# การสังเคราะห์ตัวติดตามสำหรับตรวจหาโพลีฟอสเฟตแบคทีเรียในน้ำเสีย

นางสาวอุรัจฉวี อุณหเลขกะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1110-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# SYNTHESIS OF PROBE FOR THE DETECTION OF POLYPHOSPHATE BACTERIA IN WASTEWATER

Miss Uratchwee Unhalekhaka

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 2001

ISBN 974-03-1110-5

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การสังเคราะห์ตัวติดตามสำหรับตรวจหาโพลีฟอสเฟตแบคทีเรียในน้ำเสีย |
| โดย | นางสาวอุรัจฉวี อุณหเลขกะ |
| สาขาวิชา | จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดี
คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ : การสังเคราะห์ตัวติดตามสำหรับตรวจหาโพลีฟอสเฟตแบคทีเรียในน้ำเสีย. (SYNTHESIS OF PROBE FOR THE DETECTION OF POLYPHOSPHATE BACTERIA IN WASTEWATER) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 99 หน้า. ISBN 974-03-1110-5

งานวิจัยนี้แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บจากโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสีย พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 143 สายพันธุ์ และเมื่อย้อมสีแบคทีเรียด้วยอัลคาไลน์ ลอฟเฟลอร์ส เมทิลีน บลู พบแบคทีเรียที่สามารถสะสมโพลีฟอสเฟตได้ 10 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด และเมื่อทำการตรวจความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ภายใต้ภาวะไร้อากาศและมีการให้อากาศ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ คือ CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 ที่มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับไว้ภายในเซลล์มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียตัวอย่างดังกล่าว พบว่า CUW-1 น่าจะเป็น *Propionibacterium* sp., สายพันธุ์ CUW-3 น่าจะเป็น *Corynebacterium* sp. และสายพันธุ์ CUW-8 น่าจะเป็น *Renibacterium* sp. และเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โพลีฟอสเฟตไคเนสของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ในสภาวะมีการให้อากาศ เท่ากับ 0.3945, 0.552 และ 0.256 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และจากการออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *ppk* ด้วยวิธีพีซีอาร์ในเชื้อตัวอย่างทั้งสามชนิดพบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวในเชื้อ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกโดยมีขนาดผลิตผลประมาณ 650 เบสแพร์ และเมื่อติดฉลากผลผลิตดังกล่าวด้วย digoxigenin แล้วใช้เป็นตัวติดตามตำแหน่งของยีน *ppk* ในเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งของยีน *ppk* ของเชื้อตัวอย่างเพียง 2 สายพันธุ์คือ CUW-1 และ CUW-3 โดยสัญญาณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3 กิโลเบสแพร์ และเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 10 กิโลเบสแพร์ ในเชื้อ *E. coli* JM109 ที่เป็นตัวควบคุมบวก

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต อุรัจฉวี อุณหเลขกะ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

## 2550923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: POLYPHOSPHATE / POLYPHOSPHATE KINASE / WASTEWATER / PROBE / POLYPHOSPHATE ACCUMULATING BACTERIA

URATCHWEE UNHALEKHAKA : THESIS TITLE. (SYNTHESIS OF PROBE FOR THE DETECTION OF POLYPHOSPHATE BACTERIA IN WASTEWATER) THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, 99 pp. ISBN 974-03-1110-5.

Using wastewater medium, 143 bacterial isolates were obtained from water samples of the Si Phraya wastewater treatment plant. Ten of the isolates are polyphosphate accumulating bacteria (PAB), proving by Alkaline Loeffler's Methylene Blue staining. Among 10 PABs, only isolates which are assigned as CUW-1, CUW-3 and CUW-8, that showed phosphate removal activity higher than 25% removal as pure cultures. By using physiological and biochemical tests, CUW-1, CUW-3 and CUW-8 was identified as *Propionibacterium* sp., *Corynebacterium* sp. and *Renibacterium* sp., respectively. Specific activity of polyphosphate kinase in aerobic condition of each strain was 0.3945, 0.552 and 0.256 unit/mg protein, respectively. Two synthetic oligonucleotide primers were designed using available amino acid sequence information on the most conserved region of the PPK proteins from many bacteria and were successfully in amplifying 650 basepairs fragment of the *ppk* gene from *E. coli* JM109 but no amplified products of the 3 selected strains were detected. The *Eco*RI digested genomic DNA from the 3 strains were hybridized with the PCR product from *E. coli* JM109 which digoxigenin labeling. Hybridization signal of CUW-1 and CUW-3 were detected at 3 kilobases whereas *E. coli* JM109 labeling with a positive control had signal around 10 kilobases.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2001

Student's Uratchwee Unhalekhaka
Advisor's Charnwit Kositanont
Co-advisor's -

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยเสมอ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ ข้อแนะนำตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและคำสั่งสอนต่างๆแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับเงินทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณนายวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร นายธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ นางสาวอรอนงค์ พริ้งศุลกะ นายปัญจพล ชิโนดม นายนิรันดร์ รุ่งสว่าง นางสาวทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ และนางสาวจิราภรณ์ โพธิ์เวชกุล ที่มีส่วนสนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ญาติพี่น้องที่สนับสนุน ให้กำลังใจ และมอบแต่สิ่งที่ดีให้มาโดยตลอด

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

คำย่อ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 22

4. ผลการวิจัย..... 45

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 62

รายการอ้างอิง..... 68

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ..... 76

ภาคผนวก ข. ..... 81

ภาคผนวก ค. ..... 87

ภาคผนวก ง. ..... 88

ภาคผนวก จ. ..... 89

ภาคผนวก ฉ. ..... 90

ภาคผนวก ช. ..... 98

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 99

# สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์..... 16

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่มียีน *ppk* อยู่ภายในจีโนม..... 19

2.3 ผลการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ 15 ชนิด..... 20

4.1 ความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 10 ไอโซเลต เมื่อวัดปริมาณด้วยชุดทดสอบฟอสเฟต Spectroquant® Phosphate Test..... 47

4.2 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต CUW-1, CUW-3 และ CUW-8..... 49

4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต CUW-1, CUW-3 และ CUW-8..... 52

4.4 แสดงผลของกิจกรรมโพลีฟอสเฟตไคเนส, ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธีของ Bradford และผลของกิจกรรมจำเพาะของสารสกัดจากเซลล์ตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่วัดได้จากสารสกัดจากเซลล์ของการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ปราศจากออกซิเจนและชุดที่มีการให้อากาศ..... 53

4.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์และ *E. coli* JM109..... 55

5.1 กิจกรรมโพลีฟอสเฟตไคเนส, ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธีของ Bradford และผลของกิจกรรมจำเพาะของสารสกัดจากเซลล์ของเชื้อ *E. coli* JM109 ที่วัดได้จากสารสกัดจากเซลล์ของการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ปราศจากออกซิเจนและชุดที่มีการให้อากาศ..... 66

# สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างของโพลีฟอสเฟต..... 5

2.2 แผนภาพของระบบอีบีพีอาร์..... 8

2.3 กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic process) ของโพลีพีแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในระบบอีบีพีอาร์..... 10

2.4 วัฏจักรของโพลีฟอสเฟตและการควบคุมทางพันธุศาสตร์ในเชื้อแบคทีเรีย *Aerobacter aerogenes*..... 18

2.5 ต้นไม้วิวัฒนาการ (evolutionary tree) ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโพลีฟอสเฟตไคเนสระหว่างคู่ของสปีชีส์, ระหว่างสปีชีส์ภายในกลุ่มและระหว่างสปีชีส์ของกลุ่มอื่น..... 21

3.1 ขั้นตอนการทำ Southern blot แบบ Capillary transfer..... 41

3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกเพื่อการไฮบริไดเซชัน..... 42

4.1 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตภายนอกเซลล์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจนของแบคทีเรียคัดเลือก 10 ไอโซเลต..... 46

4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียคัดเลือก 10 ไอโซเลต..... 48

4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูลของไอโซเลต CUW-1..... 50

4.4 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูลของไอโซเลต CUW-3..... 51

4.5 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งนิวเทรียนท์, การติดสีแกรมและปริมาณโวลูทิน แกรนูลของไอโซเลต CUW-8..... 51

4.6 แสดงผลของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง 3 สายพันธุ์และ *E. coli* JM109 บน 0.7 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เจล..... 54

4.7 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสบนอะกาโรส เจล 2 เปอร์เซ็นต์..... 57

4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CAP1 ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสที่ใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* JM109 เป็นแม่แบบ..... 58

4.9 การประมาณปริมาณตัวติดตาม PE ที่ถูกติดฉลากด้วย Digoxigenin แบบสุ่มเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของชุดทดสอบ..... 59

หน้า

4.10 ผลการไฮบริไดซ์แบบ dot blot ของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE..... 60

4.11 A. ภาพอะกาโรส เจลที่มีดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Eco*RI

B. สัญญาณจากเซาท์เทิร์นไฮบริไดเซชันของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE..... 61

# คำย่อ

$^{0}$ซ หมายถึง องศาเซลเซียส

kb. หมายถึง กิโลเบสแพร์

μm หมายถึง ไมโครเมตร

% หมายถึง เปอร์เซ็นต์

mg/l หมายถึง มิลลิกรัมต่อลิตร

pg/μl หมายถึง พิโครกรัมต่อไมโครลิตร