บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *Thiobacillus ferrooxidans*

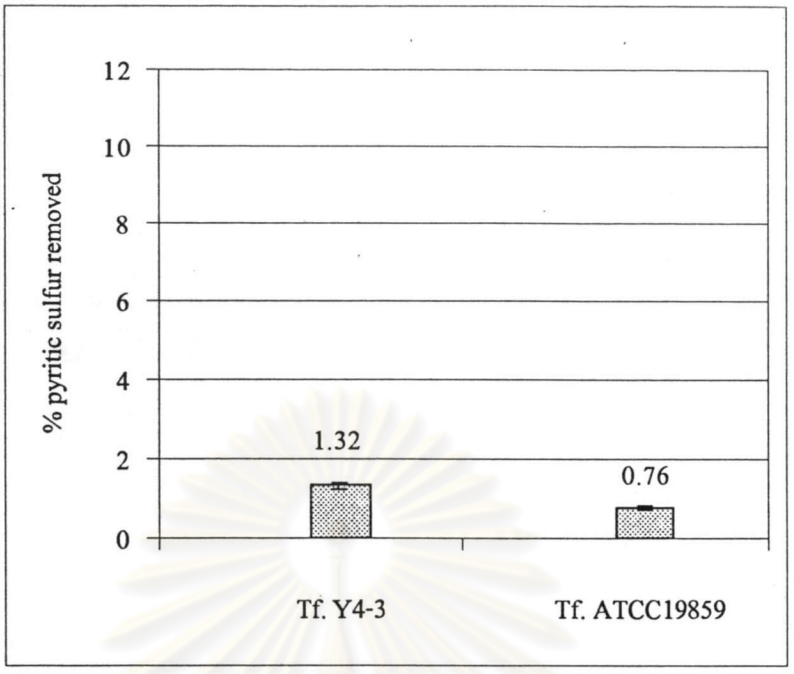
4.1.1 สมบัติบางประการของลิกไนท์

ลิกไนท์ที่นำมาศึกษาเป็นลิกไนท์บดละเอียดขนาดอนุภาค 45 ไมครอน จากขั้นตอนก่อนการนำเข้าเตาเผาของโรงไฟฟ้าแม่เมาะ (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย อำเภอแม่เมาะ จังหวัดลำปาง) ผลการศึกษาสมบัติบางประการของลิกไนท์ พบว่าค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 5.1 ปริมาณกำมะถันไพไรต์ กำมะถันซัลเฟต และกำมะถันอินทรีย์ที่ปนเปื้อนเท่ากับ 10, 8 และ 15 มก./กรัมลิกไนท์ตามลำดับ (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย)

4.1.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ระหว่าง *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ระหว่าง *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859 พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859 เท่ากับ 0.211 และ 0.122 มก./กรัมลิกไนท์ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



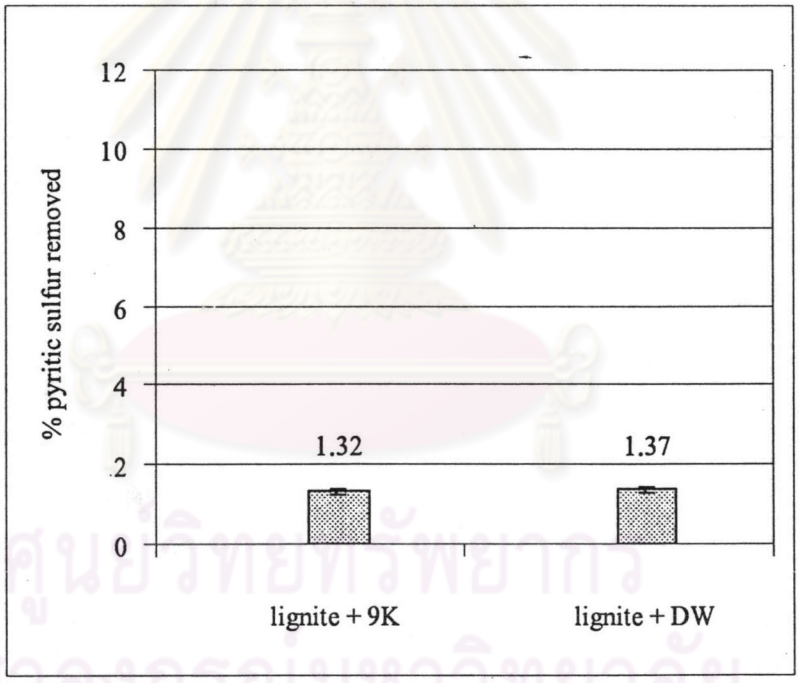
ภาพที่ 4.1 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859

หรือแสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* ATCC 19859 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 1.32% และ 0.76% ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 4.1) จึงเลือกใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการทดลองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ศึกษาชนิดของสารใช้แขวนลอยผงลิกไนท์ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ศึกษาชนิดของสารใช้แขวนลอยผงลิกไนท์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟตและน้ำกลั่น พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต และในน้ำเลี้ยงเชื้อผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นเท่ากับ 0.211 และ 0.220 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ หรือแสดงว่ากำมะถันไพไรต์ถูกขจัดออก 1.32 และ 1.37%ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น , ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 10 วัน ของ 10% (กรัม/100 มล.) ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต และแขวนลอยในน้ำกลั่นเท่ากับ 2.78 , 2.5 และ 5.1 , 4.77 ตามลำดับ เลือกใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นในการทดลองต่อไป

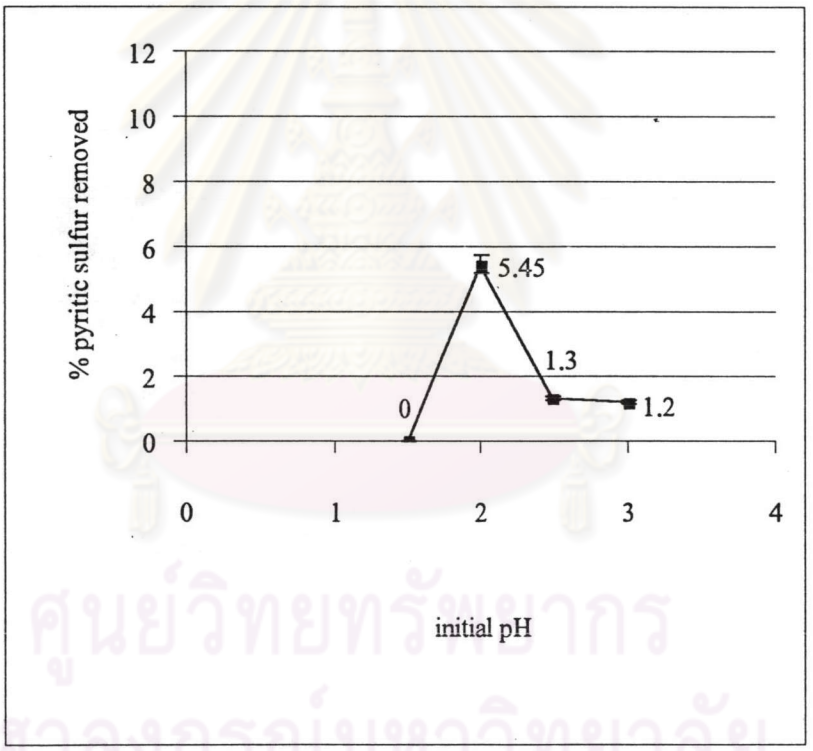


ภาพที่ 4.2 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 เมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟตและเมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มเท่ากับ 0, 0.873, 0.209 และ 0.192 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ หรือแสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้เท่ากับ 0, 5.45, 1.3 และ 1.2% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์สูงสุดเมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ในการทดลองต่อไป

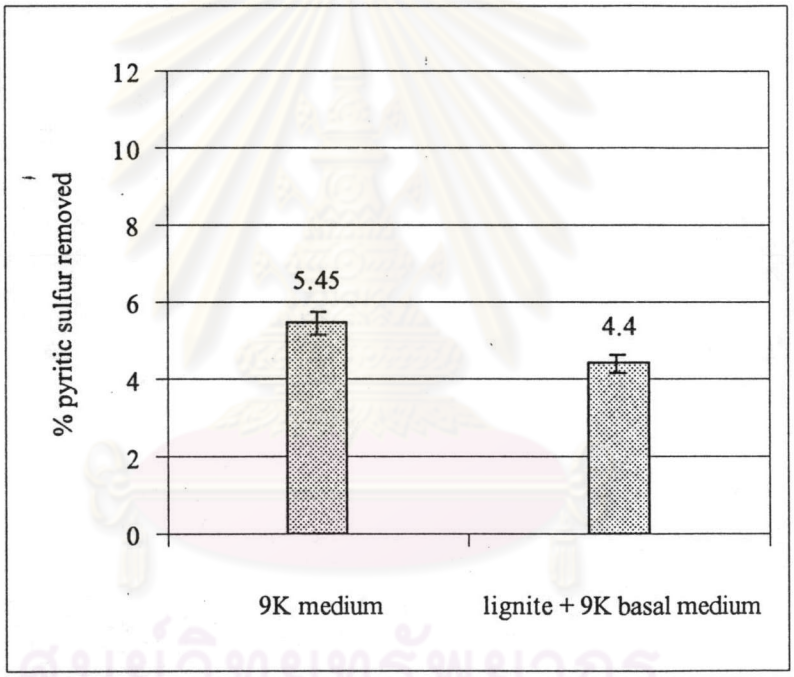


ภาพที่ 4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.5 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

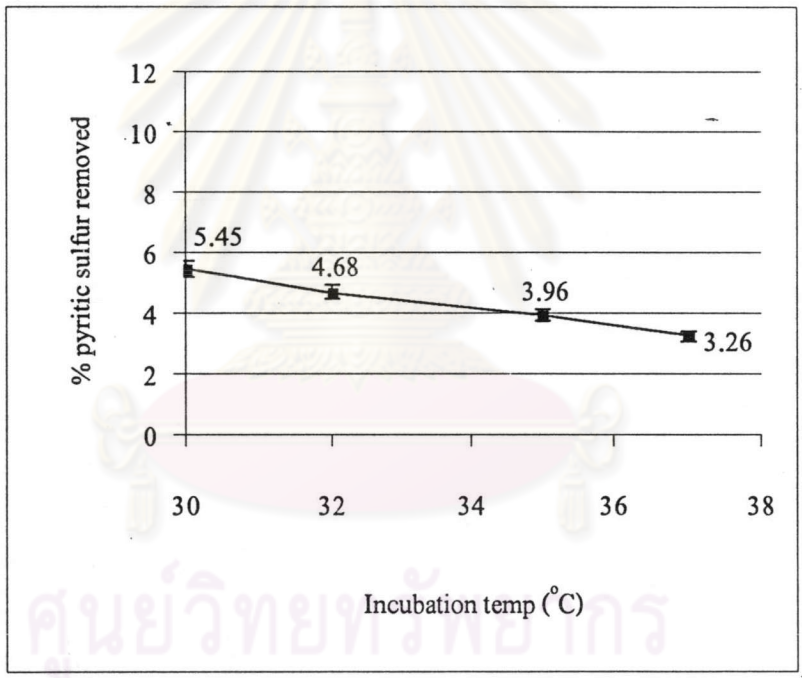
เมื่อใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K และ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต แต่เติมผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K) แทนเฟอรัสซัลเฟต เป็นเชื้อเริ่มต้น พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.873 และ 0.705 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่ากำมะถันไพไรต์ถูกขจัดออกจากลิกไนท์เท่ากับ 5.45 และ 4.40% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.4 เลือกใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.4 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น *T. ferrooxidans* Y4-3 ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์

4.1.6 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

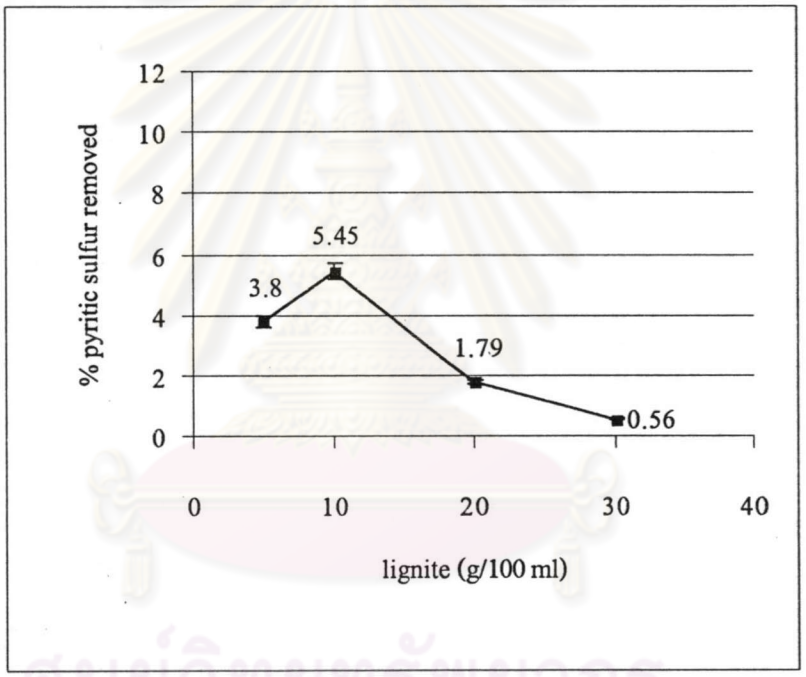
เมื่อแปรผันอุณหภูมิที่ใช้บ่มเป็นอุณหภูมิ 30, ห้อง (30-32), 35 และ 37°ซ พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มเท่ากับ 0.873, 0.749, 0.634 และ 0.523 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้เท่ากับ 5.45, 4.68, 3.96 และ 3.26% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้บ่ม ที่ 30, 30-32, 35 และ 37°ซ พบว่า ประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มสูงขึ้น ไม่ได้ทำการทดลองบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°ซ เนื่องจากไม่มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนาม เลือกบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.5 อุณหภูมิที่ใช้บ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

