12	+	-	+	-	+	motile
N13	-	-	+	-	-	motile
N14	+	-	+	-	+	motile
N15	+	-	-	+	-	motile

หมายเหตุ : + หมายถึงสามารถใช้อาหารหรือสร้างสารนั้นได้ - หมายถึงไม่สามารถใช้อาหารหรือไม่สามารถสร้างสารนั้นได้



(ก) (ข)

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Thermus* sp. (ไอโซเลท N9, N10 และ N13
ก. ลักษณะโคโลนีของ N10 บนอาหาร NA
ข. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ N10 เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



(ก) (ข)

รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (ไอโซเลท N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N11, N12, N14 และ N15)
ก. ลักษณะโคโลนีของ N14 บนอาหาร NA
ข. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ N14 เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากตัวอย่างที่นำมาศึกษา 18 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งในท้องถิ่น 4 แหล่ง คือ แหล่งที่ 1 โรงงานยางพารา ได้แก่ ขี้เถ้า+ดิน ขี้เลื่อยสูง 50 เซนติเมตร จากพื้นดิน ยอดกองขี้เลื่อย น้ำในหม้อ น้ำทิ้งตามทางเดิน น้ำทิ้งหลังการอบน้ำยากันปลวก ขี้เถ้า น้ำในท่อพักบำบัด ขี้เลื่อยบนพื้นดิน และขี้เลื่อยสูง 2 เมตร จากพื้นดิน เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth และ Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลท ได้แก่ N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11 และ N12 ส่วนเชื้อราเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar และ Potato Dextrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีเชื้อราเกิดขึ้น ซึ่งต่างกับการศึกษาแยกเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุบางชนิด ได้แก่ ขี้เลื่อย, รำข้าว, กากปาล์มน้ำมัน และถ่านแกลบ โดยวิธี Modified Soil Plate Technique พบเชื้อรา จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Rhizomucor pusillus, Chaetomium thermophile* และ *T. lanuginosns* (3) ส่วนแหล่งที่ 2 คือ เตาถ่าน ได้แก่ ด้านล่างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน ด้านข้างของกองขี้เลื่อยเผาถ่าน ด้านบนของกองขี้เลื่อย เศษถ่าน และขี้เถ้า เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth และ Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ N13, N14 และ N15 แต่ไม่พบเชื้อรา นอกจากนี้มีตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ขี้เลื่อยบนพื้นดิน เศษถ่าน และขี้เถ้า ส่วนแหล่งที่ 3 คือ แกลบ และแหล่งที่ 4 คือ มูลวัว และมูลไก่ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นช่วงหน้าฝน มีฝนตกหนัก และในปีนี้มีฝนตกยาวนานกว่าทุกปีที่ผ่านมา ตลอดจนมีน้ำท่วมบริเวณตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง จึงทำให้ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทนร้อนชนิดต่างๆ ได้

จากการศึกษาเชื้อ *Fervidobacterrium pennavorans* จากบ่อน้ำพุร้อน บนเกาะอะโรชรีส สามารถสร้าง Heat Stable Keralinolytic Enzyme ได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงสามารถมีชีวิตรอดและและเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้น เนื่องจากโครงสร้างไลปิดของผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไขมันประเภทอิ่มตัว กรดไขมันที่มีกิ่งสาขา และกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่สูง จึงทำให้ผนังเซลล์ทำหน้าที่ในการส่งสาร จึงต้องการไขมันที่อยู่ในสภาวะกึ่งของเหลว ซึ่งสภาวะนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติทางเคมีของไลปิด และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม (4) ผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว และกรดไขมันที่มีกิ่งสาขาในสัดส่วนที่สูง เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางธรรมชาติของโปรตีน และเอนไซม์ พบว่าคุณสมบัติหลายประการของโปรตีนและเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง เช่น น้ำหนักโมเลกุล, องค์ประกอบหน่วยย่อย คล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง แต่กลับมีความเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากโครงสร้างของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ซึ่งมีทั้งโครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary) และจตุรภูมิ (Quarternary) ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็ง และยืดหยุ่นต่ำภายใต้ระดับอุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถทำงานและเสถียรภาพภายใต้อุณหภูมิสูง (5)

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการพบว่า

1. ลักษณะรูปร่างและการติดสีด้วยการย้อมแกรมมีหลายแบบ คือ มีแบคทีเรีย แกรมบวก (Gram Positive Bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative Bacteria) และเป็นรูปท่อน (Bacilli) เกลียว (Spirillum) มีบางสายพันธุ์ สร้างเอนโดสปอร์แบบรูปไข่อยู่กลางเซลล์ (Central spores) และรูปไข่อยู่

ส่วนเกือบปลายของเซลล์ (Subterminal spores) สอดคล้องกับผลจากการศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนซึ่งสามารถสลายไขมันที่อุณหภูมิสูง จากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานปาล์ม ซึ่งพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนได้จำนวน 33 isolates โดยทุก isolates เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและเหลวที่ 60 องศาเซลเซียส ผลการย้อมสีกรัมพบติดสีกรัมลบจำนวน 18 isolates กรัมบวก 8 isolates และติดสีไม่แน่นอน 7 isolates (6)

2. สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่คัดเลือกออกเป็น 2 สกุล คือ *Thermus* sp. และ *Bacillus* sp. โดยไอโซเลทที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนในสกุล *Thermus* sp. ได้จากไอโซเลท N9. N10 และ N13 ไอโซเลท และที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนในสกุล *Bacillus* sp. ได้จาก ไอโซเลท N1. N2. N3. N4. N5. N6. N7. N8. N11. N12. N14 และ N15

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร ที่ได้ให้โอกาสรับทุนวิจัยในโครงการวิจัยในระดับคณะ งบประมาณบำรุงการศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2550

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์การทดลอง

ขอขอบพระคุณบริษัท ยูเอ็น พาราวู้ด ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบในการทำวิจัยและขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการเก็บตัวอย่างดังกล่าวเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆ ตลอดจนกำลังใจที่ได้มอบให้กับข้าพเจ้าตลอดมา จนโครงการวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

(1) ผจญ เรืองโรจน์ : การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากป่าชาเลน. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2547.

(2) สรรเสริญ ทรัพยโตบก : โภชนาการเชิงชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2531.

(3) มานะ กาญจนมณีเสถียร : เชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุบางชนิดและ key อย่างง่ายที่ใช้ในการจำแนก. ว.สงขลานครินทร์. 16 (1):83 -92. 2537.

(4) Fridirch, A.B. and Antranikian, G :Keratin degradtion by *Fervidobacterium pennavorans* a novel thermophillic anaerobic specirs of the order thermogales. Appl. Environ. Microbiol. 62 (8) : 2874-2882. 1996.

(5) Vandermark, P.J. and Batzing, B.L : The microbes and their environments. In The microbes : an introduction to their nature and importance. California : Benjamin Cummings. Pp. 131-173. 1987.

(6) รัตนา เรืองไรรัตนโรจน์ และ จันทรา ปุรินทราภิบาล : การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนซึ่งสามารถสลายไขมันที่อุณหภูมิจากวัสดุเหลือทิ้งโรงงานปาล์ม. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาสงขลานครินทร์. 2534.