หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์

การแยกมิวแตนท์โดยทั่วไปมักใช้มิวตาเจนเพื่อเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ให้สูงกว่าความถี่ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) ซึ่งเท่ากับ 10^{-5} – 10^{-7} ต่อเซลล์ (Luria และ Del briick, 1943 ; Cavalli - S forza, 1956) ในการแยกฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์ซึ่งเป็นรีดอกซ์เอนไซม์ตัวหนึ่ง ณ ที่นี้ได้ใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ซึ่งเป็น alkylating agent เป็นมิวตาเจน ดังรายละเอียดที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.1 เลือกมิวแตนท์โดยใช้เบนซิลไวโอโลเจนเป็นเครื่องชี้ เบนซิลไวโอโลเจนนี้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์ที่มีค่ารีดักชันโพเทนเชียล (E°) ที่ Standard state เท่ากับ –359 มิลลิโวลต์ เมื่อถูกออกซิไดซ์จะเป็นสีขาว เมื่อถูกรีดิวส์จะเป็นสีม่วง ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์เบนซิลไวโอโลเจนได้จะมีโคโลนีเป็นสีม่วง ส่วนแบคทีเรียที่มีความผิดปกติที่ตัว ให้อิเล็กตรอนซึ่งมีค่ารีดักชันโพเทนเชียลต่ำกว่าค่ารีดักชันโพเทนเชียลของเบนซิลไวโอโลเจนจะมีโคโลนีเป็นสีขาว

ผลการทดลอง พบแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว 183 ตัว จากแบคทีเรียที่ถูกกลายพันธุ์ทั้งหมด 16 200 ตัว ในจำนวน 183 ตัวนี้ เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะที่มีออกซิเจน 41 ตัว เมื่อนำแบคทีเรียส่วนที่เหลือมาทดสอบซ้ำ พบว่ามีแบคทีเรียที่ผันกลับ (reverse) เป็นไวลไทพ์ถึง 115 ตัว คือ เมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในอาหารที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่จะมีโคโลนีเป็นสีม่วง ดังนั้นจึงเหลือมิวแตนท์เพียง 27 ตัว ที่จะนำมาจำแนกฟีโนไทพ์ต่อไป

2. การจำแนกกลุ่มของมิวแตนท์

2.1 การเปรียบเทียบสีของโคโลนีและความสามารถในการครึ่งไนโตรเจน

เนื่องจากฟอร์เมตเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงไพรูเวต

ด้วยเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส โดยมีโคเอนไซม์เอเป็นตัวร่วมเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 1) และฟอร์เมตที่เกิดขึ้นนี้จะสามารถไปชักนำการถอดรหัสของเอนไซม์ฟอร์มิคดี-ไฮโดรจีเนส ดังนั้นฟอร์เมตจึงเป็นตัวแปร (parameter) ตัวแรกที่ทดสอบ

เนื่องจาก Klebsiella pneumoniae M5a1 เป็นแฟคคัลเททีฟแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ใช้เป็นตัวแบบในการศึกษากลไกการตรึงไนโตรเจนในจุลชีพอิสระ ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนจึงเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ

จากการทดลองทดสอบสีของโคโลนีเมื่อแบคทีเรียเติบโตในอาหารที่มีเบนซิล-ไวโอโลเจนผสมอยู่ และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย (แสดงในตารางที่ 1) พบว่า ไวลไทพ์จะมีโคโลนีเป็นสีม่วง เมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในอาหารที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่ทั้งที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ และมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ คือ สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และบ่มภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

จากการใช้ตัวแปรทั้ง 2 เป็นหลัก คือ การเปลี่ยนสีเบนซิลไวโอโลเจนและการตรึงไนโตรเจน ทำให้แบ่งมิวแตนท์ทั้ง 27 ตัว เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 1) กลุ่มที่ 1 มี 6 ตัว คือสายพันธุ์ 27A 29A 35A 16E 18E และ 21E กลุ่มนี้จะให้โคโลนีสีขาวเมื่อเติบโตในอาหารที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่ ครั้นใส่โซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ พบว่า แบคทีเรียเหล่านี้จะมีโคโลนีเป็นสีม่วง เมื่อทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนพบว่ามิวแตนท์ทั้ง 6 ตัวนี้สามารถตรึงไนโตรเจนได้

กลุ่มที่ 2 มี 2 ตัว คือ สายพันธุ์ 33A และ 2F ให้ลักษณะสีของโคโลนีเช่นเดียวกับมิวแตนท์กลุ่มที่ 1 แต่มิวแตนท์กลุ่มที่ 2 นี้แตกต่างจากมิวแตนท์กลุ่มที่ 1 ในด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 12 ตัว คือสายพันธุ์ 14A 16A 18A 3F 6F 7F 8F 9F 10F 11F 13F และ 14F มิวแตนท์กลุ่มนี้เป็นมิวแตนท์ที่มีสีของโคโลนีเป็นสีขาวเมื่อเจริญในอาหารที่มีเบนซิลไวโอเลเจนผสมอยู่ ทั้งที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ มิวแตนท์กลุ่มนี้สามารถตรึงไนโตรเจนได้

ตารางที่ 1 การจำแนกฟีโนไทพ์ของมิวแตนท์

จำนวนที่แยกได้	หมายเลขสายพันธุ์	สีของโคโลนีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน		ความสามารถ[3] ในการตรึงไนโตรเจน
		ไม่มีฟอร์เมต[1]	มีฟอร์เมต[2]	
6	27A 29A 35A 16E 18E 21E	ขาว	ม่วง	+
2	33A 2F			-
12	14A 16A 18A 3F 6F 7F 8F 9F 10F 11F 13F 14F	ขาว	ขาว	+
7	1A 10A 21A 24A 1F 12F 16F			-
	WT	ม่วง	ม่วง	+

1. สังเกตสีของโคโลนีเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีซูโครส 0.5 % เป็นสารต้นคอคาร์บอน เคสอะมิโนแอซิด 1 % เบนซิลไวโอโลเจน 12.5 มิลลิกรัม % ภายใต้บรรยากาศของอาร์กอน ที่อุณหภูมิห้อง
2. สังเกตสีของโคโลนีเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีซูโครส 0.5 % เป็นสารต้นคอคาร์บอน เคสอะมิโนแอซิด 1 % เบนซิลไวโอโลเจน 12.5 มิลลิกรัม % โซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ ภายใต้บรรยากาศของอาร์กอน ที่อุณหภูมิห้อง
3. สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีซูโครส 0.5 % เป็นสารต้นคอคาร์บอน และปราศจากสารต้นคอไนโตรเจนอื่น ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีทดลองข้อ 6.2

กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 7 ตัว คือ สายพันธุ์ 14A 10A 21A 24A 1F 12F และ 16F มิวแตนท์กลุ่มนี้ให้สีของโคโลนีเมื่อเติบโตในอาหารที่มีเบน-ซิลไวโอโลเจนผสมอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เช่นเดียวกับมิวแตนท์กลุ่มที่ 3 แต่แตกต่างจากมิวแตนท์กลุ่มที่ 3 คือ มิวแตนท์กลุ่มนี้ไม่สามารถครึงไนโตรเจนได้

2.2 การเกิดก๊าซ

ในสภาพแอนแอโรบิคเมื่อ Klebsiella pneumoniae M5al เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ มันจะกำจัดอำนาจรีดิวส์จากโมเลกุลของน้ำตาลโดยผานเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส และตัวรับอิเล็กตรอนอื่น ๆ จนในที่สุดอิเล็กตรอนจะรีดิวส์โปรตรอนเป็นก๊าซไฮโดรเจน ด้วยการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (รูปที่ 1)

ดังนั้นในสภาพที่ Klebsiella pneumoniae M5al เจริญเติบโตโดยไม่มีออกซิเจน ผลผลิตจากการเฟอร์เมนต์น้ำตาลคือก๊าซ 2 ชนิด ได้แก่ คาร์บอนไดออก-ไซด์และไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้การเกิดก๊าซจึงเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ

จากผลการสังเกตก๊าซที่เกิดขึ้นในอินนอคคิวลัมซึ่งบรรจุใน หลอดจุกเกลียวซึ่งเป็นการสังเกตเบื้องต้น (แสดงในตารางที่ 2) พบว่า เมื่อไวลไทพ์เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 7.6 ที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ จะพบว่ามีก๊าซผุดขึ้นเหนือหลอด สังเกตได้ง่ายภายใต้ระดับพาราฟินในชั่วโมงที่ 7 และยังคงสังเกตได้จนถึงชั่วโมงที่ 32 แต่เมื่อไวลไทพ์เจริญในอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต ไม่สามารถสังเกตก๊าซได้ ส่วนมิวแตนท์ 11 ตัวที่นำมาทดสอบการเกิดก๊าซนั้น พบว่ามิวแตนท์ส่วนมากจะไม่พบก๊าซผุดขึ้นเหนือหลอด แม้ว่าจะปล่อยให้แบ่งตัวจนถึง stationary phase แล้วก็ตาม มีมิวแตนท์เพียงสายพันธุ์เดียว คือ สาย-พันธุ์ 18 E สามารถสังเกตก๊าซได้เมื่อมิวแตนท์สายพันธุ์นี้เจริญถึงที่สุดแล้ว (ชั่วโมงที่ 46) ในอาหารที่มีฟอร์เมตผสมอยู่

เนื่องจากปริมาณการเกิดก๊าซจะแปรตาม pH ของอาหาร จึงได้ลด pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลงจาก 7.6 เป็น 7.0 และ 6.6

จากการทดลองพบว่า เมื่อลด pH ของอาหารลงเป็น 7.0 ยังคงไม่สามารถสังเกตก๊าซที่เกิดจากไวลไทพ์ที่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้ แต่เมื่อไวลไทพ์เจริญใน

อาหารที่มีโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ จะสามารถสังเกตการที่ผุดขึ้นได้จนถึงชั่วโมงที่ 43 เมื่อลด pH ของอาหารลงเป็น 6.6 จะสามารถสังเกตการที่เกิดจากไวล์ไทพ์ทั้งที่เจริญในอาหารที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ โดยที่สามารถสังเกตการที่เกิดขึ้นเมื่อไวล์ไทพ์เจริญในอาหารที่มีโซเดียมฟอร์เมตได้เร็วกว่า

ส่วนมิวแตนท์ที่นำมาทดสอบนั้น พบว่ามิวแตนท์จำนวน 8 ตัว คือ สายพันธุ์ 14 A 18A 21 A 24 A 29 A 16 E 21E และ 2 F ยังคงไม่สามารถสังเกตการได้ แม้ว่าจะลด pH ของอาหารลงจาก 7.6 เป็น 7.0 และ 6.6 แล้วก็ตาม

เมื่อลด pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลงเป็น 7.0 และ 6.6 พบว่ามีมิวแตนท์ 3 ตัว คือสายพันธ์ 27A 35 A และ 18 E สามารถสังเกตการที่ผุดขึ้นเหนือหลอดได้เมื่อมิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ และจะสังเกตการที่เกิดขึ้นเมื่อมิวแตนท์เติบโตในอาหารที่มี pH 6.6 ได้เร็วกว่าเมื่อมิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญในอาหารที่มี pH 7.0

จากการเปรียบเทียบสีของโคโลนีเมื่อเจริญในอาหารที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่ และการเกิดการเมื่อแบคทีเรียเติบโตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน พบว่า มีมิวแตนท์ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 27A 18E และ 35 A มีคุณสมบัติน่าสนใจกล่าวคือ จะมีโคโลนีเป็นสีขาว เมื่อเติบโตในอาหารที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่ แต่จะมีโคโลนีเป็นสีม่วง เมื่อมีฟอร์เมตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมิวแตนท์ทั้ง 3 จะสังเกตการเกิดขึ้นได้ เมื่อเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟอร์เมตผสมอยู่ จากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ จึงได้นำมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

3. สรีรวิทยาของมิวแตนท์กลุ่มที่ 1

3.1 การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

จากการเปรียบเทียบการเจริญของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอนโดยเขย่า

ตารางที่ 2 การเกิดก๊าซของไวลไทพ์และมิวแตนท์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 7.6, 7.0 และ 6.6

หมายเลขสายพันธุ์	pH 7.6		pH 7.0		pH 6.6	
	ไม่มีฟอร์เมต[1]	มีฟอร์เมต[2]	ไม่มีฟอร์เมต[1]	มีฟอร์เมต[2]	ไม่มีฟอร์เมต[1]	มีฟอร์เมต[2]
14A 18A 21A 24A 29A 16E 21E 2F	–	–	–	–	–	–
27A	–	–	–	ช.ม.ที่ 45–76	–	ช.ม.ที่ 36–75
35A	–	–	–	ช.ม.ที่ 46	–	ช.ม.ที่ 43
18E	–	ช.ม.ที่ 46	–	ช.ม.ที่ 57–72	–	ช.ม.ที่ 43
WT	–	ช.ม.ที่ 7–32	–	ช.ม.ที่ 7–43	ช.ม.ที่ 18–36	ช.ม.ที่ 5–73

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่มีซูโครส 0.5 % เป็นสารต้นตอคาร์บอน
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่มีซูโครส 0.5 % เป็นสารต้นตอคาร์บอนเสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 6.2

ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37° ซ (แสดงในรูปที่ 2) พบว่า ไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญได้ดีประมาณกัน มีค่าความขุ่นของเซลล์สูง 0.95–1.0 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เมื่อแบคทีเรียเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase

3.2 การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

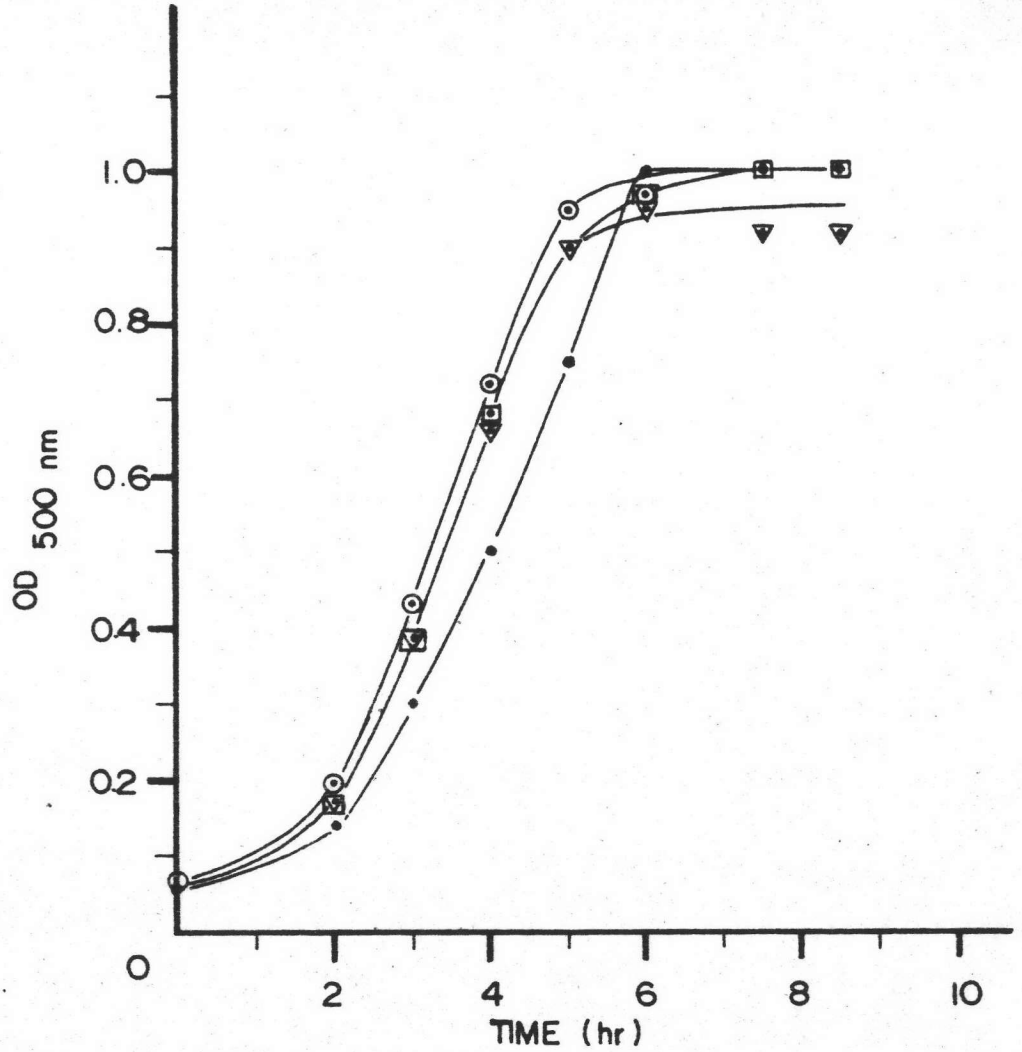
ก. การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ

จากการเปรียบเทียบการเจริญของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ (แสดงในรูปที่ 3) พบว่า ไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญได้ดีประมาณกัน กล่าวคือมีระยะแบ่งตัว 2 เท่า เท่ากับ 56 – 60 นาที (ตารางที่ 3) และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูง 0.57 – 0.62 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เมื่อแบคทีเรียเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase

ข. การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต

เนื่องจากอาเซททิลโคเอ (acetyl Co A) ซึ่งเป็นสารต้นตอ (precursor) ในกระบวนการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่าง ๆ นั้น เป็นผลิตภัณฑ์ตัวหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงไพรูเวต โดยเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส ดังนั้นอาซีเตตซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นอาเซททิลโคเอได้ (Brown, T.D.K. และคณะ, 1977) จึงเป็นตัวแปรที่น่าสนใจศึกษาผลกระทบต่อการเจริญของมิวแตนท์

จากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ และเสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ (แสดงในรูปที่ 4) พบว่า ไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญได้ดีประมาณกัน กล่าวคือ มีระยะแบ่งตัว 2 เท่า เท่ากับ 55 – 58 นาที (ตารางที่ 3) และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูง 0.55 – 0.62 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เมื่อแบคทีเรียเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase



รูปที่ 2 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นคอคาร์บอน เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°ซ

⊙——⊙ การเจริญของไวล์ไทพ์

●——● การเจริญของ 27A

⊡——⊡ การเจริญของ 18E

▽——▽ การเจริญของ 35A

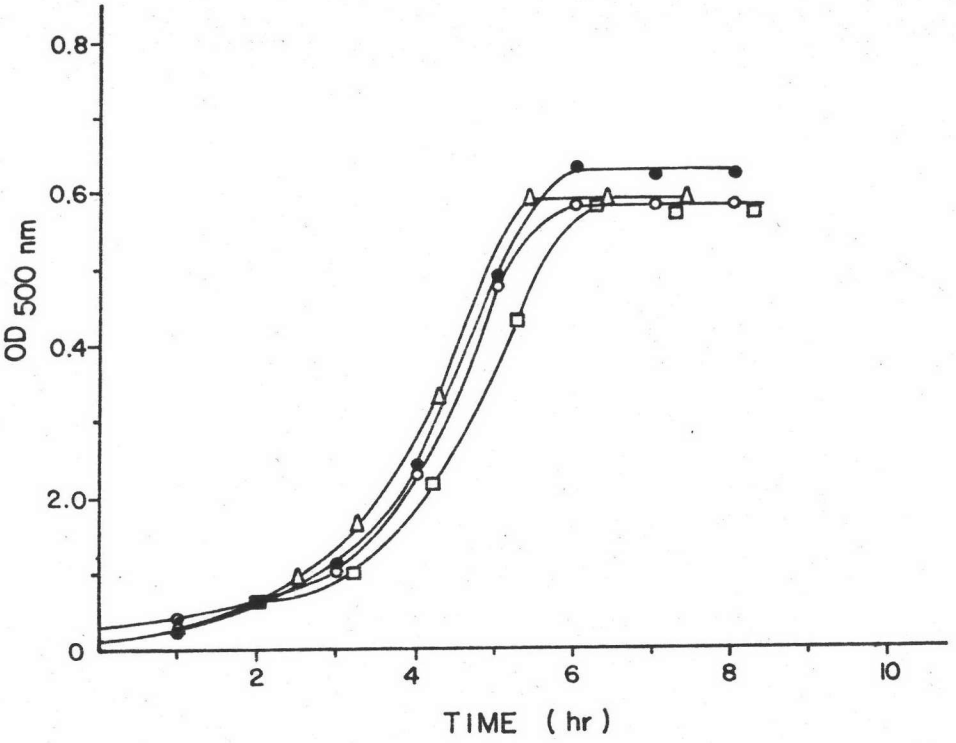
ตารางที่ 3 ระยะแบ่งตัว 2 เท่าของแบคทีเรียเมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

หมายเลขสายพันธุ์	ระยะแบ่งตัว 2 เท่า (นาที)		
	กลูโคส[1]	กลูโคส+อาซีเตต[2]	กลูโคส+ไนเตรต[3]
WT	60	56	47
27A	56	55	60
18E	60	58	62
35A	56	56	60

1. เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ
2. เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ
3. เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.78 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ

คำนวณระยะแบ่งตัว 2 เท่า (T) จาก slope ของสมการ $\log N = \frac{0.301}{T} t + \log N_o$

N คือ ความขุ่นของเชื้อเมื่อเวลา t



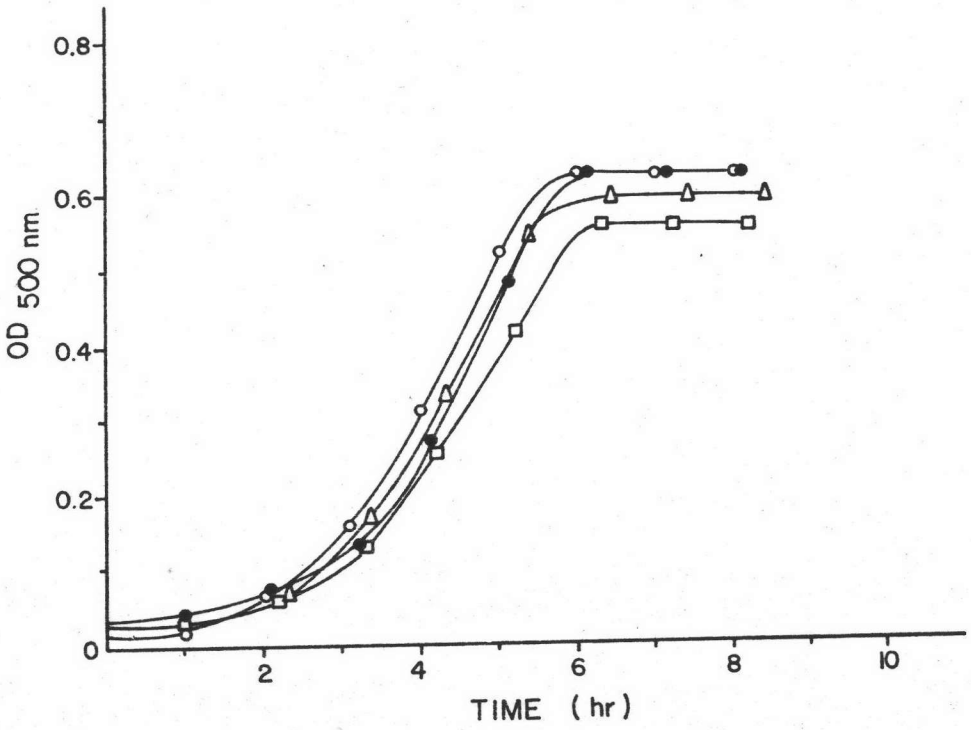
รูปที่ 3 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นคอคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37°ซ
แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

o ——— o การเจริญของไวล์ไทพ์

• ——— • การเจริญของ 27A

□ ——— □ การเจริญของ 18E

△ ——— △ การเจริญของ 35A



รูปที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.33 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37°ซ
แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

o ——— o การเจริญของไวล์ไทพ์

● ——— ● การเจริญของ 27A

□ ——— □ การเจริญของ 18E

△ ——— △ การเจริญของ 35A

ค. การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต

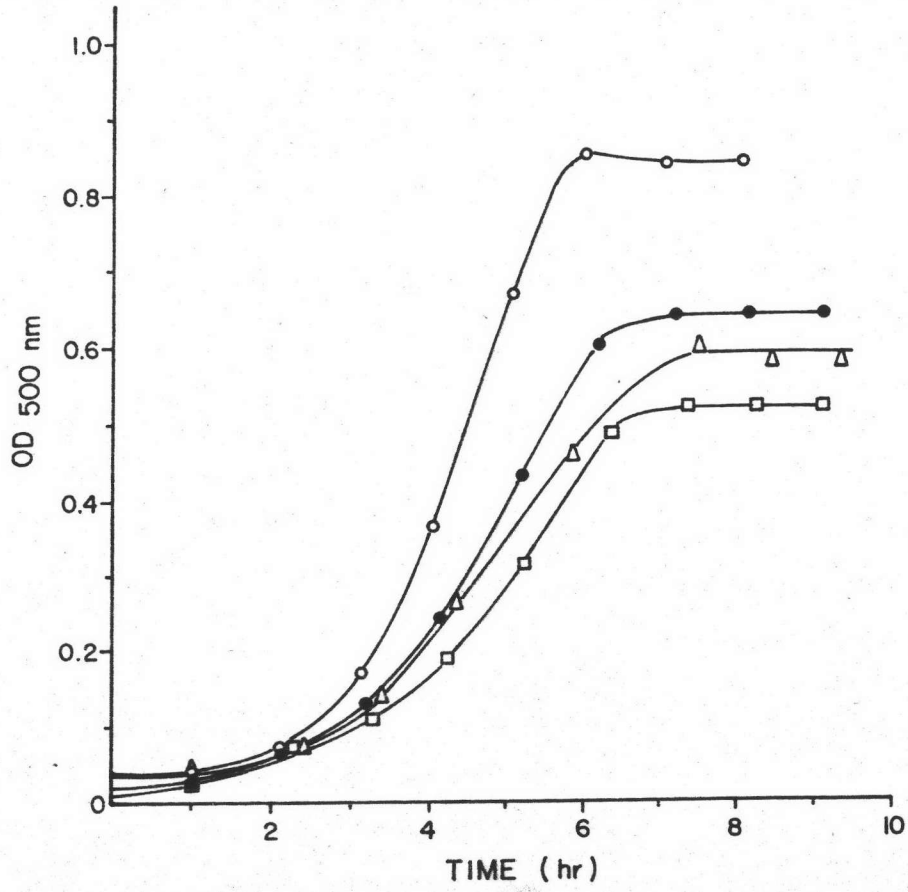
เนื่องจากเมื่อแฟคคัลเทที่ฟแบคทีเรียเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย กระบวนการ nitrate respiration จะถูกชักนำขึ้น เซลล์จะได้รับพลังงานเพิ่มขึ้นจากกระบวนการนี้อีก 2–3 โมลของ ATP ต่อ 1 โมลของไนเตรตที่ถูกรีดิวส์ (Hadjipetrou และ Stouthamer.,1965) ดังนั้นไนเตรตจึงเป็นตัวแปรที่น่าสนใจศึกษาผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.78 มิลลิโมลาร์ และเสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ (แสดงในรูปที่ 5) พบว่า ไวล์ไทพ์สามารถเจริญได้ดีกว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 กล่าวคือมีระยะแบ่งตัว 2 เท่า ลดลงเป็น 47 นาที และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุด 0.84 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ส่วนมิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญได้ดีประมาณกัน กล่าวคือมีระยะแบ่งตัว 2 เท่า เท่ากับ 60 – 62 นาที และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุด 0.52 – 0.64 หน่วย $OD_{500\ nm}$

ง. การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน

Escherichia coli สามารถใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอนเมื่อเติบโตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนได้ เมื่อมีไฮโดรเจนหรือฟอร์เมตเป็นตัวรีดิวส์ (Macy และคณะ, 1976) ในกรณีที่เติบโตในอาหารที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอนภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน แบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่รีดิวส์ฟูมาเรตเป็นซักซีเนต ซึ่งมีเอนไซม์ฟูมาเรตรีดักเทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงสามารถใช้ความสามารถในการเติบโตของแบคทีเรียในอาหารที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน ภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน เพื่อทดสอบความผิดปกติของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหรือฟูมาเรตรีดักเทสได้

จากการทดลอง ทดสอบการเจริญเติบโตของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน (แสดงในตารางที่ 4) พบว่าเมื่อไม่มีก๊าซไฮโดรเจน ทั้งไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ไม่สามารถใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน



รูปที่ 5 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 9.78 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นคอคาร์บอน เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37°ซ
แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

○ —— ○ การเจริญของไวล์ไทพ์

● —— ● การเจริญของ 27A

□ —— □ การเจริญของ 18E

△ —— △ การเจริญของ 35A

ตารางที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน

สับสเตรต	ความขุ่นสูงสุดของเชื้อ ($OD_{500\ nm}$)			
	ไวล์ไทพ์	27A	18E	35A
ฟูมาเรต[1]	0.02	0.02	0.02	0.02
ฟูมาเรต + ไฮโดรเจน[2]	0.21	0.23	0.21	0.19

1. แบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรต 30 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน ในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม ที่อุณหภูมิ 30° ซ
2. แบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรต 30 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน บรรจุอินนอคคิวลัม 3 มิลลิลิตรในขวดรูปกรวยขนาด 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ ภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน

ได้ แต่เมื่อเติบโตภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน ทั้งไวลไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเติบโตได้ประมาณกัน

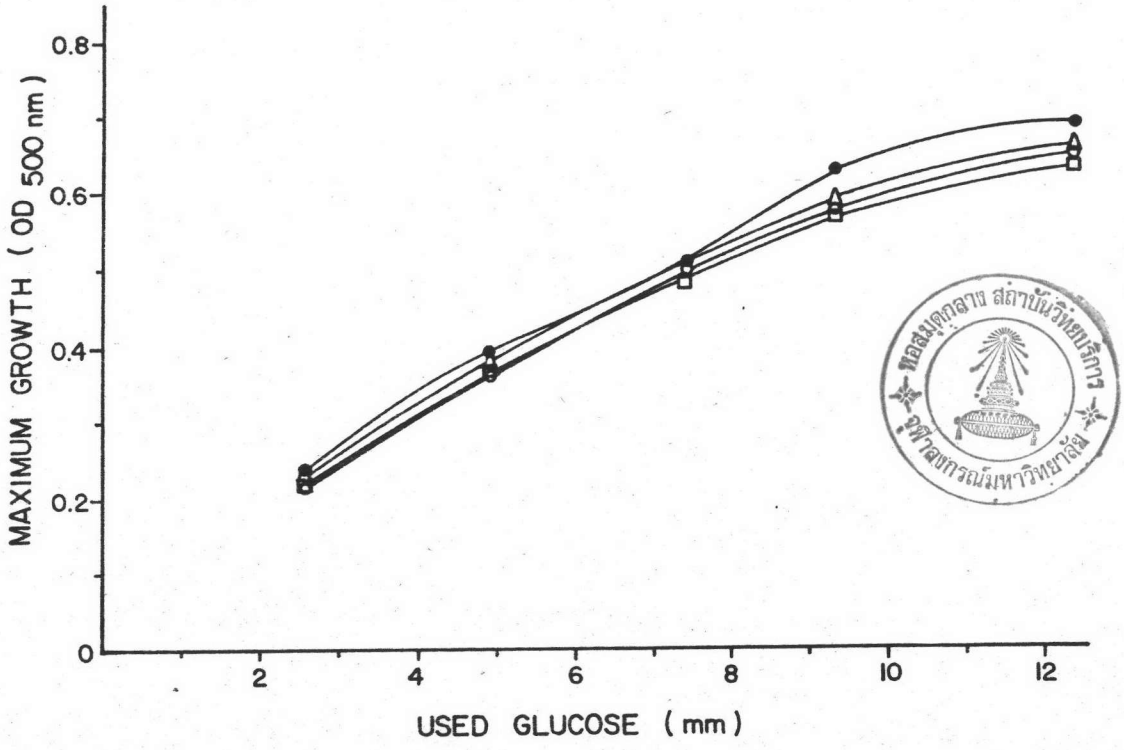
จ. <u>การเจริญสูงสุด</u> (Growth yield)

เมื่อเลี้ยงมิวแตนท์ทั้ง 3 ตัวในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต พบว่า ความขุ่นสูงสุดและระยะแบ่งตัว 2 เท่า แตกต่างไปจากไวลไทพ์ จึงน่าสนใจว่า ไนเตรตซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนนั้น อาจเป็นสาเหตุของความแตกต่างนี้ ดังนั้นจึงควรหาความขุ่นสูงสุดของเชื้อในอาหารที่จำกัดจำนวนคาร์บอน

ผลการเปรียบเทียบความขุ่นสูงสุดของไวลไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2.55 – 12.40 มิลลิโมลาร์ (แสดงผลการทดลองในรูปที่ 6) พบว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 ให้ความขุ่นสูงสุดเท่า ๆ กับไวลไทพ์ ไม่ว่าจะแปรจำนวนน้ำตาลเป็นเท่าใดก็ตาม กล่าวคือ ค่าความขุ่นสูงสุดเมื่อแบคทีเรียเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 2.55, 4.89, 7.44, 9.33 และ 12.40 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.21 – 0.23, 0.36 – 0.39, 0.48 – 0.51, 0.57–0.62 และ 0.63 – 0.69 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ตามลำดับ

เพื่อทดสอบให้แน่ใจว่า ความขุ่นสูงสุดนี้เป็นการเจริญสูงสุด (growth yield) ของเชื้อจริง จึงได้ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสก่อนและหลังการบ่ม (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5) พบว่า เมื่อกลูโคสถูกจำกัดเพียง 2.55 – 7.44 มิลลิโมลาร์นั้น เซลล์ได้ใช้กลูโคสไปทั้งหมด เพราะไม่พบกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแบคทีเรียเติบโตในระยะ stationary ในขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาณของกลูโคสเป็น 9.33 และ 12.40 มิลลิโมลาร์ พบว่าเปอร์เซนต์การใช้กลูโคสลดลงเล็กน้อย

ถ้ามิวแตนท์มีความผิดปกติที่เอนไซม์โพรูเวตฟอร์เมตไลเยส การเสริมอาซีเตตลงในอาหารควรจะทำให้การเจริญสูงสุดแตกต่างกัน (รูปที่ 1) จากการทดลองเสริมโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสแตกต่างกัน (แสดงในรูปที่ 7) จะเห็นได้ว่าอาซีเตตมิได้ทำให้ growth yield ของทั้งไวล์-ไทพ์และมิวแตนท์แตกต่างกัน ค่าความขุ่นสูงสุดของเชื้อเมื่อเติบโตในอาหารที่มีกลูโคส 2.55, 4.83, 7.39, 9.33 และ 10.38 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.21 – 0.23,



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 growth Yield ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 37° ซ แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

○ —— ○ growth yield ของไวลไทพ์

● —— ● growth yield ของ 27 A

□—— □ growth yield ของ 18 E

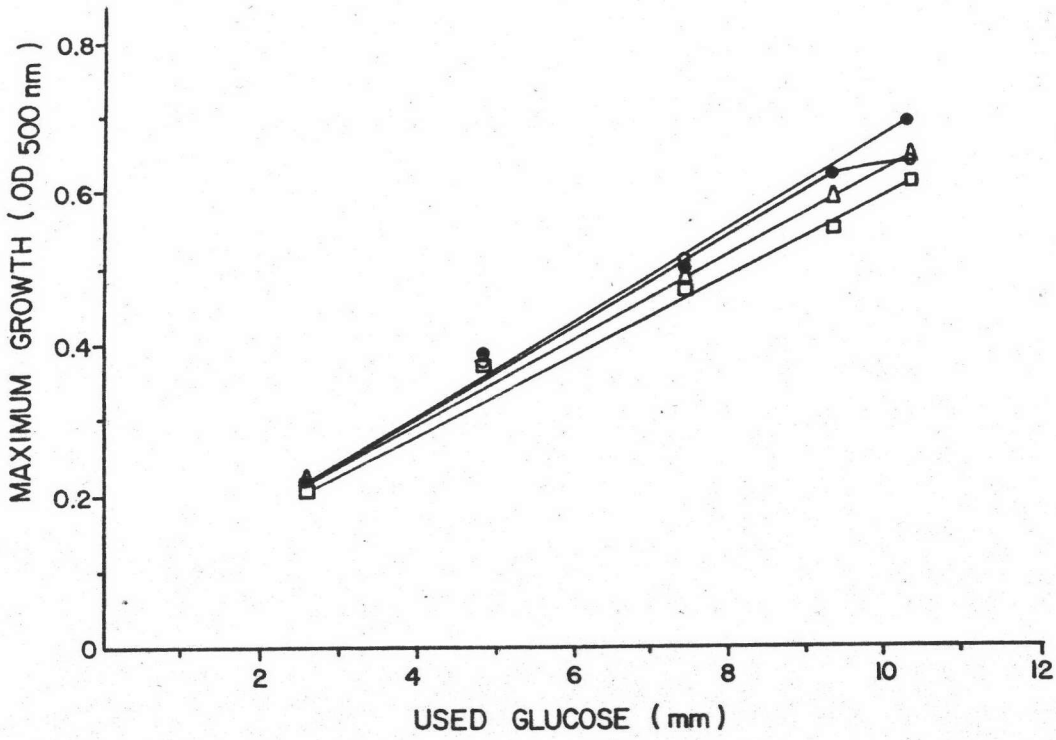
△—— △ growth yield ของ 35 A

ตารางที่ 5 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน

หมายเลขสายพันธุ์	ปริมาณกลูโคสทั้งหมด[1] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสสุดท้าย[2] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (เปอร์เซนต์)
WT	12.40	0.05	12.35	99.60
27A		0.07	12.33	99.44
18E		0.07	12.33	99.44
35A		0.07	12.33	99.44
WT	9.33	0.07	9.26	99.25
27A		0.02	9.31	99.79
18E		0.02	9.31	99.79
35A		0.03	9.30	99.68
WT	7.44	0.04	7.40	99.46
27A		0.00	7.44	100
18E		0.00	7.44	100
35A		0.00	7.44	100
WT	4.89	0.00	4.89	100
27A		0.00	4.89	100
18E		0.00	4.89	100
35A		0.00	4.89	100
WT	2.55	0.00	2.55	100
27A		0.00	2.55	100
18E		0.00	2.55	100
35A		0.00	2.55	100

1. ค่าที่รายงานเป็นผลเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง
ดังรายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง ข้อ 8.2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 growth yield ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่างๆกัน เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ
แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

O——O growth yield ของไวลด์ไทพ์

●——● growth yield ของ 27 A

□——□ growth yield ของ 18 E

△——△ growth yield ของ 35 A

ตารางที่ 6 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน และเสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต 10 มิลลิโมลาร์

หมายเลขสายพันธุ์	ปริมาณกลูโคสตั้งต้น[1] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสสุดท้าย[2] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (เปอร์เซนต์)
WT	10.38	0.09	10.29	99.13
27A		0.12	10.26	98.84
18E		0.10	10.28	99.04
35A		0.07	10.31	99.33
WT	9.33	0.04	9.29	99.57
27A		0.04	9.29	99.57
18E		0.03	9.30	99.68
35A		0.03	9.30	99.68
WT	7.39	0.00	7.39	100
27A		0.02	7.37	99.73
18E		0.02	7.37	99.73
35A		0.00	7.39	100
WT	4.83	0.00	4.83	100
27A		0.02	4.81	99.59
18E		0.02	4.81	99.59
35A		0.00	4.83	100
WT	2.55	0.00	2.55	100
27A		0.00	2.55	100
18E		0.00	2.55	100
35A		0.00	2.55	100

1. ค่าที่รายงานเป็นผลเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.2

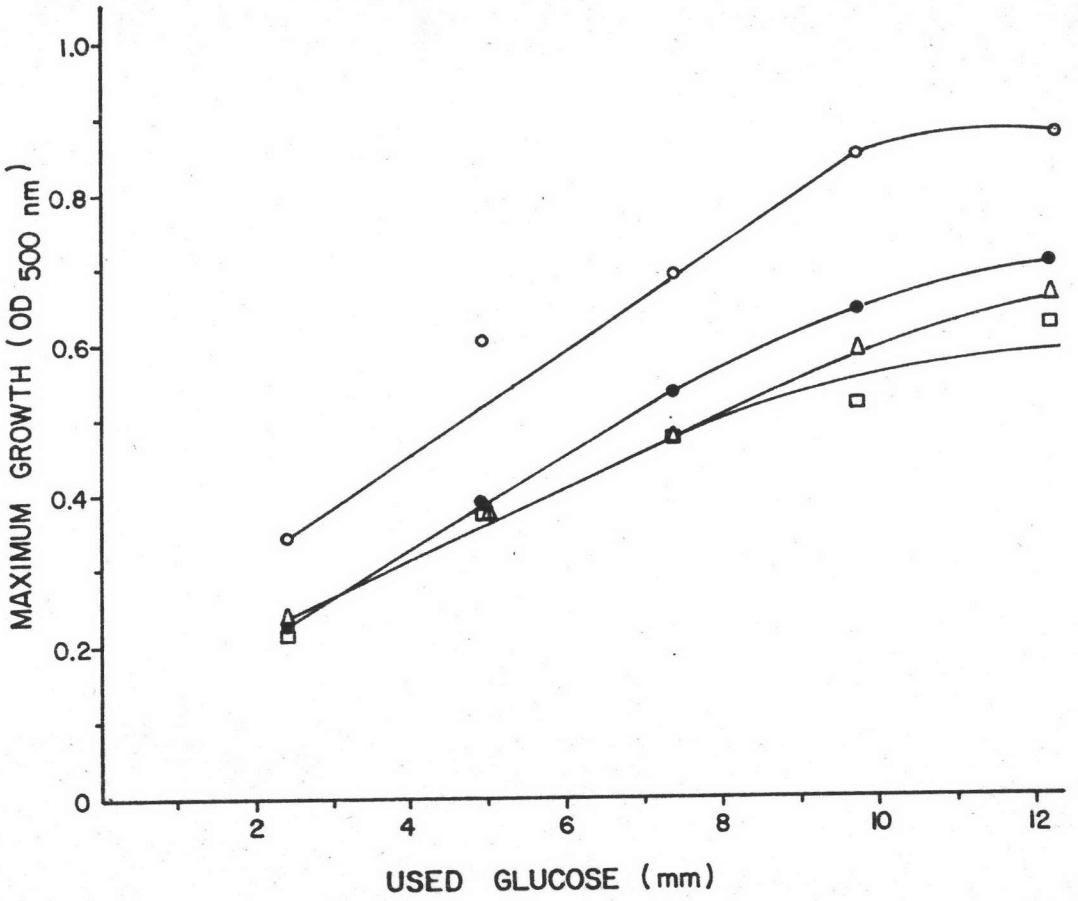
0.36 – 0.38, 0.47 – 0.51, 0.55 – 0.62 และ 0.61 – 0.69 หน่วย OD 500 nm ตามลำดับ รวมทั้งการใช้กลูโคสไประหว่างการเจริญเติบโตยังคงอยู่ในช่วงเกือบ 100 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 6) น่าสังเกตว่า ค่าการเจริญสูงสุดที่ได้ครั้งนี้เท่า ๆ กับค่าที่ได้จากการทดลองในอาหารที่ไม่เสริมด้วยอาซีเตตอีกด้วย

โดยการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ครั้งนี้เสริมโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ลงในทุก ๆ ความเข้มข้นของกลูโคส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 พบว่าไวล์ทพ์มีความเจริญสูงสุดสูงขึ้น คือ ค่าความขุ่นของเซลล์ที่กลูโคส 2.39, 4.94, 7.39, 9.78 และ 12.29 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.34, 0.60, 0.7, 0.84 และ 0.87 หน่วย OD 500 nm ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าดังกล่าวนี้เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการเจริญสูงสุดในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารที่เสริมด้วยอาซีเตตซึ่งได้ทดลองผ่านมานั้น จะเป็นค่าที่สูงกว่า ส่วนมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งให้ค่าความขุ่นสูงสุดของเซลล์ที่ปริมาณกลูโคส 2.39, 4.94, 7.39, 9.78 และ 12.29 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.22 – 0.24, 0.37 – 0.39, 0.48 – 0.53, 0.52 – 0.64 และ 0.62 – 0.7 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ตามลำดับ ค่าดังกล่าวนี้ไม่แตกต่างจากค่าที่ได้จากอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่เสริมด้วยอาซีเตตซึ่งทดลองผ่านมาแล้ว ส่วนการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือในสารอาหาร แสดงในตารางที่ 7 พบว่า แบคทีเรียทุกตัวไม่ว่าจะเป็นไวล์ทพ์หรือมิวแตนท์ ต่างก็ใช้น้ำตาลกลูโคสแทบหมดสิ้น ทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดลอง

ช. การต้านคลอเรต

อนุมูลคลอเรต (ClO_3^-) เป็นแอนาลอค (analog) ของอนุมูลไนเตรต (NO_3^-) และสามารถถูกรีดิวส์ได้ด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เป็นอนุมูลคลอไรต์ (ClO_2^-) ซึ่งจะเป็นพิษต่อเซลล์ (Konings และ Boonstra, 1977) ดังนั้นอนุมูลคลอเรตจะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์คลอเรตได้ อนุมูลคลอเรตจึงเป็นตัวแปรที่น่าสนใจอีกตัวหนึ่ง

การทดลองผลกระทบของคลอเรตต่อการเจริญเติบโตของไวล์ทพ์ แสดงในรูปที่ 9a ได้แยกเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร 2 ชนิด อาหารชนิดที่ 1 เป็นอาหารสูตร



รูปที่ 8 growth yield ของแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 37° ซ

แบคทีเรียถูกเลี้ยงในหลอดจุกเกลียวที่บรรจุอาหารเต็ม สามารถอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงได้โดยตรง

o ——— o growth yield ของไวลด์ไทพ์

● ——— ● growth yield ของ 27 A

□ ——— □ growth yield ของ 18 E

△ ——— △ growth yield ของ 35 A

ตารางที่ 7 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน และเสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์

หมายเลขสายพันธุ์	ปริมาณกลูโคสตั้งต้น[1] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสสุดท้าย[2] (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป (เปอร์เซนต์)
WT	12.29	0.07	12.22	99.43
27A		0.14	12.15	98.86
18E		0.14	12.15	98.86
35A		0.10	12.19	99.19
WT	9.78	0.07	9.71	99.28
27A		0.09	9.69	99.08
18E		0.09	9.69	99.08
35A		0.07	9.71	99.28
WT	7.39	0.04	7.35	99.46
27A		0.04	7.35	99.46
18E		0.04	7.35	99.46
35A		0.03	7.36	99.59
WT	4.94	0.02	4.92	99.60
27A		0.04	4.90	99.19
18E		0.04	4.90	99.19
35A		0.00	4.94	100
WT	2.39	0.00	2.39	100
27A		0.02	2.37	99.16
18E		0.02	2.37	99.16
35A		0.00	2.39	100

1. ค่าที่รายงานเป็นผลเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง
2. รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.2

ปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน ส่วนอาหารชนิดที่ 2 นั้น เป็นอาหารชนิดเดียวกับชนิดแรก แต่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า ถ้าเพิ่มโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ ไวล์-ไทพ์จะเจริญได้เพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ความขุ่นของเซลล์เพิ่มจาก 0.01 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เป็น 0.05 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ภายในเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ และความขุ่นของเซลล์จะเพิ่มจาก 0.01 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เป็น 0.07 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ หลังจากนี้แล้ว การเจริญของไวล์ไทพ์ในอาหารทั้ง 2 ชนิดจะหยุดชะงักลง สังเกตได้จากค่าความขุ่นของเซลล์คงที่ตลอดการทดลอง

เมื่อปล่อยให้ไวล์ไทพ์เจริญในอาหารที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรตจนถึงระยะ **mid log** แล้วจึงเติมคลอเรตปริมาณเดียวกันลงไป พบว่าความขุ่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย กล่าวคือเพิ่มจาก 0.47 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เป็น 0.54 หน่วย $OD_{500\ nm}$ หลังจากเติมโปตัสเซียมคลอเรตแล้ว 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นความขุ่นของเซลล์จะคงที่ตลอดการทดลอง

น่าสังเกตว่า เมื่อไวล์ไทพ์เติบโตในอาหารที่มิได้เสริมด้วยไนเตรตแล้วเติมโปตัสเซียมคลอเรตลงในระยะ **mid log** ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยไนเตรต กล่าวคือ ความขุ่นของเซลล์จะเพิ่มจาก 0.38 หน่วย $OD_{500\ nm}$ เป็น 0.41 หน่วย $OD_{500\ nm}$ หลังจากเติมโปตัสเซียมคลอเรตแล้ว 0.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นความขุ่นของเซลล์จะคงที่ตลอดการทดลอง

การทดลองผลกระทบของคลอเรตต่อการเจริญเติบโตของมิวแตนท์สายพันธุ์ 27 A แสดงในรูป 9 b โดยการออกแบบการทดลองเช่นเดียวกับกรณีของไวล์ไทพ์ พบว่า ไม่ว่าจะเติมโปตัสเซียมคลอเรตลงในอาหารทั้ง 2 ชนิด ตั้งแต่เริ่มต้นบ่ม หรือภายหลังจากที่ได้เจริญจนถึงระยะ **mid log** แล้วก็ตาม สายพันธุ์ 27 A ยังคงเจริญต่อไปได้ตามปกติ เสมือนหนึ่งว่ามิได้มีคลอเรตอยู่ด้วย

ส่วนการทดลองผลของคลอเรตต่อการเจริญเติบโตของมิวแตนท์สายพันธุ์ 18E และ 35A นั้น แสดงในรูป 9c และ 9 d ตามลำดับ ซึ่งได้ผลการทดลอง

รูปที่ 9 การทดสอบการต้านคลอเรตของแบคทีเรีย

รูปที่ 9a การทดสอบการต้านคลอเรตของไวล์ไทพ์

รูปที่ 9b การทดสอบการต้านคลอเรตของ 27A

รูปที่ 9c การทดสอบการต้านคลอเรตของ 18E

รูปที่ 9d การทดสอบการต้านคลอเรตของ 35A

⊙——⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์

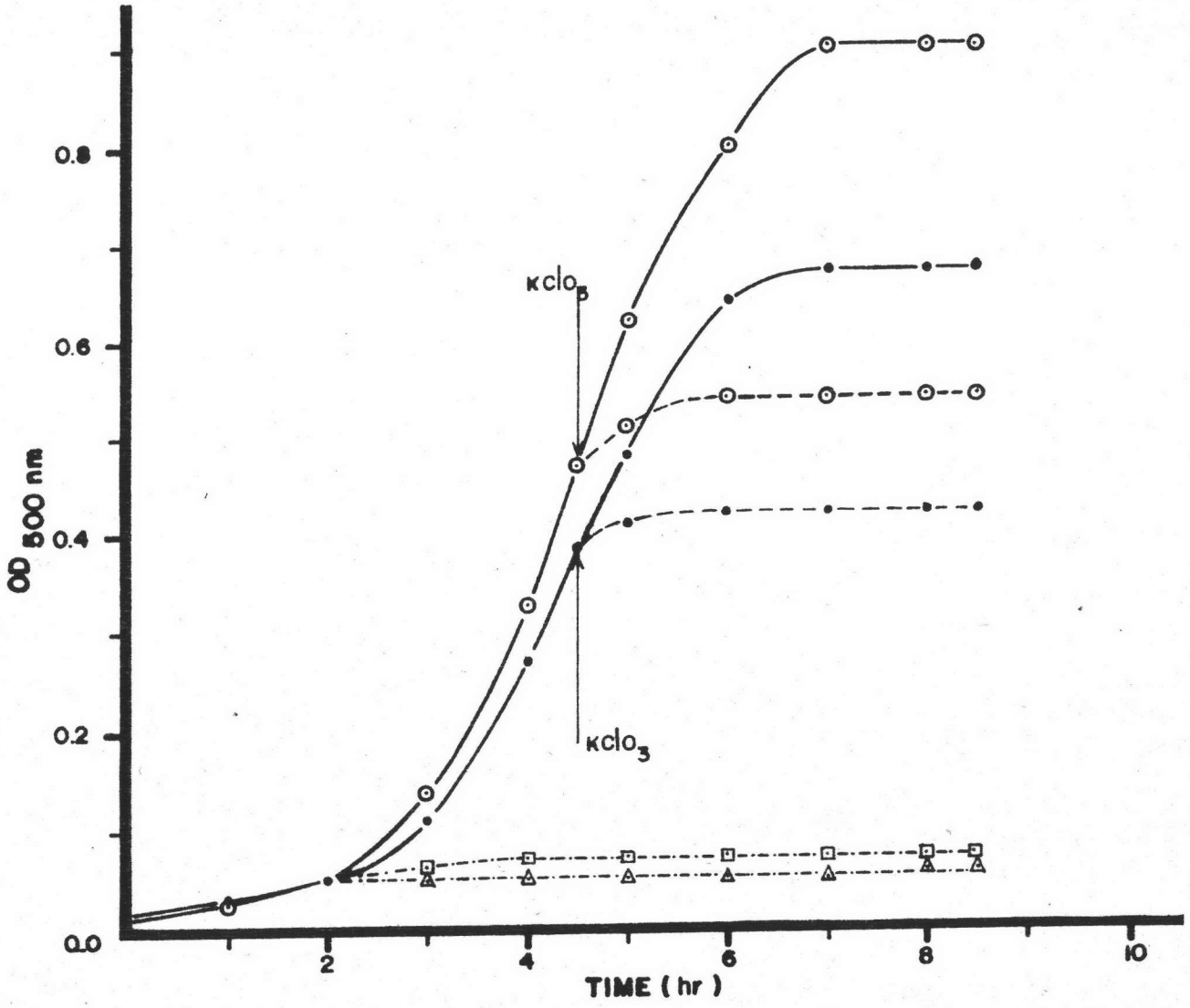
●——● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์

⊙------⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

●------● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

⊡-•-•-•-⊡ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์

▽-•-•-•-▽ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 9a

รูปที่ 9 การทดสอบการต้านคลอเรตของแบคทีเรีย

รูปที่ 9a การทดสอบการต้านคลอเรตของไวล์ไทพ์

รูปที่ 9b การทดสอบการต้านคลอเรตของ 27A

รูปที่ 9c การทดสอบการต้านคลอเรตของ 18E

รูปที่ 9d การทดสอบการต้านคลอเรตของ 35A

⊙——⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์

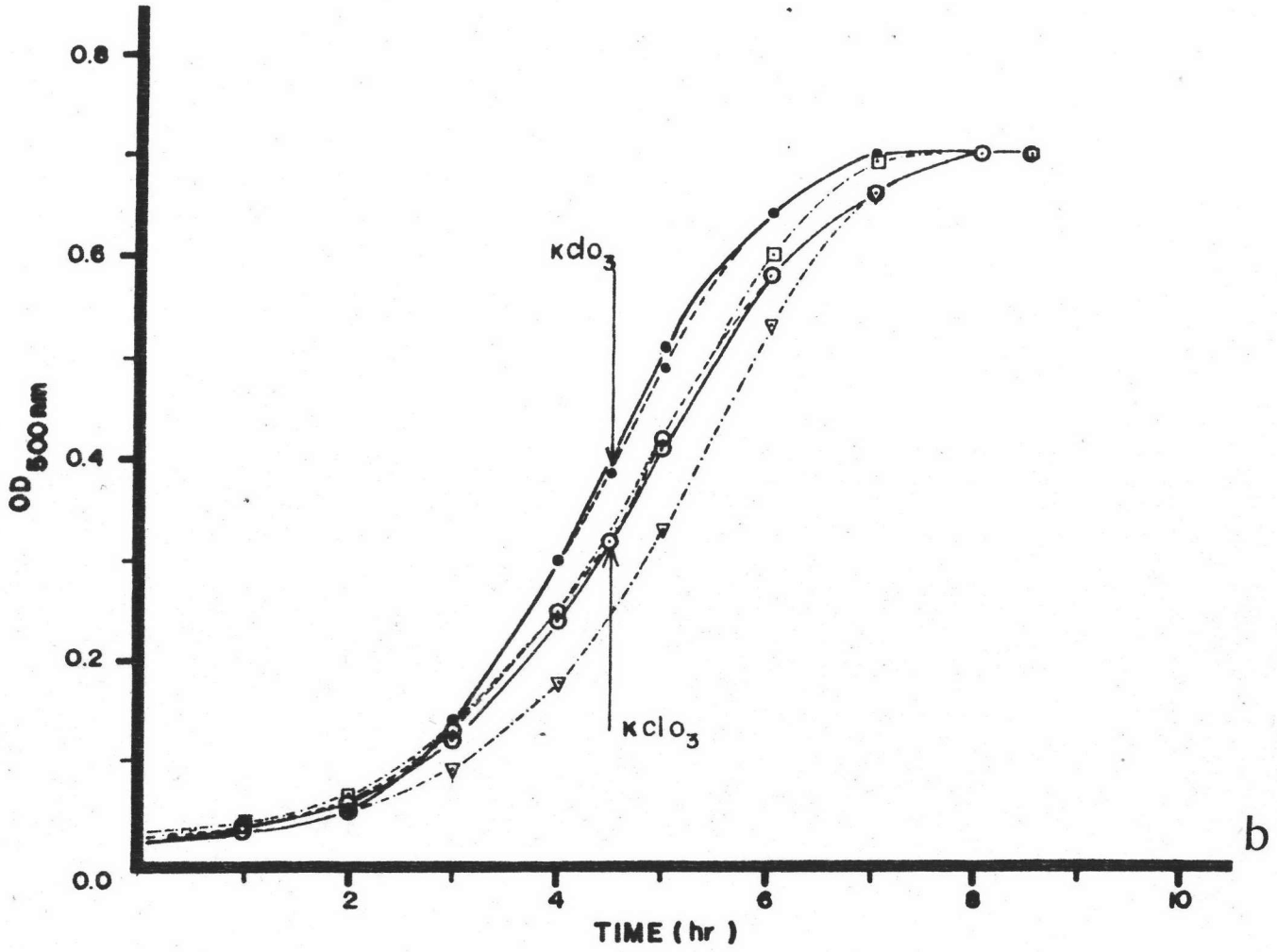
●——● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์

⊙------⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

●------● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

⊡-•-•-•-⊡ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์

▽-•-•-•-▽ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 9b

รูปที่ 9 การทดสอบการต้านคลอเรตของแบคทีเรีย

รูปที่ 9a การทดสอบการต้านคลอเรตของไวลไทพ์

รูปที่ 9b การทดสอบการต้านคลอเรตของ 27A

รูปที่ 9c การทดสอบการต้านคลอเรตของ 18E

รูปที่ 9d การทดสอบการต้านคลอเรตของ 35A

⊙——⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์

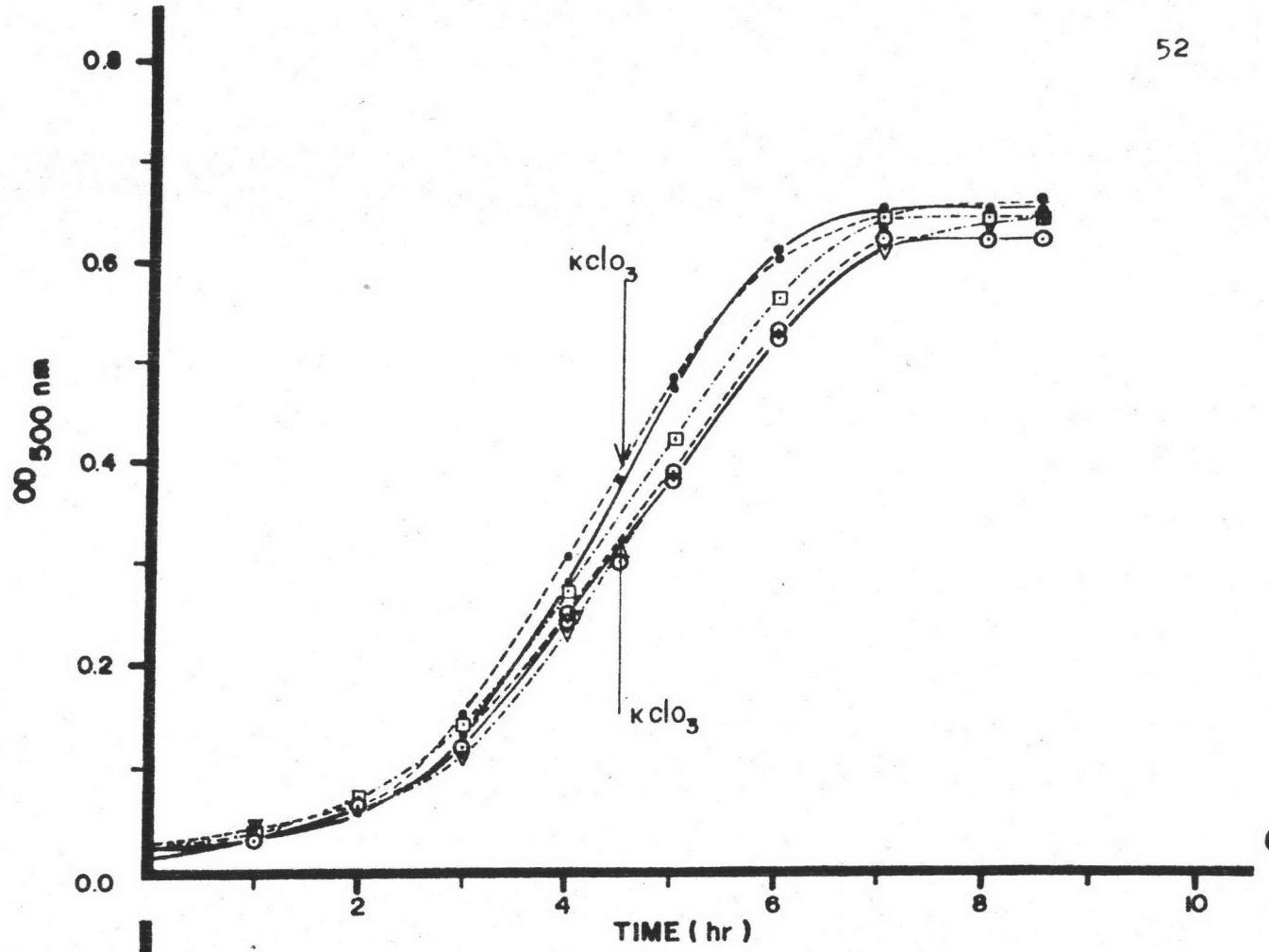
●——● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์

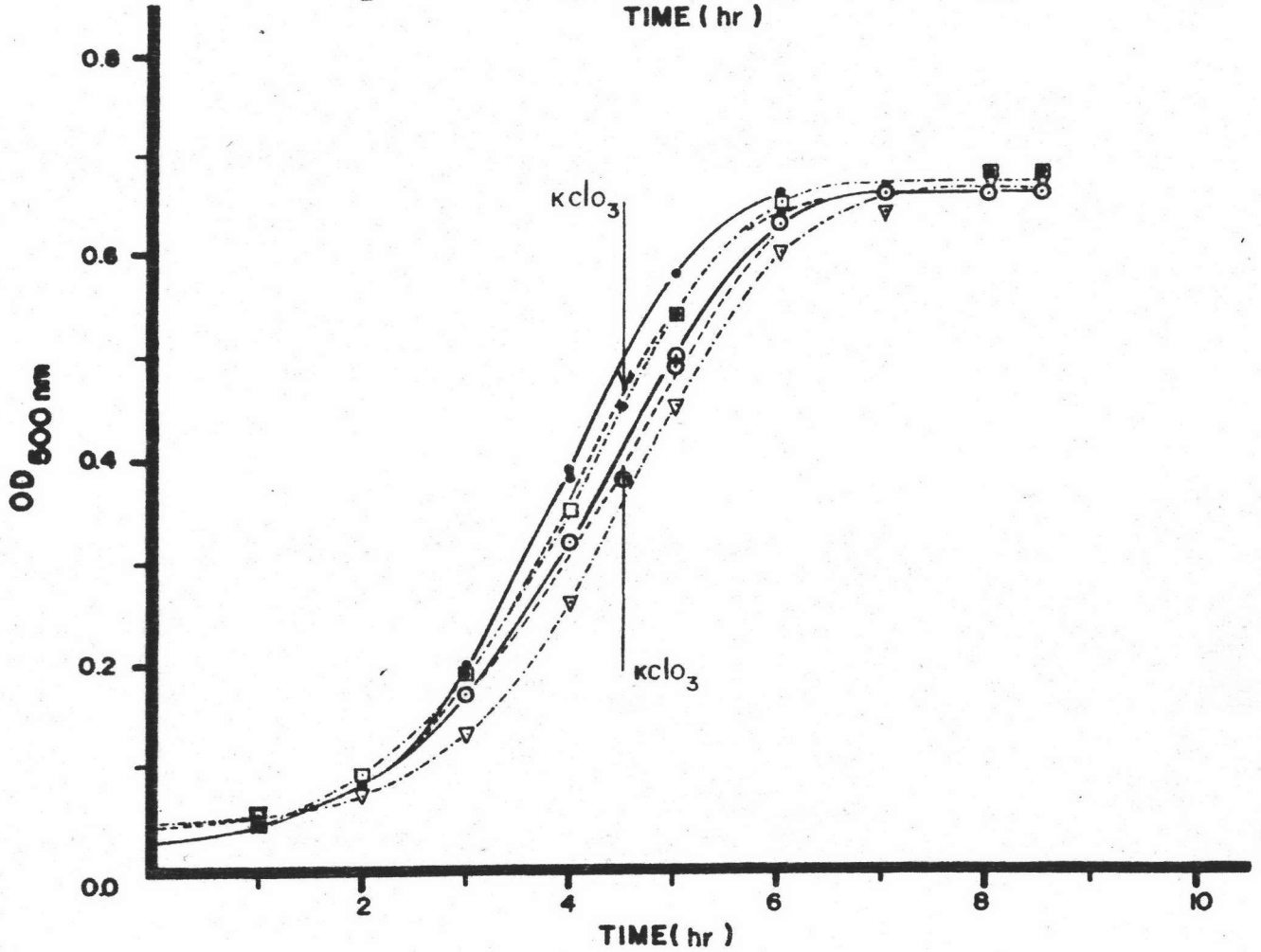
⊙------⊙ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

●------● การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เติมโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์ที่ mid log phase

⊡-•-•-•-⊡ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์

▽-•-•-•-▽ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 12.5 มิลลิโมลาร์ และโปตัสเซียมคลอเรต 10 มิลลิโมลาร์


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD 500 nm
KClO3
KClO3
2
4
6
8
10
TIME (hr)
C


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD 500 nm
KClO3
KClO3
2
4
6
8
10
TIME(hr)
d

รูปที่ 9c และ 9d

เช่น เดียวกับมิวแตนท์สายพันธุ์ 27 A

3.3 การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเติบโตของแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ก. ปริมาณอนุมูลไนไตรต์

เมื่อแบคทีเรียเติบโตในอาหารที่มีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ไนเตรตจะถูกรีดิวส์เป็นไนไตรต์โดยมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์จะมีไนไตรต์สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการวัดปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเติบโตในอาหารที่มีไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (รูปที่ 10) พบว่า เมื่อไวล์ทพ์เจริญในอาหารดังกล่าว สามารถวัดไนไตรต์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ไวล์ทพ์เริ่มเจริญเติบโต และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อไวล์ทพ์แบ่งตัวในระยะ exponential จนมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 3.8 มิลลิโมลาร์ เมื่อไวล์ทพ์แบ่งตัวเข้าสู่ระยะ late log (ชั่วโมงที่ 5) เมื่อไวล์ทพ์แบ่งตัวเข้าสู่ระยะ stationary ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง ซึ่งน่าสังเกตว่าความขุ่นของเซลล์ยังคงที่ ตรงกันข้ามกับมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต จะไม่ปรากฏไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary แล้วประมาณ 3 ชั่วโมง จึงพบไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อบ้าง แต่ปริมาณที่เพิ่มขึ้นก็ยังน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ตรวจสอบได้จากไวล์ทพ์

ข. ชนิดและปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น

เมื่อแฟคคัลเททีฟแบคทีเรียเติบโตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนจะมีผลิตภัณฑ์จากการเฟอร์เมนต์เป็นก๊าซ 2 ชนิด คือ คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน จึงทดสอบก๊าซที่เกิดขึ้นเมื่อไวล์ทพ์และมิวแตนท์เจริญในสภาพแอนแนโรบิคด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ ใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่สามารถใช้ทดสอบก๊าซทั้ง 2 ชนิดได้

รูปที่ 10 a การเจริญของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37° ซ

⊙ ——— ⊙ การเจริญของไวล์ไทพ์

● ——— ● การเจริญของ 27A

⊡ ——— ⊡ การเจริญของ 18E

▽ ——— ▽ การเจริญของ 35A

รูปที่ 10 b ปริมาณอนุมูลไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญในสภาวะตามรูปที่ 10a

⊙ ------ ⊙ ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของไวล์ไทพ์

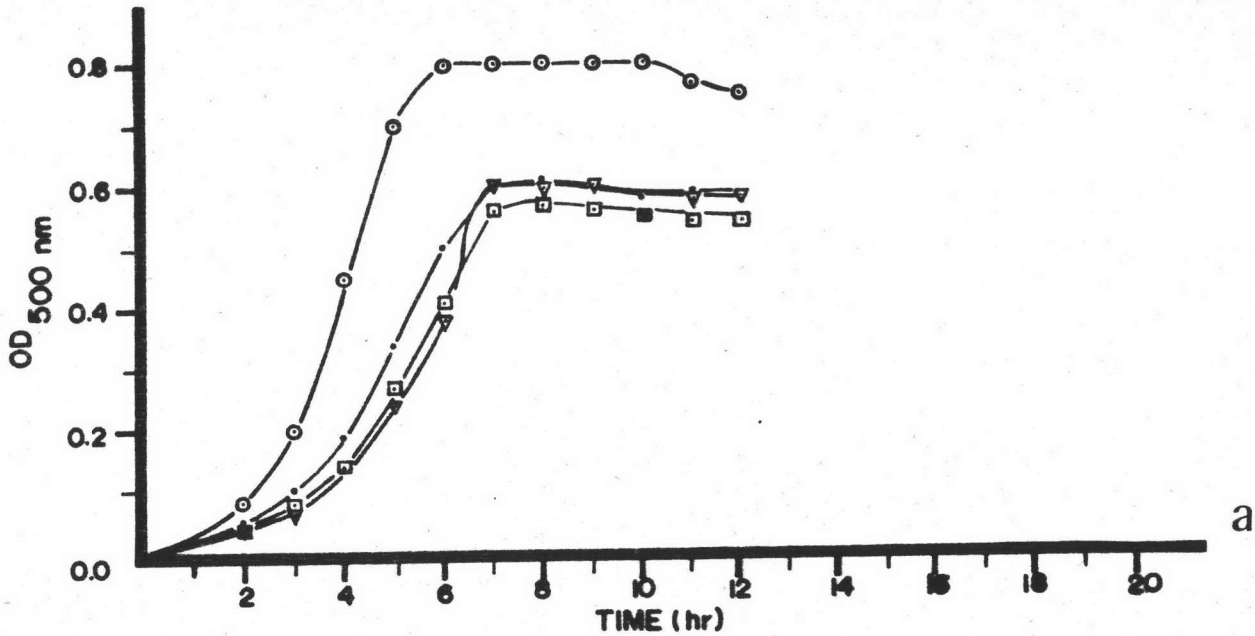
● ------ ● ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของ 27A

⊡ ------ ⊡ ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของ 18E

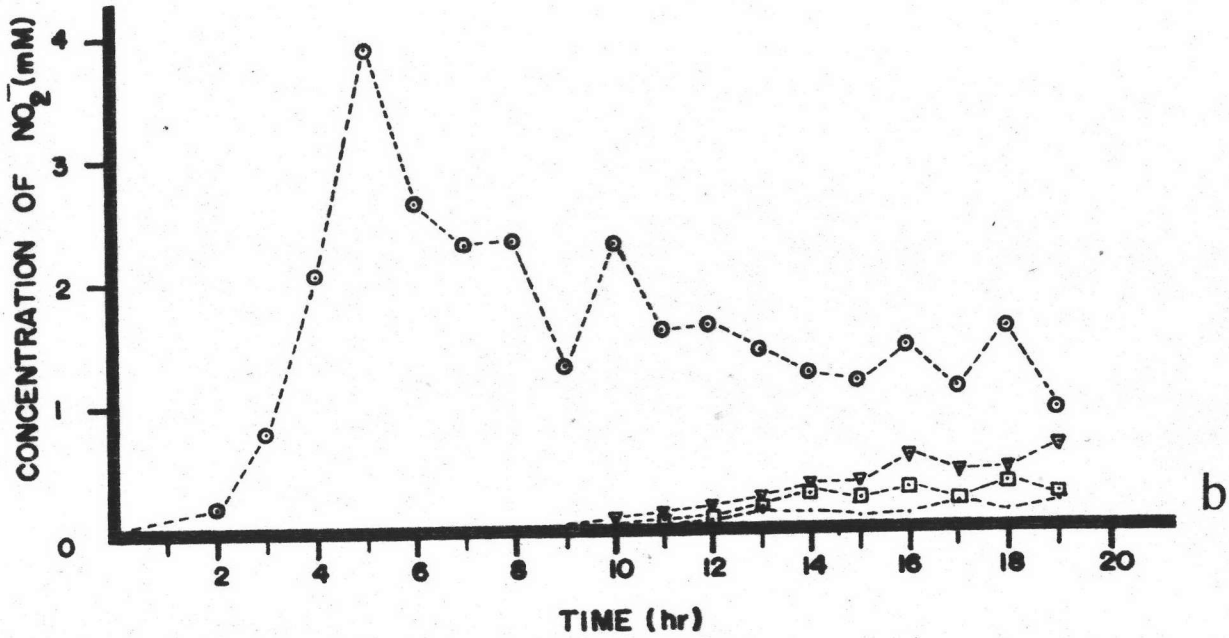
▽ ------ ▽ ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของ 35A

ค่าที่รายงานเป็นผลเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.3



a



b

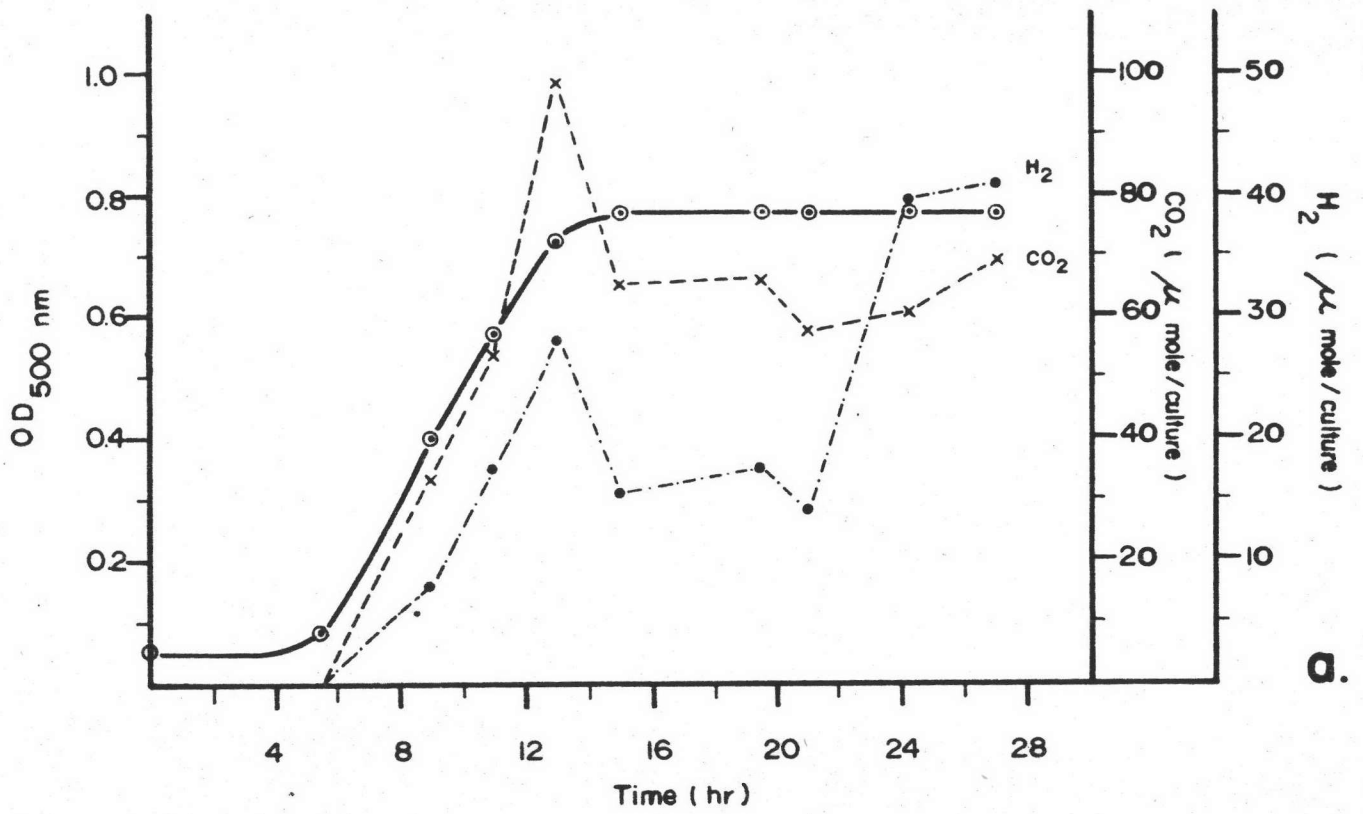
รูปที่ 10a และ 10b

จากการทดลองทดสอบก๊าซที่เกิดขึ้นเมื่อไวลไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอนและเสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 27 มิลลิโมลาร์ ภายใต้บรรยากาศของอาร์กอน โดยทำการทดลองตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.1 (แสดงในรูป 11a) พบว่าไวลไทพ์สามารถเติบโตได้ดี มีความขุ่นของเซลสูงสุดเท่ากับ 0.77 หน่วย OD 500 nm สามารถทดสอบก๊าซได้ 2 ชนิด มี retention time เท่ากับ 0.85 นาที และ 12.75 นาที ซึ่งตรงกับ retention time ของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาตรฐานตามลำดับ ก๊าซทั้ง 2 ชนิดจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อความขุ่นของเซลล์เพิ่มขึ้น สามารถวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 98 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์ และ 28 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์ตามลำดับ เมื่อไวลไทพ์เจริญเข้าสู่ระยะ late log (ชั่วโมงที่ 12.5) ปริมาณก๊าซทั้ง 2 ชนิดจะลดลง เมื่อไวลไทพ์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary กล่าวคือ คาร์บอนไดออกไซด์จะลดลงเหลือ 65 – 70 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์ และคงที่อยู่เช่นนี้เมื่อไวลไทพ์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary แล้ว 5 ชั่วโมง ส่วนก๊าซไฮโดรเจนจะลดลงเหลือ 15 – 17 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์ เมื่อไวลไทพ์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary แล้ว 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 40 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์

จากการทดสอบก๊าซที่เกิดขึ้นเมื่อมิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ 27A 18E และ 35 A เจริญในสภาวะเดียวกับไวลไทพ์ (แสดงในรูป 11b , 11c และ 11d ตามลำดับ) พบว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์เจริญได้น้อยกว่าไวลไทพ์ กล่าวคือมีความขุ่นสูงสุดของเซลเท่ากับ 0.25 – 0.3 หน่วย OD 500 nm ไม่สามารถตรวจสอบก๊าซไฮโดรเจนได้เลย แต่จะสามารถตรวจสอบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจสอบได้นั้น ต่ำกว่าของไวล์ไทพ์ กล่าวคือมีปริมาณเท่ากับ 30–40 ไมโครโมลต่อคัลเจอร์ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังคงเพิ่มขึ้น แม้ว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 จะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary แล้วก็ตาม

4. <u>แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส</u>

สรีรสมบัติต่าง ๆ ที่ศึกษาผ่านมาพอเป็นดัชนีที่แสดงได้ว่า มิวแตนท์ที่



รูปที่ 11 การเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยไซเดียมฟอร์เมต 27 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ

รูปที่ 11 a การเจริญและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนของไวลไทพ์

⊙ —— ⊙ การเจริญของแบคทีเรีย

● -·-·-·-● ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

x------x ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.1

รูปที่ 11 การเจริญของแบคทีเรีย และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 27 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ

รูปที่ 11b การเจริญและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ของ 27A

รูปที่ 11c การเจริญและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ของ 18E

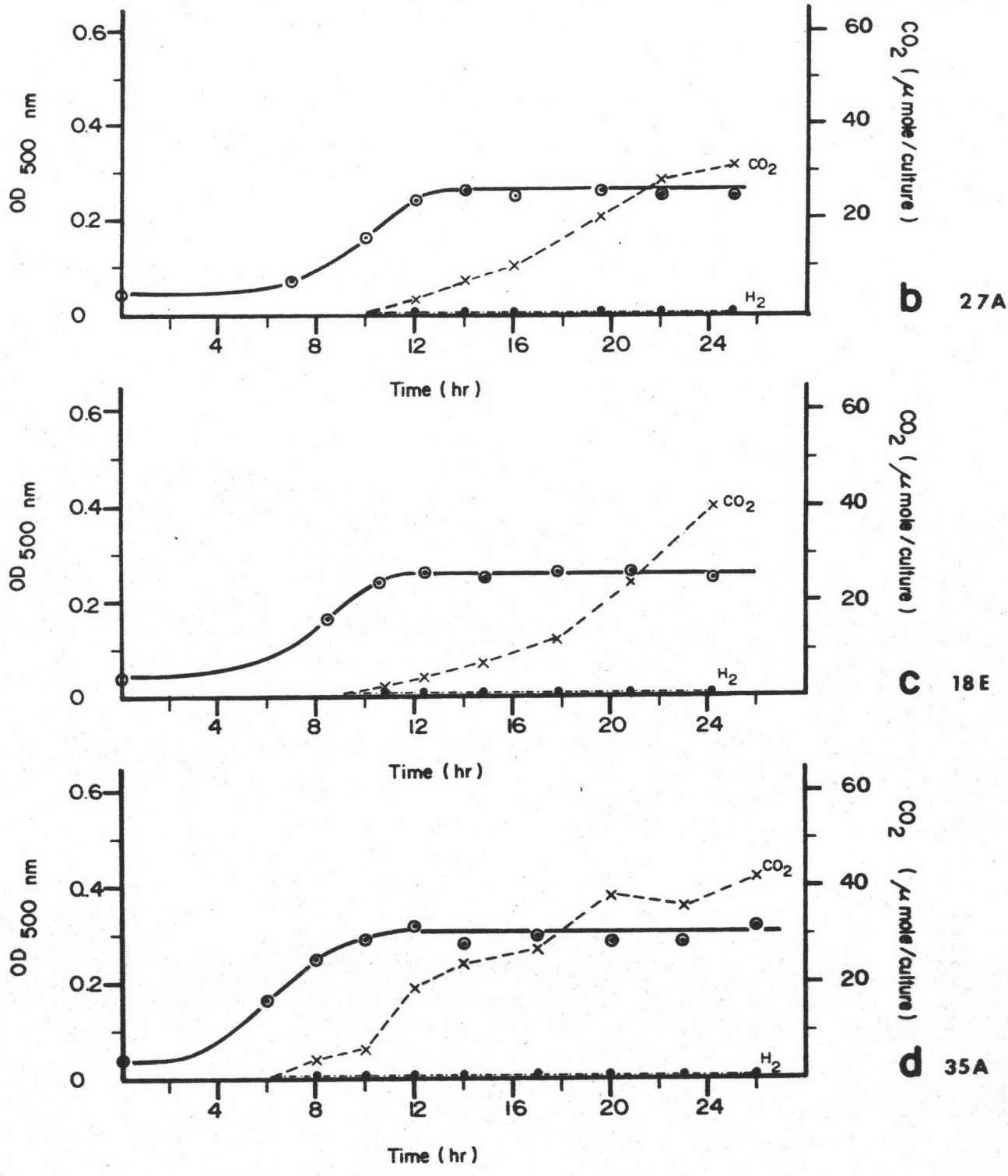
รูปที่ 11d การเจริญและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ของ 35A

⊙ ——— ⊙ การเจริญของแบคทีเรีย

●-•-·-·-● ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

x------x ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.1



รูปที่ 11b, 11c และ 11d

แยกได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ดังนั้น ถ้าหากสามารถทดสอบได้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 ไม่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ จะทำให้เชื่อมั่นได้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสจริง

เป็นไปได้ว่า การผิดปกติของมิวแตนท์อาจแสดงคุณสมบัติ pleiotropic effect ดังนั้นในที่นี้จึงได้ทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ฟอร์ม

4.1 การเตรียมเยื่อเซลล์

เนื่องจากในขณะที่ทำการทดลองนี้ ยังไม่มี French Press ในคณะวิทยาศาสตร์ ในครั้งแรกจึงลองเตรียมเยื่อเซลล์ด้วยวิธี sonication แยกชั้นเยื่อเซลล์มาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ปรากฏผลว่า ค่าความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ได้ไม่เป็นเส้นตรง (จึงมิได้รายงานไว้) สันนิษฐานว่าเอนไซม์คงถูกทำลายด้วยออกซิเจนจากอากาศ เพราะถึงแม้ว่าได้พยายามปกป้องโฮโมจิเนตด้วยการผ่านก๊าซไนโตรเจนลงไปขณะเตรียมเยื่อเซลล์แล้ว ก็ยังไม่ช่วยให้การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ดีขึ้น

ได้ลองเปลี่ยนวิธีเตรียมเยื่อเซลล์ใหม่ โดยใช้การทำลายเซลล์ 3 ขั้นตอน ดังรายละเอียดในบทที่ 2 ข้อ 9.2 กล่าวคือ ขั้นตอนที่ 1 โดยการใช้ EDTA 5 มิลลิโมลาร์และไลโซไซม์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ที่มีซูโครส 0.25 โมลาร์ ขั้นตอนที่ 2 นำโฮโมจิเนตจากขั้นที่ 1 มาทำให้แข็งโดยแช่ในไนโตรเจนเหลว 3 นาที นำไปทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 50° ซ 1.5 นาที ทำซ้ำ 6 ครั้ง ขั้นที่ 3 นำโฮโมจิเนตที่ได้จากขั้นที่ 2 มาทำ osmotic lysis โดยการเจือจางโฮโมจิเนตที่มีซูโครส 0.25 โมลาร์ลง 20 เท่า การเตรียมเยื่อเซลล์ด้วยวิธีนี้ จะสามารถแยกเยื่อเซลล์ได้ประมาณ 7 มิลลิกรัม จากเซลล์ตั้งต้นประมาณ 0.6 กรัม ปรากฏว่าวิธีนี้สามารถป้องกันโฮโมจิเนตจากออกซิเจนได้ดีกว่า จึงใช้วิธีนี้ในการเตรียมเยื่อเซลล์เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

4.2 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H คือการวัดการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นโปรตอน และอิเล็กตรอน โดยใช้เบนซิลไวโอโลเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังปฏิกิริยา

$$HCOOH \longrightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^- \begin{cases} \xrightarrow{BV} \text{oxidized} & \text{(ไม่มีสี)} \\ \xrightarrow{BV} \text{reduced} & \text{(สีม่วง)} \end{cases}$$

เนื่องจากเบนซิลไวโอโลเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์ซึ่งจะมีสีม่วงเมื่อ ถูกรีดิวส์ จึงสามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการถูกแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวล์ไทพ์ แสดงในตารางที่ 8 สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H จากเยื่อเซลล์ของไวล์ไทพ์ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัย 0.18 – 1.88 มิลลิกรัมได้เท่ากับ 135 – 622 นาโนโมลของเบนซินไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์นี้มีค่าอยู่ในพิสัย 331 – 895 นาโนโมลของเบนซิลไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวส์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวล์ไทพ์ แสดงในรูปที่ 12 จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีนเมื่อปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0 – 0.4 มิลลิกรัม เมื่อปริมาณโปรตีนสูงขึ้นกว่านี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงอีกต่อไป ถึงกระนั้นก็ตาม ด้วยปริมาณโปรตีนในช่วงเดียวกับที่สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้จากเยื่อเซลล์ของไวล์ไทพ์ จะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในเยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 เลย (ตารางที่ 9)

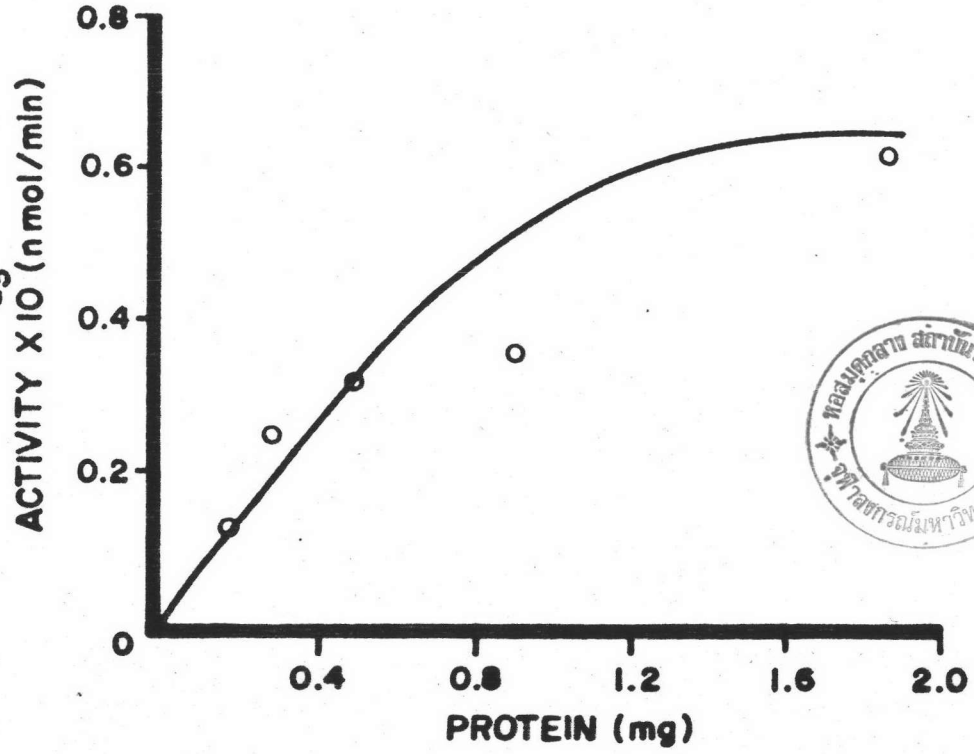
4.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N คือ การวัดการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นโปรตอน และอิเล็กตรอน โดยใช้ฟีนาซีนเมโธ-

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวลโทพ์

ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	การเปลี่ยนแปลงความเข้มการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร/นาที	แอคติวิตี[1] (นาโนโมล/นาที)	แอคติวิตีจำเพาะ (นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)
1.88	1.15	621.62	330.65
0.90	0.68	367.57	408.41
0.49	0.60	324.32	661.88
0.29	0.48	259.46	894.69
0.18	0.25	135.13	750.72

1. นาโนโมลของเบนซิลไวโอโลเจน (BV) ที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.3



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวล์ทพ์

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.3

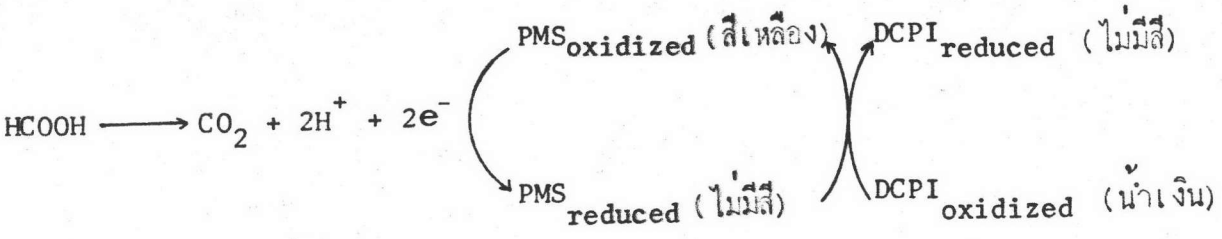
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบแอคติวิตีของ เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ระหว่างไวล์ไทพ์และมิวแคนท์

หมายเลขสายพันธุ์	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	แอคติวิตี (นาโนโมล/นาที)[1]	แอคติวิตีจำเพาะ (นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)
WT	0.18–1.88[2]	135 – 622[2]	331 – 895[2]
27A	0.50	0	0
18E	0.45	0	0
35A	0.82	0	0

1. นาโนโมลของ เบนซิลไวโอโลเจน (BV) ที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที

2. ค่าพิสัยของแอคติวิตีของ เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ซึ่งได้มาจาก การแปรปริมาณโปรตีน 5 ความเข้มข้น

ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังปฏิกิริยา



การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N พบว่า สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N จากเยื่อเซลล์ของไวล์ไทพ์ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัย 0.12 – 1.39 มิลลิกรัมได้เท่ากับ 9 – 55 นาโนโมลของไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของไวล์ไทพ์มีค่าอยู่ในพิสัย 33 – 111 นาโนโมลของไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ถูกรีดิวส์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 10, รูปที่ 13) จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของมิวแตนท์ พบว่าไม่สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N จากเยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัยของปริมาณโปรตีนของไวล์ไทพ์ได้ (ตารางที่ 11)

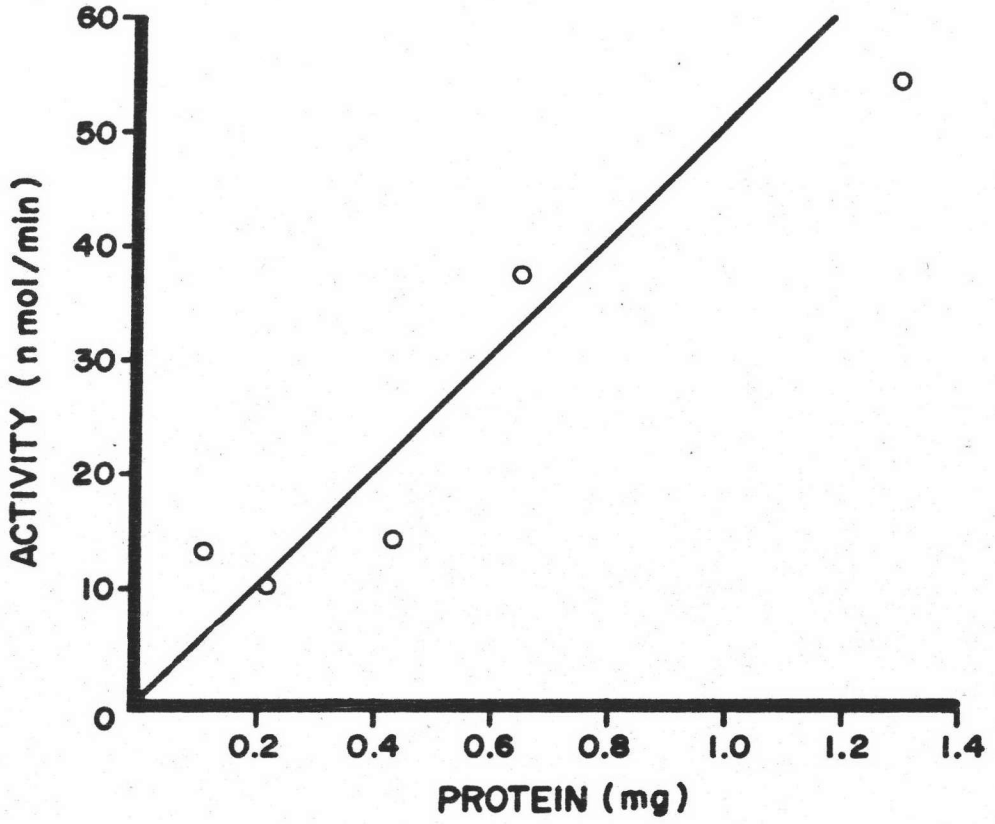
5. <u>การตรึงตำแหน่งยีนที่ผิดปกติ</u>

โดยทั่วไปเมื่อได้ทดสอบสรีรสมบัติและชีวสมบัติของมิวแตนท์แล้วสิ่งที่จะเป็นข้อทดสอบขั้นสุดท้ายก็คือ การตรึงตำแหน่งความผิดปกติของมิวแตนท์ดังกล่าว เนื่องจาก <u>Klebsiella pneumoniae</u> M5al เป็นแบคทีเรียกลุ่ม (Family) เดียวกันกับ <u>Escherichia coli</u> ดังนั้น จึงคาดว่าจะมีการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมคล้ายคลึงกัน จากสมมุติฐานดังกล่าวจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า ความผิดปกติของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์น่าจะเกิดขึ้นที่นาทีที่ 80 เช่นเดียวกับ <u>Escherichia coli</u> (Bachman, 1980) ด้วยเหตุนี้ ถ้าสามารถสร้างตัวตรึงตำแหน่งที่มีความผิดปกติที่ 80 นาทีได้ จะสามารถตรึงตำแหน่งยีนที่ผิดปกติของมิวแตนท์ได้โดยวิธีเหนี่ยวนำยีนผ่าน bacteriophage P_1 ในการทดลองนี้ ได้เลือกแมนนิทอลออกโซโทรพเป็นตัวตรึงตำแหน่ง

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของไวล์ไทพ์

ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	การเปลี่ยนแปลงความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร/นาที	แอคติวิตี (นาโนโมล/นาที)[1]	แอคติวิตีจำเพาะ (นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน)
1.39	0.29	55.24	39.74
0.69	0.20	38.09	55.20
0.46	0.08	15.24	33.13
0.23	0.05	9.52	41.39
0.12	0.07	13.33	111.08

1. นาโนโมลของไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล (DCPI) ที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.4



รูปที่ 13 แอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิลดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของไวล์ไทพ์

รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.4

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบแอคติวิตีของ เอนไซม์ ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ระหว่างไวลไทพ์ และมิวแตนท์

หมายเลขสายพันธุ์	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	แอคติวิตี (นาโนโมล/นาที)[1]	แอคติวิตีจำเพาะ (นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)
WT	0.12–1.39	9–55[2]	33 – 111[2]
27A	0.34–0.71	0	0
18E	0.24–0.84	0	0
35A	0.26–1.02	0	0

1. นาโนโมลของไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล (DCPI) ที่ถูกรีดิวส์ต่อนาที

2. ค่าพิสัยของแอคติวิตีของ เอ็นไซม์ ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ซึ่งได้มาจากผลการ แปรปริมาณโปรตีน 5 ความเข้มข้น

5.1 การแยก mtl

Escherichia coli นำแมนนิทอลจากอาหาร เลี้ยง เชื้อเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ด้วยการฟอสฟอริเลชันโดยชบวนการฟอสโฟอีนอลไพรูเวตฟอสโฟทรานส เฟอร์เรส (Solomon และ Lin, 1972) ดังปฏิกิริยา

$$\text{H Pr} + \text{phosphoenolpyruvate} \xrightleftharpoons{\text{enzyme I}} \text{P-H Pr} + \text{pyruvate}$$

$$\text{P-H Pr} + \text{mannitol} \xrightarrow{\text{enzyme II complex}_{mtl}} \text{mannitol-1-Phosphate} + \text{H Pr}$$

แมนนิทอล –1– ฟอส เฟตที่เกิดขึ้นจะถูก เปลี่ยนแปลง เป็นฟรุคโตส –6–ฟอสเฟต โดย เอ็นไซม์แมนนิทอล –1– ฟอส เฟตดีไฮโดรจีเนส โดยมี NAD เป็นตัวร่วม เร่งปฏิกิริยาดังนี้

$$\text{mannitol -1-P} + \text{NAD}^{+} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{mannitol -1- P}} \text{fructose -6- P} + \text{NAD H}$$

มิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ H Pr และเอนไซม์ I ซึ่งเป็นความผิดปกติที่ตำแหน่ง 52 นาที (Bachman, 1980) จะไม่สามารถใช้แมนนิทอลและซอร์บิทอล เป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ ส่วนมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่เอนไซม์ II คอมเพลกซ์หรือ เอนไซม์แมนนิทอล –1– ฟอส เฟตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นความผิดปกติที่ตำแหน่ง 80 นาที จะไม่สามารถใช้แมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ แต่จะสามารถใช้ซอร์บิทอล เป็นสารต้นตอคาร์บอนได้

ในการแยก mtl นี้ ได้กลายพันธุ์ Klebsiella pneumoniae M5a1 ด้วย NTG เพิ่มโอกาสในการพบมิวแตนท์ที่ต้องการ โดย enrichment ด้วยเพ็นนิซิลิน–จี และ ดี–ไซโคลซีรีนในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอ คาร์บอน ดังรายละเอียดที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7.1 สามารถแยกมิวแตนท์ที่ไม่สามารถเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ 55 ตัวจาก แบคทีเรียทั้งหมด 2 600 ตัว เมื่อนำมาทดสอบซ้ำพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ผันกลับ (reverse) เป็นไวล์ไทพ์ แต่สามารถแยก mtl ที่ต้องการได้ 1 ตัว

เพื่อนำไปใช้เป็นตัวตรึงตำแหน่งในการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัสต่อไป

5.2 การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส

การเหนี่ยวนำยีนของ bacteriophage P_1 ที่เจริญเมื่อใช้มิวแคนท์ทั้ง 3 เป็นเซลล์เจ้าเรือนนั้น ใช้ปริมาณเซลล์ตัวรับ (mtl) ประมาณ $2-3 \times 10^9$ เซลล์ ปริมาณ bacteriophage P_1 ที่เติบโตโดยใช้มิวแคนท์ทั้ง 3 เป็นเซลล์เจ้าเรือนเท่ากับ $2-3 \times 10^9$ P.F.U. (m.o.i. ประมาณ 1) ได้จำนวนทรานสดักแคนท์ที่เป็น mtl^+ เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ ดังนั้นเปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส เท่ากับ $\frac{1 \times 10^4}{2-3 \times 10^9} \times 100 = 0.5 - 0.3 \times 10^{-3}$

5.3 เปอร์เซนต์โคทรานสดักชันของมิวแคนท์กับแมนนิทอลออกโซโทรพ

จากการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัสโดยมีมิวแคนท์สายพันธุ์ 27A เป็นเซลล์เจ้าเรือน แยกทรานสดักแคนท์ที่เป็น mtl^+ ได้ 143 ตัว เมื่อนำทรานสดักแคนท์ทั้งหมดนี้ไปทดสอบหาความชุนสูงสุดในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์เป็นสารต้นคาร์บอน และเสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า ทรานสดักแคนท์บางตัวให้ค่าความชุนสูงสุดเท่ากับไวลไทพ์ ในขณะที่มีทรานสดักแคนท์บางตัวให้ค่าความชุนสูงสุดต่ำกว่ามาก แสดงว่าทรานสดักแคนท์กลุ่มหลังมีคุณสมบัติของ fdh จากทรานสดักแคนท์ 143 ตัว พบทรานสดักแคนท์ที่มีคุณสมบัติ fdh 64 ตัว คิดเป็นเปอร์เซนต์โคทรานสดักชันเท่ากับ 45 % (ตารางที่ 12) โดยการทดลองและการคำนวณอย่างเดียวกัน พบว่า แยกทรานสดักแคนท์จากสายพันธุ์ 18E และ 35A ได้ 100 ตัว และ 150 ตัวตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบ พบว่ามีทรานสดักแคนท์ที่มีคุณสมบัติ fdh จำนวน 24 ตัวและ 22 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซนต์โคทรานสดักชันได้เท่ากับ 24 และ 15 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

ตารางที่ 12 เปอร์เซนต์โคทรานสดักชันของ fdh กับ mtl

สายพันธุ์ตัวให้	สายพันธุ์ตัวรับ	จำนวน[1] ทรานสดักแตนท์ (mtl^+)	จำนวน[2] ทรานสดักแตนท์ (mtl^+ fdh^-)	เปอร์เซนต์[3] โคทรานสดักชัน
27A	mtl	143	64	45
18E	mtl	100	24	24
35A	mtl	150	22	15

1. ทรานส์ดักแตนท์ที่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37° ซ

2. ทรานส์ดักแตนท์จากข้อ 1 ที่มีความชุ่นสูงสุดน้อยกว่าไวล์ไทพ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์

3. คำนวณจาก $\frac{\text{จำนวนทรานสดักแตนท์ } (mtl^+ \ fdh^-)}{\text{จำนวนทรานสดักแตนท์ } (mtl^+)} \times 100$

รายละเอียดของวิธีการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 7.4