4.1.7 ผลของปริมาณผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น (กรัม/100 มล.) ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

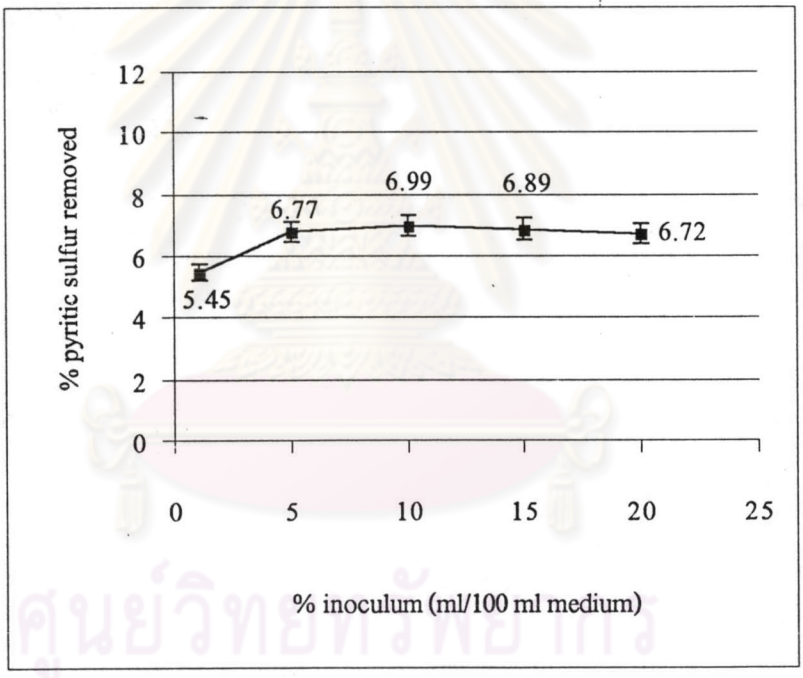
เมื่อแปรผันปริมาณผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นเป็น 5, 10, 20 และ 30 (กรัม/100 มล.) พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มเท่ากับ 0.608, 0.873, 0.286 และ 0.089 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 3.8, 5.45, 1.79 และ 0.56% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์สูงที่สุดเมื่อแขวนลอยผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.) ในน้ำกลั่น เลือกใช้ 10% (กรัม/100 มล.) ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.6 ปริมาณผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น (กรัม/100 มล.) ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

4.1.8. ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

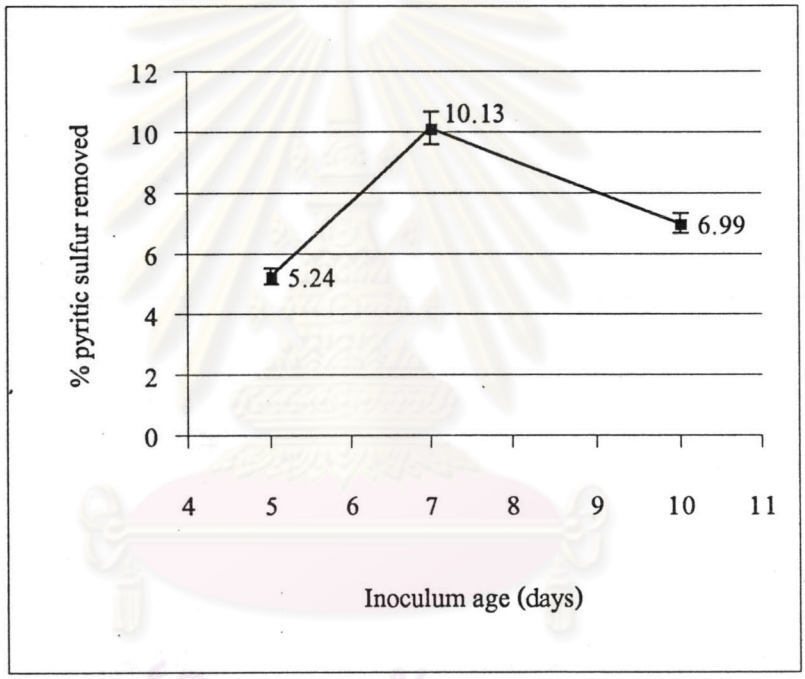
เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1, 5, 10, 15 และ 20% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มเท่ากับ 0.873, 1.084, 1.120, 1.104 และ 1.076 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้เท่ากับ 5.45, 6.77, 6.99, 6.89 และ 6.72% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 ประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์สูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% เลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

4.1.9 ผลของอายุของเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

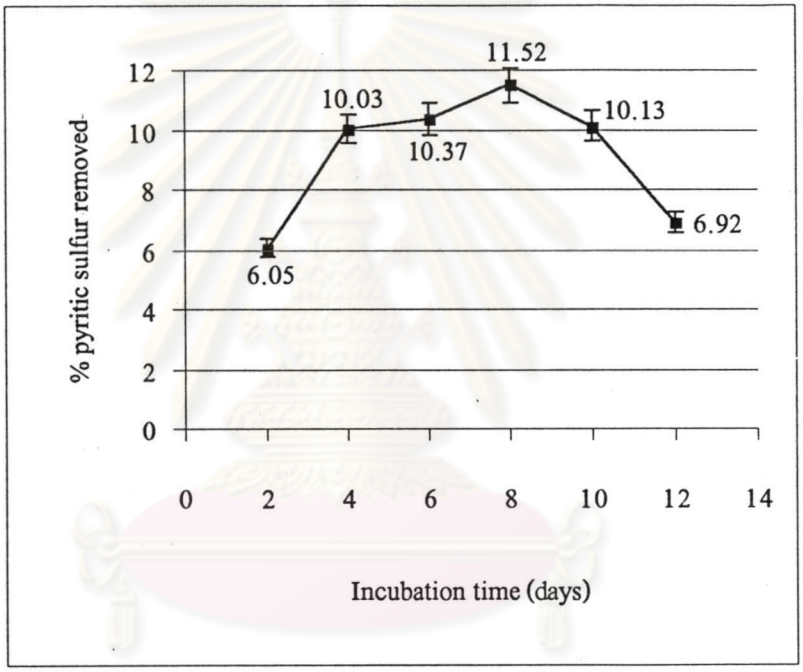
เมื่อแปรผันอายุของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 5, 7 และ 10 วัน พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.840, 1.623 และ 1.120 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้เท่ากับ 5.24, 10.13 และ 6.99% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์สูงที่สุดเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 7 วัน เลือกใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 อายุ 7 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.8 อายุของเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

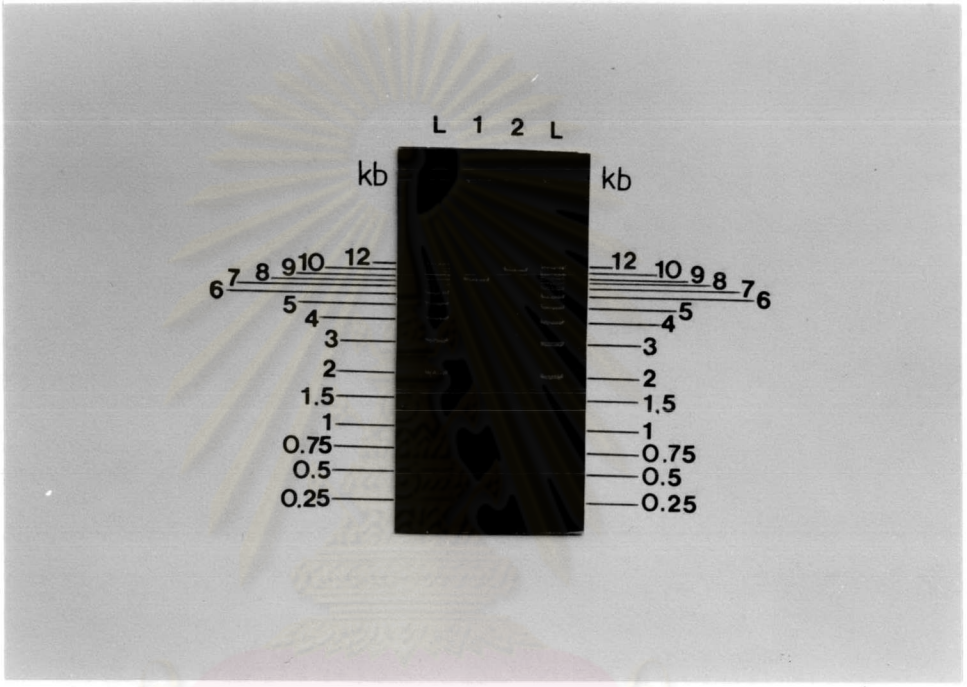
4.1.10 ผลของระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

เมื่อแปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 วัน พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.970, 1.607, 1.662, 1.846, 1.623 และ 1.109 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ แสดงว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 6.05, 10.03, 10.37, 11.52, 10.13 และ 6.92% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 สูงที่สุดเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 8 วัน



ภาพที่ 4.9 ระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

จากผลการทดลองข้อ 4.1.3 – 4.1.10 พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *T. ferrooxidans* Y4-3 ในการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ คือ ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10 % (มล./100 มล. ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) ปริมาณผงลิกไนท์ที่เหมาะสมคือ 10% (กรัม/100 มล.) แขวนลอยในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 2.0 ใช้ 10% (กรัม/100 มล.) ผงลิกไนท์แขวนลอยใน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.10 การตัดพลาสมิด pNTS50 และ pTMZ48 ด้วยเรสทริกชัน *Eco*RI และ *Xba*I ตามลำดับ

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดความยาวตั้งแต่ 250 เบส ถึง 12 กิโลเบส

1 หมายถึง การตัดพลาสมิด pNTS50 ด้วยเรสทริกชัน *Eco*RI
แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 8.0 กิโลเบส และ 2.7 กิโลเบส

2 หมายถึง การตัดพลาสมิด pTMZ48 ด้วยเรสทริกชัน *Xba*I
แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 10.7 กิโลเบส

น้ำกลั่น 30 มล.ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 8 วัน *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ 11.52%

4.2 การสร้างพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180)

4.2.1 การสร้างพลาสมิดพาหะ

การตัดพลาสมิด pTMZ48 ขนาด 10.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเองของ *T. ferrooxidans* และมียีนต้านต่อสารปรอทคือ ยีน *merA*, *merC* และ *merR* ด้วยเรสทริกชัน *Xba*I ได้ดีเอ็นเอ 1 ชิ้น ขนาด 10.7 กิโลเบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.10)

4.2.2 การแยกยีน *sat* และยีน *apr* จากพลาสมิด pNTS50

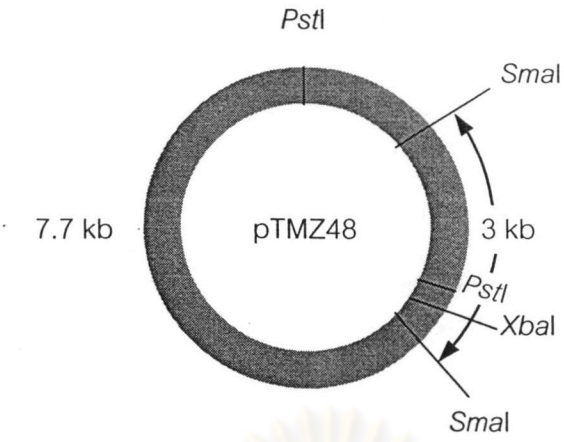
การตัดพลาสมิด pNTS50 ขนาด 10.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เชื่อมต่ออยู่กับพลาสมิด pUC18 ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Eco*RI (ภาคผนวก ค.2) ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 8 และ 2.7 กิโลเบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.10) ดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส คือ ยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

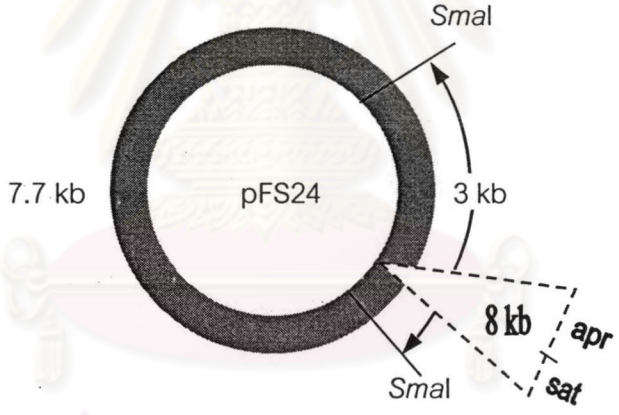
4.2.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *sat* และยีน *apr* จาก *A. vinosum*

เมื่อการนำพลาสมิด pTMZ48 ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชัน *Xba*I ขนาด 10.7 กิโลเบส (ผลจากข้อ 4.2.1) ซึ่งทำให้เป็นปลายทู่ด้วยเอนไซม์ Klenow large fragment และกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกด้วยเอนไซม์ Calf intestinal alkaline phosphatase มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส (ผลจากข้อ 4.2.2) ซึ่งทำให้เป็นปลายทู่เช่นกัน ด้วยเอนไซม์ T4 ligase แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีจากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. สกัดพลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีนำมาตัดด้วยเรสทริกชัน *Sma*I ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 11.0 และ 7.7 กิโลเบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.11ก และ 4.11ข) แสดงว่าเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



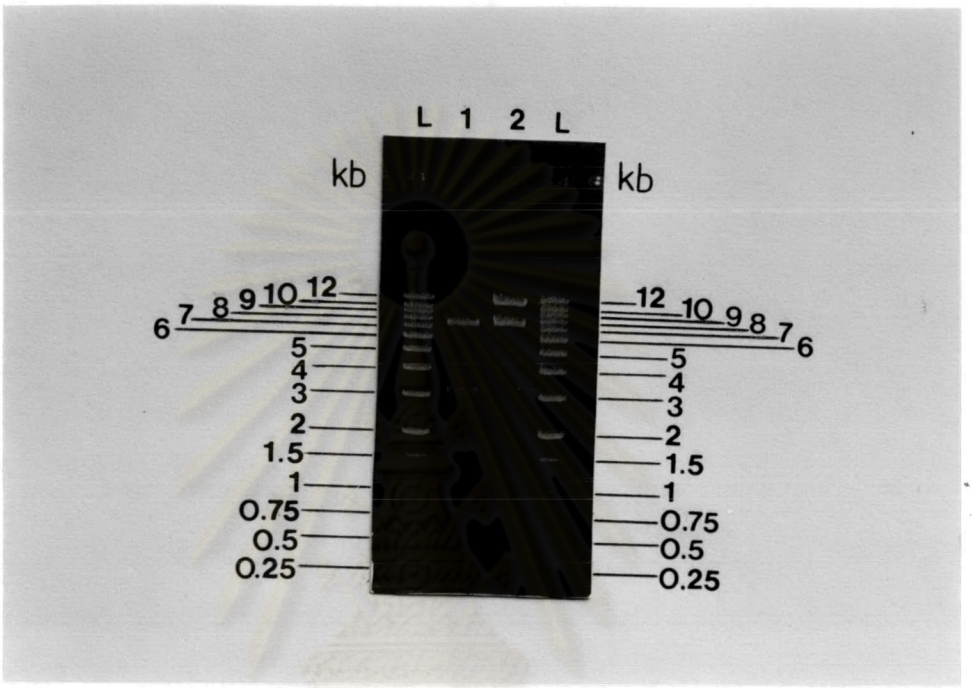
พลาสมิด pTMZ48 ขนาด 10.7 กิโลเบส



พลาสมิด pFS24 ขนาด 18.7 กิโลเบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.11ก แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTMZ48 และของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.11ข การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Sma*I

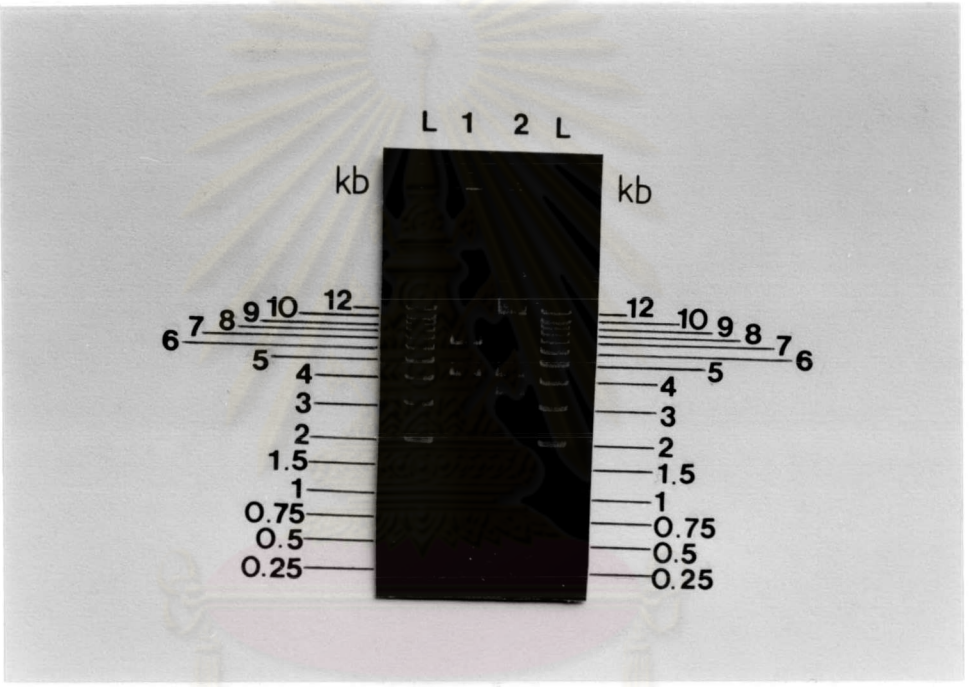
L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดความยาวตั้งแต่ 250 เบส ถึง 12 กิโลเบส

1 หมายถึง การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 ด้วยเรสทริกชัน *Sma*I แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 7.7 และ 3.0 กิโลเบส

2 หมายถึง การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Sma*I แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 11.0 และ 7.7 กิโลเบส

4.3 การตรวจสอบทิศทางการจัดเรียงตัวของยีน *sat* และยีน *apr* ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24

เมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I ได้ดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ขนาด 11.2, 4.2 และ 3.3 กิโลเบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.12) แสดงว่าทิศทางการจัดเรียงตัวของยีน *sat* และยีน *apr* ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 แสดงดังภาพที่ 4.13 เป็นแบบ B



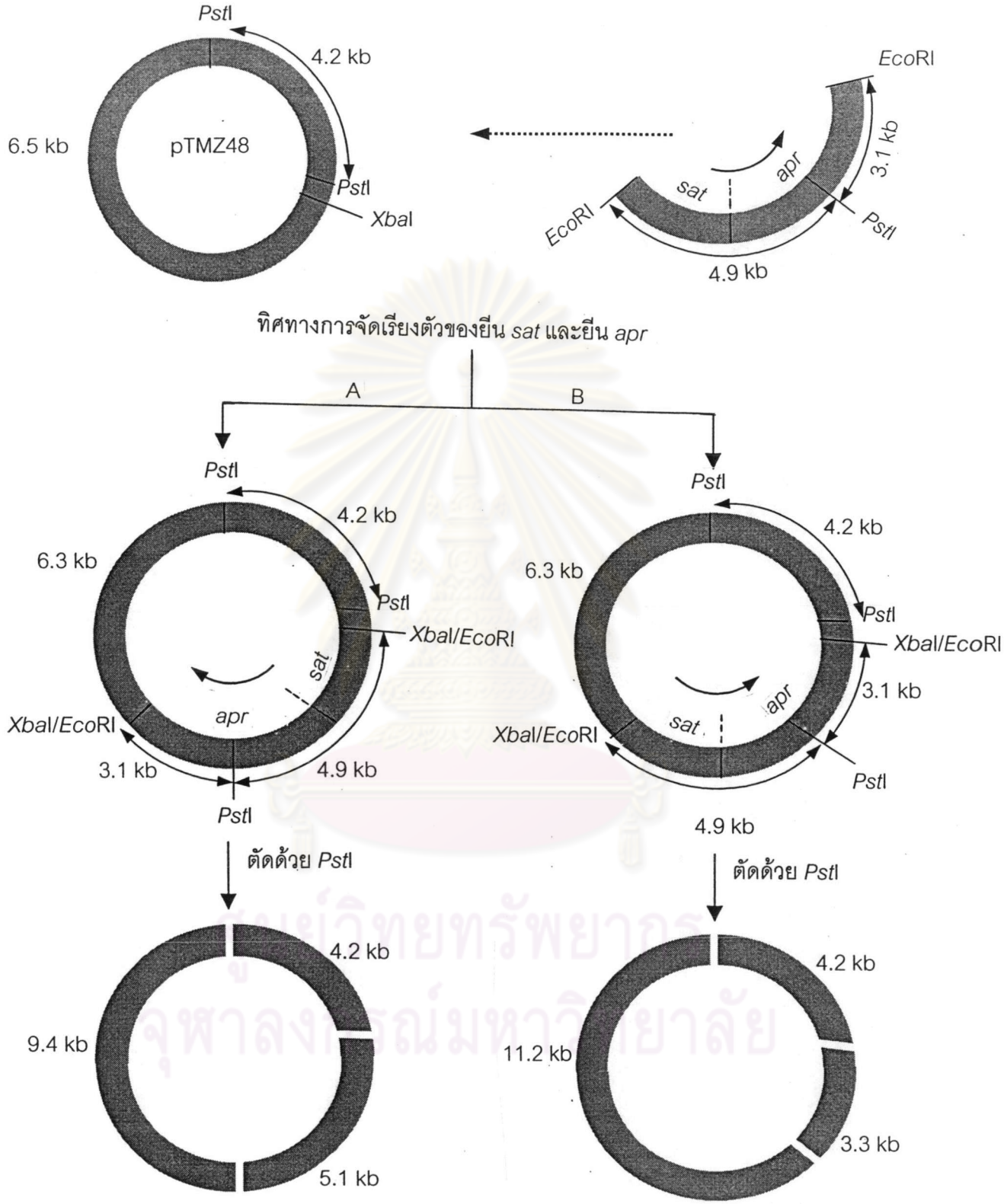
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.12 การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดความยาวตั้งแต่ 250 เบส ถึง 12 กิโลเบส

1 หมายถึง การตัดพลาสมิดพาหะ pTMZ48 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 6.5 และ 4.2 กิโลเบส

2 หมายถึง การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *Pst*I แสดงแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ คือ ดีเอ็นเอขนาด 11.2, 4.2 และ 3.3 กิโลเบส



ภาพที่ 4.13 ตำแหน่งจดจำเรสทริกชัน *PstI* บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ทิศทางการจัดเรียงตัวที่เป็นไปได้ 2 ชนิดของยีน *sat* และ *apr* ในพลาสมิด pFS24 และผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ด้วยเรสทริกชัน *PstI*

4.4 การถ่ายโอนยีน *sat* และยีน *apr* เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3

4.4.1 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ซึ่งมียีน *sat* และยีน *apr* จาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3

เมื่อทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 ซึ่งมียีน *sat* และยีน *apr* จาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3 โดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน (ตามวิธีข้อ 3.5.2) ได้ทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีซึ่งสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM ที่เติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 ไมโครกรัม/มล. 100 โคโลนี เลือกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี 3 โคโลนี มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงต้องตรวจหายีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ในทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีโดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ เมื่อเกลี่ยเซลล์แขวนลอยของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM ที่เติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่ามีโคโลนี 15 โคโลนี สามารถเจริญได้ แสดงว่าประมาณ 15% ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 สามารถปรับตัวให้สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายเมอคิวรอคคลอไรด์ 0.25 ไมโครกรัม/มล.

4.4.2 การตรวจหายีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ในทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีโดยวิธี PCR

4.4.2.1 การหาข้อมูลของยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

การหาข้อมูลของยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) จากฐานข้อมูล NCBI พบว่าหมายเลขใน GenBank (accession number) คือ U84759 ประกอบด้วย 5,090 เบส บริเวณถอดรหัสของยีน *sat* 1,206 เบส และบริเวณถอดรหัสของยีน *apr* 3,227 เบส ยีน *apr* ประกอบด้วย ยีน *aprM* บริเวณถอดรหัส 838 เบส ยีน *aprB* บริเวณถอดรหัส 497 เบส และยีน *aprA* บริเวณถอดรหัส 1,881 เบส

4.4.2.2 การออกแบบและสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

ตารางที่ 4.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 4 สาย ซึ่งออกแบบและสังเคราะห์

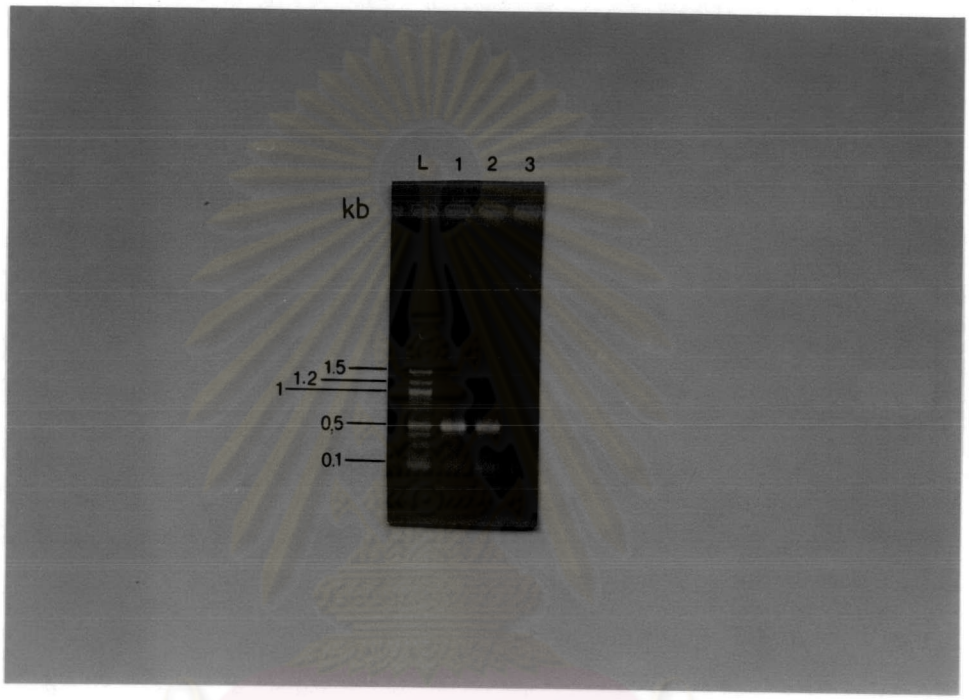
โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ความยาว (เบส)	Tm (°ซ)
sat1	AGACCTTCAACAGC	23	69
sat2	CAGGGCCGC	23	69
apr1	GAAGATGGTCTGGGCGTCGAAGG	18	54
apr2	CATACGCTGGAGTCCAAC	18	54
	CTCGTCCATCAGCAGATG		

ออกแบบและสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ sat1 ขนาด 23 เบส โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *sat* ตำแหน่งที่ 572-594 ออกแบบและสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ sat2 ขนาด 23 เบส โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *sat* ตำแหน่งที่ 1,052-1,074 ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR จะมีขนาด 503 เบส

ออกแบบและสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr1 ขนาด 18 เบส โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *apr* ตำแหน่งที่ 3,040-3,057 ออกแบบและสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr2 ขนาด 18 เบส โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *apr* ตำแหน่งที่ 3,567-3,585 ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR จะมีขนาด 546 เบส ซึ่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr1 และ apr2 นี้ครอบคลุมทั้งหน่วยย่อย *aprB* และ *aprA* ของยีน *apr* ข้อมูลลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 4 สาย ข้างต้น ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ ค.3 (ภาคผนวก ค)

4.4.2.3 การตรวจหายีน *sat* และยีน *apr* ในทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3

เมื่อนำดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3 (ผลจากข้อ 4.4.1) 3 โคโลนี มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR (ตามวิธีข้อ 3.6.2.4) ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ sat1 และ sat2 พบว่าดีเอ็นซึ่งสกัดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีเพียง 1 โคโลนีเท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.14)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ sat1 และ sat2

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

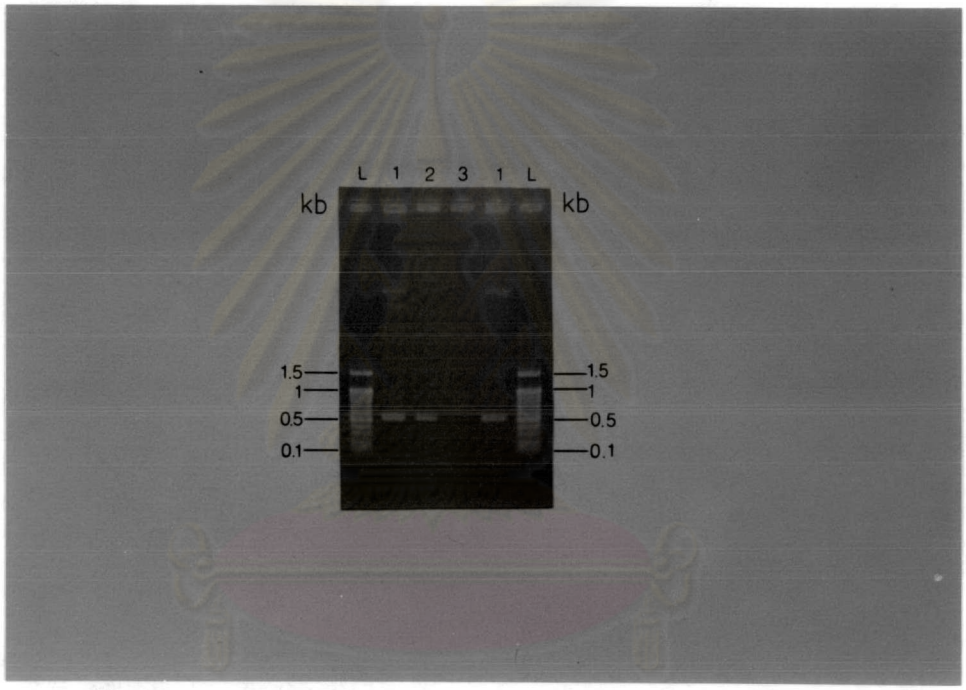
1 หมายถึง แถบดีเอ็นเอขนาด 503 เบส เมื่อใช้พลาสมิด pNTS50 ซึ่งมียีน *sat* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

2 หมายถึง แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส เมื่อใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 หมายถึง ไม่ได้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจาก *T. ferrooxidans* Y4-3 พันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

เมื่อนำดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR (ตามวิธีข้อ 3.5.2.4) ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr1 และ apr2 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.15)

จากภาพที่ 4.14 และ 4.15 แสดงว่าทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3 มียีน *sat* และยีน *apr* จาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) หรือ มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pFS24 เรียกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ว่า *T. ferrooxidans* sat-apr



ภาพที่ 4.15 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ apr1 และ apr2

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1 หมายถึง แถบดีเอ็นเอขนาด 546 เบส เมื่อใช้พลาสมิด pNTS50 ซึ่งมียีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

2 หมายถึง แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส เมื่อใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี *T. ferrooxidans* Y4-3 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 หมายถึง ไม่ได้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจาก *T. ferrooxidans* Y4-3 พันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบ

4.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสในทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* sat – apr

เมื่อเลี้ยง *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* sat-apr ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9KS ปริมาตร 35 ลิตร ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน นำเซลล์ซึ่งล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 มาแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาณ 10% (กรัมน้ำหนักเปียก/100 มล.) 2.2 มล. ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิก ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ เก็บส่วนน้ำใส (crude extract) วัดปริมาตรของส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใส 1 มล. มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่า crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* sat-apr มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 11.15 และ 11.17 มก. ตามลำดับ นำ crude extract ที่เหลือมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส โดยเติม crude extract ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย APS, glucose, hexokinase, NADP และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (ตามวิธีภาคผนวก ข ข้อ 20) วัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นจึงเติมโซเดียมไพโรฟอสเฟตลงในปฏิกิริยา หากใน crude extract มีกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส จะมีการสร้าง ATP ดังสมการ

$$APS + PPi \xrightarrow{\text{ATP sulfurylase}} ATP + SO_4^{2-} \quad \text{.....(15)}$$

ATP จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้าง glucose-6-phosphate ดังสมการ

$$ATP + \text{glucose} \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{glucose-6-phosphate} \quad \text{.....(16)}$$

ต่อจากนั้น glucose-6-phosphate จะถูกออกซิไดส์ไปเป็น 6-phosphogluconolactone โดย NADP ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนได้เป็น NADPH ดังสมการ

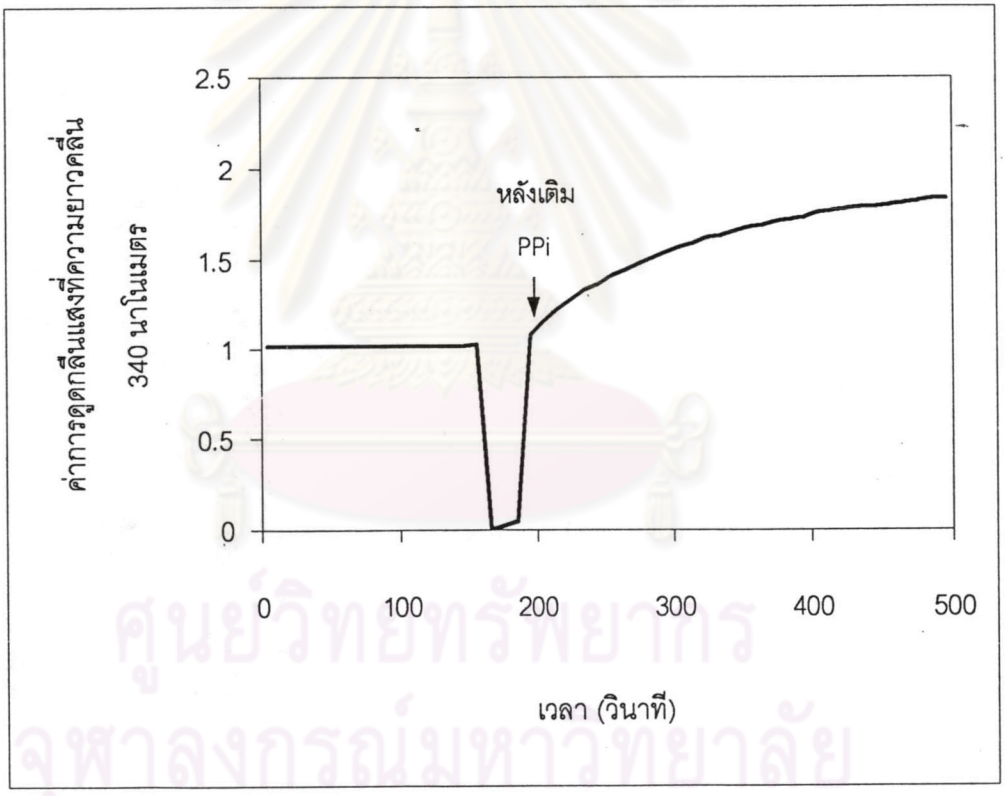
$$\text{glucose-6-phosphate} \xrightarrow[NADP \rightarrow NADPH + H^+]{\text{glucose-6-phosphate dehydrogenase}} \text{6-phosphogluconolactone} \quad \text{.....(17)}$$

วัดปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด NADPH 1 ไมโครโมลต่อนาที พบกิจกรรมทั้งหมดของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* sat-apr เท่ากับ 0.378 หน่วย ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.16 และไม่พบกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ดังแสดงในภาพที่ 4.17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

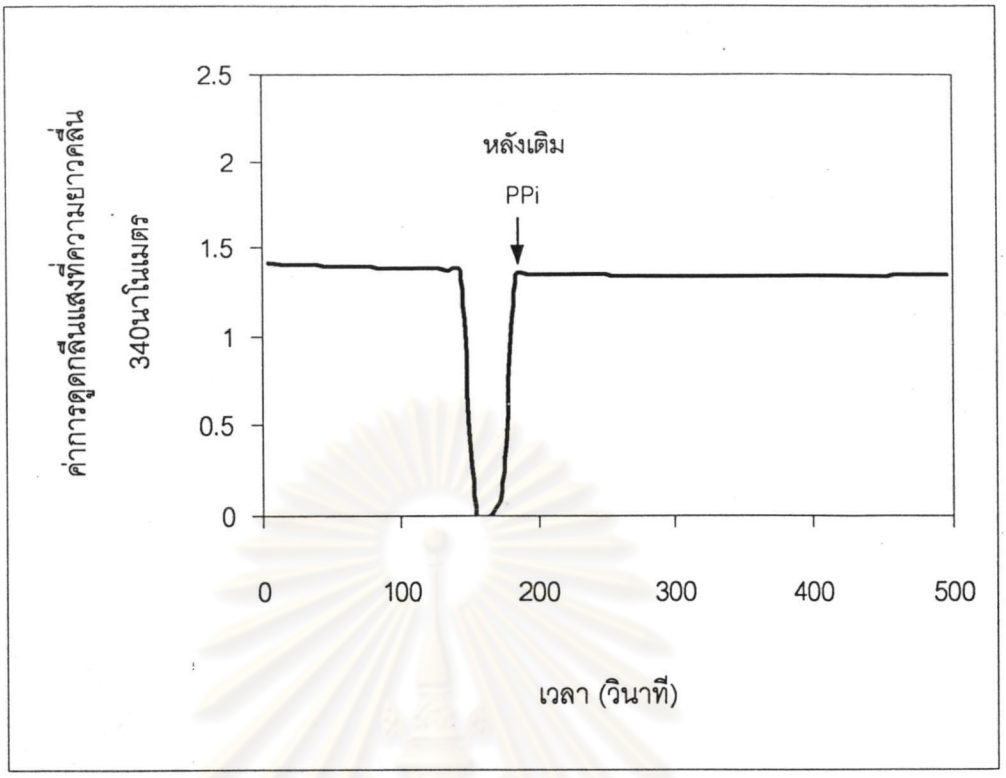
ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* sat–apr และ *T. ferrooxidans* Y4-3

จุลินทรีย์	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	ความเข้มข้นโปรตีน (มก./มล.)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	กิจกรรม (หน่วย/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (หน่วย)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)
T. ferrooxidans Y4-3	2.17	5.14	11.15	0	0	0
T. ferrooxidans sat–apr	1.97	5.67	11.17	0.192	0.378	0.034



ภาพที่ 4.16 แสดงกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ*T. ferrooxidans* sat-apr จากค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร กับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป

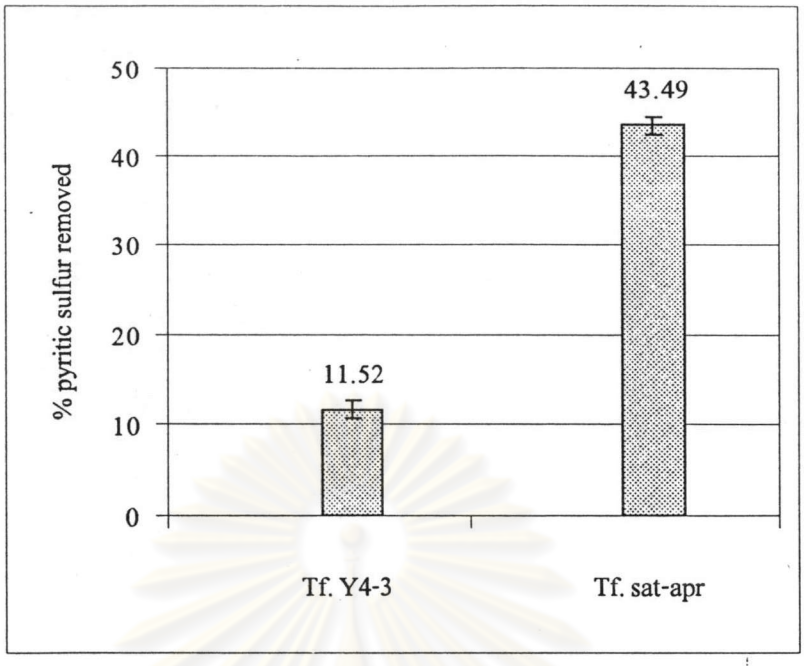
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.17 แสดงกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสใน crude extract ของ *T. ferrooxidans* Y4-3 จากค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร กับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป

4.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* sat–apr

เมื่อปลูก *T. ferrooxidans* Y4-3 หรือ *T. ferrooxidans* sat–apr ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่ 30 °ซ ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณ 10% (มล./100 มล.) ลงใน 10% (กรัม/100 มล.) ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 2.0 ปริมาตร 30 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30°ซ เป็นเวลา 8 วัน พบกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. ferrooxidans* Y4-3 และของ *T. ferrooxidans* sat–apr เท่ากับ 1.846 และ 6.969 มก./กรัมลิกไนท์ ตามลำดับ หรือ *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* sat–apr สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้ 11.52 และ 43.49% ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 4.18) *T. ferrooxidans* sat–apr สามารถขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ได้มากกว่า *T. ferrooxidans* Y4-3 3.8 เท่า



ภาพที่ 4.18 ประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ *T. ferrooxidans* sat–apr

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย