การสร้างดีเอ็นเอติดตามพอลิฟอสเฟตไคเนสในแบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตที่แยกจากระบบบำบัดน้ำเสียสี่พระยา

นางสาวปวีณา รัตนมาศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1011-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF DNA PROBE FOR POLYPHOSPHATE KINASE IN POLYPHOSPHATE ACCUMULATING BACTERIA ISOLATED FROM SI PRAYA WASTEWATER TREATMENT SYSTEM

Miss Paweena Ratanamart

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-53-1011-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างดีเอ็นเอติดตามพอลิฟอสเฟตไคเนสในแบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียสี่พระยา

โดย นางสาวปวีณา รัตนมาศ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……………………………………….. รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…………………………………………. ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

……………………………………….. อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

…………………………………………. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

…………………………………………. กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

…………………………………………. กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปวีณา รัตนมาศ : การสร้างดีเอ็นเอติดตามพอลิฟอสเฟตไคเนสในแบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียสี่พระยา (CONSTRUCTION OF DNA PROBE FOR POLYPHOSPHATE KINASE IN POLYPHOSPHATE ACCUMULATING BACTERIA ISOLATED FROM SI PRAYA WASTEWATER TREATMENT SYSTEM)
อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
จำนวน 102 หน้า. ISBN: 974-53-1011-5

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสีย จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4 และ CU-PK 5 หาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตโดยการติดตามกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์มีกิจกรรมของพอลิฟอสเฟตไคเนสโดยที่สายพันธุ์ CU-PK2 มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตสูงสุด เมื่อเพิ่มจำนวนยีน *ppk* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเจเนอเรตไพร์เมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อ *ppk* พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *ppk* ได้ใน CU-PK2, CU-PK5 และ *Escherichia coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก โดยได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1300 bp นำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาติดฉลากด้วย Digoxygenin และใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีน *ppk* ในแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งสามชนิดเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์กับ จีโนมิกดีเอ็นเอ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 เหมือนกัน แต่ไม่เกิดสัญญาณกับสายพันธุ์ CU-PK1, CU-PK3 และ CU-PK4 การจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้นของ CU-PK2 และCU-PK5 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU-PK2 มีความคล้ายคลึงกับ *Klebsiella oxytoca* และ CU-PK 5 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterobacter aerogenes*

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....................................
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.................................

4472325323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Polyphosphate / Polyphosphate kinase / Polyphosphate accumulating bacteria / probe

PAWEENA RATANAMART : CONSTRUCTION OF DNA PROBE FOR POLYPHOSPHATE KINASE IN POLYPHOSPHATE ACCUMULATING BACTERIA ISOLATED FROM SI PRAYA WASTEWATER TREATMENT SYSTEM.
THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHARNWIT KOSITTANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr.rer.nat. 102 pp.
ISBN: 974-53-1011-5

Five phosphate accumulating bacteria strains, CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4 and CU-PK 5 were isolated from wastewater samples of Si Praya wastewater treatment system by using wastewater medium. Polyphosphate synthesis activity was assessed by monitoring the activity of polyphosphate kinase. The result revealed that all five strains have polyphosphate kinase activity whereas the strain CU-PK2 shows the highest activity. After *ppk* amplification by polymerase chain reaction using degenerated primers specific to *ppk*, the 1300 bp product can be observed when using genomic DNA of CU-PK2, CU-PK5 and *Escherichia coli* JM109 as template. The PCR products were labeled with Digoxygenin and used as DNA probe for detection of *ppk* of the 5 bacterial strains using dot blot hybridization. Only genomic DNA from the strain CU-PK2, CU-PK5 and *E. coli* JM109 showed the positive hybridization signals with those synthesized probes. The strain CU-PK2 and CU-PK5 were preliminary identified based on their morphological characteristics and 16S rDNA nucleotide sequences to be *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter aerogenes*, respectively.

Department ....Microbiology........ Student's signature..................................
Field of study ....Industrial Microbiology.... Advisor's signature..................................
Academic year ....2004.................... Co-advisor's signature..................................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณห้องวิจัย 402 405 และ 449 ที่กรุณาเอื้อเฟื้อแบคทีเรียและสารเคมีบางชนิดที่ใช้ในงานวิจัย ขอบคุณ คุณขนิษฐา วงษ์นิกร คุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ คุณศิโรจน์ ศรีสราภรณ์ คุณวิชุตา เหล่าเรืองธนา คุณเวฬุรีย์ ทองคำ คุณสุหัทยา จิระนันทิพร คุณวัชรี ชุณห์กุล คุณจันทรนาถ พลชำนิ คุณวีระศักดิ์ จงเฟื่องปริญญา คุณไพฑูรย์ ทวีรุจิโรจน์ และน้องๆในห้องวิจัย 453 ทุกคน ที่อยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ……	จ
กิตติกรรมประกาศ ……	ฉ
สารบัญ ……	ช
สารบัญตาราง ……	ซ
สารบัญรูป ……	ฌ
คำย่อ ……	ญ
บทที่	
1. บทนำ ……	1
2. ปริทรรศน์วรรณกรรม……	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง ……	21
4. ผลการทดลอง ……	44
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง ……	58
รายการอ้างอิง ……	65
ภาคผนวก ……	75
ภาคผนวก ก ……	76
ภาคผนวก ข ……	79
ภาคผนวก ค ……	90
ภาคผนวก ง ……	91
ภาคผนวก จ ……	92
ภาคผนวก ฉ……	93
ภาคผนวก ช……	95
ภาคผนวก ซ……	101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ……	102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์………………….….. 13

2.2 ผลการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของจุลินทรีย์ 15 ชนิด ………………… 18

2.3 จุลินทรีย์ที่มียีน *ppk* ……………………………………………………………………... 19

3.1 แบคทีเรีย………………………………………………………………………………… 24

3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์…………………………………………………………….…… 25

3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *ppk*... 34

3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA ………………………………………………………………………. 38

4.1 ความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียคัดเลือก 5 ชนิด… 45

4.2 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4 และ CU-PK5……………………………………………………….. 47

4.3 ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนสและผลการวิเคราะห์โปรตีนของสารสกัดจากเซลล์……………………… 48

4.4 แสดงผลการแปรผันปัจจัยต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199 และ TGNYf-1435r………………………………………………………… 49

4.5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank.. 52

4.6 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA ของ CU-PK2 และ CU-PK5…………………... 54

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงวัฏจักรของฟอสฟอรัส..	5
2.2	แสดงลักษณะโครงสร้างของพอลิฟอสเฟต..	6
2.3	แสดงแผนภาพของEBPR...	8
2.4	กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism process) ของ พีเอโอ ที่เกิดขึ้นในEBPR.......	10
3.1	ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน	41
4.1	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตภายนอกเซลล์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและ มีออกซิเจน ของแบคทีเรียตัวอย่าง 5 ชนิด..	46
4.2	ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียตัวอย่าง CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109...	51
4.3	Dot blot hybridization ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม PP1..	55
4.4	Dot blot hybridization ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม PP2..	56
4.5	Dot blot hybridization ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม PP3..	57
5.1	Phylogene tree ของแบคทีเรีย 23 สายพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัส *ppk*	62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

$^{\circ}$ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
μg	=	ไมโครกรัม
μM	=	ไมโครโมลาร์
μl	=	ไมโครลิตร
bp	=	คู่เบส
mM	=	มิลลิโมลาร์
pg	=	พิโครกรัม
U	=	ยูนิต (หน่วยของเอนไซม์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

น้ำ เป็นสิ่งจำเป็นในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทว่า แหล่งน้ำมีสิ่งเจือปนต่างๆที่มาจากแหล่งกำเนิดแตกต่างกัน เช่น โรงงานอุตสาหกรรม กสิกรรม และชุมชน ปัจจุบันปัญหามลภาวะทางน้ำนี้ยิ่งทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเนื่องจากความต้องการบริโภคของประชากรที่เพิ่มขึ้น ทั้งปัญหาจากแบคทีเรีย โลหะหนัก น้ำมัน รวมถึงปัญหาจากธาตุอาหาร

ธาตุอาหาร ได้แก่ ฟอสฟอรัสซึ่งก่อให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน กล่าวคือ เมื่อมีฟอสฟอรัสปริมาณสูงในแหล่งน้ำจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของสาหร่าย (Algae Bloom) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ระดับออกซิเจนในน้ำลดลงมากในช่วงกลางคืน อีกทั้งทำให้เกิดวัชพืชน้ำ เป็นปัญหาแก่การสัญจรทางน้ำ และทัศนียภาพที่ไม่ชวนมองส่งผลกระทบต่อการท่องเที่ยว

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดค่าความเข้มข้นฟอสฟอรัสในน้ำทิ้ง แต่มีรายงานว่าเกิดยูโทรฟิเคชันในประเทศไทยหลายครั้งด้วยกัน เช่น พบในอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวง อ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่งัด จังหวัดเชียงใหม่ กว๊านพระเยา จังหวัดพระเยา หนองหารจังหวัดสกลนคร อ่างเก็บน้ำเขื่อนลำตะคลอง จังหวัดนครราชสีมา และอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2543)

การกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียทำได้โดย การตกตะกอนด้วยสารเคมี (วิโรจน์, 2541) กำจัดโดยชีววิธี (Bond และคณะ, 1999) และใช้ 2 วิธีนี้ร่วมกัน(Van Loosdrecht และคณะ, 1997)การกำจัดฟอสฟอรัสโดยชีวภาพนี้เรียกว่า Enchance Biological Phosphate Removal (EBPR) (Shapiro และคณะ, 1960) ทำได้โดยอาศัยแบคทีเรียที่มีความสามารถจับฟอสเฟตแล้วสะสมในรูปพอลิฟอสเฟตในระบบสลัดจ์กัมมันต์) (Shapiro และคณะ, 1967) วิธีนี้สามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งใช้ค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีกำจัดทางเคมี

ในปัจจุบันการกำจัดธาตุอาหารได้รับความสนใจจากหลายประเทศ เช่นโรงบำบัดน้ำเสียในประเทศสวิตเซอร์แลนด์และสวีเดน ประมาณร้อยละ 90 เป็นกระบวนการขั้นสูงชนิดกำจัดฟอสฟอรัส (Henze, 1990) ในประเทศไทยก็เริ่มสนใจกระบวนการนี้เช่นกัน โดยระบบน้ำเสียยานนาวาของกรุงเทพมหานคร ซึ่งใช้ระบบบำบัดชนิด CASS หรือ Cyclic Activated Sludge System)

ระบบ EBPR เป็นระบบที่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นที่ยอมรับในหลายประเทศ แต่ EBPR ยังมีปัญหาเกี่ยวกับความเสถียรของระบบเนื่องจากบางครั้งไม่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้ ในขณะที่การกำจัดบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) และซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) การตรวจสอบที่ปฏิบัติกันคือวัดปริมาณฟอสเฟตในน้ำเข้าและออกแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน (Park และคณะ ,1997) ซึ่งเป็นวิธีล่าช้าเกินไปที่จะแก้ไขระบบที่ล้มเหลว ดังนั้นการติดตามจำนวนแบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตน่าจะเป็นวิธีที่ช่วยให้ทราบสภาวะของระบบขณะนั้น และสามารถป้องกันการล้มเหลวของระบบบำบัดได้อย่างรวดเร็ว

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544) ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 2 ทิศทาง จากบริเวณอนุรักษ์ของ *ppk* ในเชื้อต่างๆ ที่สะสมพอลิฟอสเฟต โดยอาศัยฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าไพร์เมอร์ที่สังเคราะห์ไม่สามารถเพิ่มจำนวน *ppk* ของแบคทีเรียที่แยกจากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา แต่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณ *ppk* ใน *Escherichia coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกโดยมีผลิตภัณฑ์ขนาด 650 bp และเมื่อติดฉลากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวด้วย digoxigenin แล้วใช้เป็นตัวติดตามตำแหน่งของ *ppk* (ตัวติดตาม PE) ในเชื้อตัวอย่างที่แยกได้จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของ *ppk* ของ *E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกและเชื้อตัวอย่างที่แยกได้เพียง 2 จาก 3 สายพันธุ์ และยังไม่ได้ทำการทดสอบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสีย

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *ppk* โดยใช้ข้อมูลจากแบคทีเรียอื่นๆ เพื่อให้สามารถติดตามเชื้ออื่นๆ ที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียได้มากขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสพอลิฟอสเฟตไคเนส (polyphosphate kinase, *ppk*) ของแบคทีเรียที่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสจากน้ำเสีย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียที่มีฟอสเฟต
2. จำแนกชนิดและศึกษาความสามารถในการสะสมฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้
3. สร้างดีเอ็นเอติดตามซึ่งจำเพาะต่อพอลิฟอสเฟตไคเนส
4. การตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอติดตาม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสพอลิฟอสเฟตไคเนส เพื่อช่วยตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียและเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงในต่อไป

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

ฟอสฟอรัส เป็นธาตุที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก คือ ดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นองค์ประกอบของเยื่อเมมเบรนของสิ่งมีชีวิตโพรแคริโอต (prokaryote) และสิ่งมีชีวิตยูแคริโอต (eukaryote) รวมถึงเป็นองค์ประกอบของพลังงานภายในเซลล์หรือ เอทีพี (ATP) โดยทั่วไปเซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของฟอสฟอรัส 1.5 ถึง2.5 % ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Kornberg และคณะ, 1999)

ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารจำกัดที่มักเกี่ยวข้องกับการเกิดยูโทรฟิเคชันในแหล่งน้ำจืดปิด (Randall และคณะ, 1992) หากมีฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำปิดในปริมาณสูงอาจกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วของสาหร่าย จนแหล่งน้ำเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวหรือแดง โดยค่าเริ่มต้นของปริมาณฟอสฟอรัสที่ทำให้เกิดยูโทรฟิเคชั่นมีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธงชัย พรรณสวัสดิ์ , 2544)

ยูโทรฟิเคชันทำให้ออกซิเจนลดลงในช่วงกลางคืน นอกจากนี้เมื่อสาหร่ายตายและจมลงสู่ก้นแหล่งน้ำแล้วย่อยสลายตามธรรมชาติ ทำให้ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหรือค่าดีโอ (DO) ลดลงมาก จนทำให้สัตว์น้ำตาย ยิ่งทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียหากเป็นแหล่งน้ำในสถานที่ท่องเที่ยวจะส่งผลกระทบต่อการท่องเที่ยวทำให้แหล่งชุมชนขาดแคลนรายได้

ฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

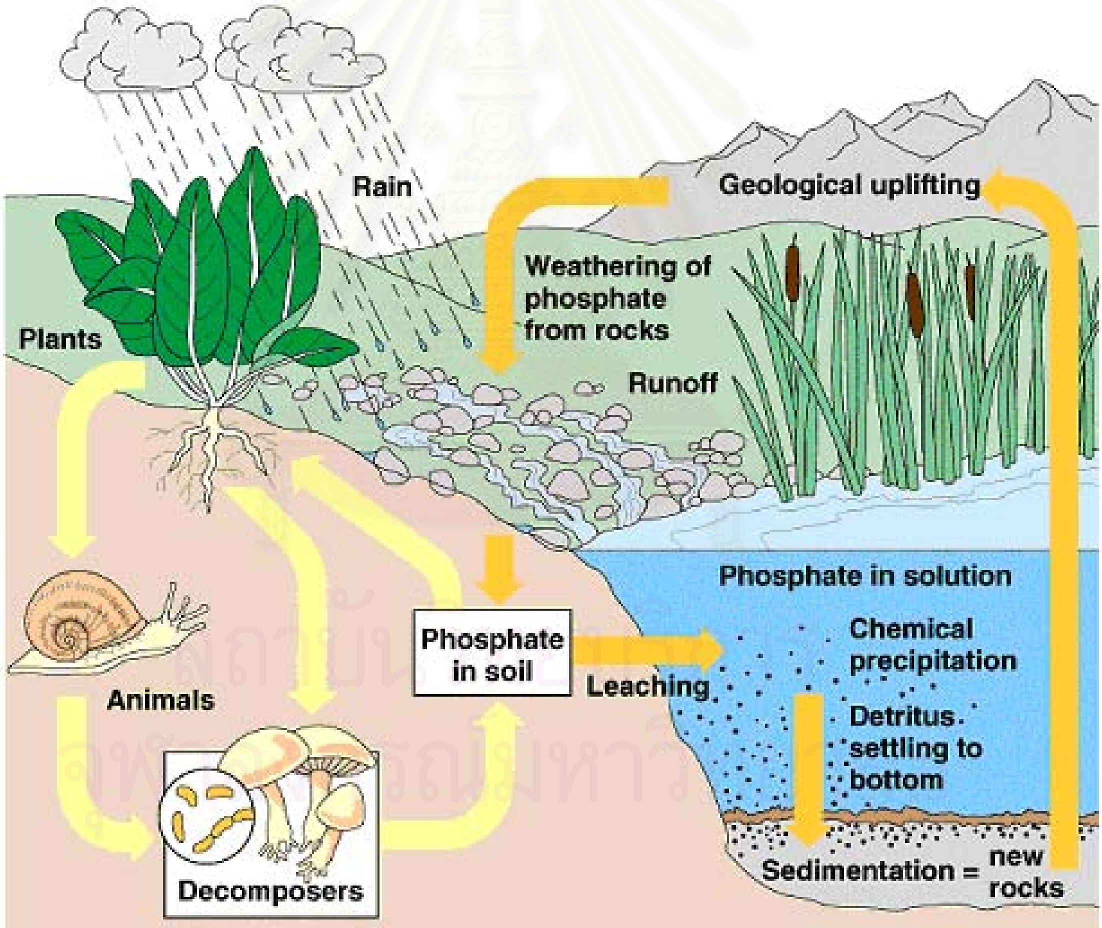
1. สารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำ คือ ออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate หรือ PO_4^{3-}) ซึ่งเป็นรูปที่พร้อมใช้ของพืชและจุลินทรีย์ส่วนใหญ่
2. สารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ดูดซับบนสารแขวนลอย เช่น ฟอสฟอรัสที่ยึดอยู่กับเหล็ก แคลเซียม หรืออลูมินัม ซึ่งความสามารถในการละลายจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่างของแหล่งน้ำ
3. สารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำซึ่งสลายจากสิ่งมีชีวิต เช่น ฟอสโฟโปรตีน ฟอสโฟลิพิด

4. สารอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตทั้งที่ยังมีชีวิต หรือที่เพิ่งตายและยังลอยแขวนอยู่ ฟอสฟอรัสแบบนี้เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์จะที่ออกมาสู่น้ำเมื่อเซลล์แตก

ฟอสฟอรัสแต่ละชนิดมีแหล่งกำเนิดแตกต่างกัน เช่น

1. น้ำเสียจากครัวเรือน
2. ปศุสัตว์ และ กสิกรรม
3. อุตสาหกรรม
4. การผลิตน้ำประปา

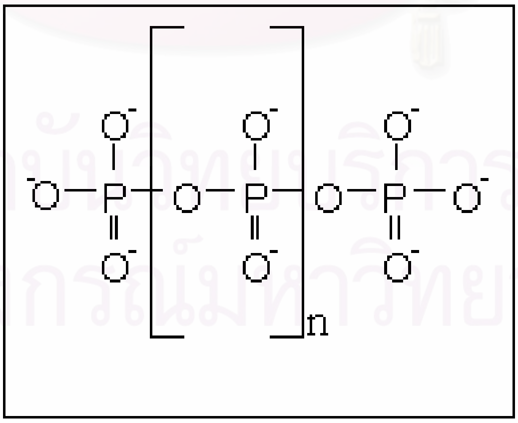
วัฏจักรของฟอสฟอรัส



รูป 2.1 แสดงวัฏจักรของฟอสฟอรัส (Pitocchelli, 2001)

ในธรรมชาติฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่พบในดินและน้ำเท่านั้นไม่พบในบรรยากาศ ซึ่งฟอสฟอรัสที่แปรกลับไปมาในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ได้โดยอาศัยจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Bacillus subtilis, Arthrobacter, Streptomyces, Aspergillus* และ *Penicillium* สามารถเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต เช่น ไฟติน (Phytin) กรดนิวคลีอิก และ ฟอสโฟลิพิด ให้เป็นออร์โธฟอสเฟตได้โดยใช้เอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) ซึ่งออร์โธฟอสเฟตนี้นำไปใช้ได้โดย พืชชนิดต่างๆ จุลินทรีย์บางชนิดใช้ออร์โธฟอสเฟตเพื่อสร้างองค์ประกอบของเซลล์และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น พีเอโอ (polyphosphate accumulating organism, PAO) มีความสามารถสะสมพลังงานไว้ในเซลล์โดยเก็บไว้ในรูปพอลิฟอสเฟตกรานูล (polyphosphate granule) หรือเมตาโครมาติกแกรนูล (metachromatic granule) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์ , 2544)

พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) เป็นพอลิเมอร์สายยาวของออร์โธฟอสเฟตขนาดหลายสิบหรือหลายร้อยโมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟแอนไฮไดรด์ (phosphoanhydride bonds) โดยทั่วไปเกิดในรูปสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับโปรตีน ลิพิด กรดไรโบนิวคลีอิก โปแตสเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน ซึ่งก่อรูปเป็นโวลูทินแกรนูล สามารถย้อมติดด้วยสีย้อม เมธิลีน บลู (methylene blue) และ โทลูอิดีน บลู (toluidine blue)



รูป 2.2 **แสดงลักษณะโครงสร้างของพอลิฟอสเฟต** (Kornberg **และคณะ**,1999)

พอลิฟอสเฟตเป็นสิ่งจำเป็นของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีหน้าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของพอลิฟอสเฟตในไซโตพลาสซึม(Kornberg และคณะ, 1999) เช่น

-เป็นแหล่งของพลังงาน กล่าวคือ เป็นองค์ประกอบของ ATP และเป็นแหล่งสะสมพลังงานในรูปพอลิฟอสเฟต

- เป็นตัวคีเลต (chelator) ของโลหะไอออน (Mn^{2+}, Mg^{2+} และ Ca^{2+})

- เป็นบัฟเฟอร์ต้านแอลคาไล (alkali)

- เป็นแคปซูล (capsule)รอบๆเซลล์ของแบคทีเรีย

การกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเสีย

เนื่องจากการปนเปื้อนของฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม คือ ปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชันดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงต้องมีการกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสียก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งการกำจัดฟอสฟอรัสทำได้ 3 วิธี (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) คือ

1. วิธีกำจัดฟอสฟอรัสทางเคมี

ทำได้ 3 แบบ คือ การโคแอกกูเลชั่น (coagulation) การดูดซับ (adsorption) และ การตกตะกอน (precipitation)ด้วยสารเคมี ตัวอย่างเช่น การควบคุมสภาพน้ำให้เป็นด่าง แล้วเติมแคทไอออน เช่น แคลเซียม เหล็ก เกลืออลูมินัม ให้ทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัส เกิดตะกอนของโลหะฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ แล้วแยกออกด้วยถังตกตะกอน ข้อเสียของวิธีนี้ คือ สารเคมีมีราคาแพง และกากตะกอนเคมีกำจัดยาก

2 .การกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ

เป็นการกำจัดฟอสฟอรัสโดยอาศัยจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากเนื่องจาก

2.1 ปริมาณสลัดจ์จากระบบบำบัดทางชีวภาพมีน้อยกว่าวิธีอื่น

2.2 คุณค่าทางปุ๋ยของสลัดจ์ทางชีวภาพมีมากกว่า เพราะมีสัดส่วนของฟอสฟอรัสในสลัดจ์สูง

กระบวนการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ มีทั้งกระบวนการที่กำจัดพอลิฟอสเฟตอย่างเดียว และกระบวนการที่ใช้กำจัดฟอสฟอรัสควบคู่กับการกำจัดไนโตรเจน

หลักการของการใช้จุลินทรีย์ในระบบกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพ มีดังนี้ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)

1. จุลินทรีย์ใช้ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของการสร้างเซลล์ใหม่ และใช้เป็นแหล่งพลังงาน

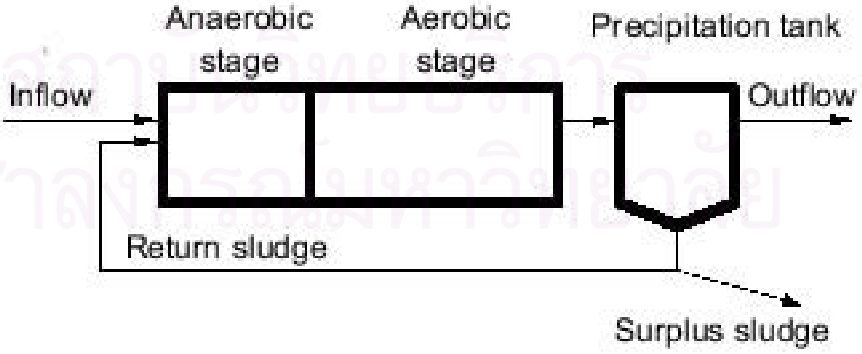
2. จุลินทรีย์สะสมฟอสฟอรัสไว้ภายในเซลล์ในรูปของพอลิฟอสเฟต

3. จุลินทรีย์ช่วยในกระบวนการตกตะกอนด้วยสารเคมีให้เกิดดีขึ้น เนื่องจากสร้างสารที่ทำให้น้ำมีสภาวะเป็นด่าง

3.การกำจัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีทางชีวภาพร่วมกับวิธีทางเคมี

โดยอาศัยหลักการที่จุลินทรีย์กลุ่ม พีเอโอ กำจัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีทางชีวภาพร่วมด้วยการตกตะกอนด้วยสารเคมี เช่น การตกตะกอนฟอสฟอรัสด้วยปูนขาว

ในปัจจุบันความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก แต่วิธีการกำจัดฟอสฟอรัสด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมมากในหลายประเทศ วิธีที่นิยมใช้มากที่สุด คือ Enhanced Biological Phosphorus Removal หรือ EBPR เพราะระบบนี้กำจัดฟอสฟอรัสได้มากกว่าระบบอื่น (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)



รูป 2.3 **แสดงแผนภาพของ**EBPR (Kealing **และคณะ**, 2000)

หลักการของระบบEBPR

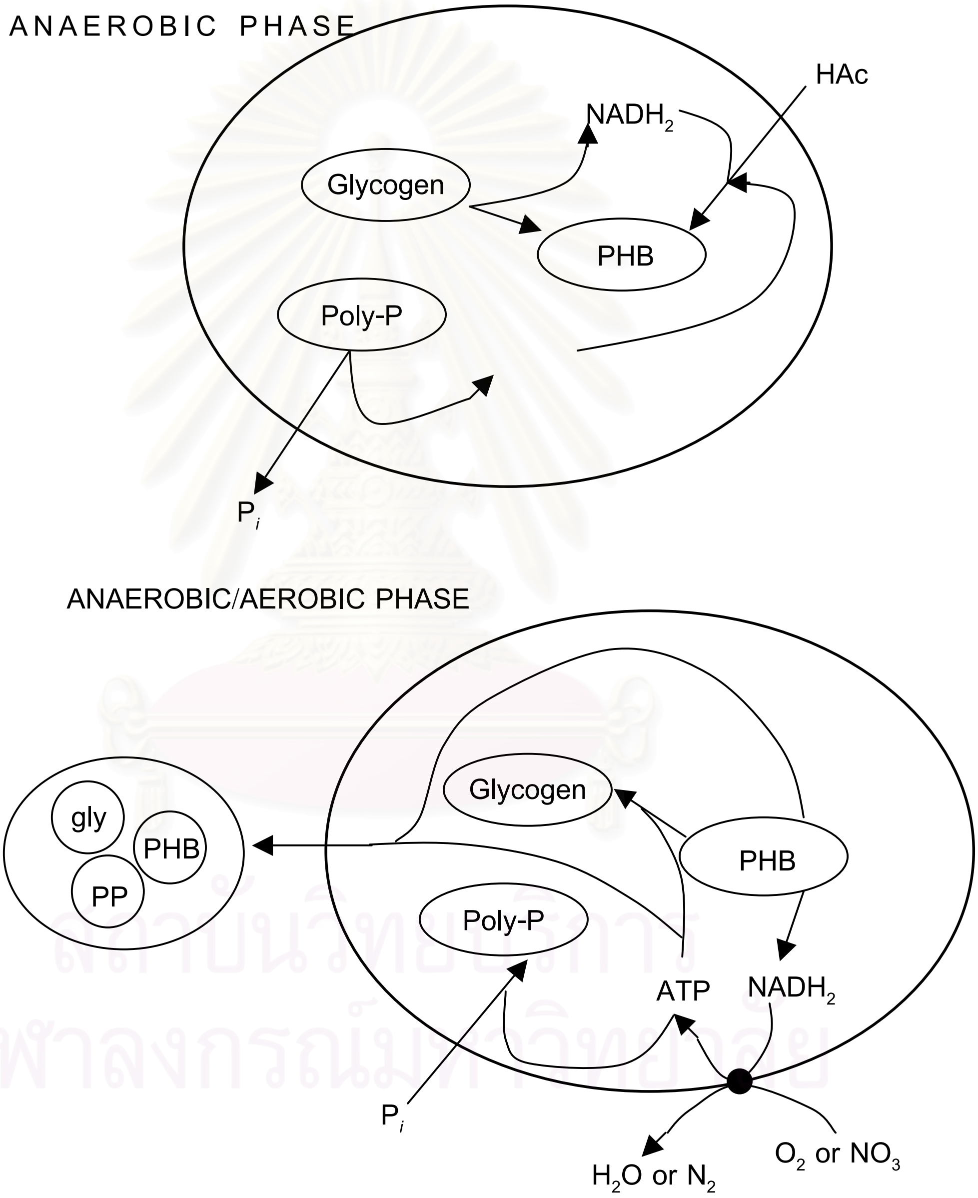
Enhanced Biological Phosphorus Removal ทำได้โดยการสร้างสภาพแวดล้อมให้เกิดการคัดเลือกพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดพิเศษที่สามารถสะสมฟอสฟอรัสได้มาก ซึ่งเรียกว่าแบคทีเรียกลุ่ม PAO โดยผ่านถังไร้อากาศสลับกับถังให้อากาศ จนเกิดการคัดเลือกพันธุ์แบคทีเรียชนิดนี้ขึ้น พีเอโอเป็นแบคทีเรียที่สามารถสะสมฟอสเฟตได้มากกว่าปริมาณที่เซลล์ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต หรือที่เรียกว่า การจับใช้อย่างฟุ่มเฟือย (luxury phosphorus uptake) โดยปกติเซลล์แบคทีเรียจะต้องการฟอสฟอรัสประมาณร้อยละ 1.5 – 2 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถกำจัดฟอสฟอรัสได้เพียงร้อยละ 10 – 30 จากการระบายสลัดจ์ส่วนเกินออกจากระบบ แต่ในกรณีของการจับใช้อย่างฟุ่มเฟือยแบคทีเรียจะสามารถจับใช้ฟอสฟอรัสได้ร้อยละ 4 – 12 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถกำจัดฟอสฟอรัสในระบบได้มากกว่าระบบธรรมดาถึง 2.5 – 4 เท่า (WEF manual of practice, 1992) โดยที่ EBPR ประกอบด้วย ถังไร้อากาศต่อด้วยถังให้อากาศ และถังตกตะกอน ซึ่งมีการปล่อยน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วทิ้งไป และมีการหมุนเวียนสลัดจ์มาใช้ใหม่

กลไกทางชีวเคมีของระบบEBPR

ถังปฏิกิริยาที่ใช้ในกระบวนการกำจัดฟอสฟอรัสทางชีวภาพภายใต้สภาพไร้อากาศเรียกว่า ถังคัดพันธุ์ (biological selector) โดยสภาพแวดล้อมในถังนี้มีประโยชน์ต่อการแข่งขันของแบคทีเรียกลุ่ม PAO เพราะแบคทีเรียกลุ่ม PAO จะสามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้ก่อนแบคทีเรียชนิดอื่นๆในสภาพไร้อากาศ (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)

ในภาวะไร้อากาศนี้แบคทีเรียจะสลายพอลิฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ เพื่อการผลิต ATP โดยอาศัยพอลิฟอสเฟตเอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส (polyphosphate AMP:phosphotransferase) ATP ที่สร้างขึ้นจะนำไปใช้ในกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันระเหยง่ายที่นำเข้าสู่เซลล์ให้กลายเป็น Polyhydroxy butyrate (PHB) เนื่องจาก PHB เป็นสารประกอบที่ถูกรีดิวซ์ได้ง่ายกว่ากรดไขมันระเหยง่ายดังกล่าว จึงต้องอาศัยพลังสมมูลรีดิวซ์ (reducing eqivalent) คือ เอ็นเอดีเอช (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) ซึ่งได้มาจากการสลายไกลโคเจน ไปเป็นกรดไพรูวิก ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นอะซิติลโคเอก่อนที่จะผลิต PHB ได้ต่อไป จากการสลายพอลิฟอสเฟตในขั้นแรกทำให้เกิดการปล่อยฟอสเฟตออกนอกเซลล์

ในสภาวะให้อากาศ แบคทีเรียใช้พลังงานใหม่นี้ในการจับออร์โธฟอสเฟตจากภายนอกเซลล์ เข้าสะสมภายในเซลล์ในรูปของพอลิฟอสเฟต PHB จะถูกสลายไปเพื่อกระบวนการแอแนบอลิซึม และกระบวนการแคแทบอลิซึม ในกระบวนการแอแนบอลิซึม พีเอชบีจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้น ส่วนในกระบวนการแคแทบอลิซึมนั้น PHB ถูกย่อยให้เล็กลงจนเป็นอะซิติลโคเอเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ และวัฏจักรไกลออกซิเลต



รูปที่ 2.4 **กระบวนการเมแทบอลิซึม** (metabolism process) **ของ** PAO **ที่เกิดขึ้นใน** EBPR (Van Loosdrecht **และคณะ**, 1997)

HAc คือ กรดอะซิติก, **PHB** คือ Polyhydroxy butyrate, **gly** คือ ไกลโคเจน, **PP** คือ พอลิฟอสเฟต

ซึ่งพลังงานสมมูลจากทั้งสองวัฏจักรนี้จะถูกออกซิไดซ์ ผ่านวิถีการขนถ่ายอิเล็คตรอน เกิดฟอสโฟรีเลชั่นแบบออกซิเดทีพ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนทำให้เกิดการสร้าง ATP เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานตามความต้องการของเซลล์และใช้เพื่อการเปลี่ยนออร์โธฟอสเฟตที่ถูกจับเข้าเซลล์ให้กลายเป็นพอลิฟอสเฟตเพื่อเก็บสะสมในเซลล์ นอกจากนี้ PHB ยังถูกนำไปสังเคราะห์เป็นคาร์โบไฮเดรตเพื่อเก็บสะสมในรูปของไกลโคเจน ทั้งพอลิฟอสเฟตและไกลโคเจนที่สะสมในเซลล์จะถูกนำไปใช้ในสภาวะไร้อากาศที่ต้องหมุนเวียนต่อไปในระบบEBPR

