บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจำแนกโพลีพีแบคทีเรียหลักหรือแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ จากน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสียสี่พระยา แล้วจึงติดตามประชากรของแบคทีเรียนั้นด้วยตัวติดตามที่ออกแบบจากยีน *ppk* ที่ประมวลรหัสโพลีฟอสเฟตไคเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมการสร้างโพลีฟอสเฟตของเซลล์แบคทีเรียในภาวะที่มีการให้อากาศ

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ออกจากตัวอย่างน้ำเสียของโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร แล้วย้อมแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ ลอฟเฟลอร์ส เมทิลีนบลู พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตจากแบคทีเรียทั้งหมด 143 ไอโซเลต หรือคิดเป็น 6.933 เปอร์เซ็นต์ที่มีการสะสมโพลีฟอสเฟต แกรนูลไว้ภายในเซลล์ และเมื่อตรวจสอบความสามารถของการสะสมโพลีฟอสเฟตของแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตดังกล่าวในภาวะที่ไร้อากาศและมีการให้อากาศ พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 4 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้ในช่วง 100 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1 ยกเว้นแบคทีเรียไอโซเลต CUW-9 ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ติดลบอาจเป็นเพราะในสภาวะที่มีอากาศแบคทีเรียนี้ใช้ฟอสเฟตที่ปล่อยออกมาจากสภาวะไม่มีอากาศไปในการเจริญ หรือใช้เป็นพลังงานมากกว่าการสะสมไว้ในเซลล์ดังที่โพลีพีแบคทีเรียควรจะเป็น ดังนั้นปริมาณฟอสเฟตในสภาวะที่มีอากาศจึงเหลืออยู่มากในสารละลาย

และเมื่อคัดเลือกโพลีพีแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงได้แล้ว 4 ไอโซเลต จึงนำมาจำแนกสกุลของแบคทีเรียดังกล่าวด้วยวิธีทางอนุกรมวิธาน แต่เนื่องจากไม่สามารถเพาะเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CUW-16 ต่อไปได้อีก จึงเหลือแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้เพียง 3 ไอโซเลต คือ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 สาเหตุของการที่ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CUW-16 ให้เจริญได้อีกต่อไป อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมหรืออาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้นไม่เหมาะสมพอแก่การเจริญ กล่าวคือ CUW-16 อาจต้องการสารอาหารเฉพาะบางชนิด หรืออาจเป็นเพราะเชื้อดังกล่าวจะมีการเจริญเพิ่มจำนวนเมื่ออยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น (coculture) เท่านั้น ทำให้เมื่อถูกนำมาเพาะเลี้ยงโดยแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกมาทำให้ไม่สามารถเจริญได้ดีและตายไปในที่สุดหลังผ่านลงอาหารเลี้ยงชุดใหม่ ดังที่ Mino และคณะ (1998) ได้

เสนอไว้ว่าอาจต้องมีการช่วยกันระหว่างสายพันธุ์ต่างกลุ่มกัน แต่ข้อเสนอแนะดังกล่าวนี้ก็อาจมีข้อโต้แย้งได้เพราะยังไม่มีงานวิจัยใดยืนยันอย่างชัดเจน

เมื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 โดยอาศัยลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โดยอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CUW-1 น่าจะเป็น *Propionibacterium* sp., สายพันธุ์ CUW-3 น่าจะเป็น *Corynebacterium* sp. และ สายพันธุ์ CUW-8 น่าจะเป็น *Renibacterium* sp.

ทั้ง *Propionibacterium* sp. และ *Corynebacterium* sp. ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูงนั้น ได้มีหลักฐานแสดงว่าถูกแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียโดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มด้วยกัน คือ

1. Bark และคณะ (1993) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถกำจัดฟอสเฟตออกจากระบบบำบัดระดับห้องปฏิบัติการพบว่า ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียพวก Coryneform
2. Wagner และคณะ (1994) พบว่าเมื่อใช้วิธีที่ไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ การทำไฮบริไดส์เซชันด้วยสารเรืองแสงเพื่อหาประชากรของโพลีพีแบคทีเรียในระบบบำบัด พบว่ากลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูงนั้น เป็นแบคทีเรียหลักของระบบ
3. Kämpfer และคณะ (1996) ทดลองหาประชากรแบคทีเรียในระบบบำบัดด้วยการใช้ตัวติดตามที่จำเพาะกับ rRNA พบว่าประชากรส่วนใหญ่คือแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูงเช่นเดียวกับการทดลองของ Kawaharasaki และคณะ (1999)
4. Merzouki และคณะ (1999) ทำการแยกเชื้อโพลีพีแบคทีเรียจาก anaerobic-aerobic sequencing batch reactor ด้วยวิธีการเพาะเชื้อและใช้ชุดทดสอบ API20NE เพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่ามี *Corynebacterium* อยู่ในประชากรแบคทีเรียด้วย

แต่มีข้อสังเกตจากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของไอโซเลต CUW-8 ที่พบว่าไม่สามารถเจริญได้ในภาวะไร้อากาศเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไธโอไกลโคเลต แต่เมื่อพิจารณาจากการวัดปริมาณโปรตีนของเชื้อในภาวะปราศจากออกซิเจนเพื่อศึกษากิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว พบว่ามีปริมาณโปรตีนของเชื้อในภาวะดังกล่าวอยู่สูง ดังนั้นไอโซเลต CUW-8 น่าจะพอมีการเจริญได้ในภาวะที่ไร้ออกซิเจน แต่อาจเป็นเพราะสารบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไธโอไกลโคเลตที่ทำให้ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น

จากนั้นนำแบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาหากิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสทั้งในภาวะที่ไม่มีการให้อากาศและมีการให้อากาศ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้ยังไม่เคยมีนักวิทยาศาสตร์กลุ่มใดทำมาก่อน เพราะส่วนใหญ่จะติดตามเอนไซม์นี้เฉพาะในภาวะที่มีการให้อากาศเท่านั้น จากผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.4 พบว่ากิจกรรมจำเพาะของโพลีฟอสเฟตไคเนสของเชื้อตัวอย่างในภาวะที่มีการให้อากาศจะสูงกว่าในภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ เพราะในสภาวะปราศจากออกซิเจน เซลล์ของแบคทีเรียมีการปล่อยฟอสเฟตออกมาภายนอก ซึ่งฟอสเฟตดังกล่าวได้มาจากการสลายโพลีฟอสเฟตที่เก็บอยู่ในเซลล์ การสลายนี้สามารถเกิดได้ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดด้วยกัน เช่น โพลีฟอสเฟต: เอเอ็มพี ฟอสโฟ ทรานส์เฟอเรส, โพลีฟอสเฟต กลูโคไคเนส, โพลีฟอสฟาเทส หรือโพลีฟอสเฟตไคเนสในปฏิกิริยาย้อนกลับ

แต่ในภาวะที่มีการให้อากาศ แบคทีเรียจะต้องอาศัยโพลีฟอสเฟตไคเนสในการเปลี่ยนฟอสเฟตที่ถูกดูดซับเข้าไปให้กลายเป็นโพลีฟอสเฟตที่เซลล์จะสะสมไว้ใช้ได้ต่อไป ดังนั้นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าวในภาวะนี้จึงสูงกว่าในภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ

และจากการรายงานของ Bark และคณะ (1993) ที่หากิจกรรมจำเพาะของโพลีฟอสเฟตไคเนสในแบคทีเรียพวก Coryneform พบว่าในภาวะที่มีการให้อากาศจะมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 17 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมากกว่างานวิจัยนี้อยู่ 30 เท่า

จากปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าโพลีฟอสเฟตไคเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการติดตามการกำจัดฟอสเฟตของระบบบำบัดน้ำเสียได้ดีทีเดียว

เนื่องจากข้อจำกัดในข้อมูลของยีน *ppk* ของเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ไม่มีการรายงานลำดับของยีนอยู่เลย มีเพียงข้อมูลที่ Kornberg และคณะ (1999) เสนอไว้ว่า *Propionibacterium shermanii* มียีน *ppk* อยู่ในจีโนมจริง และในเชื้อ *Corynebacterium* sp. มีเพียงการยืนยันว่าสามารถสะสมโพลีฟอสเฟตได้ภายในเซลล์เท่านั้น ส่วน *Renibacterium* sp. นั้นไม่มีรายงานดังกล่าว ดังนั้นในการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ข้างต้น จึงต้องอาศัยข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่แปลผลมาจากยีน *ppk* ของเชื้อต่างๆจากฐานข้อมูลของ GenBank มาหาลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ แล้วจึงเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ ดังกล่าวให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบางตัวถูก code ด้วยโคดอนหลายแบบ (codon usage) การออกแบบไพร์เมอร์ชนิดนี้จึงต้องเลือกหาบริเวณที่มีความแปรปรวนของลำดับ (degenerate sequence) ไม่มากนัก นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญอีกหลายอย่างด้วยกันเพื่อให้ไพร์เมอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพที่ดี

ซึ่งจากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถออกแบบไพร์เมอร์ชนิดดีเจ็นเนอเรต (degenerate primer) ได้ 2 เส้น คือ ไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 ซึ่งมีความแปรปรวนเท่ากับ 2^{15} และ 2^{14} ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาใช้ทำการเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยวิธี PCR แล้ว ไม่ปรากฏว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ทั้งในเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างและเชื้อควบคุมบวก นั่นคือ *Streptomyces coelicolor* ซึ่งเป็นหนึ่งในเชื้อที่ใช้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนในการออกแบบไพร์เมอร์ดังกล่าว สาเหตุอาจเนื่องมาจากความแปรปรวนของไพร์เมอร์ทั้งสองเส้นนั้นค่อนข้างสูง ดังนั้นแม้ว่าไพร์เมอร์ทั้งสองจะสามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ได้ถูกต้องก็ตามแต่ไม่สามารถสร้างสายให้ยาวต่อไปได้เพราะปลาย 3' ของไพร์เมอร์ไม่เสถียร (unstable) เพียงพอ

เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงเบสในตำแหน่งที่เป็น N ของลำดับเบสใน CUP5 และ CUP6 โดยใช้ดีอ็อกซีอิโนซีนแทน เพราะเบส I นี้สามารถจับกับเบสทั้ง 4 ชนิดได้เช่นเดียวกับ N แต่จะก่อให้เกิดความแปรปรวนของไพร์เมอร์น้อยกว่า (Ohtsuka และคณะ, 1985) ดังนั้นไพร์เมอร์ใหม่คือ CUP7 และ CUP8 จะมีความแปรปรวนลดลงเหลือเพียง 2^9 และ 2^7 ตามลำดับ แต่ก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ด้วยวิธี PCR ของเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์และเชื้อ *Streptomyces coelicolor* ที่เป็นตัวควบคุมบวกได้ แม้จะมีการทดลองปรับหาสภาวะที่พอเหมาะของ PCR เช่น การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการจับคู่ของไพร์เมอร์ (primer annealing) การปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน หรือการใส่สารเติมแต่ง (PCR additives) ลงในปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ amplify นั่นคือการเติมไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide หรือ DMSO) 5 เปอร์เซ็นต์ (Hung และคณะ, 1990) การใช้ฟอร์มาไมด์ (formamide) 1.25 เปอร์เซ็นต์ หรือการเติมโพลีเอทธิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) 5 เปอร์เซ็นต์ (Innis และคณะ, 1990)

เมื่อเปลี่ยนไพร์เมอร์ชนิดดีเจ็นเนอเรตให้กลายเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยทำการอ้างอิงกับไพร์เมอร์ของ López และคณะ (1997) ทำให้ได้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 ที่มีลำดับส่วนใหญ่เหมือนกับไพร์เมอร์ CUP5 และ CUP6 ที่ได้ออกแบบไว้ และเมื่อใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 ในการเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยวิธี PCR พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น แต่เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อควบคุมบวก นั่นคือ *E. coli* JM109 ถึง 3 แถบซึ่งมีขนาดประมาณ 400-650 เบสแพร์ เช่นเดียวกับผลที่เกิดขึ้นในการทดลองของ López และคณะ ซึ่งได้ทดสอบด้วยวิธีการทำไฮบริไดเซชันแล้วพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *ppk* ที่แท้จริงคือแถบที่มีขนาดประมาณ 650 เบสแพร์นั่นเอง จึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (CAP1) มายืนยันผลด้วยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับเบสใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน *ppk* ของเชื้อ *E. coli* K-12, *E. coli* Kohara clone #425 และ *E. coli* O157:H7 อยู่ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแถบดีเอ็นเอผลผลิต CAP1 ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 นั้น เป็นส่วนหนึ่งของยีน *ppk* ของเชื้อ *E. coli* JM109 จริง

และเมื่อทำการศึกษากิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสของเชื้อ *E. coli* JM109 ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวกนี้พบว่าได้ผลดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 กิจกรรมโพลีฟอสเฟตไคเนส, ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธีของ Bradford และผลของกิจกรรมจำเพาะของสารสกัดจากเซลล์ของเชื้อ *E. coli* JM109 ที่วัดได้จากสารสกัดจากเซลล์ของการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ปราศจากออกซิเจนและชุดที่มีการให้อากาศ

สารสกัดจากเซลล์	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
ชุดปราศจากออกซิเจน	0.65	0.81	0.5265	0.0237	0.0154	0.0292
ชุดที่มีการให้อากาศ	0.65	1.57	1.0205	0.4749	0.3086	0.3024

จากการนำส่วนหนึ่งของยีน *ppk* ของเชื้อ *E. coli* JM109 ดังกล่าวมาติดฉลากด้วย digoxigenin เพื่อใช้เป็นตัวติดตามหาตำแหน่งของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมยีนดังกล่าวได้จากวิธี PCR โดยอาศัยวิธีการไฮบริไดเซชันตัวติดตามดังกล่าว (PE) กับจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างเพียง 2 สายพันธุ์คือ CUW-1 และ CUW-3 โดยสัญญาณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3 กิโลเบสแพร์ และเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 10 กิโลเบสแพร์ ในเชื้อ *E. coli*

JM109 ที่เป็นตัวควบคุมบวก ดังรูปที่ 4.14 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นอาจมีความคล้ายคลึง (similarity) กับยีน *ppk* ใน *E. coli* JM109

การที่เชื้อตัวอย่าง CUW-8 ไม่ปรากฏสัญญาณของไฮบริไดเซชันอาจเนื่องมาจากยีน *ppk* ของเชื้อ CUW-8 นี้มีความเหมือนกับยีน *ppk* ของ *E. coli* JM109 ต่ำกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook และ Russell, 2001) และอาจเป็นด้วยข้อจำกัดของความไว (sensitivity) ของตัวติดตามที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ซึ่งมีไม่สูงนัก

โดยสรุปคือ เมื่อทำการแยกและจำแนกโพลีพีแบคทีเรียจากน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสีย สี่พระยาพบว่าแบคทีเรียตัวอย่าง 3 สายพันธุ์คือ *Propionibacterium* sp., *Corynebacterium* sp. และ *Renibacterium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณสมบัตินี้มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสีย ดังนั้นการติดตามประชากรของแบคทีเรียดังกล่าวจึงมีประโยชน์ต่อการศึกษาเพื่อพัฒนาให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป แม้การออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ที่ประมวลรหัสโพลีฟอสเฟตไคเนสของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องมาจากข้อมูลของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างดังกล่าวมีไม่เพียงพอและอาจเนื่องมาจากสาเหตุสำคัญคือความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ในเชื้อแบคทีเรียต่างๆกันที่เป็นข้อจำกัดของการทดลอง

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ก็ยังได้ให้ข้อมูลพื้นฐานที่แสดงถึงความเหมือนกันของยีน *ppk* ของเชื้อตัวอย่าง กับเชื้อ *E. coli* JM109 ดังนั้นงานวิจัยที่ควรศึกษาต่อไปคือการศึกษาลำดับเบสของเชื้อตัวอย่างที่เกิดสัญญาณขึ้นในกระบวนการไฮบริไดเซชัน ซึ่งน่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องของยีน *ppk* ของเชื้อตัวอย่างที่แท้จริง และขยายผลให้เกิดการสร้างตัวติดตามที่มีประสิทธิภาพต่อระบบบำบัดน้ำเสียได้ต่อไป