บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์หรือกำมะถันไพไรต์เป็นกำมะถันซัลเฟตจากดินทางภาคเหนือของประเทศไทย ได้แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟตสูงกว่า 310 มิลลิกรัมซัลเฟต / ลิตร จำนวน 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 เมื่อเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 7 วัน Kargi และ Robinson (1982) รายงานว่า *Sulfolobus acidocaldarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 60-93°ซ. สามารถกำจัด 96 เปอร์เซนต์ของกำมะถันไพไรต์ทั้งหมดออกจากถ่านหินได้ภายในเวลา 10 วัน Rai และ Reyniers (1988) รายงานว่า *Pseudomonas putida* สามารถกำจัด 75 เปอร์เซนต์ของกำมะถันไพไรต์ทั้งหมดออกจากถ่านหินลิกไนต์ในมลรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกาภายในเวลา 7 วัน จากรายงานข้างต้นแม้ว่าแบคทีเรียจะสามารถกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินได้สูงถึง 96 เปอร์เซนต์ของกำมะถันไพไรต์ทั้งหมด แต่ก็ต้องใช้เวลานานถึง 10 วัน ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติจึงไม่มีศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เพื่อการกำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินได้โดยตรง เนื่องจากปริมาณถ่านหินที่จะต้องมีการเผาเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าในแต่ละวันนั้นมากถึง 2-5หมื่นตัน การวิจัยนี้จึงได้ทำการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการเปลี่ยนกำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต เนื่องจากมีจำนวนชุดของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสสูง เพื่อนำมาใช้กำจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากถ่านหินลิกไนต์ที่ขุดได้จากเหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปาง

ผลการตรวจหาพลาสมิดในแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไม่พบพลาสมิดใด ๆ แสดงว่ายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสนี้อยู่บนโครโมโซม จึงทำการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น 2 สาย ขึ้นโดยการทำนายจากลำดับกรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *R. pachyptila* และของ *S. cerevisiae* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันสูง (Laue และ Nelson, 1994) ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี Polymerase chain reaction ภายใต้ภาวะที่สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นต้องมีความจำเพาะสูงมาก ได้สายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ สายพันธุ์ละเพียง 1 ชนิดเท่านั้น แต่เนื่องด้วยเฉพาะสายดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบเท่านั้นที่มีขนาดยาวกว่า 150 เบส จึงสามารถแยกออกมาจากเจลแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep -A- Gene จากการหาลำดับเบสทำให้ทราบสมบัติของสายโอลิโก

นิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้ว่ามีขนาดยาว 243 เบส พบตำแหน่งเกาะของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น เป็นส่วนของสายดีเอ็นเอที่สามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้และทราบแผนที่เรสตริชัน นำสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 243 เบสนี้มาใช้เป็นสายดีเอ็นเอติดตาม เรียกว่าดีเอ็นเอติดตาม GO2 ผลการทำ Southern hybridization ระหว่างโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชันชนิดต่าง ๆ อย่างสมบูรณ์ และใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีโดยชุดติดฉลากและตรวจสอบ Rad-Free kit ได้สัญญาณการเกิดไฮบริดเพียง 1 แถบ ขนาด 2 และ 3 กิโลเบส เมื่อโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสตริชัน *Pst* I และ *Bam* HI ตามลำดับ ดังนั้นจึงสร้างขนาดารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 โดยการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส (*sop T*) ของแบคทีเรียที่ต้องอาศัยแบบภาวะพึ่งพาอยู่กับ *R. pachyptila* มีขนาด 1,317 เบส (Laue และ Nelson, 1994) นำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pBluescript SK ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I แล้วทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL-1 Blue นำทรานฟอร์แมนท์ที่ได้มาตรวจหาทรานฟอร์แมนท์ซึ่งพลาสมิดลูกผสมภายในเซลล์มียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 โดยวิธี Colony hybridization ผลการตรวจทรานฟอร์-แมนท์จำนวน 8,600 โคโลนี ด้วยดีเอ็นเอติดตาม GO2 ได้ทรานฟอร์แมนท์ที่ให้สัญญาณการเกิดไฮบริด 7 โคโลนี คือโคโลนีหมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/4 13/1 13/2 และ 13/3 ผลการสกัดพลาสมิดลูกจากผสมโคโลนีทั้ง 7 ข้างต้นแล้วนำมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม GO2 เฉพาะโคโลนีหมายเลข 11/3 เท่านั้นที่ให้สัญญาณการเกิดไฮบริด และเมื่อนำพลาสมิดลูกผสมของโคโลนีหมายเลข 11/3 มาตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Pst* I พบว่าดีเอ็นเอสอดแทรกมีขนาด 1.8 กิโลเบส ผลการทำ Southern Hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม GO2 พบว่าดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 1.8 กิโลเบสนี้ให้สัญญาณการเกิดไฮบริด คาดว่ายีนที่โคลนได้นี้น่าจะเป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ซึ่งงานที่จะต้องทำขั้นต่อไปคือตรวจหาความสามารถของโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 ในการออกซิไดซ์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต และหาลำดับเบสวิเคราะห์ลักษณะของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้