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับEBPR

แบคทีเรียที่สามารถสะสมฟอสฟอรัสได้เป็นพิเศษนั้นเดิมเชื่อว่ามีอยู่ประเภทเดียว คือ *Acinetobaeter* (Fuhs และ Chen, 1975 และ Malnou และคณะ, 1984) จึงมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่เกี่ยวข้องกับ *Acinetobaeter* (Deinema และคณะ, 1980 , Cloete และคณะ, 1985 , Groenestijn และคณะ, 1989 , Stereichen และคณะ, 1990 , Lotter และคณะ, 1992 , Beacham และคณะ, 1992) ต่อมาพบว่า *Acinetobaeter* ไม่ใช่แบคทีเรียชนิดเดียวที่สามรถสะสมฟอสฟอรัสได้ ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นอีกคือ *Aeromonas* และ *Pseudomonas* ซึ่งมีจำนวนมากกว่าร้อยละ 50 ของแบคทีเรียชนิดแอโรบิกทั้งหมดในระบบ โดยแบคทีเรีย *Acinetobaeter* มีจำนวนเพียงร้อยละ 15 เท่านั้น (Karin และคณะ, 1983) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า *Acinetobaeter* มีรูปแบบการใช้และสะสมคาร์บอนและฟอสฟอรัสไม่สอดคล้องกับรูปแบบของแบคทีเรียในระบบ EBPR (Ohtake และคณะ , 1985 , Groenestijin และคณะ , 1989)

ต่อมามีการศึกษาแบคทีเรียในระบบ EBPR ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่แสดงว่า *Acinetobaeter* เป็นแบคทีเรียที่เป็นประชาการส่วนน้อยในระบบ EBPR อาทิเช่น Auling และคณะ (1995) ใช้ไดอะมิโนโปรเพน (diaminopropane) หรือ ดีเอพี (DAP)เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ ที่จำเพาะต่อ *Acinetobaeter* พบว่ามี แบคทีเรียดังกล่าวอยู่เล็กน้อยเท่านั้น ผลที่ได้สอดคล้องกันเมื่อใช้เทคนิค fluorescent antibody ร่วมกับเทคนิค *in situ* hybridization (Cloete และคณะ ,1987 , Wagner และคณะ, 1993) นอกจากนั้น Bond และคณะ (1995) ใช้เทคนิคของ 16S rDNA กับตัวอย่างน้ำเสียที่ได้รับการบำบัดในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าในระบบบำบัดมี *Acinetobaeter* อยู่เพียง 2 %

จากงานวิจัยที่ผ่านมา Wagner และคณะ (1994) จึงเสนอว่า *Acinetobacter* ไม่ใช่แบคทีเรียในระบบ EBPR เนื่องการศึกษาประชากรแบคทีเรียในระบบEBPRด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดข้อสรุปที่ผิดพลาด เนื่องจากวิธีนี้เป็นการส่งเสริมการเจริญของ *Acinetobacter* อีกทั้งแบคทีเรียหลายชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ

ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวกับระบบEBPRจึงมุ่งเน้นการศึกษาแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวิธีที่ไม่ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยง (culture-independent method) ในการวิเคราะห์สลัดจ์ในระบบ EBPR เช่น ในปี 1994 Wagner และคณะ ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวติดตาม 16S rDNA ที่ติดสลากด้วยสารเรืองแสงของเชื้อ *Acinetobacter* และแบคทีเรียอื่นๆ กับวิธีการย้อมสีแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วย DAPI (4',6-diamidono-2-phenylindol dihydrochloride) ซึ่งสามารถย้อมติดพอลิฟอสเฟตกรานูลได้ พบว่าเมื่อใช้ตัวติดตามพบ *Acinetobacter* ในระบบน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียกลุ่มเด่นคือ บีต้าซับคลาส (beta subclass)ของ *proteobacteria* และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง แต่เมื่อใช้การย้อมสีด้วย DAPI พบว่ามี แกมมา ซับคลาส (gamma subclass)ของ *proteobacteria* อยู่มาก และบ่งชี้ว่าเป็น *Acinetobacter* ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น Wagner และคณะ จึงสรุปว่าแบคทีเรียที่มีความสำคัญของ EBPR น่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม บีต้าซับคลาส ของ proteobacteria และแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง

ข้อสรุปดังกล่าว ของ Wagner และคณะ ได้รับการยืนยันที่สอดคล้องจากงานวิจัยหลายชิ้น ที่ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เทคนิค Flow cytometry (Wallner และคณะ, 1995) เทคนิค 16S rDNA (Bond และคณะ, 1995) เทคนิค 16S rRNA ที่จำเพาะต่อกลุ่มของแบคทีเรียที่ติดฉลากด้วยเตตระเมทธิลโรโดเอมีน-5-ไอโซไธโอไซยาเนต (tetramethylrhoamine -5-isothiocyanate, TRITC) (Kampfer และคณะ, 1996) เทคนิคหาเค้าโครงของควิโนน (Hiraishi และคณะ, 1998) เทคนิคการตรวจหาด้วย16S rRNA โดยใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization ,FISH) (Bond และคณะ, 1999) เทคนิค 16S rRNA ที่ติดฉลากด้วย TRITC ร่วมกับการย้อมสีด้วย DAPI (Kawaharasaki และคณะ, 1999) เทคนิค 16S rRNA เพื่อตรวจหาและวัดปริมาณ โดยใช้ FISH (Crocetti และคณะ, 2000)

ในปี 2002 McMahon และคณะ ศึกษาระบบ EBPR โดยใช้เทคนิคหลายอย่าง กล่าวคือใช้เทคนิค 16S rRNA และ FISH พบ *Rhodocyclus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม บีต้าซับคลาส ของ *proteobacteria* มีปริมาณประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียทั้งหมดในระบบบำบัด

จากงานวิจัยที่ศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มทำให้ทราบข้อมูลแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ (อุรัจฉวี อุณหเลขกะ, 2544)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Corynebacterium xerosis	Muhammed (1961)
Acinetobacter	Fuhs และ chen (1975)
Moraxella, Aeromonas, Pseudomonas	Brodisch และ Joyner (1983)
Propionibacterium shermanii	Robinson และคณะ (1984)
Curtobacterium, Aureobacterium	Bark และคณะ (1993)
Salmonella Minnesota, *Neisseria, Sulfolobus acidocaldarius*	Tinley และคณะ (1993)
Microthix parvicella, Nocardia, Rhodococcus, Arthrobacter	Wagner และคณะ (1994)
Arthrobacter globiform, Pseudomonas, Microlunatus phosphovorus	Nakamura และคณะ (1995)
Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter Aquaspirillum dispar, Klebsiella	Merzouki และคณะ (1999)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Alcaligenes denitrificans, Enterobacter	Sidat และคณะ (1999)
Tetrasphaera	Maszenan และคณะ (2000)
Candida humicola,Saccharomyces cerevisiae	McGrath และ Quinn (2000)
Lampropedia, Rhodocyclus	Mino (2000)
Hydrogenomonas eutropha, Myxococcus xanthus, Nitrosomonas spheroides, Rhodopseudomonas spheroides, Streptococcus SL-1	ธงชัย พรรณสวัสดิ์ (2000)
Rhodocyclus	McMahon และคณะ (2002)
Rhodocyclus	Kong และคณะ (2004)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการEBPR

แบคทีเรียในระบบEBPRต้องการเอนไซม์มาช่วยเร่งให้เกิดกระบวนการสะสมพอลิฟอสเฟตเพื่อเก็บสะสมไว้ในเซลล์ และการสลายพอลิฟอสเฟต ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1. เอนไซม์ที่ใช้เพื่อสังเคราะห์พอลิฟอสเฟต คือ พอลิฟอสเฟตไคเนส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโดยถ่ายโอนกลุ่มฟอสฟอริลตัวสุดท้าย ของ ATP ให้กับพอลิฟอสเฟต โดยอัตราส่วนของ ATP-ADP ภายในเซลล์จะเป็นตัวควบคุมการเกิดปฏิกิริยาโดยตรง ดังสมการที่ 2.1 (Harold, 1966)

$$\text{nATP} + \text{poly } P_n \longrightarrow \text{poly } P_{n+1} + \text{nADP} \quad \text{(สมการที่ 2.1)}$$

2. เอนไซม์ในกลุ่มสลายพอลิฟอสเฟต ได้แก่

2.1 เอนไซม์กลุ่มฟอสโฟทรานส์เฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการใช้พอลิฟอสเฟตในการสร้าง ATP หรือสารที่ทำหน้าที่แทน ATP โดยทำงานร่วมกันของพอลิฟอสเฟต : เอเอ็มพี ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา การเติมกลุ่มฟอสฟอริลของพอลิฟอสเฟตให้กับ AMP (adenosine monophosphate)

ดังสมการที่ 2.2 กับพอลิฟอสเฟตไคเนสในปฏิกิริยาที่แปรผันกลับได้ ในสมการที่ 2.1 เมื่อมีพอลิฟอสเฟตกลูโคไคเนส (polyphosphate glucokinase)ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมกลุ่มฟอสฟอริลของพอลิฟอสเฟตให้กับกลูโคส จะเกิดการสร้าง กลูโคส-6-ฟอสเฟตขึ้น ดังสมการที่ 2.3 โดยที่อะดีนิเลตไคเนส (adenylate kinase) จะควบคุมสมดุลของ AMP, ADP และ ATP ดังสมการ ที่ 2.4

$$\text{poly } P_n + \text{AMP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{poly } P_{n-1} + \text{nADP}$$ (สมการที่ 2.2)

$$\text{Glucose} + \text{poly } P_n \xrightarrow[\text{Neutral salt}]{Mg^{2+}} \text{G-6-P} + \text{poly } P_{n-1} + \text{nADP}$$ (สมการที่ 2.3)

$$\text{2ADP} \longleftrightarrow \text{AMP} + \text{nADP}$$ (สมการที่ 2.4)

2.2. พอลิฟอสฟาเทส (polyphosphatase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายพอลิฟอสเฟตในน้ำ (hydrolysis) ให้เป็นฟอสฟอรัส ด้วยแรงขับของพอลิฟอสเฟตกลูโคไคเนส (Bonting และคณะ, 1991) ดังสมการที่ 2.5

$$\text{poly } P_n + H_20 \longrightarrow \text{poly } P_{n-1} + \text{Pi}$$ (สมการที่ 2.5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส

เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้ครั้งแรกจาก *E.coli* (Kornberg และคณะ, 1956) มี 4 subunit ขนาด 80 กิโลดาลตัน อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาหลายชนิดด้วยกัน โดยที่มีแมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็น cofacter (Tzeng และคณะ, 2000)

1. ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโดยถ่ายโอนกลุ่มฟอสฟอริลตัวสุดท้าย ของ ATP ให้กับพอลิฟอสเฟต ดังแสดงในสมการที่ 2.1

$$nATP + poly\ P_n \longrightarrow poly\ P_{n+1} + nADP \quad \text{(สมการที่ 2.1)}$$

2. ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโดยการเปลี่ยน ADP ให้เป็น ATP โดยการสลายพอลิฟอสเฟต (ปฏิกิริยาผันกลับของ สมการที่2.1) ดังสมการที่ 2.6

$$ADP + poly\ P_n \longrightarrow ATP + poly\ P_{n-1} \quad \text{(สมการที่ 2.6)}$$

3. ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโดยการเปลี่ยน Guanosine-diphosphate (GDP) ให้เป็น GTP โดยการสลายพอลิฟอสเฟต ดังสมการที่ 2.7

$$GDP + poly\ P_n \longrightarrow GTP + poly\ P_{n-1} \quad \text{(สมการที่ 2.7)}$$

4. ทำหน้าที่สังเคราะห์ linear Guanosine 5'-tetraphosphatekinase (ppppG) ดังแสดงในสมการที่ 2.8

$$GDP + poly\ P_n \longrightarrow ppppG + poly\ P_{n-2} \quad \text{(สมการที่ 2.8)}$$

5. ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา autophosphorylation ดังแสดงในสมการที่ 2.9

$$PPK + ATP \longrightarrow PPK\text{-}P + ATP \quad \text{(สมการที่ 2.9)}$$

เนื่องจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนสมีบทบาทสำคัญในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ จึงมีงานวิจัยรายงานการค้นพบเอนไซม์ชนิดนี้ในแบคทีเรียอีกหลายชนิด เช่น *Corynebacteria xerosis, Azobacter vinelandii, Salmonella minnesota, Arthrobacter atrocyaneus, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter johnsonii, Klebsiella aerogenes* และเชื้อก่อโรคอีกหลายชนิด เป็นต้น (Rashid และคณะ, 2000)

ในปี 1964 Harold พบว่ากิจกรรมจำเพาะของพอลิฟอสเฟตไคเนสจะถูกกระตุ้นให้มีมากขึ้นเมื่อ *Aerobacter aerogenes* ถูกเลี้ยงในสภาพที่มีฟอสเฟตจำกัด และยังค้นพบเพิ่มเติมด้วยในปี 1965 ว่า เอนไซม์ดังกล่าวจำเป็นต่อการสร้างสายพอลิเมอร์ของพอลิฟอสเฟต โดยสังเกตว่า *Aerobacter aerogenes* กลายพันธุ์ (mutant) ที่ไม่มีเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไม่สามารถสร้างสายพอลิฟอสเฟตขึ้นได้ (Harold และคณะ, 1965)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับพอลิฟอสเฟตไคเนส

ในปี 1966 Harold ศึกษาเมตาบอลิซึมของพอลิฟอสเฟตของ *Aerobacter aerogenes* และเสนอว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของพอลิฟอสเฟต คือ พอลิฟอสเฟตไคเนส (polyphosphate kinase, *ppk*), พอลิฟอสฟาเทส (polyphosphatase) และอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งต่อมาพบว่า ยีนประมวลรหัสพอลิฟอสเฟตไคเนส (*ppk*) และเอ็กโซพอลิฟอสฟาเทส (exopolyphosphatase, *ppx*) อยู่บนโอเปอรอน (operon) เดียวกัน (Akiyama และคณะ, 1993) ซึ่งถูกควบคุมโดย Pho regulon ซึ่งประกอบด้วยบริเวณโปรโมเตอร์ คือ Pho B box ซึ่งถูกกระตุ้นโดยโปรตีน PhoB ซึ่งเป็น regulatory protein .ใน Pho regulon ซึ่ง Pho regulon จะมีการสนองตอบเมื่อในภาวะที่มีฟอสเฟตต่ำ และจุลินทรีย์ที่มียีน *ppk* แสดงดังตารางที่ 2.3

เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของ *E.coli* พบว่า ใน stationary phase มีกิจกรรมของ พอลิฟอสเฟตไคเนสสูงสุด ในขณะที่มีกิจกรรมของเอ็กโซพอลิฟอสฟาเทสต่ำที่สุด แต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันว่าการกระตุ้น *ppk* ต่างจากการกระตุ้น *ppx* อย่างไร นอกจากนี้ *E.coli* ที่ทำให้กลายพันธุ์

โดยปราศจากโอเปอรอนของ *ppk* และ *ppx* ทำให้ความสามารถของเซลล์ในการอยู่รอดในระยะ stationary phase ลดลง และมีโคโลนีที่เล็กลง (Kornberg และคณะ 1999)

Kornberg และคณะ (1999) นำลำดับเบสของ *ppk* ของจุลินทรีย์ 15 ชนิด ได้แก่ *Deinococcus radiodurans*, *Synechocystis* sp., *Klebsiella aerogenes*, *vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Streptomyces coelicolor* มาเทียบหาความเหมือนกัน พบว่ามีส่วนที่เหมือนกันอย่างสมบรูณ์อยู่เพียง 14 เปอร์เซนต์เท่านั้น เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของจุลินทรีย์ข้างต้นมาเทียบหาความเหมือนกัน พบว่าได้ผลดังตารางที่ 2.2 ซึ่งความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนั้นเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.2 ผลการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์พอลิฟอสเฟตจากจุลินทรีย์ 15 ชนิด (Kornberg และคณะ, 1999)

จุลินทรีย์	เปอร์เซนต์ความเหมือน (% identity)
Deinococcus radiodurans และ *Synechocystis* sp	45
Mycobacterium leprae และ *Mycobacterium tuberculosis*	92
Campylobacter coli และ *Helicobacter pylori*	46
Acinetobacter calcoaceticus, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Neisseria meningitidis*	39
Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae*	51

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่มียีน *ppk*

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Klebsiella aerogenes	Kato และคณะ, (1993)
Pseudomonas aeruginosa, Salmonella Dudlin, *Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae,* *Vibrio cholerae, Helicobacter pylori,* *Streptomyces coelicolor, Neisseria meningitidis* *Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae* *Mycobacterium leprae, Yersinia pestis,* *Bordetella pertussis, Enterococcus faecalis,* *Escherichia coli, Campylobacter coli,* *Propionibacterium shermanii, Myxococcus xanthus,* *Clostridium acebutylicum, Synechocystis* sp. *Deinococcus radiodurans, Dictyostelium discoideum*	Kornberg และคณะ (1999)
Acinetobacter baumannii 252	Gavigan และคณะ (1999)
Rhodocyclus	McMahon และคณะ (2002)

Soung-Hee และคณะ (1999)ได้ทดลองใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจหายีน *ppk* จากจุลินทรีย์หลายชนิดโดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากข้อมูลลำดับอนุรักษ์ของยีน *ppk* ที่มีอยู่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ได้ในเชื้อกลุ่ม *Rhizobium, Enterobacter, Chlorogloea* และ *Pseudomonas*

Kuo และคณะ (2000) ได้ศึกษาลำดับของยีน *ppk* ในจุลินทรีย์ทางทะเล (marine microorganisms) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนของยีน *ppk* พบว่าได้ข้อมูลในแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Acinetobacter, Serratia fonticola* และ *Bacillus aquamarinus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

McMahon และคณะ (2002) ใช้วิธีการวิเคราะห์แบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตในระบบบำบัดEBPRด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยออกแบบดีเจเนอเรตไพร์เมอร์ (degenerate primer) จากลำดับอนุรักษ์ของกรดอะมิโนของยีน *ppk* ในแบคทีเรีย 12 ชนิด พบยีน *ppk* 4 ชนิด โดยที่ type I และ type II ของ *ppk* มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ *Rhodocyclus tenuis* ถึง 86 และ 87 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่ง *R. tenuis* เป็นแบคทีเรียที่พบในระบบบำบัดมากประมาณ 80 เปอร์เซนต์

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544) ได้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP 10 ที่ออกแบบไพร์เมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับข้อมูลกรดอะมิโนอนุรักษ์จากฐานข้อมูล Genbank ของแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์โดยอ้างอิงจากสำดับกรดอะมิโนของยีน *ppk* ของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E.coli, Campylobacter coli, Klebsiella aerogenes* และ *Neisseria meningtidis* (Lopez และคณะ, 1997) กับแบคทีเรียตัวอย่างที่แยกได้จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาพบว่า ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ในแบคทีเรียตัวอย่างใดเลย แต่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ใน *E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก เนื่องจาก *E.coli* เป็นแบคทีเรียที่มี *ppk* (Akiyama และคณะ, 1992) โดยมีขนาดประมาณ 650 bp และสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PE จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ดังกล่าว โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E.coli* JM109 เป็นแม่แบบ นำตัวติดตามที่ได้ไปติดตามจีโนมิดีเอ็นเอของ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของ *ppk* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1 และ CUW-3ที่ถูกตัดด้วย *E*coRI โดยสัญญาณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 10 กิโลเบสใน จีโนมิดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *E*coRI ของ*E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก เนื่องจากโดยที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ของ CUW-1 และ CUW-3 จึงยังไม่ทราบขอบเขตในการติดตาม *ppk* ของแบคทีเรียระบบบำบัดของตัวติดตามดีเอ็นเอ PE

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex Genie II G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE600 ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น BV-124 ของบริษัท Dwyer Instruments, USA
10. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. H1 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 UV/VIS spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, USA
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ION-check10 ของบริษัท Radiometer, France.
14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 ^{o}ซ รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
15. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ รุ่น MDF-U536D ของบริษัท

SanyoElectric, Japan.

16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

    16.1 Personal gel-electrophoresis apparatus รุ่น GelMate® 2000 ของบริษัท TOYOBO, Japan.

    16.2 Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.

17 ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.

18. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH ThermoBlock SL TDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.

19. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.

20. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.

21. แผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose filter membrane) ขนาดรู 0.45ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore, U.S.A.

22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.

23.. ชุดคอมพิวเตอร์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น UNIVERSAL HOOD ใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
8. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany.
9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merk, Germany.

12. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.

13. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane),($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.

14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$• $2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.

15. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.

16. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [$C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.

19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.

21. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.

22. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.

25. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.

26. Proteinase K ของบริษัท Qiagen, Germany.

27. Lyzozyme ของบริษัท Sigma, USA.

28. สีย้อมโทลูดิอิน บลู ของบริษัท Fluka, Germany.

29. สีย้อมเมธิลีน บลู ของบริษัท Fluka, Switzerland.

30. Sodium Phosphate glass (n=35) ของบริษัท Sigma, USA.

31. Bovine serum albumin ของบริษัท Sigma, USA.

32. Alumina ของบริษัท Sigma, USA.

33. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick® Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN, USA.

34. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) หรือดีกว่า

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
Escherichia coli JM109	บริษัท NewEngland Biolabs, USA
Lactobacillus plantarum TISTR 850	ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
CUW-1	อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544)
CU-PK1	คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้
CU-PK2	คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้
CU-PK3	คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้
CU-PK4	คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้
CU-PK5	คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
NLDE-0199f	5'-CGTATGAATTTTCTTGGTATTTATTGTA CTAATCT(AGCT)GA(CT)GA(AG)TT(CT)T-3'	McMahon และคณะ (2002)
TGNY-1435r	5'-GTCGAGCAGTTTTTGCATGA(AT)A(AG) TT(AGCT)CC(AGCT)GT-3'	McMahon และคณะ (2002)
27f	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Widada และคณะ (2002)
350f	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'	Mueller และคณะ (1997)
1240r	5'-CCATTGTAGCACGTGT-3'	Achenbach และคณะ (2001)
1492r	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Widada และคณะ (2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. 5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1) แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำเสีย เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ภาคผนวก ก 5) เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°ซ

ในกรณีที่ต้องการหาการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ และต้องการหาความสามารถของการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ชนิดเหลว (ภาคผนวก ก 3) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°ซ

3.5.2) แบคทีเรีย *E.coli* JM109, *L. plantarum* TISTR 850 และ CUW-1 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ภาคผนวก ก 5) เช่นเดียวกันแต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ

3.5.3) เก็บรักษาแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข 1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟต

3.6.1 การแยกแบคทีเรียที่สะสมพอลิฟอสเฟตจากตัวอย่างน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนจากบ่อที่มีการให้อากาศ และบ่อพักที่ไม่มีการให้อากาศจากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร แล้วนำน้ำตัวอย่างมาผ่านการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นความถี่สูง (sonication) เพื่อทำให้ตะกอน (floc) แตกออกและแบคทีเรียกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอ ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นกระจาย (spread) ตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็ง (waste water agar medium , ภาคผนวก ก 3) โดยใช้แท่งแก้วงอ (spreader) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวไปขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็ง เพื่อคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำแบคทีเรียที่แยกได้มาย้อมดู โวลูทิน แกรนูล ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ลอฟเฟลอร์ส เมธิลีนบลู (Alkaline Loeffler's Methylene Blue, ภาคผนวก ข.3) แล้วเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มองเห็นโวลูทิน แกรนูล ติดสีน้ำเงินเข้มอยู่ภายในเซลล์เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 การตรวจสอบความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์จากไอโซเลตที่คัดแยกได้จากกระบวนการข้างต้นดังข้อ 3.6.1 (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2538)

นำไอโซเลตที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.1 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดแข็งเอียง (synthetic waste water agar slant, ภาคผนวก ก 2.) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไอโซเลตดังกล่าวปริมาณ 1 ลูปทดลอง (loop) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว (synthetic waste water medium, ภาคผนวก ก 3) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์

ปริมาณ 0.8 % เพื่อเพิ่มการเจริญของเชื้อ ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 32 ชั่วโมง จึงปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว ปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิมอีกครั้งเพื่อทำให้เซลล์ตกตะกอน เจือจางเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลวเพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 แล้วจึงลงเชื้อที่ปรับให้ได้ความเข้มข้นดังกล่าวในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในภาวะไร้อากาศโดยใช้หม้อที่ปราศจากออกซิเจน (anaerobic jar) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำชุดการทดลองหนึ่งชุดไปวัดปริมาณฟอสเฟตในสารละลาย ส่วนอีกชุดนำไปบ่มต่อในภาวะให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจึงนำไปวัดปริมาณฟอสเฟตในสารละลาย โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงตรวจวัดการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์โดย นำส่วนใสที่ได้จากจากหมุนเหวี่ยงปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายผสมสำหรับทดสอบฟอสเฟต (ภาคผนวก ข 3) บ่มไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 885 นาโนเมตร โดยมีหลอดควบคุม คืออาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว การเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะไร้อากาศสลับกับให้อากาศนั้นทำเพื่อเลียนแบบภาวะในระบบอีพีบีอาร์ โดยที่แบคทีเรียสลายฟอสเฟตออกมานอกเซลล์ในภาวะไร้อากาศและมีการสะสมฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ในภาวะให้อากาศ

การตรวจวัดการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์อาศัยหลักการวัดปริมาณออโธฟอสเฟตในสารละลาย โดยกรดซัลฟูริก จะทำให้ฟอสเฟตสามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโมลิบเดต (molybdate ion) ได้เป็นกรดโมลิบโดฟอสฟอริก (molybdophosphoric acid แล้วกรดแอสคอบิก (ascobic acid) จะรีดิวซ์ให้เป็นฟอสโฟโมลิบดินัมบลู (phosphomolybdenum blue) ที่วัดปริมาณได้ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 885 นาโนเมตร

จากการทดลองนี้จึงสามารถหาปริมาณของฟอสเฟตที่แบคทีเรียสะสมไว้ภายในเซลล์ได้โดยการเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต (KH_2PO_4) เป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค.)

3.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส

3.7.1 การเตรียมเซลล์ของแบคทีเรียตัวอย่าง

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บส่วนเซลล์มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรปลูกลงในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลงที่มีฟอสเฟตจำกัด (ภาคผนวก ก 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.7.2 การเตรียมสารสกัดจากเซลล์

นำชุดการทดลองไปปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาบดบนโกร่งที่มีการเติมอะลูมินา (alumina)ในปริมาณเท่ากับเซลล์เปียกเพื่อทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.6 (Tris-EDTA buffer, ภาคผนวก ข 5) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แยกกากเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้คือ สารสกัดจากเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.3 การหาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส (Mullan และคณะ, 2002)

จากหลักการที่พอลิฟอสเฟตไคเนสจะดึงหมู่ฟอสเฟตจากพอลิฟอสเฟตไปเติมใน ADP เกิดเป็น ATP :ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ ดังสมการ

$$\text{ATP + (พอลิฟอสเฟต)}_n \xleftrightarrow{\text{PPK}} \text{ADP + (พอลิฟอสเฟต)}_{n+1}$$

พอลิฟอสเฟต เป็นพอลิแอนอิออน (polyanion) ที่มีประจุลบ โดยที่พอลิฟอสเฟตจะมีประจุลบเพิ่มขึ้นเมื่อมีจำนวนพอลิฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้น ประจุของพอลิแอนอิออนที่เพิ่มขึ้นทำให้การดูดกลืนแสงสูงสุดต่อสีย้อมโทลูอิดิน บลู (toluidine blue, ภาคผนวก ข 4) ของพอลิฟอสเฟตเปลี่ยนจาก 630 นาโนเมตรไปเป็น 530 นาโนเมตร ซึ่งอัตราส่วนของ A530/630 จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพอลิฟอสเฟตที่เกิดขึ้น ดังนั้นสามารถหาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนสได้โดยหาอัตราส่วนของพอลิฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้นต่อเวลาที่ A530/630

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บส่วนเซลล์มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรปลูกลงในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลงที่มีฟอสเฟตจำกัด (ภาคผนวก ก 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเตรียมสารสกัดจากเซลล์โดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2

นำสารสกัดที่ได้จากเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาผสมกับพอลิฟอสเฟต (n=35) เข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ,2, 4, 6, 8 และ 10 นาที ต้มเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำสารที่ทำปฏิกิริยาแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปผสมกับสีย้อมโทลูดิอิน บลู ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร และ 530 นา

โนเมตร เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 ต่อ 630 นาโนเมตร ต่อเวลาทำปฏิกริยา

3.7.4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry **และคณะ,** 1951)

ใส่สารสกัดจากเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Lowry C ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Lowry D ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เทียบหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงของโบวาย ซีรัม อัลบูมิน (ภาคผนวก จ.) ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8 การเพิ่มจำนวน *ppk* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.8.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) **ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

3.8.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียแกรมลบ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ แบคทีเรียตัวอย่างแกรมลบตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข 19) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข 8) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข

27) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข 20) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข 23) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข 22) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 29) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.1.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียแกรมบวก

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ แบคทีเรียตัวอย่างแกรมบวกตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไป ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง

นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข 18) ปริมาตร 425 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม Lysozyme(ภาคผนวก ข 28) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข 23) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –70 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของ absolute ethanol ทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปจะเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 29) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.8.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.8.3 **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ PCR ในงานวิจัยนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ NLDE-0199f(forward primer) และ TGNY-1435r(reward primer) (McMahon และคณะ , 2002) เพื่อเพิ่มจำนวน *ppk* โดยสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ดังกล่าว โดยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์มีความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวแสดงในตาราง 3.3 และทำการหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม โดยเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ในแต่ละปฏิกริยาที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน ***ppk***

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$			
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ NLDE-0199f	50 μM	1	1.0 μM
ไพร์เมอร์ TGNY-1435r	50 μM	1	1.0 μM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 μM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ μl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 μg/μl	1	1 pg -1 μg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ			
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ทำการหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม โดยทำการทดลองที่ 45, 46, 47,48 และ 49 °ซ ที่ 45 วินาที			
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 2 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.8.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงใน แชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข 24) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส GelMate 2000 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 23) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.8.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.8.3 มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจาก อะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข 7) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลายดังกล่าวใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ

หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.10

3.9 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรียตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

3.9.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) **ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

การสกัด การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวน *ppk* จากข้อ 3.3 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ ,1999) ซึ่งอธิบายไว้ในข้อ 3.8.1 โดยสุดท้ายให้ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 29) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.9.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ คือ forward primer 27f (5’-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) และ reverse primer 1492r (5’-ACGGCTACCTT GTTACG ACTT-3’) นอกจากนี้ในตารางที่ 3.4 จะแสดงส่วนผสมสารในปฏิกิริยา ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ 27f	50 μM	1	1.0 μM
ไพร์เมอร์ 1492r	50 μM	1	1.0 μM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 μM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ μl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 μg/μl	1	1 pg –1 μg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	46°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.9.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.8.3 มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิสในข้อ 3.8.4 จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจาก อะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.8.5

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพร์เมอร์ดังนี้คือ forward primer 27f, forward primer 350f, reverse primer 1240r และ reverse primer 1492r นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN

3.10 การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ แบคทีเรียตัวอย่างที่มี *ppk* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

3.10.1 การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

3.10.1.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *ppk*

จากการทำ PCR เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่มาจาก *ppk* ต้องใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ตามข้อ 3.8.3 จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังกล่าว ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1300 bp สำหรับ *ppk* ตามลำดับ ออกจาก อะกาโรสเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข 7) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตที่อธิบายไว้ในข้อ 3.8.5

3.10.1.2 การติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม *ppk* โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข 15) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.1.1 ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

เรียกดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2 , CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 ว่า PP1, PP2 และ PP3 ตามลำดับ

3.10.2 การเตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างสำหรับการไฮบริไดซ์ (Sambrook **และ** Russell, 2001)

การเตรียมไนลอนเมมเบรนสำหรับการไฮบริไดซ์เพื่อติดตาม *ppk* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างมีขั้นตอนดังนี้

3.10.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่าง

สกัดและหาความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างตามวิธีของ Ausubel และคณะ ,1999) ดังอธิบายในข้อที่ 3.8.1 นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.6 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

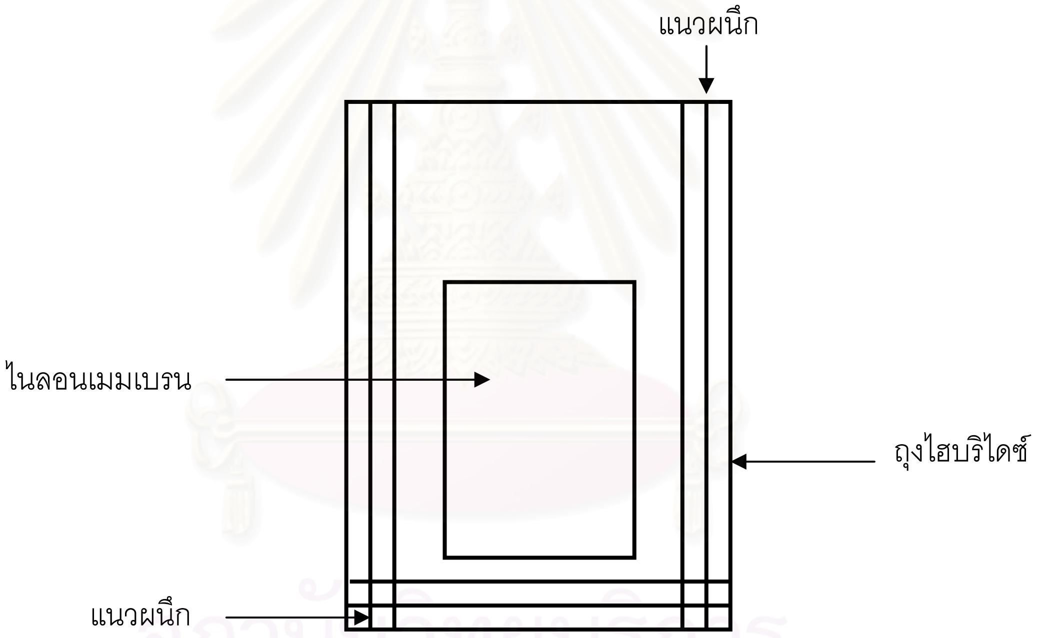
3.10.2.2 การเตรียมไนลอนเมมเบรน

ตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งดีเอ็นเอให้ชัดเจน ระหว่างนั้นแช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ต้มดีเอ็นเอในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่อ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนออกจากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาหยดลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5 ไมโครลิตร โดยใช้ PCR product ของตัวติดตามดีเอ็นเอเป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และดีเอ็นเอของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 เป็นตัวเปรียบเทียบเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส

เมื่อหยดตัวอย่างครบและแห้งแล้วนำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลต ประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรน

3.10.3) ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ ด้วยดีเอ็นเอติดตาม *ppk*

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยเครื่องผนึกที่ใช้ความร้อนดังรูปที่ 3.1 เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข 15) ซึ่งทำการอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42°ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นผนึกปิดให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.1 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *ppk* สำหรับการไฮบริไดซ์โดยนำดีเอ็นเอติดตาม *ppk* จากข้อ 3.5.1 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมลงในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสาร

ละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้งแล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นทำการผนึกด้านข้างถุงเหมือนเดิม เทสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *ppk* ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไล่ฟองอากาศออกให้หมดแล้วปิดผนึกด้านบน 2 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องทำการแยกสายดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที (ระวังอย่านำไปต้มจนเดือดเพราะสารละลาย DIG Easy Hyb จะเสียสภาพ)

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริไดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกโดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย 2XSSC /0.1%SDS (ภาคผนวก ข 13) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข 14) ที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่าง ที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม *ppk* ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข 15) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข 15) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆเป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข 15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข 15) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วล้าง

Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซับสเตรท NBT/BCIP (ภาคผนวก ข 15) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ถุงพลาสติกแล้วผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทซับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับซับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544) ได้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP 10 ที่ออกแบบไพร์เมอร์โดยเปรียบเทียบลำดับข้อมูลกรดอะมิโนอนุรักษ์จากฐานข้อมูล Genbank ของแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์โดยเลือกลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 515-521 สำหรับ forward ไพร์เมอร์ CUP-9 และตำแหน่ง 723-728 สำหรับ reverse ไพร์เมอร์ CUP-10 แล้วเปลี่ยนไพร์เมอร์ที่เป็นดีเจเนอเรคให้กลายเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยอ้างอิงจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *ppk* ของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E.coli, Campylobacter coli, Klebsiella aerogenes* และ *Neisseria meningtidis* (Lopez และคณะ, 1997) กับแบคทีเรียตัวอย่างที่แยกได้จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาพบว่า ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ในแบคทีเรียตัวอย่างใดเลย แต่เกิดผลิตภัณฑ์ PCRใน *E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก เนื่องจาก *E.coli* เป็นแบคทีเรียที่มี *ppk* (Akiyama และคณะ, 1992) โดยมีขนาดประมาณ 650 bp และสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PE จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ดังกล่าว โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E.coli* JM 109 เป็นแม่แบบ นำตัวติดตามที่ได้ไปติดตามจีโนมิดีเอ็นเอของ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของ *ppk* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1 และ CUW-3ที่ถูกตัดด้วย *E*coRI โดยสัญญาณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 10 กิโลเบสใน จีโนมิดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *E*coRI ของ*E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก เนื่องจากโดยที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ของ CUW-1 และ CUW-3 จึงยังไม่ทราบขอบเขตในการติดตาม *ppk* ของแบคทีเรียระบบบำบัดของตัวติดตามดีเอ็นเอ PE

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัสพอลิฟอสเฟตไคเนส (polyphosphatekinase, *ppk*) ของแบคทีเรียสะสมพอลิฟอสเฟตในน้ำเสีย โดยอาศัยข้อมูลจากแบคทีเรียอื่นๆเพิ่มเติม

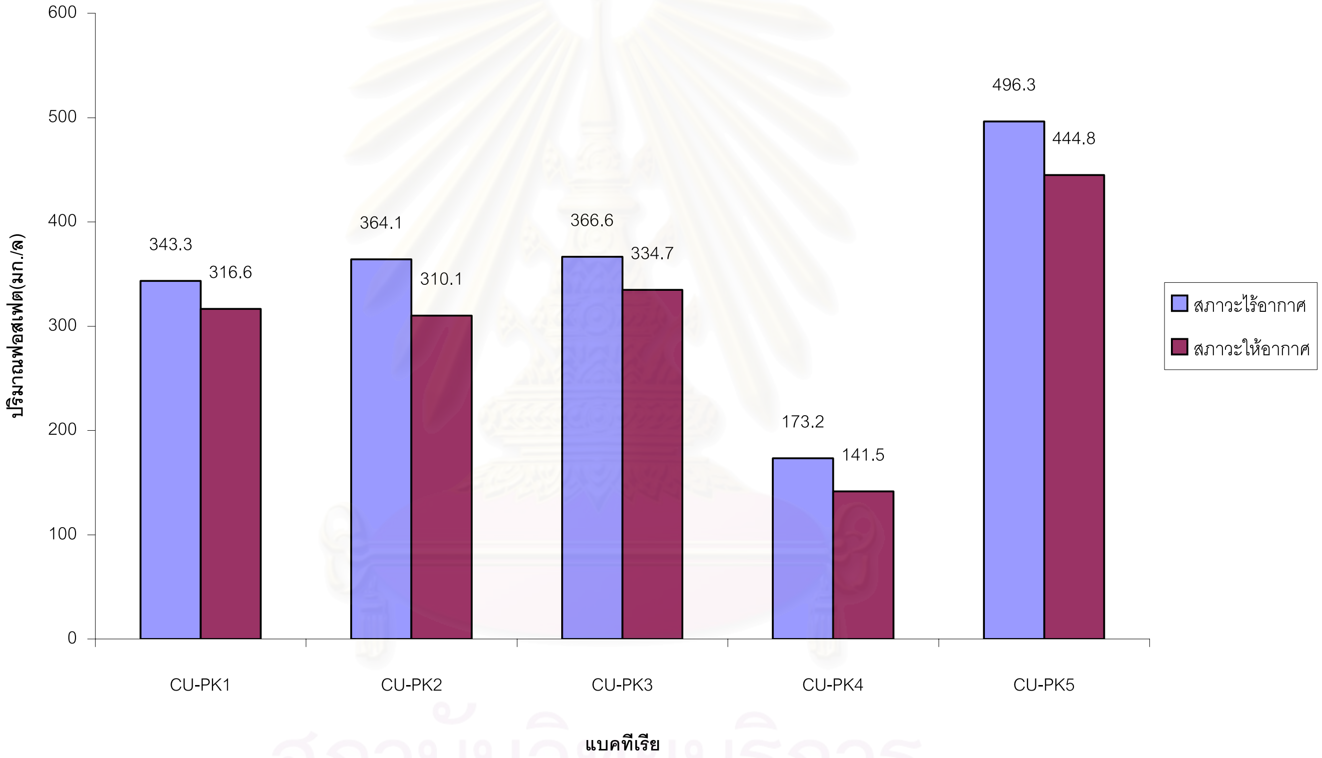
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟต

จากการแยกแบคทีเรียจำนวน 197 สายพันธุ์จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา พบว่ามี 26 สายพันธุ์ที่มีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ในรูปของ volutin granule จากนั้นนำแบคทีเรียตัวอย่างที่มี volutin granule มาทำการทดสอบความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ พบว่าแบคทีเรียตัวอย่าง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์เมื่อเปลี่ยนภาวะจากไร้อากาศเป็นให้อากาศดังแสดงในรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการสะสมและการใช้พอลิฟอสเฟตเช่นเดียวกับหลักการชีวเคมีของ EBPR ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย CU-PK2 มีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ และมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์สูงที่สุดในแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่4.1 จึงคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์นี้มาทำการทดลองต่อไป ตารางแสดงจำนวนแบคทีเรียที่มี volutin granule และจำนวนแบคทีเรียที่มีการสะสมและปลดปล่อยพอลิฟอสเฟตในภาวะที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาคผนวก จ และลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK และ CU-PK5 แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียคัดเลือก 5 ชนิด

แบคทีเรีย	ปริมาณพอลิฟอสเฟตที่สะสมในเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์
CU-PK1	26.7	7.80
CU-PK2	54.0	12.41
CU-PK3	31.9	7.36
CU-PK4	31.5	2.20
CU-PK5	51.5	9.00

วิธีคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ ดังแสดงใน ภาคผนวก ค



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตภายนอกเซลล์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจน ของแบคทีเรียตัวอย่าง 5 ชนิด

แบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 5 สายพันธุ์ มีลักษณะการเจริญ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4, และ CU-PK5

ลักษณะที่ทดสอบ	CU-PK1	CU-PK2	CU-PK3	CU-PK4	CU-PK5
โคโลนีบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์	โคโลนีสีเหลือง มีความโค้งนูนเล็กน้อย มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.0 มิลลิเมตร	โคโลนีสีขาวอมเหลือง มีความโค้งนูนเล็กน้อย มันวาว มีเมือกรอบเซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-3.0 มิลลิเมตร	โคโลนีสีขาว ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-3.0 มิลลิเมตร	โคโลนีสีขาว มีความโค้งนูนเล็กน้อย มันวาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.5 มิลลิเมตร	โคโลนีสีขาว มีความโค้งนูนเล็กน้อย มันวาวเส้นผ่านศูนย์กลาง2.0 - 3.0 มิลลิเมตร
เซลล์ : รูปร่าง : สีแกรม : ขนาด	 กลม มักอยู่เป็นกลุ่ม บวก 3.0 ไมโครเมตร	 แท่งสั้น ลบ 0.7 ไมโครเมตร	 แท่ง ผอมเรียว บวก 1.0 ไมโครเมตร	 แท่ง บวก 0.8 ไมโครเมตร	 แท่ง ลบ 0.9. ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส

เมื่อวิเคราะห์หาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนสของแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า CU-PK2 เป็นแบคทีเรียคัดเลือกที่มีความสามารถ ในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตสูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่4.3 ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนสและผลการวิเคราะห์โปรตีนของสารสกัดจากเซลล์

แบคทีเรีย	ความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตด้วยเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส	ปริมาณโปรตีน มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
CU-PK1	0.022	0.272
CU-PK2	0.075	0.420
CU-PK3	0.012	0.413
CU-PK4	0.010	0.362
CU-PK5	0.039	0.383

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเพิ่มจำนวน *ppk* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *ppk* ของแบคทีเรียตัวอย่าง 5 ชนิด โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r โดยปรับภาวะต่างๆ คือ การแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing ตั้งแต่ 45, 46, 47,48 และ 49 ^{o}ซ ตามลำดับ แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ด้วยตั้งแต่ 0.5, 1.0, 1.5. 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหมายมีขนาด 1300 bp

ผลการแปรผันภาวะต่างๆในการทำ PCR แสดง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่.4.4 แสดงผลการแปรผันปัจจัยต่าง ๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r

อุณหภูมิในการ annealing	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์	แบคทีเรีย						
		CU-PK1	CU-PK2	CU-PK3	CU-PK4	CU-PK5	*E. coli* JM109	CUW-1
45^{O}ซ	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	+	+	-
	2.5	-	-	-	-	-	+	-
46^{O}ซ	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	+	-
	2.5	-	-	-	-	-	+	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่.4.4 แสดงผลการแปรผันปัจจัยต่าง ๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f **และ** TGNY-1435r **(ต่อ)**

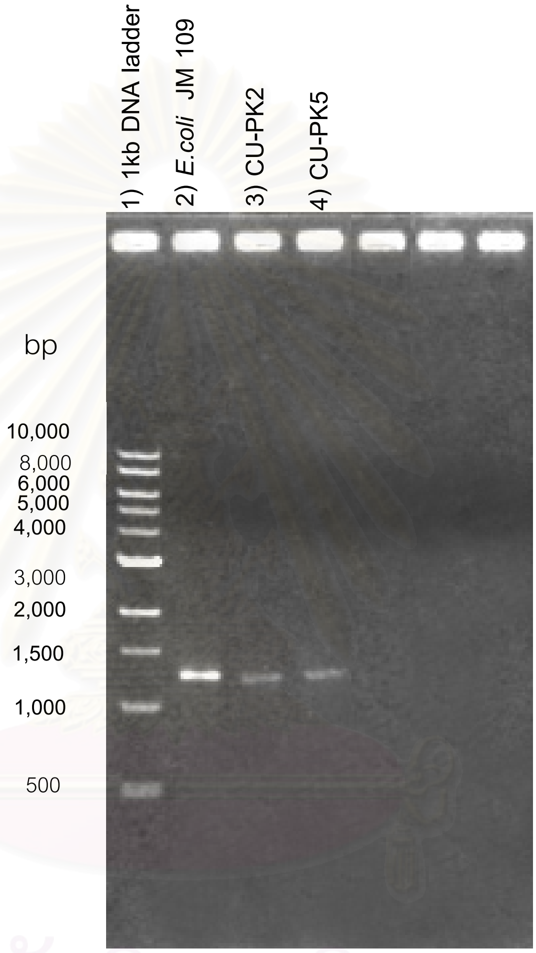
อุณหภูมิในการ annealing	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์	แบคทีเรีย						
		CU-PK1	CU-PK2	CU-PK3	CU-PK4	CU-PK5	*E. coli* JM109	CUW-1
47^{O}ซ	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	+	-
	1.5	-	-	-	-	-	+	-
	2.0	-	+	-	-	-	+	-
	2.5	-	-	-	-	-	+	-
48^{O}ซ	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-	-
49^{O}ซ	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-	-

\+ หมายถึงเกิดผลิตภัณฑ์ PCR

\- หมายถึงเกิดผลิตภัณฑ์ PCR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อตัวอย่างในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ 2 สายพันธุ์ คือ CU-PK2 และ CU-PK5 รวมทั้งเชื้อ *E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) มีขนาดตรงตามที่คาดหมาย ดังรูปที่ 4. 2 ส่วน CU-PK1, CU-PK3, CU-PK4 และ CUW-1 ไม่เกิดผลิตภัณฑ์เลยในการแปรผันภาวะต่างๆ



รูปที่ 4.2 **ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์** PCR **ของแบคทีเรียตัวอย่าง** CU-PK2, CU-PK5 **และ***E.coli* JM109

1) 1Kb DNA ladder
2) **ผลิตภัณฑ์** PCR **ของ** *E.coli* JM109 **เมื่อใช้ความเข้มข้นของ**$MgCl_2$ 2.0 mM annealing time **ที่** 45° **ซ** 45 **วินาที**
3) **ผลิตภัณฑ์** PCR **ของ** CU-PK2 **เมื่อใช้ความเข้มข้นของ**$MgCl_2$ 2.0 mM annealing time **ที่** 47° **ซ** 45 **วินาที**
4) **ผลิตภัณฑ์** PCR **ของ** CU-PK5 **เมื่อใช้ความเข้มข้นของ**$MgCl_2$ 2.0 mM annealing time **ที่** 45° **ซ** 45 **วินาที**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการแปรผันปัจจัยข้างต้นพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ CU-PK2 คือใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ใช้อุณหภูมิและเวลา annealing ที่เหมาะสม คือ 47° ซ เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิที่ 72° ซ เป็นเวลา 2 นาที

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 คือ ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ใช้อุณหภูมิและเวลา annealing ที่เหมาะสม คือ 45° ซ เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิที่ 72° ซ เป็นเวลา 2 นาที

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 จึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 485 bp, 423 bp และ 345 bp ตามลำดับ จากนั้นยืนยันความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.10 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำเข้าไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบางส่วนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank (ภาคผนวก ฉ)

ผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย	ลำดับกรดอะมิโน (bp)	% ความเหมือน (Homology)	เอกสารอ้างอิง
CU-PK2	485	92% ต่อ *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes*	Kato และคณะ, (1993)
CU-PK5	423	100% ต่อ *ppk* ของ *Escherichia coli* K-12	Rao และคณะ, (1998)
E.coli JM109	345	73% ต่อ *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes*	Kato และคณะ, (1993)

ดังนั้นจะเห็นว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2 และ CU-PK5 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยภาวะเหมาะสมข้างต้น โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r ซึ่งมีความจำเพาะกับ *ppk* นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับยีนที่ต้องการจริง ดังแสดงในภาคผนวก ฉ จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพร์เมอร์ดังกล่าวมาสร้างเป็นตัวติดตามดีเอ็นเอ เรียกว่า PP1, PP2 และPP3 ตามลำดับ

4.4 **การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CU-PK2 และ CU-PK5 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ** 16S ribosomal DNA

ทำการจำแนกแบคทีเรีย CU-PK2 และ CU-PK5 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomol DNA) ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการทดลองในข้อ 3.9 พบว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ ไพร์เมอร์ 27f และ 1492r จะให้ผลิตภัณฑ์จาก 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ สวทช. โดยใช้ไพร์เมอร์ 4 สายคือ 27f 350f 1240r และ 1492r เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 1.5 กิโลเบส ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงต้องใช้ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแม่นยำมากที่สุด ซึ่งได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU-PK2 และ CU-PK5 บางส่วนคือ 1445 และ 1437 bp ตามลำดับ (ภาคผนวก ช) นำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastN เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ใน GenBank พบว่า CU-PK2 และ CU-PK5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของสายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ดังนี้

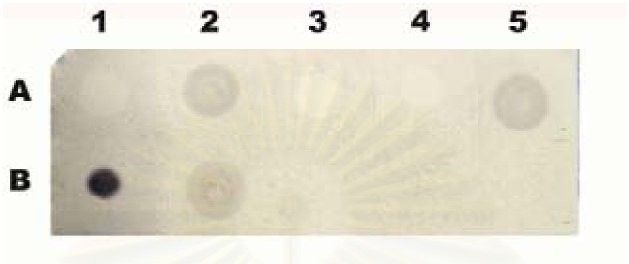
ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA ของ CU-PK2 และ CU-PK5

จุลินทรีย์คัดเลือก	สายพันธุ์จุลินทรีย์	% ความเหมือน	Accession number ใน Genbank
CU-PK2	*Klebsiella oxytoca*	98	AJ8718559.1
CU-PK5	*Enterobacter aerogenes*	99	AF395913

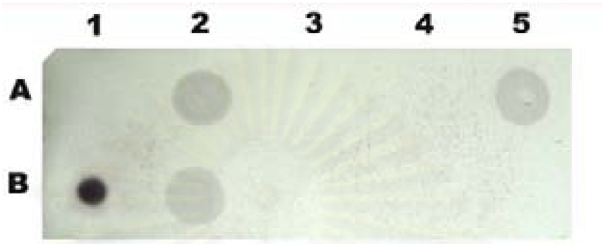
4.5 การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ แบคทีเรียตัวอย่างที่มี *ppk* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r มาติดฉลาก เพื่อเป็นดีเอ็นเอติดตาม PP1, PP2 และ PP3 ตามลำดับ แล้วนำมาทำ Dot blot hybridization กับ จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4, CU-PK5, *E.coli* JM 109 และ CUW-1 ดังรูปที่ 4.3, 4.4 และ4.5



รูปที่ 4.3 Dot blot hybridization **ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม** PP1

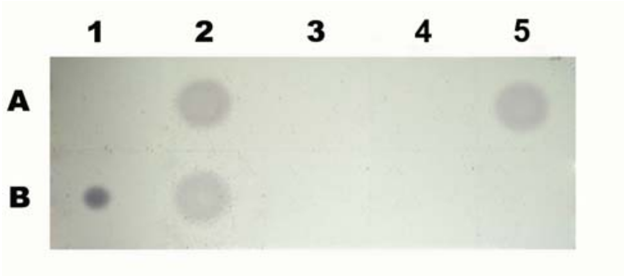
ช่องที่ A1	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1
ช่องที่ A2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK2
ช่องที่ A3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK3
ช่องที่ A4	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK4
ช่องที่ A5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK5
ช่องที่ B1	ผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *ppk* ของเชื้อ CU-PK2 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ B2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *E.coli* JM 109
ช่องที่ B3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1
ช่องที่ B5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิเฟตจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไตเนส)



รูปที่ 4.4 Dot blot hybridization **ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม** PP2

ช่องที่ A1	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1
ช่องที่ A2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK2
ช่องที่ A3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK3
ช่องที่ A4	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK4
ช่องที่ A5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK5
ช่องที่ B1	ผลิตภัณฑ์ PCR ยีน *ppk* ของเชื้อ CU-PK5 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ B2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *E.coli* JM109
ช่องที่ B3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1
ช่องที่ B5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิเฟตจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไตเนส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 Dot blot hybridization **ของจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างด้วยดีเอ็นเอติดตาม** PP3

ช่องที่ A1	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1
ช่องที่ A2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK2
ช่องที่ A3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK3
ช่องที่ A4	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK4
ช่องที่ A5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK5
ช่องที่ B1	ผลิตภัณฑ์ PCRยีน *ppk* ของ *E.coli* JM109 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ B2	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *E.coli* JM109
ช่องที่ B3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1
ช่องที่ B5	จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิเฟตจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไตเนส)

จากการใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งสามคือ PP1, PP2 และ PP3 ติดตามจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 5 สายพันธุ์ รวมทั้ง *E.coli* JM109 และ CUW-1 พบว่าตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งสามเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดเซชันกับ CU-PK2, CU-PK5 *E.coli* JM109 และตัวควบคุมผลบวก แต่ไม่เกิดสัญญาณบวกกับ จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลลบ แสดงว่าตัวติดตามดีเอ็นเอ PP1, PP2 และ PP3 มีความสามารถติดตาม *ppk* ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 ได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544) ได้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP 10 ที่ออกแบบไพร์เมอร์โดยอ้างอิงจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *ppk* ของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ E.coli, Campyrobacter.coli, Klebsiella aerogenes และNeisseria meningitidis(Lopez และคณะ, 1997) กับแบคทีเรียตัวอย่างที่แยกได้จากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาพบว่า ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCRใน CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 แต่เกิดผลิตภัณฑ์ PCRใน *E.coli* JM 109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก โดยมีขนาดประมาณ 650 bp และสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PE จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ดังกล่าว โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ E.coli JM109 เป็นแม่แบบ แล้วนำไปติดตามจีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 ด้วยวิธี Southern hybridization พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของ *ppk* ของเชื้อ CUW-1 และ CUW-3 โดยสัญญาณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3 กิโลเบส จากโดยที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ของ CUW-1 และ CUW-3 และเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 10 กิโลเบสใน *E.coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนประมวลรหัส *ppk* โดยใช้ข้อมูลจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้สามารถติดตามแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียได้มากขึ้น

จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร ด้วยการย้อมโวลูทินแกรนูลของแบคทีเรียทีแยกได้ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ ลอฟเฟอร์ส เมทิลีนบลู พบว่าแบคทีเรีย 26 สายพันธุ์สะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ในสภาวะที่มีการให้อากาศ คิดเป็น 13.2 เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียทั้งหมด 197 สายพันธุ์ เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถของการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ พบว่ามีแบคทีเรียคัดเลือก 5 ชนิดคือ CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4 และCU-PK5มีการสะสมฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ในภาวะให้อากาศและปลดปล่อยออกมาในภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การสะสมฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์

สูงสุด คือ CU-PK2 มีการสะสมฟอสเฟตเท่ากับ 12.41 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบต่อไป

นำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ พอลิฟอสเฟตไคเนส พบว่า CU-PK2 มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตสูงที่สุดในแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด คือเท่ากับ 0.075 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ในงานวิจัยนี้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่ม *ppk* ด้วยดีเจเนอเรตไพร์เมอร์ NLDE-0199f ซึ่งออกแบบโดย บริเวณด้านปลาย5'เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบจากข้อมูลลำดับอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 45-60 ส่วนบริเวณด้านปลาย3'มีการแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบจากลำดับอะมิโนอนุรักษ์ และ TGNY-1435r ซึ่งมีหลักการออกแบบบริเวณด้านปลาย5' และ3' เช่นเดียวกับ NLDE-0199f โดยที่บริเวณด้านปลาย5'เลือกอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 457-466 (Rose และคณะ 1998) การสร้างดีเจเนอเรตไพร์เมอร์ที่มีการแปรผันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ด้านปลาย3 ' เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของ *ppk* มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด (McMahon และคณะ 2002)

เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วย NLDE-0199f และ TGNY-1435r กับแบคทีเรียคัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ และ CUW-1 ที่คัดแยกได้โดยอุรัจฉวี (อุรัจฉวี อุณหเลขกะ, 2544) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกได้โดยอุรัจฉวี คือ CUW-3 และ CUW-8 ไม่สามารถนำมาทดลองเนื่องจาก แบคทีเรียไม่สามารถเติบโตได้เมื่อ เก็บรักษาแบคทีเรียที่ไว้อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ ซ นานกว่า 1 ปี

ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าเมื่อปรับภาวะต่างๆในการทดลอง คือ การแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing ตั้งแต่ 45, 46, 47,48 และ 49 $^{\circ}$ซ ตามลำดับ และแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ด้วยตั้งแต่ 0.5, 1.0, 1.5. 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อตัวอย่างในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ 2 สายพันธุ์ คือ CU-PK2 และ CU-PK5 รวมทั้งเชื้อ *E.coli* JM 109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) มีขนาดตรงตามที่คาดหมาย คือ มีขนาดประมาณ 1300 เบสแพร์ ดังแสดงในรูปที่ 4. 7 ส่วน CU-PK1, CU-PK3, CU-PK4 และ CUW-1 ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR

โดยที่ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ CU-PK2 คือ ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ใช้อุณหภูมิและเวลา annealing ที่เหมาะสม คือ 47° ซ เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิที่ 72° ซ เป็นเวลา 2 นาที

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของ CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 คือ ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ใช้อุณหภูมิและเวลา annealing ที่เหมาะสม คือ 45° ซ เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิที่ 72° ซ เป็นเวลา 2 นาที

จากนั้นจำแนกสกุลของ คือ CU-PK2 และ CU-PK5ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS และโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ใน CU-PK2 คือ 1445 bpมีความคล้ายคลึงกับ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ *Klebsiella oxytoca* เท่ากับ 92% และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ใน CU-PK5 คือ 1437 bp มีความคล้ายคลึงกับ 16 S rDNA ของ *Enterobacter aerogenes* เท่ากับ 99%

ดังนั้น CU-PK2 น่าจะเป็น *Klebsiella oxytoca* และ CU-PK5 น่าจะเป็น *Enterobacter aerogenes* ซึ่งทั้งสองชนิดยังไม่มีรายงานว่าถูกพบในระบบบำบัด แต่ *Klebsiella oxytoca* และ *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียจำพวก Gamma proteobacteria ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wagner (Wagner และคณะ,1994) ซึ่งได้ทำการทดลองย้อมสีโวลูทินกรานูลของแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วย DAPI พบว่า แบคทีเรียในระบบบำบัดส่วนใหญ่อยู่ในแกมมาซับคลาสของ *proteobacteria*

เนื่องจากพบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสของ CU-PK2 และ CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 กับไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ppk* บางส่วนไปเทียบหาความเหมือนด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.10 ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank

พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของCU-PK2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 485 bp มีความคล้ายของลำดับกรดอะมิโน 92% ต่อ *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes* ส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของCU-PK5 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 423 bp มีความคล้ายของลำดับกรดอะมิโน 100% ต่อ *ppk* ของ

Escherichia coli K-12 และผลิตภัณฑ์ PCR ของCU-PK5 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 345 bp มีความคล้ายของกรดอะมิโน 73% ต่อ *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes*

ซึ่งผลการเทียบหาความเหมือนด้วยโปรแกรม BlastX ที่ได้ของผลิตภัณฑ์ PCR ใน CU-PK2 มีความสอดคล้องกับผลการจำแนกสกุลด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ กล่าวคือ CU-PK2 น่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Klebsiella* sp. และมีชิ้นส่วนของ *ppk* บางส่วนเหมือน *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes* ซึ่งมีรายงานว่ามีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ (Kuroda และคณะ, 1997)

ผลการจำแนกสกุลด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ CU-PK5 ทำให้คาดว่า CU-PK5 น่าเป็น *Enterobacter aerogenes* ซึ่งยังไม่มีรายงานว่าพบแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในระบบ EBPR แต่ผลการเทียบหาความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 423 bp ด้วยโปรแกรม BlastX ของผลิตภัณฑ์ PCR ใน CU-PK5 จะเหมือนกับ *ppk* ของ *Escherichia coli* K-12 ถึง 100% ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ (Ault-Riche และคณะ, 1998)

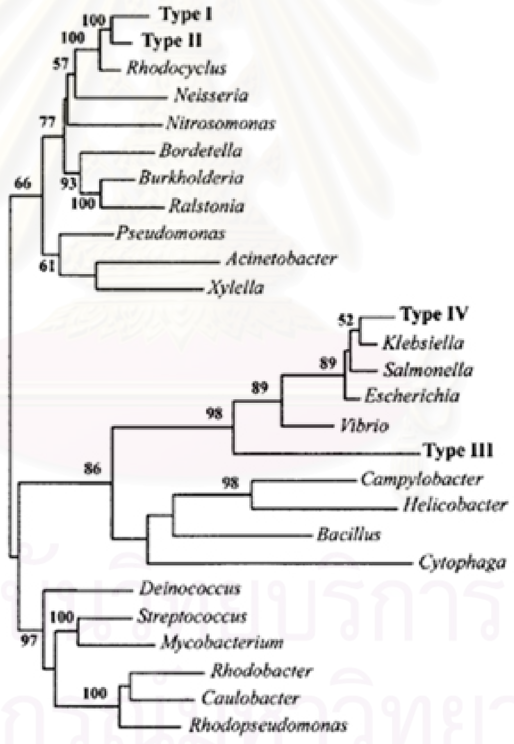
ส่วนผลการเทียบหาความเหมือนด้วยโปรแกรม BlastX ของผลิตภัณฑ์ PCRใน *E.coli* JM 109 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 345 bp นั้นมีความเหมือนกับ *ppk* ของ *Klebsiella aerogenes* ถึง 73% เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ppk* ใน *E.coli* JM109 ที่นำไปเทียบความเหมือนเป็นเพียงบางส่วนของ *ppk* เท่านั้น

ผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM 109 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยภาวะเหมาะสมข้างต้น โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r ซึ่งมีความจำเพาะกับ *ppk* นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับยีนที่ต้องการจริง จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 ที่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยไพร์เมอร์ดังกล่าวมาสร้างเป็นตัวติดตามดีเอ็นเอ ด้วยการติดฉลากด้วย digoxygenin เรียกว่า PP1, PP2 และPP3 ตามลำดับ

นำตัวติดตามดีเอ็นทั้งสามมาติดตามจีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1, CU-PK2, CU-PK3, CU-PK4, CU-PK5, CUW-1 และ *E.coli* JM109 ด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าตัวติดตามดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถติดตามแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัส ppk ได้จริง เนื่องจากปรากฏสัญญาณไฮบริไดซ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 เมื่อติดตามจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นทั้งสาม ทั้งนี้เนื่องมาจาก

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนประมวลรหัส *ppk* ของแบคทีเรีย CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 มีความคล้ายคลึงกันแสดงโดย การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งสามด้วยโปรแกรม ClustalX ดังแสดงในภาคผนวก ซ ซึ่งมีรายงานว่าลำดับกรดอะมิโนของพอลิฟอสเฟตไคเนสของ*E. coli* และ *K. aerogenes* มีความเหมือนกันถึง 91% (Kornberg และคณะ, 1999)

ในปี 2002 McMahon และคณะได้แบ่งกลุ่ม *ppk* ตามความคล้ายคลึงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเป็น 4 type ดังแสดงในรูปที่ 5.1 ซึ่งดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้อาจมีความสามารถติดตามแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัส *ppk* type IV เท่านั้น



รูปที่ 5.1 Phylogenetic tree **ของแบคทีเรีย 23 สายพันธุ์ ที่มียีนประมวลรหัส** *ppk* (McMahon **และคณะ**, 2002)

จากผลการทดลอง dot blot hybridization ด้วยตัวติดตามดีเอ็นเอ PP1, PP2 และPP3 ไม่พบสัญญาณไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ CU-PK1, CU-PK3, CU-PK4 และ CUW-1 ทั้งๆที่แบคทีเรียทั้ง 4 ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส และมีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย คาดว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจมียีนประมวลรหัส *ppk* type อื่นนอกเหนือจากtype IV หรือการสะสมพอลิฟอสเฟตของแบคทีเรียดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยอื่นร่วมด้วยนอกเหนือจากเอนไซม์พอลิฟอสเฟตไคเนส กล่าวคือมีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดมีการสะสมพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์แต่ไม่มียีนประมวลรหัสพอลิฟอสเฟต นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตในแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่บริเวณยีน *ppk* (Kornberg และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พอลิฟอสเฟต นั่นคือ Polyphosphate: AMP Phosphotransferase (PAP) ในแบคทีเรีย *Acinetobacter johnsonii* ซึ่งสังเคราะห์พอลิฟอสเฟตโดยใช้ ADP เป็นสับเสรต ดังแสดงในสมการที่ 5.1 (Itoh และ Shiba, 2004) ซึ่งในอดีตเข้าใจว่า PAP มีแต่ forward activity เท่านั้น (Van Groenestijin และคณะ, 1989) (Bonting และคณะ, 1991) แต่ *A. johnsonii* เป็นแบคทีเรียที่มียีน *ppk* ด้วย

$$\text{AMP} \longleftrightarrow \text{Poly(P)}_{n-1} + \text{ADP} \qquad \text{สมการที่ 5.1}$$

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ (2544) สร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PE จากการติดฉลากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.coli* JM109 ที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP 10 เมื่อทำการทดลอง dot blot hybridization พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของ *ppk* ของเชื้อ CUW-1 ส่วนงานวิจัยนี้สร้างตัวติดตาม PP3 จากการติดฉลากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E.coli* JM109 ที่ใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f และ TGNY-1435r แต่ไม่พบสัญญาณไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ CUW-1 ทั้งนี้เป็นเพราะไพร์เมอร์ CUP-9 และ CUP-10 ออกแบบโดยเลือกลำดับกรดอะมิโนคนละตำแหน่งกับการออกแบบ NLDE-0199f และ TGNY-1435r โดยที่การออกแบบไพร์เมอร์ CUP-9 เลือกลำดับอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 515-521 และตำแหน่ง 723-728 สำหรับ CUP-10 สำหรับการออกแบบไพร์เมอร์ NLDE-0199f เลือกลำดับอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 45-60 และตำแหน่ง 457-466 สำหรับ TGNY-1435r ทำให้เกิดชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คนละส่วนของ *ppk*

งานวิจัยนี้ได้แยกแบคทีเรียที่มีการดูดซับพอลิฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ 5 สายพันธุ์ และสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PP1 และPP2 จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ข้างต้น คือ *Klebsiela oxytoca* และ *Enterobacter aerogenes* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสร้างตัวติดตามดีเอ็นเอ PP3 จาก *Escherichia coli* JM109 ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งสามด้วยโปรแกรม ClusterX ดังแสดงในภาคผนวก ซ ทำให้ทราบถึงความคล้ายคลึงกันของลำดับยีนประมวลรหัส *ppk* ของแบคทีเรียทั้งสาม และตัวติดตามดีเอ็นเอ PP1, PP2 และ PP3 ที่สร้างขึ้นคาดว่าสามารถติดตามชิ้นส่วนของยีนประมวลรหัส *ppk* ที่คล้ายกับ *ppk* type IV ได้ ดังนั้นงานวิจัยที่ควรศึกษาต่อไป คือ พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย CU-PK1, CU-PK3, CU-PK4 และ CUW-1 โดยวิเคราะห์ลำดับของ16S rDNA ซึ่งทำให้ทราบว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัส *ppk* ในtypeใด เพื่อทราบถึงขอบเขตในการติดตามของตัวติดตามดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ว่ามีความสามารถติดตามแบคทีเรียที่มียีนประมวลรหัส *ppk* type อื่นๆได้หรือไม่ และพัฒนาไปสู่ตัวติดตามดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2543. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิโรจน์ ประเทืองสวัสดิ์. 2541. ประชากรและประสิทธิภาพของ *Acinetobacter* sp. ในการกำจัดฟอสเฟตในระบบบำบัดน้ำเสียชนิดทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ. 2544 การสังเคราะห์ตัวติดตามสำหรับตรวจหาโพลีฟอสเฟตแบคทีเรียในน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กรมควบคุมมลพิษ. 2543. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย. [online] Available from: http//www.pcdv1.pcd.go.th/Information/sumstatathai43.html.[2004,January18]

ภาษาอังกฤษ

Achenbach, L. A., Carey, J. and Madigan, M. T. 2001. Photosynthetic and phylogenic primer for detection of anoxygenic phototrophs in natural environment. Appl. Environ. Microbio. 67: 2922-2926.

Akiyama, M., Crooke.E. and Kornberg. A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. J. Biol. Chem. 268: 633-639.

Auling, G., Pilz, F., Busse, HG. J., Karrasch, S., Streichan, M. and Schon, G. 1991. Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus eliminaing, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diamionopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3585-3592.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kington, R.E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Current protocols in molecular biology. 4th ed. New York: John Willey & Sons.

Ault-Riche, D. F. Fraley, C. D., Tzeng, C. M. and Kornberg, A. 1998. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. J. Bacteriol. 180: 1841-1847.

Bark, K., Kampfer, P., Sponner, A. and Dott. W. 1993. Polyphosphate-dependent enzymes in some coryneform bacteria isolated from sewage sludge. FEMS Microbiol. Lett. 107: 133-138.

Bitton G. 1994. Wastewater Microbiology. John Wiley&Sons, New York

Bond, P. L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J. and Blackall, L. L. 1999. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non efficient biological phosphorus removal activated sludge systems. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4077-4084.

Bond, P. L., Hugenholtz, P., Keller, J., and Blackall, L. L. 1999. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequence batch reactors. Appl. Environ. Microbiol 61: 1910-1916.

Bonting, C. F. C., Kortstee, G J. J. and Zehnder, A. J. B 1991. Properties of polyphosphate: AMP phosphotranferase of *Acinetobacter* strain 210A. J. Bacteriol. 173: 6484-6488.

Brodisch, K. E. U. and Joyner, S. J. 1983. The role of microorganisms other than *Acinetobacter* in biological phosphorus removal in the activated sludge process, Water Sci Technol. 15: 117-125.

Cloete, T. E., and Steyn, P. L.1985. An autoecological study of *Acinetobacter* in activated sludge. Environ. Technol. Lett. 5: 457-463.

Cloete, T. E., and Steyn, P. L. 1987. A combined fluorescent antibody-membrane filter technique for enumerating *Acinetobacter* in activated sludge. Advances in water pollution control biological phosphate removal from wastewaters. (Ramadori R., ed), pp. 335-338, Pergamon Press, Oxford.

Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler , A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L. L. 2000 Identification of polyphosphate-accumulating organisms ang design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1175-1182.

Deinema, M. H., Habets, L. H. A., Scholten, J., Turkstra, E. and Weber, H. A. A . M. 1980. The accumulation of polyphosphate in *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol. Lett. 9: 275-279.

Fuhs, G. W., and Chen, M. 1975. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. Microbiol. Ecol. 2: 119-138

Groenestijin, J. W., Zuidema, M., van de Worp, J. M., Deinnema M. H. and Zehnder, A. J. B. 1989. Influence of environmental parameters on polyphosphate accumulation in *Acinetobacter* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 55: 67-82.

Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphate in biology: Structure, metabolism, and function. Bacteriol. Rev. 30: 772-794

Harold, F. M.,and Harold, R. L. 1965. Degradation of inorganic polyphosphate in mutants of *Aerobacrter aerogenes*. J. Bacteriol. 89: 1262-1270.

Henze, M. and Harremoes, M. P. 1990. Chemical-Biological Nutrient Removal- The HYDRO concept. Water Pollution Microbiology. Springer-Verlag. Berlin. Germany. 499.

Hiraishi, A., Ueda, Y., and Ishihara, J. 1998. Quinone profiling of bacteria population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge for enhanced phosphate removal. Appl. Environ. Microbiol. 64: 992-998.

Itoh, H. and Shiba, T. 2004. Polyphosphate synthetc activity of Polyphosphate: AMP Phosphotransterase in *Acinetobacter jonhnsonii* 210A. J. Bacterriol. 186: 5178-5181.

Kampfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Bohringer, J., Wagner. M. and Amann, R. 1996. Characterization of bacteria communities from activared sludge: culture dependent numurical identification versus *in situ* identification using group and genus-specific rRNA-targeted oliginucleotide probes. Micro. Ecol. 32: 101-121.

Karin,. E. U., Brodish and Joyner, J. 1983. The role of microorganism other than *Acinetobacter* in biological phosphorus removal in activated sludge process. Water Sci.Technol. 15: 117-125.

Kato, J., Yamamoto, T., Yamada, K., and Ohtake, H. 1993. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. Gene. 137:237-242.

Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T. and Nakamura, K. 1999. In *situ* indentification of polyphosphate- accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oliginucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. Water Res. 33: 257-265.

Kealing, J. D., Van Dien, S. J., Trelstad, P., Renniger, N. and Mcmahon, K. 2000. Application of polyphosphate metabloism to environment and biotechnological problems. Biochemistry (Moscow).65: 324-331.

Kong, Y., Nielsen, J. L. and Nielsen, P. K. 2004. Microautoradiograhic study of *Rhodocyclus*- related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale Enhance Biological Phosphorus Removal plant. Appl. Environ. Microbiol 70: 5383-5390.

Kornberg, A., Rao, N. N., and Ault-Rich, D. 1999. Inorganic polyphosphate:a molecule of many functions. Ann. Rev. Biochem. 68:89-125

Kuo, H., McMahon, K. D. and J. D. 2000. Retriving novel *ppk* gene fragments from marine bacteia. [online] Available from: htpp://www .marbec.net/ education/ project/report kuo.pdf [2000, August]

Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A. 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 272: 21240-21243.

Lopez, N. I., Pettinari, M. J. and Mendez, B. S. 1997. Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacteria populations. FEMS Microbiol. Ecol. 22: 129-136.

Lowry, o. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J 1951. Protein measurement with the folin pnenol reagent. J. Biol.Chem. 193: 267-275.

Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Schumann,. P., Burghardt, J., Tokiwa, Y. and Stratton, H. M. 2000. Three isolates of novel polyphosphate accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. Nov. and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. Nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 593-603.

McMahon, K. D., Dojka, M. A., Pace, N. R., Jenkin, D. and Kealing, J .D. 2002. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enchanced biological phosphorus removal. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4971- 4978.

McGrath, J. W., and Quinn, J. P. 2000. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4068-4073.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Merzouki, M., Bernet, N., Delgenes, J-P., Moletta, R., and Benlemlih, M. 1999. Kinetic behavior of some polyphosphate accumulating bacteria isolates in the presence of nitrate and oxygen. Curr. Microbiol. 38: 300-308.

Mino, T. 2000. Microbial selection of polyphosphate accumulation bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. Biochemistry (Moscow). 65: 341-348.

Mueller, J. G., Devereux, R., Santavy, D. L., S. E., Willis, S. G. and Pritchard, P. H. 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soil. Antonie van Lecuwenhoek. 71: 329-343.

Muhammed, a. 1961. Studies on biosynthesis of polymetaphosphate by an enzyme from *Corynebacterium xerosis*. Biochem. Biophys. Acta. 54: 121-132.

Mullan, A., Quinn, J. P. and McGrath, J. W. 2002. A non radioactive method for the assay of polyphsophate kinase activity and its application in the study of polyphosphate metabolism in *Burkhderia cepacia*. Anal. Biochem. 308: 294-299.

Nakamura, K., Ishikawa, S. and Kawaharasaki, M. 1995. Phosphate uptake and release activity in immobilized polyphosphate accumulating bacterium *Microlunatus phosphovorus* strain NM-1. J. Ferment. Bioeng. 80: 377-382.

Ohtake, H., Takahashi, K., Tsuzuki, Y.,and Toda, k. 1985. Uptake and release of phosphorus by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. Water Res. 19: 1587-1594.

Park, J. K., Wang. J., and Novotny, G. 1997. Wastewater characterization for Evaluation of Biological Phosphorus removal[online]. Available from: http//www.dnr. state.wi.us/org/water/ wm/biophos/2sample.htm[2003,January 22]

Pitocchoelli, J. 2000. Ecology[online]. Avilable from: http//www.anselm.edu [2003,December]

Randall, C. W, Barnard, J. L. and Stensel, H. D. 1992. Design and Retrofit of wastewater treatment plants for Biological Nutrient Removal. Water Quality Management Libraly. Technomic. Lancaster.

Rao, N. N., Liu, S. and Kornberg, A. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia col* the phosphate regulon and the stringent response. J. Bacteriol. 180: 2176-2193.

Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., D. G., Hamood, A.N., Lglewski, B. H., and Kornberg, A. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS. 97: 9636-9641.

Robinson, N. A., Goss, N. H., and Wood, H. G. 1984. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*: formation of an enzymatically active inslouble complex with basic proteins and characterization of synthesized polyphosphate. Biochem Int. 8: 757-769.

Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokouski, S., McCallum, C. M., and Henikoff, S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences. Nucleic Acids Res. 26(7): 1628-1635.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shaprio, J. and Levin G. V. 1965. Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organism. J. Water Pollut. Control fed. 37: 88-824.

Shaprio, J. 1967. Induced rapid release and uptake of phosphaorus by microorganisma. Science. 155: 1269-1271.

Sidat, M., Bux, F. and Kasan, H. C. 1999. Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. Water SA. 25: 175-179.

Srinath, C. A., Sastry, C. A., and Pillai, S. C. 1959. Rapid removal of phosphate from sewage by activated sludge. Experienta.15: 339-340

Soung-Hee, H., Soo-Ki, K. and Ki-Sung, L. 1999.Cloning of polyphosphate kinase gene , *ppk*, from several microorganisms. The 39th Annual Meting of the Microbiolocal Society of Korea. Korea.

Tinsley, C. R., Manjula, B. N. and Gotschlich, E. C. 1993. Purification and characterization of Polyphosphate kinase from *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun. 61: 3703-3710.

Tzeng, C. M. and Korngberg, A. 2000. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target. J. biolo. Chem. 275: 3977-3983.

Van Groenestijin, J. W., Bentvelsen. M. M., Deinema, M. H. and Zehnder, A. J. 1989. Polyphosphate-degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. and activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 55: 219-233.

Van Loosdrecht, M. C. M., Brdjanovic, D., Heijnen, J. J., and Hoijmans,. C. M., 1997. Biological phosphate removal processes. Appl. Environ. Microbiol. 48: 4077-4087

Wallner, G., Erhart, R. and Amann, R. 1995. Flow cytometry analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1859-1866.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer H. and Schleifer, K. H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. . Appl. Environ. Microbiol 59: 1520-1525.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K. H. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 60: 792-800.

WEF Manual of practice. 1998. Biology and Chemical Systems for Nutrient Removal. Water Environment Federation, USA.

Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2002 . Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated form geographically diverse sites. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 202-209.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็ง** (Waste water agar medium)

น้ำเสีย	1000.0	มิลลิลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออโธฟอสเฟต	0.1	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ปั่นเหวี่ยงน้ำเสียเพื่อกำจัดตะกอน แล้วจึงนำน้ำเสียปริมาตร 500 มิลลิลิตร มากรองผ่านแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane filter) ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อให้ปราศจากเชื้อ น้ำเสียส่วนที่เหลืออีกส่วนหนึ่งปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำมาละลายกับโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและวุ้นผงจากนั้นจึงทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน แล้วจึงผสมน้ำเสียทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันในสภาวะปราศจากเชื้อ

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดแข็ง** (Synthetic waste water agar medium)

โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$)	2.04	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.60	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.32	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.19	กรัม.
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.09	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.07	กรัม
ไดโซเดียมเอทธิลีนไดเอมีนอะซิเตท (EDTA)	0.10	กรัม
สารละลายแร่ธาตุ	2.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

สารละลายแร่ธาตุต่าง ๆ

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	1.50	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.15	กรัม

.

โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	0.15	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.12	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.12	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.06	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.03	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	0.03	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0.	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายแร่ธาตุต่างๆ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงในอาหารปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว** (Synthetic waste water medium)

สูตรอาหารและวิธีการฆ่าเชื้อเป็นสูตรเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดแข็ง แต่ไม่มีการเติมวุ้นผง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **อาหารแข็งนิวเทรียนท์**(Nutrient agar)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโทน	5.0	กรัม.
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. **อาหารนิวเทรียนท์เหลว** (Nutrient broth)

สูตรอาหารและวิธีการฆ่าเชื้อเป็นสูตรเดียวกับอาหารแข็งนิวเทรียนท์ แต่ไม่มีการเติมวุ้นผง

6. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (trytone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. สารละลายอัลคาไลน์ ลอฟเฟอร์ส เมทิลีนบลู

เมธิลีนบลู คลอไรด์	5.0	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.0 ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ แล้วเก็บในขวดสีชา

3. สารละลายผสมสำหรับทดสอบฟอสเฟต

1.) สารละลายแอมโมเนียมพาราโมลิบเดต

Ammoniumparamolybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	15	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

เก็บในขวดพลาสติก ไม่ให้โดนแสง

2.) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	140	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

เก็บในขวดแก้วและเย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.)สารละลายกรดแอสคอร์บิค

กรดแอสคอร์บิค	27	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

เก็บใส่ขวดพลาสติกชนิดทนเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.) สารละลายโพแตสเซียมแอนติโมลิบเดต

โพแตสเซียมแอนติโมลิบเดต	0.34	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

เก็บในขวดแก้วหรือพลาสติก

ผสมสารข้างต้นเข้าด้วยกัน ดังนี้

Mixed reagent

1.) สารละลายแอมโมเนียมพาราโมลิบเดต	100	มิลลิลิตร
2) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก	250	มิลลิลิตร
3.) สารละลายกรดแอสคอร์บิค	100	มิลลิลิตร
4.) สารละลายโพแตสเซียมแอนติโมลิบเดต	50	มิลลิลิตร.

หมายเหตุ

- ผสมให้เข้ากัน และใช้ภายใน 4 ชั่วโมง เนื่องจากผสมเข้าด้วยกันแล้ว สารเหล่านี้ไม่เสถียร

-ก่อนทำการทดลองแช่เครื่องแก้วทุกชิ้นด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น10% ทิ้งไว้ข้ามคืน

4. **สีย้อมโทลูดิอินบลู**

โทลูดิอิน บลู	6	มิลลิกรัม
กรดอะซิติก เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์	1,000	มิลลิลิตร

5. **สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อีดีทีเอ เข้มข้น 0.05 โมลาร์**

ทริสมา เบส	3.0275	กรัม
อีดีทีเอ	0.7444	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. **สารละลาย** Lowry

ประกอบด้วย

1.) Lowry A

โซเดียมคาร์โบเนต	60.0 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12.0 กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6 กรัม
น้ำกลั่น	3,000 มิลลิลิตร

2.) Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

3.) Lowry C

ผสม Lowry A	50 ส่วน
Lowry B	1 ส่วน

4.) Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

7. **ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล** QIAquick® Gel Extraction kit

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE (concentrate)

Buffer EB

Collection tube

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

QIAquick Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลให้เติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE ทำการสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

8. **สารละลาย** 10%SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60°ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

9 . Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

10. Neutralization buffer

Trismabase	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

11. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)	0.3	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

12. สารละลาย 2XSSC

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

13. สารละลาย 2XSSC/0.1% SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

14. สารละลาย 0.5XSSC/0.1% SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

15. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1.	DIG-High Prime, 5Xconc.
หลอดหมายเลข 2.	DIG-labeled control DNA 5 μg/ml
หลอดหมายเลข 3.	DNA dilution buffer
หลอดหมายเลข 4.	Anti-Digoxygenin-AP Conjugate 750 U/ml
หลอดหมายเลข 5.	NBT/BCIP, 50X conc.
ขวดหมายเลข 6.	Blocking solution, 10X conc.
ขวดหมายเลข 7.	DIG Easy Hyb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37°C)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

Detection buffer

Trismabase	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

16. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

17. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 20 นาที

18. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

19. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

20. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

21. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 °ซ จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน นำชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

22. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

23. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

24. สีติดตาม

Bromphenolblue	0.025%
สารละลายซูโคส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

25. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

26. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 **โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ** 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

27. สารละลายโปรตีเนสเค (proteinaseK) **ความเข้มข้น** 20 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผงโปรตีเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

.

28. สารละลายไลโซไซม์ (lyzozyme) **ความเข้มข้น** 20 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผงไลโซไซม์ น้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

29. สารละลาย RNase A **เข้มข้น** 10 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

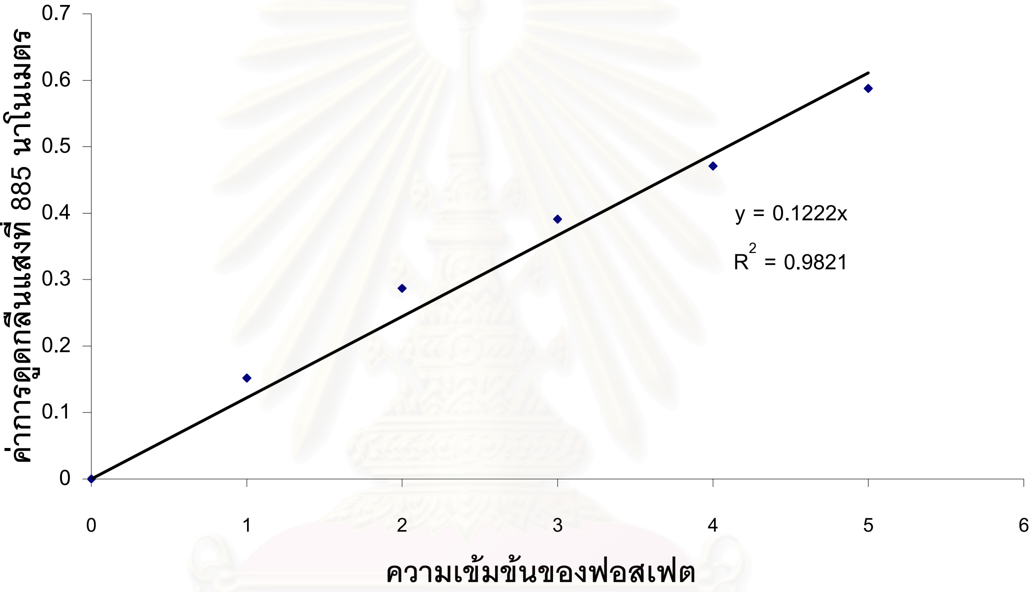
30. สารละลายผสม dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว)

ผสม dNTP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรสารละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

แสดงกราฟมาตรฐานปริมาณฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



คำนวนหาเปอร์เซนต์การสะสมฟอสเฟตภายในเซลล์ ดังนี้

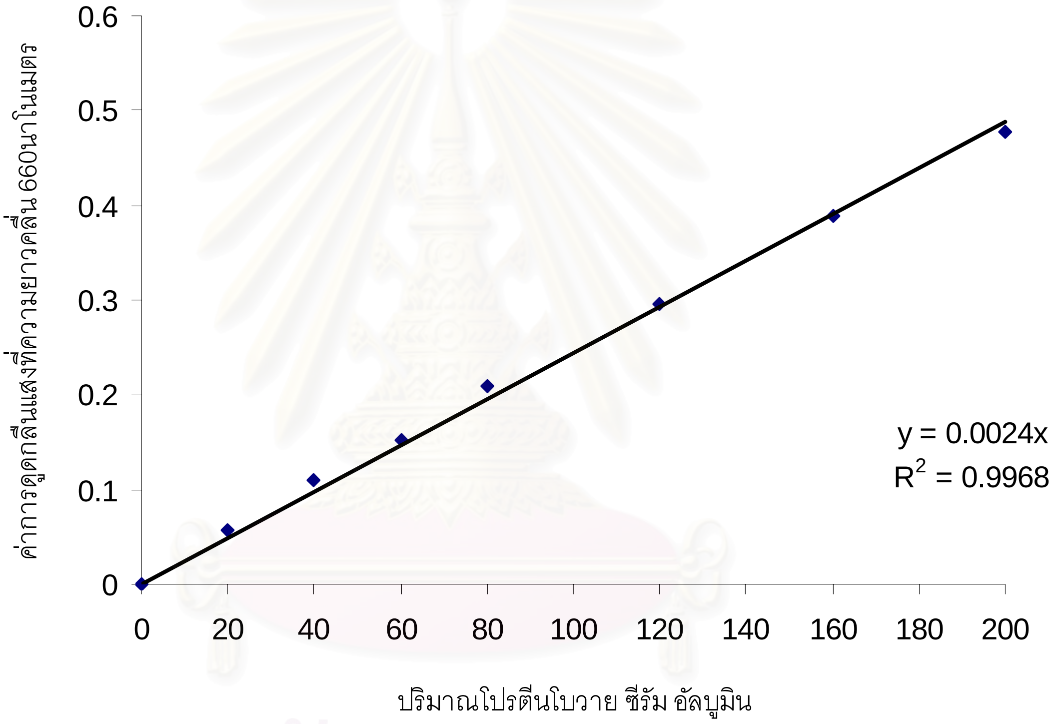
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณฟอสเฟตที่สะสมในเซลล์ = ปริมาณฟอสเฟตในสารละลายในสภาวะไร้อากาศ - ปริมาณฟอสเฟตในสารละลายในสภาวะให้อากาศ

$$\text{เปอร์เซนต์การสะสมฟอสเฟตภายในเซลล์} = \frac{\text{ปริมาณฟอสเฟตที่สะสมในเซลล์} \times 100}{\text{ปริมาณฟอสเฟตในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว}}$$

ภาคผนวก ง

แสดงกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน โบวาย ซีรัม อัลบูมิน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงจำนวนแบคทีเรียที่มี volutin granule และจำนวนแบคทีเรียที่มีการสะสมและสลาย พอลิฟอสเฟตในภาวะที่แตกต่างกัน

จำนวนแบคทีเรียที่มี volutin granule (สายพันธุ์)	แบคทีเรียที่มีการสะสมพอลิฟอสเฟตในภาวะให้อากาศและปลดปล่อยพอลิฟอสเฟตในภาวะไร้อากาศ (สายพันธุ์)	แบคทีเรียที่มีการสะสมพอลิฟอสเฟตในภาวะไร้อากาศและปลดปล่อยพอลิฟอสเฟตในภาวะให้อากาศ (สายพันธุ์)
26	5	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

การเปรียบเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม

BlastX version 2.2.10

Query หมายถึง ลำดับอะมิโนในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับอะมิโนที่เปรียบเทียบใน Genbank

\+ หมายถึง กรดอะมิโนกลุ่มเดียวกัน

1. ผลจากการเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซพอลิเมอเรสของ *ppk* จากจีในมิกดีเอ็นเอของ CU-PK2 โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f

```
gi|286035|dbj|BAA03335.1|    polyphosphate kinase [Klebsiella aerogenes]
 gi|730364|sp|Q07411|PPK_KLEAE    Polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid
kinase)(ATP-polyphosphate phosphotransferase)
Length = 685

 Score =  369 bits (947), Expect = e-101
 Identities = 185/201 (92%), Positives = 185/201 (92%)
 Frame = +2

Query: 11  RFAELKRRIIISEEQGLNSHSRHLLGKIQSRVLKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINE 190
           RFAELKRRIIISEEQGLNSHSRHLLGKIQSRVLKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINE
Sbjct: 53  RFAELKRRIIISEEQGLNSHSRHLLGKIQSRVLKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINE 112

Query: 191 RQLSVNQQNWLRHYFKQYLRQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGESIRYALL 370
           RQLSVNQQNWLRHYFK YLRQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGESIRY LL
Sbjct: 113 RQLSVNQQNWLRHYFKHYLRQHITPILINRETDLVQFLKDDYTYLAVEIIRGESIRYPLL 172

Query: 371 EIPSDKVPRFVNLPPETPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFFDYDALNAYSMKMTRDAE 550
           EIPSDKVPRFVNLPPETPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFFDYDALNAYSMKMTRDAE
Sbjct: 173 EIPSDKVPRFVNLPPETPRRRKPMILLDNILRYCLDDIFKGFFDYDALNAYSMKMTRDAE 232

Query: 551 YDLVHXXXXXXXXXXXXXXKQ 613
           YDLVH              KQ
Sbjct: 233 YDLVHEMEASLMELMSSSLKQ 253
```

2. ผลจากการเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซพอลิเมอเรสของ *ppk* จากจีในมิกดีเอ็นเอของ CU-PK5 โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f

gi|16130426|ref|NP_416996.1| polyphosphate kinase [*Escherichia coli* K12]
gi|1788847|gb|AAC75554.1| polyphosphate kinase; polyphosphate kinase, component of RNA degradosome [Escherichia coli K12]

Length = 688

Score = 119 bits (298), Expect(4) = 7e-46
Identities = 57/57 (100%), Positives = 57/57 (100%)
Frame = +3

```
Query: 111 LKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINERQLSVNQQNWLRHYFKQYLRQHITPILIN 281
           LKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINERQLSVNQQNWLRHYFKQYLRQHITPILIN
Sbjct: 85  LKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINERQLSVNQQNWLRHYFKQYLRQHITPILIN 141
```

3. ผลจากการเทียบความคล้ายของกรดอะมิโนบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซพอลิเมอเรสของ *ppk* จากจีในมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* JM 109 โดยใช้ไพร์เมอร์ NLDE-0199f

gi|286035|dbj|BAA03335.1| polyphosphate kinase [Klebsiella aerogenes]
gi|730364|sp|Q07411|PPK_KLEAE Polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase)(ATP-polyphosphate phosphotransferase)Length = 685

Score = 78.2 bits (191), Expect(2) = 3e-17
Identities = 42/61 (68%), Positives = 45/61 (73%)
Frame = +1

```
Query: 73  LNSHSATSGGEKSSLAFMKADQELDGLYNELLLEMARNQICLINERQLSANQANWRRQYL 252
           LNSHS    G+  S   +KADQE DGLYNELLLEMARNQI LINERQLS NQ NW R Y
Sbjct: 69  LNSHSRHLLGKIQSRV-LKADQEFDGLYNELLLEMARNQIFLINERQLSVNQQNWLRHYF 127

Query: 253 E 255
           +
Sbjct: 128 K 128
```

ภาคผนวก ช

การเปรียบเทียบหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BlastN

1. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ CU-PK2 โดยโปรแกรม BlastN

Query หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ CU-PK2

Sbjct หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ *Klebsiella oxytoca*

gi|60416689|emb|AJ871859.1| Klebsiella oxytoca partial 16S rRNA gene, strain SB2908
Length = 1454

Score = 2730 bits (1377), Expect = 0.0
Identities = 1427/1445 (98%), Gaps = 1/1445 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 6    tggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtagcacagagagcttgctctcgggtga 65
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 10   tggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtagcacagagagcttgctctcgggtga 69

Query: 66   cgagtggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggataactactg 125
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 70   cgagtggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggataactactg 129

Query: 126  gaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagagggggaccttcgggcctct 185
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 130  gaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagagggggaccttcgggcctct 189

Query: 186  tgccatcagatgtgcccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcg 245
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 190  tgccatcagatgtgcccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcg 249

Query: 246  acgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccaga 305
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 250  acgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccaga 309

Query: 306  ctcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgca-gcctgatgcagccat 364
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 310  ctcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccat 369
```

```
Query: 365  gccgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaaggcgat 424
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 370  gccgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaaggcgat 429

Query: 425  gaggttaataacctcatcgattgacgttacccgcagaagaagcaccggctaactccgtgc 484
             |||||||||||||  || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 430  aaggttaataacctyrtcrattgacgttacccgcagaagaagcaccggctaactccgtgc 489

Query: 485  cagcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgc 544
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 490  cagcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgc 549

Query: 545  acgcaggcggtctgtcaagtcggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcattc 604
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 550  acgcaggcggtctgtcaagtcggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcattc 609

Query: 605  gaaactggcaggctagagtcttgtagaggggggtagaattccaggtgtagcggtgaaatg 664
            |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 610  gaaactggcaggctggagtcttgtagaggggggtagaattccaggtgtagcggtgaaatg 669

Query: 665  cgtagagatctggaggaataccggtggcgaaggcggcccccctggacaaagactgacgctc 724
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 670  cgtagagatctggaggaataccggtggcgaaggcggcccccctggacaaagactgacgctc 729

Query: 725  aggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacg 784
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct: 730  aggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgctgtaaacg 789

Query: 785  atgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaagtcga 844
            ||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 790  atgtcgacttggaggttgttcccttgaggagtggcttccggagctaacgcgttaagtcga 849

Query: 845  ccgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaa 904
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 850  ccgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaa 909

Query: 905  gcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatc 964
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 910  gcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatc 969

Query: 965  cagagaactttccagagatggattggtgccttcgggaactctgagacaggtgctgcatgg 1024
            || |||||||  ||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 970  casagaacttagcagagatgctttggtgccttcgggaactctgagacaggtgctgcatgg 1029

Query: 1025 ctgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttat 1084
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1030 ctgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttat 1089

Query: 1085 cctttgttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggagg 1144
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1090 cctttgttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggagg 1149
```

```
Query: 1145 aaggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctaca 1204
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1150 aaggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctaca 1209

Query: 1205 atggcgcatacaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtgcgtcgt 1264
            |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||
Sbjct: 1210 atggcatatacaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtatgtcgt 1269

Query: 1265 agtccggattggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtggat 1324
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1270 agtccggattggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtggat 1329

Query: 1325 cagaatgccacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatggga 1384
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1330 cagaatgccacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatggga 1389

Query: 1385 gtgggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccactttgtgatt 1444
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1390 gtgggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccactttgtgatt 1449

Query: 1445 catga 1449
            |||||
Sbjct: 1450 catga 1454
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ CU-PK5 โดยโปรแกรม BlastN

Query หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ CU-PK5

Sbjct หมายถึง 16 เอสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (16S rDNA) ของ *Enterobacter aerogenes*

gi|15042704|gb|AF395913.1|AF395913 *Enterobacter aerogenes* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length = 1510

Score = 2738 bits (1381), Expect = 0.0
Identities = 1426/1437 (99%), Gaps = 3/1437 (0%)
Strand = Plus / Minus

```
Query: 1    ggcaggcctaacacaatgcaagtcgaacgggtagcacagagagcttgctctcgggtgacg 60
            ||||||||||||||| |||||||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1485 ggcaggcctaacaca-tgcaagtcgagcgg-tagcacagagagcttgctctcgggtgacg 1428


Query: 61   agtggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggataactactgga 120
            || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1427 agcggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggataactactgga 1368


Query: 121  aacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagagggggaccttcgggcctcttg 180
            |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1367 aacggtagctaataccgcataatgtcgcaagaccaaagagggggaccttcgggcctcttg 1308


Query: 181  ccatcagatgtgcccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcgac 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1307 ccatcagatgtgcccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcgac 1248


Query: 241  gatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccagact 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1247 gatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccagact 1188


Query: 301  cctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgc 360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1187 cctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgc 1128


Query: 361  cgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaaggcgatga 420
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct: 1127 cgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaaggcgataa 1068


Query: 421  ggttaataacctcatcgattgacgttacccgcagaagaagcaccggctaactccgtgcca 480
            ||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1067 ggttaataaccttgtcgattgacgttacccgcagaagaagcaccggctaactccgtgcca 1008
```

```
Query: 481  gcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcac 540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1007 gcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcac 948

Query: 541  gcaggcggtctgtcaagtcggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcattcga 600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 947  gcaggcggtctgtcaagtcggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcattcga 888

Query: 601  aactggcaggctagagtcttgtagaggggggtagaattccaggtgtagcggtgaaatgcg 660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 887  aactggcaggctagagtcttgtagaggggggtagaattccaggtgtagcggtgaaatgcg 828

Query: 661  tagagatctggaggaataccggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctcag 720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 827  tagagatctggaggaataccggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctcag 768

Query: 721  gtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggttagtccacgccgtaaacga 780
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct: 767  gtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgg-tagtccacgccgtaaacga 709

Query: 781  tgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaagtcgac 840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 708  tgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaagtcgac 649

Query: 841  cgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaag 900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 648  cgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaag 589

Query: 901  cggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatcc 960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 588  cggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatcc 529

Query: 961  agagaactttccagagatggattggtgccttcgggaactctgagacaggtgctgcatggc 1020
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 528  agagaactttccagagatggattggtgccttcgggaactctgagacaggtgctgcatggc 469

Query: 1021 tgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttatc 1080
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 468  tgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttatc 409

Query: 1081 ctttgttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggagga 1140
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 408  ctttgttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggagga 349

Query: 1141 aggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaa 1200
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 348  aggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaa 289

Query: 1201 tggcgcatacaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtgcgtcgta 1260
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 288  tggcgcatacaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtgcgtcgta 229
```

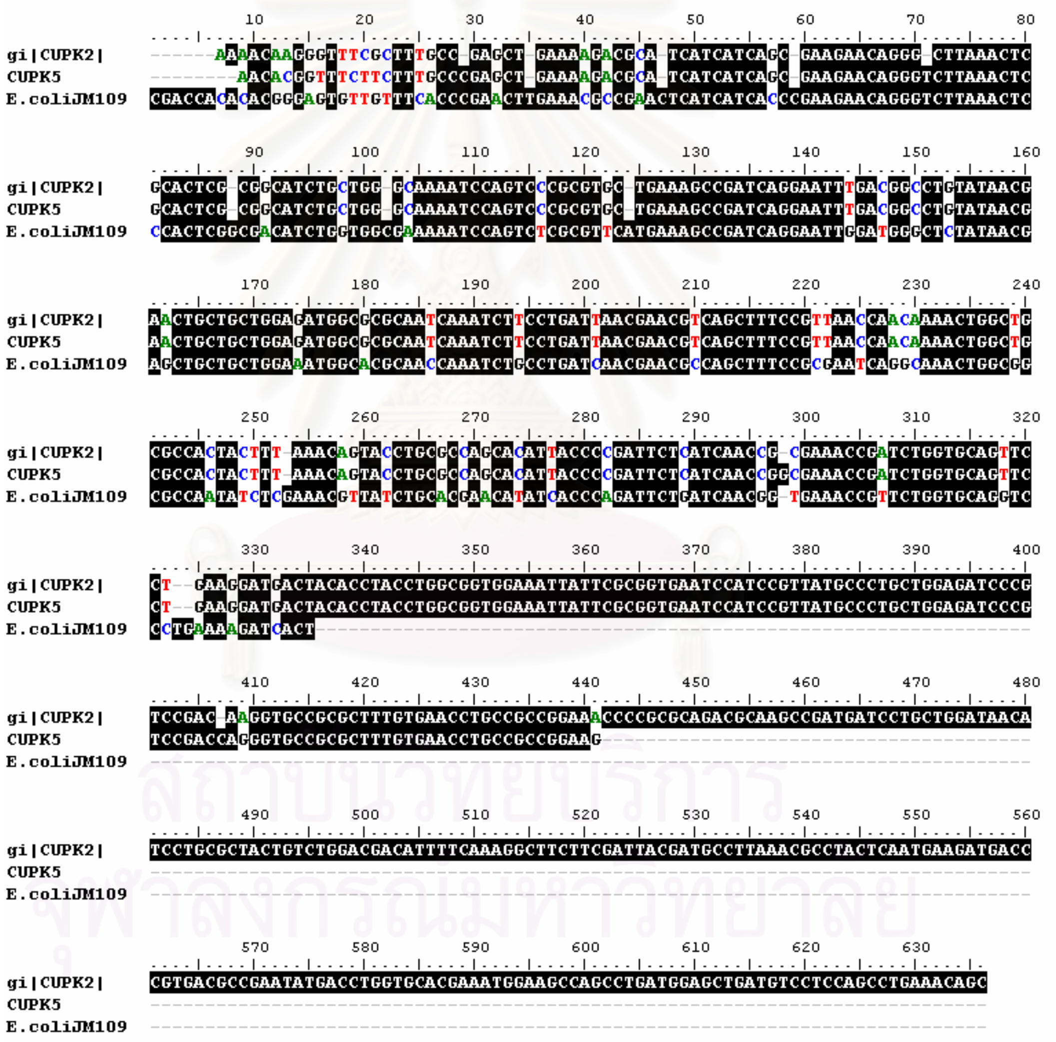
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
Query: 1261 gtccggattggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtggatc 1320
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct: 228  gtccggattggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtagatc 169

Query: 1321 agaatgccacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggag 1380
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 168  agaatgctacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggag 109

Query: 1381 tgggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccactttgtga 1437
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 108  tgggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccactttgtga 52
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตัวติดตามดีเอ็นเอ PP1, PP2 และ PP3 ที่สร้างจาก CU-PK2, CU-PK5 และ *E.coli* JM109 ตามลำดับด้วยโปรแกรม ClustalX



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปวีณา รัตนมาศ เกิดเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2543 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย