จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การคัดแยกเชื้อและการวิเคราะห์บน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของเชื้อคลอสทริเดียมที่สามารถผลิตอะซีโตนบิวทานอลและเอทานอล

โดย

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

กันยายน 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การคัดแยกเชื้อและการวิเคราะห์บน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของเชื้อคลอสทริเดียมที่สามารถผลิตอะซีโตนบิวทานอลและเอทานอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

กันยายน 2549

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

ขอขอบคุณ ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช สนับสนุนทุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549 (ครั้งที่ 5) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เลขหมู่
เลขทะเบียน 013989
วัน, เดือน, ปี 14 ม.ค. 52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การคัดแยกเชื้อและการวิเคราะห์บน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของเชื้อคลอสทริเดียมที่สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล และ เอทานอล

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

เดือนและปี 25 ธันวาคม 2550

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม เป็นแบคทีเรียแอนแอโรบส์ (Anaerobes) แกรมบวก (Gram positive) ลักษณะเป็นรูปท่อน (Rod shape) สามารถสร้างสปอร์ได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นคือการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ค่อนข้างยาก งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้ กับฐานข้อมูลที่ได้มีการศึกษามาแล้ว โดยเริ่มจากการคัดแยกแบคทีเรีย ทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ การสร้างเอ็นโดสปอร์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต้มเดือด เพิ่มปริมาณ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการพีซีอาร์ หาลำดับเบส และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn แล้วนำคลอสทริเดียมมาวิเคราะห์ปริมาณสารละลายที่เกิดขึ้นจากการหมักโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการวิจัยพบว่าไอโซเลต DECO-THA DECOM-PA DECOM-PE MIX-P2 และ SC-THA มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%identities) กับ *Clostridium diolis* strain DSM 5431 เท่ากับ 98 98 99 99 และ 99 ตามลำดับ และ DECOM-PB กับ FEA-PC มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ *Clostridium* sp. Kas106-4 เท่ากับ 99 ซึ่งทั้ง 7 ไอโซเลต มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและสร้างเอ็นโดสปอร์ แต่ DECOM-PB กับ SC-THA ไม่พบความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ และจากการวิเคราะห์ตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ 96 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่ใส่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้ง 7 ไอโซเลตผลิต เอทานอล อะซีโตน บิวทานอล และกรดบิวทิริค ส่วนอาหารที่ใส่เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า DECO-THA DECOM-PA DECOM-PB และ DECOM-PE ผลิตเอทานอล FEA-PC MIX-P2 และ SC-THA ผลิตเอทานอลและบิวทานอล จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า การวิเคราะห์บน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของคลอสทริเดียม ได้ผลที่น่าเชื่อถือ สะดวกและรวดเร็วมากกว่าการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Project Title Screening and 16S ribosomal DNA sequence analysis of *Clostridium* producing acetone butanol and ethanol

Name Associated Professor Warawut Chulalaksananukul Ph.D

Year 25 December 2007

ABSTRACT

The clostridia are rod-shape anaerobes, Gram positive, spore-forming bacteria. However, there is a problem with the identification of the *Clostridium* which is hard to identify. Thus, this project uses the sequences of 16S ribosomal DNA to analyze screened Clostridia with the database because this method is comfortable and reliable. First, Clostridia were screened by selective medium and then tested the abilities to reduce sulfite and to form the endospore. Next, DNA were extracted by boiling assay and amplified by PCR (Polymerase chain reaction), and 16S rDNA were sequenced and analyzed by program blastn. Acid and solvent productions by *Clostridium* were analyzed by gas chromatrography. There are 5 isolates: DECO-THA, DECOM-PA, DECOM-PE, MIX-P2 and SC-THA, which similar to *Clostridium diolis* strain DSM 5431 and the %identities are 98, 98, 99, 99 and 99 respectively. DECOM-PB and FEA-PC are similar to *Clostridium* sp. Kas106-4 and the %identities are 99. All of 7 isolates can use cellulose and form the endospore. Only DECOM-PB and SC-THA can't reduce sulfite. The acid and solvent productions in the broth incubated with *Clostridium* for 96 hrs were analyzed. All of 7 isolates in the medium which has glucose as carbon source produce ethanol, acetone, butanol and butyric acid. In the medium which has cellulose as carbon source, DECO-THA, DECOM-PA, DECOM-PB and DECOM-PE produce ethanol and FEA-PC, MIX-P2 and SC-THA produce ethanol and butanol. According to this project, the conclusion is the identification of *Clostridium* by 16S ribosomal DNA sequence analysis is more trustworthy and comfortable than the morphological analysis.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ii
สารบัญ.....iii
รายการตารางประกอบ..... iv
รายการภาพประกอบ.....v
1. บทนำ.....1
2.เครื่องมือวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....7
3. วิธีการทดลอง
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์.....10
3.2 การทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม.....10
3.3 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ลำดับบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) 11
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี 13
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรีย.....14
4.2 ผลการทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม.....14
4.3 ผลการพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)… 18
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโท-กราฟี.....29
5. สรุปผลการวิจัย.....31
6. ข้อเสนอแนะ.....33
เอกสารอ้างอิง.....34
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....36
ภาคผนวก ข Multiple Sequence Alignments ของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต.....39
ภาคผนวก ค ข้อมูลเกี่ยวกับการทำแก๊สโครมาโทกราฟี.....41

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ผลผลิตจากกระบวนการหมักของคลอสทริเดียม และตัวอย่างการนำไปใช้.....3
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของคลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการหมักและผลิตภัณฑ์ที่ได้……4
ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างและการเรียกชื่อกลุ่มแบคทีเรีย.....10
ตารางที่ 4 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในสารละลายพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ต้องการ 12
ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์.....14
ตารางที่ 6 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของทั้ง 7 ไอโซเลต……26
ตารางที่ 7 ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่คลอสทริเดียมผลิตในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....29
ตารางที่ 8 ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่คลอสทริเดียมผลิตในอาหารที่ใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....30
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Multiple Sequence Alignments…..…….....39
ตารางที่ 10 พื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 g/l……41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1 รูปร่างและเอ็นโดสปอร์ของคลอสทริเดียม.....1
ภาพที่ 2 ตัวอย่างคุณสมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนกของคลอสทริเดียม.....5
ภาพที่ 3 (ก) Anaerobic jar ที่ใส่ GENbox anaer (ข) ขวดแก้วเลี้ยงเชื้อ จุกยาง และคลิมเปอร์ (ใช้ปิดฝาโลหะ).....8
ภาพที่ 4 ลักษณะของ DECO-THA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....15
ภาพที่ 5 ลักษณะของ DECOM-PA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....15
ภาพที่ 6 ลักษณะของ DECOM-PB (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....16
ภาพที่ 7 ลักษณะของ DECOM-PE (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....16
ภาพที่ 8 ลักษณะของ FEA-PC (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....16
ภาพที่ 9 ลักษณะของ MIX-P2 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....17
ภาพที่ 10 ลักษณะของ SC-THA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์.....17
ภาพที่ 11 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บน 1.0% อะกาโรสเจล.....18
ภาพที่ 12 ผลการ alignment ส่วนต้นของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ DECOM-PB ที่ได้จาก ไพร์เมอร์ 27f (สายดีเอ็นเอ สายบน) กับส่วนท้ายของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ได้จาก ไพร์เมอร์ 1492r (สายล่าง) และบริเวณแถบสีเทาคือ ส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน.....27

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 13 phylogenetic tree ของทั้ง 12 ลำดับเบส ที่มาพร้อมกับการทำ Multiple Sequence Alignments ด้วยโปรแกรม ClustalW version (1.83) จากเวปไซต์ของ Kyoto University Bioinformatics center (http://align.genome.jp/).....40

ภาพที่ 14 Chromatogram ของ standard ความเข้มข้น 2 g/l โดย ethanol acetone acetic acid butanol และ butyric acid มี retention time คือ 1.067 1.693 2.102 5.567 และ 10.927 ตามลำดับ.....41

ภาพที่ 15 Standard curve ของ ethanol.....42

ภาพที่ 16 Standard curve ของ acetone.....42

ภาพที่ 17 Standard curve ของ acetic acid.....42

ภาพที่ 18 Standard curve ของ butanol.....43

ภาพที่ 19 Standard curve ของ butyric acid.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

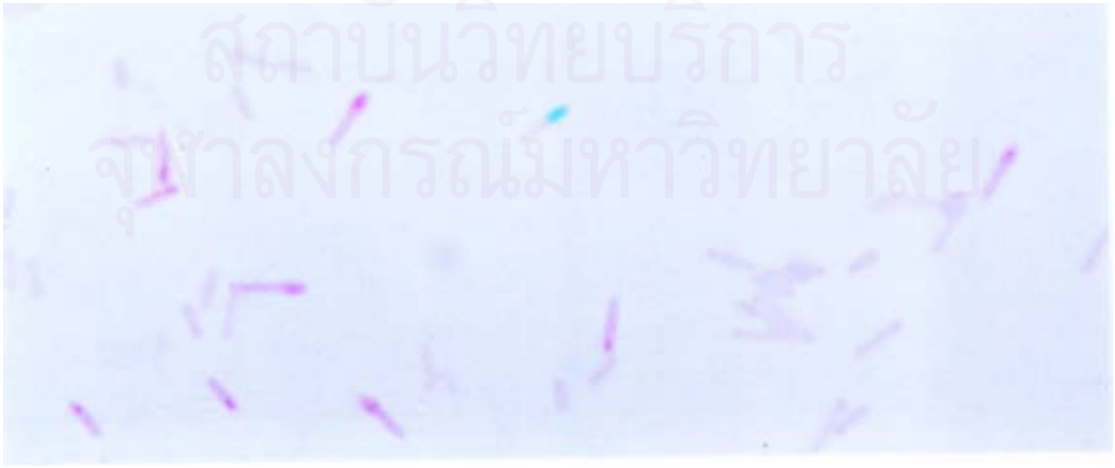
1.1 บทนำ

แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม เป็นแบคทีเรียแอนแอโรบส์ (Anaerobes) แกรมบวก (Gram positive) มีลักษณะเป็นรูปท่อน (Rod shape) สามารถสร้างสปอร์ได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ คลอสทริเดียมมักพบทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง น้ำ และบางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณลำไส้ (Morris, 1993)

คลอสทริเดียม มีทั้งชนิดที่เป็น pathogenic (ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์) และ non-pathogenic มีการค้นพบคลอสทริเดียมตั้งแต่ช่วง ค.ศ.1880 -1900 ตัวอย่างของคลอสทริเดียมที่ทำให้เกิดโรคในคนที่พบคือ

- *C. tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (tetanus)
- *C. perfringens* เกิด gas gangrene บาดแผลที่ติดแบคทีเรียนี้ gas gangrene จะทำให้เลือดไปเลี้ยงไม่พอ แผลเน่า เป็นพิษ และเสียชีวิตได้
- *C. difficle* ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่อักเสบและเกิดอาการท้องร่วง (pseudomembranous colitis)
- *C. botulinum* เกิดอาการอาหารเป็นพิษ (botulism) และ neurotoxin ทำให้เป็นอัมพาต และเสียชีวิตได้

สำหรับกลุ่มที่เป็น non-pathogenic ประโยชน์ที่เราได้รับจากคลอสทริเดียมกลุ่มนี้คือ ความสามารถในกระบวนการหมัก (fermentation metabolism) และย่อยสารประกอบอินทรีย์หลายอย่าง เช่น แป้ง เซลลูโลส และน้ำตาล ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น เอทานอล บิวทานอล อะซีโตน เป็นต้น (Maddox, Qureshi และ Gutierrez, 1993)



ภาพที่ 1 รูปร่างและเอ็นโดสปอร์ของคลอสทริเดียม

Loius Pasteur เป็นบุคคลแรกที่ได้อธิบายถึงกระบวนการสร้าง butanol จากการหมักของแบคทีเรีย และต่อมา ก็มีรายงานถึงความสามารถในการสร้าง butanol โดยการหมักของแบคทีเรียแอนแอโรบส์ และในปี ค.ศ.1905 Schardinger เป็นผู้ที่รายงานถึงการสร้าง acetone

ปัญหาที่เกิดขึ้นในช่วงนั้นในประเทศอังกฤษคือ ยางธรรมชาติมีไม่เพียงพอ จึงมีความคิดที่จะผลิตยางสังเคราะห์ขึ้น โดยผู้ที่มีส่วนสำคัญในโครงการนี้คือ นักเคมีที่ชื่อ **Chaim Azriel Weizmann** อยู่ที่ Manchester University (ซึ่งภายหลังได้ดำรงตำแหน่งประธานของ the World Zionist Organisation เป็นประธานาธิบดีคนแรกของอิสราเอล และเป็นผู้ก่อตั้งสถาบันวิจัย the Weizmann Institute of Science ในอิสราเอล) จากการศึกษาของเขาระบุว่า สารสำคัญที่จะนำมาสร้าง butadiene หรือ isoprene ซึ่งจะนำมาใช้ในการผลิตยางสังเคราะห์นั่นก็คือ butanol หรือ isoamyl alcohol

ในช่วงปี **ค.ศ.**1912-1914 Weizmann สามารถแยกแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งต่อมาได้ชื่อว่า **Clostridium acetobutylicum** ซึ่งคุณสมบัติที่โดนเด่นของแบคทีเรียชนิดนี้คือสามารถหมัก starchy substance ได้หลายชนิด และสามารถผลิต acetone และ butanol ได้มากกว่าแบคทีเรียอื่น โดยเรียกกระบวนการหมักนี้ว่า Acetone-Butanol-Ethanol fermentation หรือ ABE fermentation

เมื่อเกิดสงครามโลกครั้งที่ 1 ในช่วงเดือนสิงหาคมปี ค.ศ.1914 ทหารอังกฤษมีความต้องการใช้ smokeless powder (cordite) ซึ่งต้องใช้ acetone เป็น solvent ในส่วนประกอบสำคัญในการผลิต ซึ่งปกติแล้ว อังกฤษสามารถผลิต acetone ได้จาก calcium acetate ที่นำเข้ามาในประเทศ แต่เมื่อเกิดภาวะสงครามการนำเข้านี้จึงถูกตัดขาดไป จึงมีโรงงานที่ทำ ABE fermentation เกิดขึ้นหลายแห่ง และผลจากการปิดกันจากประเทศเยอรมัน ทำให้ขาดแคลนวัตถุดิบที่จำนำมาใช้ในการผลิต solvent ทางออกสำหรับปัญหานี้คือ การนำ fermentation process ที่ Weizmann เป็นคนพัฒนานี้ไปทำในประเทศอื่นซึ่งไม่มีปัญหาเรื่องวัตถุดิบ เช่น ประเทศในจักรวรรดิอังกฤษ แคนาดา และสหรัฐอเมริกา ที่สุดเมื่อสงครามสิ้นสุดลง ความต้องการใช้ acetone ก็ลดน้อยลง แต่การวิจัยเกี่ยวกับ ABE fermentation ยังคงดำเนินต่อไป เพราะมีความต้องการใช้ butanol เพิ่มมากขึ้น ซึ่งนำมาใช้เป็นส่วนผสมใน nitrocellulose lacquers และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะ

ในช่วงปี ค.ศ.1930 ได้มีวัตถุดิบใหม่ซึ่งมีราคาถูก และมีเป็นจำนวนมากนั่นคือ กากน้ำตาล และในปี ค.ศ.1935 ได้มีการใช้ *Clostridium sacchroacetobutylicum* จาก lab ที่ Terre Haute หลังจากนั้น โรงงานที่ใช้กากน้ำตาลในการหมักก็เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว

เมื่อเกิดสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศอังกฤษมีความต้องการ acetone จำนวนมากอีกครั้ง จึงมีการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อจะได้ผลิต solvent ได้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยศึกษาวิจัยทั้งสภาวะที่ใช้ในการหมัก กระบวนการที่ใช้ในการสกัด solvent ออกมา หลังสงครามสิ้นสุดลงจนถึงประมาณปี 1960 ในประเทศอังกฤษ และสหรัฐอเมริกามีการใช้ ABE fermentation น้อยลงเนื่องจากสาเหตุสำคัญ 2 ประการคือ 1)การนำกากน้ำตาลไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ ทำให้ราคาของกากน้ำตาลนั้นสูงขึ้น และ 2) การเติบโตขึ้นของ petrochemical industry ทำให้มีการผลิต solvent โดยกระบวนการทางเคมีเพิ่มขึ้น

เนื่องจากในช่วงปี ค.ศ. 1970 เกิดวิกฤติการณ์ราคาน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น ประกอบกับความวิตกกังวลเกี่ยวกับปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียม และปริมาณน้ำมันดิบที่มีอย่างจำกัด Fermentation process จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Morris, 1993)

ตารางที่ 1 ผลผลิตจากกระบวนการหมักของคลอสทริเดียม และตัวอย่างการนำไปใช้

	ตัวอย่างการนำไปใช้
Acetone	ผลิต cordite / ทำปฏิกิริยากับ phenol ได้สารที่นำไปใช้ผลิต polymer หลายชนิด เช่น polycarbonates, polyurethanes, epoxy resins / ทำน้ำยาล้างเล็บ / เป็นส่วนผสมใน rubber monomer, butadiene, dimethyl butadiene
Butanol	ใช้เป็นเชื้อเพลิง / ใช้ในงานด้านเคมีและสิ่งทอ / เป็นส่วนผสมในrubber monomer, butadiene, dimethyl butadiene / เป็นสารสกัดในอุตสาหกรรมอาหาร
Ethanol	เป็น solvent ในการผลิตน้ำยาเคลือบเงา และน้ำหอม / เป็นส่วนประกอบของยา / เป็นสาร disinfectant / ใช้ดองตัวอย่างพืช สัตว์ / เป็นเชื้อเพลิงและ gasoline additive (ได้ gasohol)
Acetic acid	ใช้ในการผลิตสารประกอบหลายชนิด / ผลิต vinyl acetate monomer, acetic anhydride และสารพวก ester / ทำน้ำส้มสายชู
Butyric acid	ใช้ในการผลิตสารพวก butyrate esters โดยใช้เป็น food และ perfume additive
CO_2 (gas)	ทำเป็นน้ำแข็งแห้ง / ใส่ในเครื่องดื่มที่มีฟองฟู่ / คาร์บอนไดออกไซด์เหลวใช้เป็น solvent สำหรับ organic compound หลายชนิด
H_2 (gas)	ใช้ใน chemical และ petroleum industries เช่น Harbor process ในการผลิตแอมโมเนีย / ใช้ในการทำ hydrogenation ในไขมันและน้ำมัน เช่น การทำครีม

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของคลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการหมักและผลิตภัณฑ์ที่ได้

Organism	*Substrates*	*Products*
C. thermoaceticum	Sugars, H_2 + CO_2	Acetate
C. thermoautotrophicum *C. aceticum*	CO	
C. thermolacticum	Sugars	Lactate
C. propionicum	Lactate	Propionate
C. tyrobutyricum *C. butyricum*	Sugars	Butyrate, acetate, CO_2 + H_2
C. kluyveri	Ethanol, acetate	Butyrate, caproate, H_2
C. acetobutylicum *C. beijerinckii*	Sugars, starch	Acetone, butanol, ethanol, isopropanol, CO_2, H_2, acetate, butyrate
C. thermohydrosulfuricum	Starch, sugars	Ethanol, CO_2, H_2, acetate
C. thermocellum	Cellulose, sugars	
C. thermosaccharolyticum	Starch, sugars	
C. sphenoides	Starch, sugars	

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารไบโอโพลีเมอร์พบทั่วไปในธรรมชาติและในขยะทางอุตสาหกรรม-เกษตร หรือของเสียจากอุตสาหกรรม (Lee, Forsberg และ Gibbins, 1985) และในปัจจุบันเริ่มมีการนำขยะเหล่านี้มาใช้ประโยชน์มากขึ้น ตัวอย่างหนึ่งคือ การนำเซลลูโลสเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบของการย่อยสลายในถังหมัก (Guedon, Desvaux และ Petitdemange, 2002) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า เช่น ตัวทำละลายต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม เนื่องจากประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงได้หลากหลายและมีปริมาณสูงในเวลาอันสั้น (Morris, 1993) จึงทำให้แบคทีเรียสกุลนี้มีความโดดเด่นและถูกนำมาใช้ในการผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงอย่างแพร่หลาย ดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญอยู่ที่การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ค่อนข้างยาก การจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา อาจไม่สามารถระบุได้ถึงระดับ species จึงต้องอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีมาช่วยในการจัดจำแนก คือ การทดสอบ activities ของ enzyme ต่างๆ ที่ผลิตได้ในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งต้องทดสอบ 10-20 activities ซึ่งยุ่งยากและเสียเวลามาก กว่าจะสามารถระบุได้ในระดับ species และแม้ว่าจะมีการผลิตชุด kit ที่ใช้ในการทดสอบ แต่ผลการทดสอบที่ได้อาจคลาดเคลื่อนได้ด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่างกัน การสังเกตสีของผลการทดสอบ (Clarridge, 2004)

	GELATIN HYDROLYSIS	GLUCOSE FERMENTATION	LECITHINASE	LIPASE	INDOLE	BUTYRIC ACID PRODUCED IN PYG	ISOACIDS PRODUCED IN PYG	AEROBIC GROWTH	UREASE	MILK REACTION	FERMENTATION OF: LACTOSE	MALTOSE	FRUCTOSE	CELLOBIOSE	ARABINOSE	MANNOSE	XYLOSE	NITRATE REDUCTION	SPORE SHAPE AND LOCATION	END PRODUCTS FROM PYG
Saccharolytic proteolytic																				
C. bifermentans	+	+	+	-	+	+	-	-	-	d	-	W	V	-	-	-	-	ND	ND	ABL
C. sordellii	+	+	+	-	+	(+)	(+)	-	+	d	-	W	V	-	-	-	-	ND	ND	A (p ib b iv ic l)
C. perfringens	+	+	+	-	-	+	-	-	ND	d	+	+	+	-	-	+	-	ND	ND	A B L (p s)
C. novyi type A	+	+	+	+	-	+	-	-	ND	c	-	V	-	-	-	-	-	ND	OS	A P B
*C. sporogenes***	+	+	-	+	-	+	(+)	-	ND	d	-	-	-	-	-	-	-	ND	OS	A B ib iv (p v l s)
C. cadaveris	+	+	-	-	+	+	-	-	ND	cd	-	-	V	-	-	-	-	-	OT	A b
C. septicum	+	+	-	-	-	+	-	-	ND	cd	+	+	+	+	-	+	-	V	OS	A B (p)
C. difficile	+	+	-	-	-	+	+	-	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	OS	A ib B iv ic (v)
C. putrificum	+	+	-	-	-	+	+	-	ND	d	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	A ib B iv (p v l s)
Saccharolytic nonproteolytic																				
C. baratii	-	+	+	-	-	+	-	-	ND	c	+	+	+	+	-	+	-	V	ND	ND
C. tertium	-	+	-	-	-	+	-	+	ND	c	+	+	+	+	-	+	+	+	OT	A B L (s)
C. butyricum	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	c	+	+	+	+	+	+	+	-	OS	A B F (l s)
C. innocuum	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	-	-	-	-	+	-	+	-	-	OT	A B L (s)

ภาพที่ 2 ตัวอย่างคุณสมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนกของคลอสทริเดียม

16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ

16S ribosomal RNA gene (16S rDNA) เป็นส่วนที่ถอดรหัสได้เป็น small subunit ของ ribosome จึงเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อชีวิต ดังนั้นลำดับเบสบริเวณนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงไปมาก ปัจจุบันลำดับเบสบน 16S rDNA นำมาใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของ prokaryotes (Drancourt และคณะ, 2000) สาเหตุที่ทำให้ลำดับเบสของ 16S rDNA มีประโยชน์อย่างมาก เพราะประกอบด้วยทั้งส่วนที่เป็น variable region และ highly conserved region ทำให้บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการได้ โดยลำดับเบสจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตนั้น เช่น อาจบ่งชี้ได้ถึงแหล่งที่อยู่ หรือสิ่งแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตนั้น และบริเวณ conserved genes นี้สามารถหาลำดับเบสได้โดย standard primer และลำดับเบสที่ได้จะนำไป align กับลำดับเบสในฐานข้อมูล

โดยทั่วไป 16S rDNA จะมีความยาวประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยหลายบริเวณต่างๆ กัน ซึ่งมี evolutionary rates ต่างกัน และลำดับเบสความยาวเท่านี้ก็เพียงพอที่จะนำมาใช้ทาง phylogenetic (Clarridge, 2004)

งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกคลอสทริเดียม ซึ่งทำได้ รวดเร็ว สะดวก เข้าถึงง่าย มีความแม่นยำสูง โดยมีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16 เอสไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่สามารถผลิตสารละลายอินทรีย์ต่างๆ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำขั้นตอนการคัดแยกเชื้อนี้ไปใช้หาคลอสทริเดียมสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นสารละลายและเชื้อเพลิงในปริมาณสูงจากแหล่งอื่นได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์

Anaerobic jar
Hot plate
Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
PCR machine
PCR tube
pH meter
Slide and cover glass
Tip พร้อมกล่อง
เข็มฉีดยา
เครื่องโครมาโทกราฟีแก๊ส (Shimatsu Model Gc 7AG)
เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
เครื่องถ่ายรูปเจล
เครื่อง UV transilluminator
เครื่องทำ Gel electrophoresis
แท่งแก้วคน, glass spreader
ไมโครปิเปตต์ (P_2, P_{20}, P_{200}, และ P_{1000})
กระดาษชำระ
กระบอกตวง
กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
ขวด Pyrex
ขวดแก้ว จุกยาง และคลิมเปอร์
จานเลี้ยงเชื้อ
ช้อนตักสาร
ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Larminar flow
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
ตู้ดูดควัน
ตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)
ตะเกียงแอลกอฮอล์
ถุงมือยาง
บีกเกอร์
ปิเปตต์ ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
ลูป (loop)
เข็มเขี่ย (needle)
สำลี
หลอดหยดสาร
หลอด Falcon ขนาด 15 มิลลิลิตร
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
อลูมิเนียมฟอยล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก ข

ภาพที่ 3 (ก) Anaerobic jar ที่ใส่ GENbox anaer (ข) ขวดแก้วเลี้ยงเชื้อ จุกยาง และคลิมเปอร์ (ใช้ปิดฝาโลหะ)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Acetic acid
Agar
Ammonia
Avicel (crystalline cellulose)
Biotin
Calcium carbonate
Cysteine
D(+)glucose
Ferric (III) ammonium citrate
Ferrous sulfate
L-Cystenium chloride
Meat extract
Magnesium sulfate
PABA (4-aminobenzoic acid)
Peptone from casein
Peptone from meat
Potassium dihydrogen phosphate
Potassium hydrogen phosphate
Resazurin
Sodium acetate
Sodium chloride
Sodium sulfite x $7H_2O$
Starch
Yeast extract

- สารเคมีในงานดีเอ็นเอ

1 kb DNA ladder
1X TBE buffer
Agarose
Bovine serum albumin
dNTP Mixes
Ethidium bromide
Loading dye
Magnesium chloride
Primers
Taq buffer
Taq DNA polymerase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สารเคมีในขั้นตอนอื่น ๆ

3% Potassium hydroxide

5% Malachite green

70% Ethanol

95% Ethanol

6 N Hydrochloric acid

Acetic acid

Acetone

Butanol

Butyric acid

Ethanol

Immersion oil

Safranin O

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างกองปุ๋ยหมัก ชานอ้อยหมัก และอุจจาระวัว จากวังสวนจิตรลดา กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัวอย่างแต่ละแหล่ง ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งตัวอย่าง 1 กรัมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว cellulose medium broth (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเติมบิวทานอล 3 มิลลิลิตร (โดยคาดว่าบิวทานอลจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิต บิวทานอลได้) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย โดยสังเกตจากการเกิดฟองก๊าซ จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิมที่เตรียมใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำเช่นนี้อีก 5 ครั้ง เพื่อให้ได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสที่แท้จริง จากนั้นทำการเจือจางสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มไว้โดยวิธี serial ten fold dilution ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วสเปรท (spread) 0.1 มิลลิลิตรสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เจือจาง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง cellulose medium agar (ภาคผนวก ก 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวไปขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA เพื่อคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยตั้งชื่อกลุ่มแบคทีเรียตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างและการเรียกชื่อกลุ่มแบคทีเรีย

ชนิดของตัวอย่าง	การเรียกชื่อกลุ่มแบคทีเรีย
กองปุ๋ยหมัก	DECO DECOM
อุจจาระวัว	FEA
ปุ๋ยหมักผสมอุจจาระวัว	MIX
ชานอ้อยหมัก	SC

3.2 การทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม

นำแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ ความสามารถในการสร้างเอ็นโดสปอร์ อันเป็นลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามที่ทดสอบไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA และตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี KOH test (Arthi, Appalaraju และ Parvathi, 2003)

3.2.2 ศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นจากการที่เซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งถูกย่อยสลาย

3.2.3 ศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Differential Clostridia Agar (ภาคผนวก ก 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สังเกตสีดำที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.4 ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอ็นโดสปอร์ โดยวิธี Schaeffer-Fulton Spore Stain (Wistreich, 2003) โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB มาแล้ว 7 วัน มา 1-2 หยด หยดลงบนสไลด์ รอให้แห้งพอประมาณ แล้วนำสไลด์ไปผ่านไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ 2-3 ที (heat fix) หยด 5% malachite green ให้ท่วมบริเวณเชื้อ แล้วนำสไลด์ไปอังไว้บนไอจากน้ำเดือดใน water bath เป็นเวลา 5 นาที *ระวังอย่าให้ malachite green แห้ง* จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง หยด safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง นำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นแบคทีเรียติดสีชมพูหรือแดง และสปอร์ติดสีเขียว

3.3 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)

3.3.1 การเตรียมดีเอ็นแม่แบบ (template)

เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบโดยวิธีต้มเดือด โดยนำไอโซเลตที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไอโซเลตดังกล่าวปริมาณ 1 ลูปทดลอง (loop) ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร นำ microcentrifuge tube ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของเหลวส่วนบน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.3.1 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คือ forward primer 27f (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') และ reverse primer 1492r (5' GGTACCTTGTTACGACTT 3') ตามวิธีของ Gillan และคณะ (1998) โดยมีส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในสารละลายพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
แมกนิเซียมคลอไรด์	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	1x
ไพร์เมอร์ 27f	1.0 µM
ไพร์เมอร์ 1492r	1.0 µM
สารผสม dNTP (dNTP mixture)	0.2 mM
BSA (bovine serum albumin)	200 ng/µl
แม่แบบ (template)	1 pg – 1 µg
Taq DNA polymerase	1.25 U

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

Hot start	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที	
Denature	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	25 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	
End	ที่อุณหภูมิ	4 องศาเซลเซียส		

เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ โดยเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0% หลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอากาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมเหนืออากาโรสเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยอดลงในหลุม โดยช่องแรกจะเติมดีเอ็นเอมาตรฐานผสมกับสีติดตาม

จากนั้นทำอิเลคโทรโฟริซีส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวล์ต 45 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 kb DNA ladder

3.3.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

เลือกผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้จากข้อ 3.3.3 ไปหาลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ โดยใช้บริการของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ใช้ไพร์เมอร์ 27f และ 1492r แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบโดยการ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เลือกโปรแกรม nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของ GenBank จากเวปไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC)

นำไอโซเลตที่เป็นแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม จากข้อ 3.3.4 มาวิเคราะห์หาปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล และกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดอะซิติก และ กรดบิวทิริก ที่สร้างได้จากกระบวนการหมัก โดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี ในการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก ทำได้โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ peak ของสาร ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียม standard ที่ทราบความเข้มข้น เพื่อทำ standard curve ที่จะใช้ในการคำนวณหาปริมาณสาร และเพื่อให้ทราบว่าแต่ละสารนั้นจะมี retension time เท่าใด โดยเตรียม standard ให้มีความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปทำ GC นำค่าพื้นที่ใต้ peak มา plot ได้ standard curve ของตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์แต่ละชนิด และเตรียมตัวอย่างในการทำ GC โดยนำไอโซเลตที่เลือกได้จากข้อ 3.3.4 ที่บ่มอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB ใหม่ และอีก 1 มิลลิลิตรถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB ที่ใส่กลูโคสแทนเซลลูโลส เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการหมักจากซับสเตรทที่ต่างกัน บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่บ่มไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Falcon ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แต่ละ tube เติม 6 N HCl 1 หยด เก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปทำ GC ใช้โครมาโทกราฟีแก๊สของ Shimatsu Model Gc 7AG กับ recorder integrater ของ chromatopac CR1A ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ

คอลัมน์ยาว 2 เมตร ขนาด 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย porapax Q80-100 mesh

Carrier gas → 50 มิลลิลิตร/นาที (แก๊สไนโตรเจน)

Flame Ionization detector → 240 องศาเซลเซียส

Inject temperature → 240 องศาเซลเซียส

Column temperature → 200 องศาเซลเซียส

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากกองปุ๋ยหมัก ชานอ้อยหมัก และอุจจาระวัว ที่เก็บจากวังสวนจิตรลดา จังหวัดกรุงเทพฯ ตามข้อที่ 3.1-3.3 สามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต คือ DECO-THA DECOM-PA DECOM-PB DECOM-PE FEA-PC MIX-P2 และ SC-THA

4.2 ผลการทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม

4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Cellulose Medium Agar ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าขนาดของโคโลนีของทั้ง 7 ไอโซเลตค่อนข้างใกล้เคียงกัน มีรูปร่างและความหนาเหมือนกัน และเกือบทุกไอโซเลตมีขอบค่อนข้างเรียบ ยกเว้น FEA-PC ที่ขอบหยักมากกว่า ทั้ง 7 ไอโซเลตมีสีต่างกันบ้างตั้งแต่สีขาวจนถึงเหลืองอ่อนๆ ทั้งหมดผิวดูเรียบ เกือบทุกไอโซเลตโคโลนีมันวาว ยกเว้น DECOM-PA FEA-PC ที่มันวาวน้อยกว่า

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์	ลักษณะที่ศึกษา	
	โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA	รูปร่างเซลล์ และชนิดแกรม
DECO-THA	โคโลนีกลมแบน สีขาวเหลือง ผิวเรียบมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-0.9 มม.	แท่งสั้น แกรมบวก
DECOM-PA	โคโลนีกลมแบน สีขุ่นขาวเหลือง ผิวเรียบไม่ค่อยมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาด 0.4-0.6 มม.	แท่ง แกรมบวก
DECOM-PB	โคโลนีกลมแบน สีขุ่นขาวเหลือง ผิวเรียบมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาด 0.7-0.9 มม.	แท่ง แกรมบวก
DECOM-PE	โคโลนีกลมแบน สีขุ่นขาว ผิวเรียบมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาด 0.8-1.0 มม.	แท่ง แกรมบวก
FEA-PC	โคโลนีกลมแบน สีขุ่นขาว ผิวเรียบไม่ค่อยมัน ขอบหยักเล็กน้อย ทึบแสง ขนาด 0.4-0.6 มม.	แท่ง แกรมบวก
MIX-P2	โคโลนีกลมแบน สีขุ่นขาวเหลือง ผิวเรียบมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาด 0.8-1.0 มม.	แท่ง แกรมบวก

SC-THA	โคโลนีกลมแบน สีครีม ผิวเรียบมัน ขอบค่อนข้างเรียบ ทึบแสง ขนาด 0.8-1.0 มม.	แท่ง แกรมบวก

4.2.2 ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส

จากการนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Cellulose Medium Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นจากการที่เซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งถูกย่อยสลาย พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลตมีวงใสเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4-10

4.2.3 ศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์

จากการนำแบคทีเรียที่แยกได้ มาทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Differential Clostridia Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สังเกตสีดำที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า DECOM-PB และ SC-THA ไม่พบสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA ในขณะอีก 5 ไอโซเลตพบสีดำเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4-10

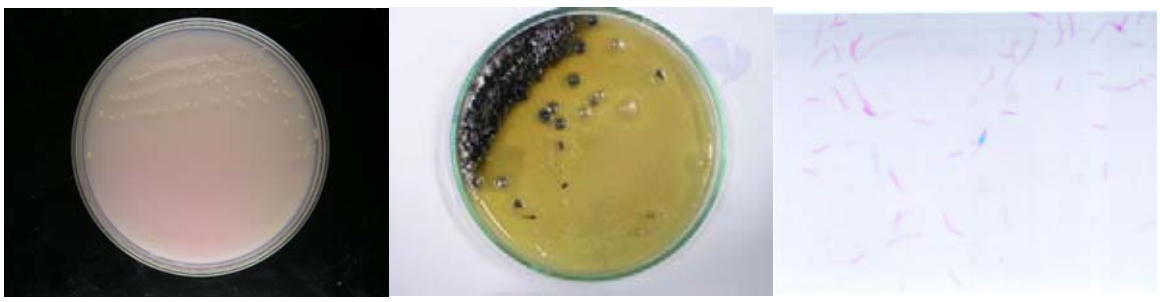
4.2.4 ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์

จากการย้อมแบคทีเรีย โดยวิธี Schaeffer-Fulton Spore Stain (Wistreich, 2003) พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ โดยตำแหน่ง และขนาดของเอ็นโดสปอร์ มีความแตกต่างกันบ้างดังแสดงในภาพที่ 4-10

ก ข ค

ภาพที่ 4 ลักษณะของ DECO-THA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

ก ข ค



ภาพที่ 5 ลักษณะของ DECOM-PA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

ก ข ค

ภาพที่ 6 ลักษณะของ DECOM-PB (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

ก ข ค

ภาพที่ 7 ลักษณะของ DECOM-PE (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

ก ข ค

ภาพที่ 8 ลักษณะของ FEA-PC (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

ก ข ค

ภาพที่ 9 ลักษณะของ MIX-P2 (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

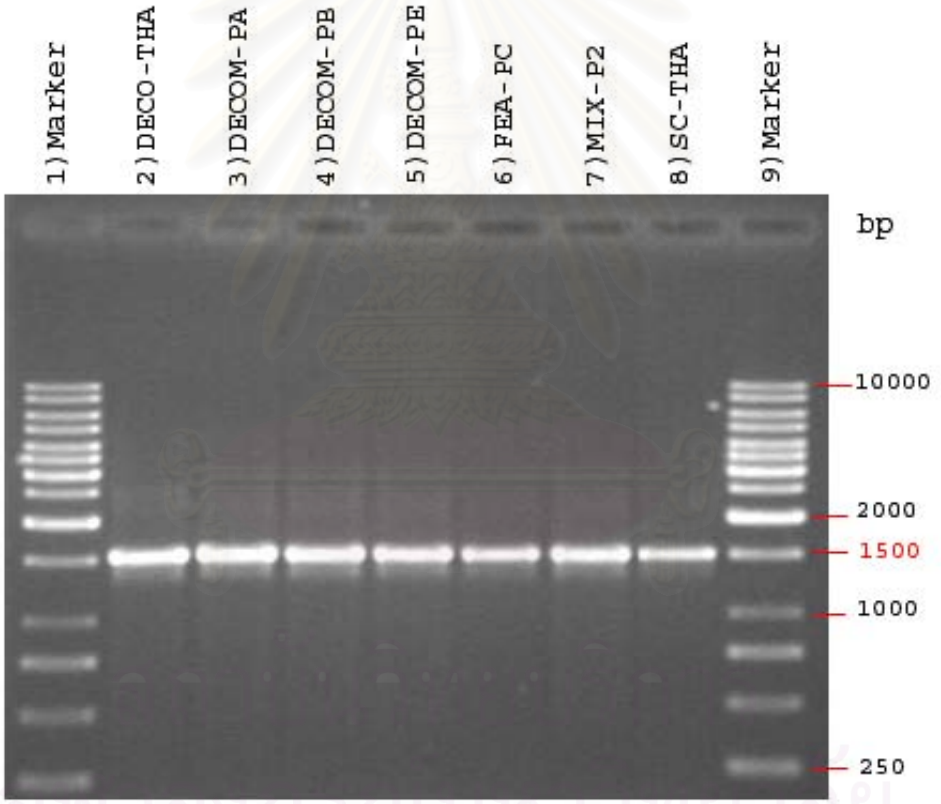
ก ข ค

ภาพที่ 10 ลักษณะของ SC-THA (ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMA (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง DCA และ (ค) รูปร่างของเซลล์และเอ็นโดสปอร์

จากการศึกษา ความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลตสามารถย่อยเซลลูโลสได้ และมีการสร้างเอ็นโดสปอร์ แต่ DECOM-PB และ SC-THA ไม่พบความสามารถเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอแล้วได้ผลออกมาเป็นแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม จึงสรุปได้ว่า คลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการใช้เซลลูโลสอาจจะไม่พบความสามารถสามารถเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์

4.3 ผลการพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)

จากการเตรียมดีเอ็นแม่แบบ (template) การเพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่-พอลิเมอเรส และวิเคราะห์ขนาดของ16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวล์ต 45 นาที เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 kb DNA ladder (Marker) ดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 3.3.1-3.3.3 พบชิ้นส่วน 16 เอส ไรโบโซมัล ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ มีขนาดประมาณ 1500 bp ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บน 1.0% อะกาโรสเจล

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ

จากการนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้ ไปหาลำดับเบสโดยใช้บริการของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ได้ลำดับเบสของ DECO-THA DECOM-PA DECOM-PB DECOM-PE FEA-PC MIX-P2 และ SC-THA เป็นดังนี้

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ DECO-THA ความยาว 1441 bp

```
   1 NTTTACGACA GAAGGACACT CCATAATGGN GNTGNAGCTC TTGCGTGAGT 50
  51 GGATTGCCCG GGGACTCCTG TCGTGGACCT TGGACACCTG CCCCATCCGC 100
 101 CAAGTGGCCT TTCTATACGA TGAGTCTTCC GCATCGAGCG TTCTGCCGTG 150
 151 CGTCCTACGC CTCCTTAAGG TATTCCGCTG TGGGCTGGAC CCGCGTCGCG 200
 201 TTGGCTAGCT GGCGAGGGGA CCGCCCCCCT AGGCGACGAT GCGTAGCCGA 250
 251 CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT 300
 301 ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGGGAAA CCCTGATGCA 350
 351 GCAACGCCGC GTGAGTGATG ACGGTCTTCG GATTGTAAAG CTCTGTCTTC 400
 401 AGGGACGATA ATGACGGTAC CTGAGGAGGA AGCCACGGCT AACTACGTGC 450
 451 CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCGG ATTTACTGGG 500
 501 CGTAAAGGGA GCGTAGGTGG ATATTTAAGT GGGATGTGAA ATACTCGGGC 550
 551 TTAACCTGGG TGCTGCATTC CAAACTGGAT ATCTAGAGTG CAGGAGAGGA 600
 601 AAGTAGAATT CCTAGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGAGATT AGGAAGAATA 650
 651 CCAGTGGCGA AGGCGACTTT CTGGACTGTA ACTGACACTG AGGCTCGAAA 700
 701 GCGTGGGGAG GCAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCCGTAAAC 750
 751 GAGGAATACT AGGTGTAGGG GGTGGTCATG ACCTCCTGTG CCGCCGCCTA 800
 801 ACGCAAGTAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGTTTAA AACTCAAGGG 850
 851 AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCAGCGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC 900
 901 AACGCGAAGA ACCTTACCTA GACTTGACAT CTCCTGAATT ACCCTTAATC 950
 951 GGGGAAGCCC TTCGGGGCAG GAAGACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC 1000
1001 TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTTATT 1050
1051 GTTAGTTGCT ACCATTTAGT TGAGCACTCT AGCGAGACTG CCCGGGTTAA 1100
1101 CCGGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGTCTAG 1150
1151 GGCTACACAC GTGCTACAAT GGCTGGTACA GAGAGATGCT AAACCGCGAG 1200
1201 GTGGAGCCTA GAGTTAGATC CAGGCTCAGT TCGGATTGTA GGCTGAAACT 1250
1251 CGCCTACATG AAGCTGGAGT TTATAGTAAT CTCGAATCAG AATGTCGCGG 1300
1301 TGAATACGTT CCCGGGCCTA GTACACACCG CCCGTCACAC CATGAGAGTT 1350
1351 GGCAATACCC TATGTTAGTG AGCTACCGCG CAAACGAGGC AGCGACCTAA 1400
1401 GGTAGGTCAN ACNACTGTAG AGTGTCCTGC TGAATGGCCC C         1441
```

ลำดับเบสบน 16 **เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ** DECOM-PA **ความยาว** 1451 bp

```
   1 NTTTTACGAT CAGTATGGAC CATCCATACG AGNGATGAAG CTCCTTCGGG 50
  51 AGCGGATTAG CGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC CTGCCTCATA 100
 101 GAGGGGAATA GCCTTTCGAA AGGAAGATTA ATACCGCATA AGATTGTAGT 150
 151 GCCGCATGGC ATAGCAATTA AAGGAGTAAT CCGCTATGAG ATGGACCCGC 200
 201 GTCGCATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC GACGATGCGT 250
 251 AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCCACATT GGGACTGAGA CACGGCCCAG 300
 301 ACTCATACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG GGGAAACCCT 350
 351 GATGCAGCAA CGCCGCGTGA GTGATGACGG TCTTCGGATT GTAAAGCTCT 400
 401 GTCTTCAGGG ACGATAATGA CGGTACCTGA GGAGGAAGCC ACGGCTAACT 450
 451 ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGATTT 500
 501 ACTGGGCGTA AAGGGAGCGT AGGTGGATAT TTAAGTGGGA TGTGAAATAC 550
 551 TCGGGCTTAA CCTGGGTGCT GCATTCCAAA CTGGATATCT AGAGTGCAGG 600
 601 AGAGGAAAGT AGAATTCCTA GGGTAGCGGT GAAAATGCGT AGAGATTAGG 650
 651 AAGAATTTCA AGTGCGAAAG GCGACTTTCT GGACTGTAAC TGACACTGAG 700
 701 GCTCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATCCCCTGG TAGTCCACGC 750
 751 CGTAAACGAT GAATACTAGG TGTAGGGGTT GTCATGACCT CTGTGCCGCC 800
 801 GCTAACGCAT TAAGTATCCC GCCTGGGGAG TACGGTCGCA AGATTAAAAC 850
 851 TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAGC AGCGGAGCAT GTGGTTTAAT 900
 901 TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCTAGAC TTGACATCTC CTGAATTACC 950
 951 CTTAATCGGG GAAGCCCTTC GGGGCAGGAA GACAGGTGGT GCATGGTTGT 1000
1001 CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC 1050
1051 CCTTATTGTT AGTTGCTACC ATTTAGTTGA GCACTCTAGC GAGACTGCCC 1100
1101 GGGTTAACCG GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCCTTA 1150
1151 TGTCTAGGGC TACACACGTG CTACAATGGC TGGTACAGAG AGATGCTAAA 1200
1201 CCGTGAGGTG GAGCCTAACT TTAGAACCAG TCTCAGTTCG GATTGTAGGC 1250
1251 TGAAACTCGC CTACATGAAG CTGGAGTTGC TAGTAATCGC GAATCAGAAT 1300
1301 GTCGCGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACTCCGCCC GTCACACCAT 1350
1351 GAGAGTTGGC AATACCCAAT ATTCGTGAGC TAACGCGCAA GCGAGGCAGC 1400
1401 GACCTAAGGT AGGTCANNCA CNTTATGAGT GATCCATGCA GATAGGNNNN 1450
1451 N
```

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ DECOM-PB **ความยาว** 1435 bp

```
   1 ATCGANCTAC CATGCATATC GAGCGATGAA GCTCCTTCGG GAGCGGATTA 50
  51 GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTCAT AGAGGGGAAT 100
 101 AGCCTTTCGA AAGGAAGATT AATACCGCAT AAGATTGTAG TGCCGCATGG 150
 151 CATAGCAATT AAAGGAGTAA TCCGCTATGA GATGGACCCG CGTCGCATTA 200
 201 GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATGCG TAGCCGACCT 250
 251 GAGAGGGTGA TCGGCCACAT TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG 300
 301 GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGGGAAACCC TGATGCAGCA 350
 351 ACGCCGCGTG AGTGATGACG GTCTTCGGAT TGTAAAGCTC TGTCTTCAGG 400
 401 GACGATAATG ACGGTACCTG AGGAGGAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG 450
 451 CAGCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT TGTCCGGATT TACTGGGCGT 500
 501 AAAGGGAGCG TAGGTGGATA TTTAAGTGGG ATGTGAAATA CTCGGGCTTA 550
 551 ACCTGGGTGC TGCATTCCAA ACTGGATATC TAGAGTGCAG GAGAGGAAAG 600
 601 TAGAATTCCT AGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGAGATTAGG AAGAATACCA 650
 651 GTGGCGAAGG CGACTTTCTG GACTGTAACT GACACTGAGG CTCGAAAGCG 700
 701 TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG 750
 751 AATACTAGGT GTAGGGGTTG TCATGACCTC TGTGCCGCCG CTAACGCATT 800
 801 AAGTATTCCG CCTGGGGAGT ACGGTCGCAA GATTAAAACT CAAAGGAATT 850
 851 GACGGGGGCC CGCACAAGCA GCGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG 900
 901 CGAAGAACCT TACCTAGACT TGACATCTCC TGAATTACCC TTAATCGGGG 950
 951 AAGCCCTTCG GGGCAGGAAG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT 1000
1001 GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTATTGTTA 1050
1051 GTTGCTACCA TTTAGTTGAG CACTCTAGCG AGACTGCCCG GGTTAACCGG 1100
1101 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GTCTAGGGCT 1150
1151 ACACACGTGC TACAATGGCT GGTACAGAGA GATGCTAAAC CGTGAGGTGG 1200
1201 AGCCAAACTT TAAAACCAGT CTCAGTTCGG ATTGTAGGCT GAAACTCGCC 1250
1251 TACATGAAGC TGGAGTTGCT AGTAATCGCG AATCAGAATG TCGCGGTGAA 1300
1301 TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG AGAGTTGGCA 1350
1351 ATACCCAAAG TTCGTGAGCT AACGCGCAAG CGGGGCAGCG ACCTAAGGTA 1400
1401 GGGTTCAGCG ATTGGTNGAA GTCGNACCAG TAANG          1435
```

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ DECOM-PE **ความยาว** 1437 bp

```
   1 ATNGNAGNCT ACCCTCCNTA TCGAGCGATG AAGCTCCTTC GGGAGCGGAT 50
  51 TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT AACCTGCCTC ATAGAGGGGA 100
 101 ATAGCCTTTC GAAAGGAAGA TTAATACCGC ATAAGATTGT AGTGCCGCAT 150
 151 GGCATAGCAA TTAAAGGAGT AATCCGCTAT GAGATGGACC CGCGTCGCAT 200
 201 TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA GGCGACGATG CGTAGCCGAC 250
 251 CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA 300
 301 CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG 350
 351 CAACGCCGCG TGAGTGATGA CGGTCTTCGG ATTGTAAAGC TCTGTCTTCA 400
 401 GGGACGATAA TGACGGTACC TGAGGAGGAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC 450
 451 AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA TTTACTGGGC 500
 501 GTAAAGGGAG CGTAGGTGGA TATTTAAGTG GGATGTGAAA TACTCGGGCT 550
 551 TAACCTGGGT GCTGCATTCC AAACTGGATA TCTAGAGTGC AGGAGAGGAA 600
 601 AGTAGAATTC CTAGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATTA GGAAGAATAC 650
 651 CAGTGGCGAA GGCGACTTTC TGGACTGTAA CTGACACTGA GGCTCGAAAG 700
 701 CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA 750
 751 TGAATACTAG GTGTAGGGGT TGTCATGACC TCTGTGCCGC CGCTAACGCA 800
 801 TTAAGTATTC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGATTAAAA CTCAAAGGAA 850
 851 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CAGCGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA 900
 901 CGCGAAGAAC CTTACCTAGA CTTGACATCT CCTGAATTAC CCTTAATCGG 950
 951 GGAAGCCCTT CGGGGCAGGA AGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC 1000
1001 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTATTGT 1050
1051 TAGTTGCTAC CATTTAGTTG AGCACTCTAG CGAGACTGCC CGGGTTAACC 1100
1101 GGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCCTT ATGTCTAGGG 1150
1151 CTACACACGT GCTACAATGG CTGGTACAGA GAGATGCTAA ACCGTGAGGT 1200
1201 GGAGCCAAAC TTTAAAACCA GTCTCAGTTC GGATTGTAGG CTGAAACTCG 1250
1251 CCTACATGAA GCTGGAGTTG CTAGTAATCG CGAATCAGAA TGTCGCGGTG 1300
1301 AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA TGAGAGTTGG 1350
1351 CAATACCCAA AGTTCGTGAG CTAACGCGCA AGCGNGGCAG CGACCTAAGG 1400
1401 TAGGGTTCAG CGATTGGTAG AAGTCGNANC NGTTAAT       1437
```

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ FEA-PC **ความยาว** 1447 bp

```
   1 GNTNGATTNT ACACCTCCTN ACGAGCGATG AAGTTCCTTC GGGANCGGAT 50
  51 TAGCGGCGGA CGGGTGANTA ACACGTGGGT AACCTGCCTC ATAGAGGGGA 100
 101 ATAGCCTTTC GAAAGGAAGA TTAATACCGC ATAAGATTGT AGTGCCGCAT 150
 151 GGCATAGCAA TTAAAGGAGT AATCCGCTAT GAGATGGACC CGCGTCGCAT 200
 201 TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA GGCGACGATG CGTAGCCGAC 250
 251 CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA 300
 301 CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG 350
 351 CAACGCCGCG TGAGTGATGA CGGTCTTCGG ATTGTAAAGC TCTGTCTTCA 400
 401 GGGACGATAA TGACGGTACC TGAGGAGGAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC 450
 451 AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA TTTACTGGGC 500
 501 GTAAAGGGAG CGTAGGTGGA TATTTAAGTG GGATGTGAAA TACTCGGGCT 550
 551 TAACCTGGGT GCTGCATTCC AAACTGGATA TCTAGAGTGC AGGAGAGGAA 600
 601 AGTAGAATTC CTAGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATTA GGAAGAATAC 650
 651 CAGTGGCGAA GGCGACTTTC TGGACTGTAA CTGACACTGA GGCTCGAAAG 700
 701 CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA 750
 751 TGAATACTAG GTGTAGGGGT TGTCATGACC TCTGTGCCGC CGCTAACGCA 800
 801 TTAAGTATTC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGATTAAAA CTCAAAGGAA 850
 851 TTGACGGAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCAGCGGAG CATGTGGTTT 900
 901 AATTCGAAGC AACGCGAAGA ACCTTACCTA GACTTGACAT CTCCTGAATT 950
 951 ACCCTTAATC GGGGAAGCCC TTCGGGGCAG GAAGACAGGT GGTGCATGGT 1000
1001 TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC 1050
1051 AACCCTTATT GTTAGTTGCT ACCATTTAGT TGAGCACTCT AGCGAGACTG 1100
1101 CCCGGGTTAA CCGGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC 1150
1151 TTATGTCTAG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGCTGGTACA GAGAGATGCT 1200
1201 AAACCGTGAG GTGGAGCCAA ACTTTAAAAC CAGTCTCAGT TCGGATTGTA 1250
1251 GGCTGAAACT CGCCTACATG AAGCTGGAGT TGCTAGTAAT CGCGAATCAG 1300
1301 AATGTCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC 1350
1351 CATGAGAGTT GGCAATACCC AAAGTTCGTG AGCTAACGCG CAAGCGNGGC 1400
1401 AGCGACCTAA GGTAGGGTCA GCGANTGGTT GAGTTGNACC GNTTGAT    1447
```

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ MIX-P2 ความยาว 1437 bp

```
   1 NTNNTTGTNC ACCTCCNAAT CGAGCGATGA AGCTCCTTCG GGAGCGGATT 50
  51 AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGTA ACCTGCCTCA TAGAGGGGAA 100
 101 TAGCCTTTCG AAAGGAAGAT TAATACCGCA TAAGATTGTA GTGCCGCATG 150
 151 GCATAGCAAT TAAAGGAGTA ATCCGCTATG AGATGGACCC GCGTCGCATT 200
 201 AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG GCGACGATGC GTAGCCGACC 250
 251 TGAGAGGGTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC 300
 301 GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGGGAAACC CTGATGCAGC 350
 351 AACGCCGCGT GAGTGATGAC GGTCTTCGGA TTGTAAAGCT CTGTCTTCAG 400
 401 GGACGATAAT GACGGTACCT GAGGAGGAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA 450
 451 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTACTGGGCG 500
 501 TAAAGGGAGC GTAGGTGGAT ATTTAAGTGG GATGTGAAAT ACTCGGGCTT 550
 551 AACCTGGGTG CTGCATTCCA AACTGGATAT CTAGAGTGCA GGAGAGGAAA 600
 601 GTAGAATTCC TAGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATTAG GAAGAATACC 650
 651 AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGACTGTAAC TGACACTGAG GCTCGAAAGC 700
 701 GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT 750
 751 GAATACTAGG TGTAGGGGTT GTCATGACCT CTGTGCCGCC GCTAACGCAT 800
 801 TAAGTATTCC GCCTGGGGAG TACGGTCGCA AGATTAAAAC TCAAAGGAAT 850
 851 TGACGGGGGC CCGCACAAGC AGCGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCAAC 900
 901 GCGAAGAACC TTACCTAGAC TTGACATCTC CTGAATTACC CTTAATCGGG 950
 951 GAAGCCCTTC GGGGCAGGAA GACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG 1000
1001 TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATTGTT 1050
1051 AGTTGCTACC ATTTAGTTGA GCACTCTAGC GAGACTGCCC GGGTTAACCG 1100
1101 GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCCTTA TGTCTAGGGC 1150
1151 TACACACGTG CTACAATGGC TGGTACAGAG AGATGCTAAA CCGTGAGGTG 1200
1201 GAGCCAAACT TTAAAACCAG TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGAAACTCGC 1250
1251 CTACATGAAG CTGGAGTTGC TAGTAATCGC GAATCAGAAT GTCGCGGTGA 1300
1301 ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GAGAGTTGGC 1350
1351 AATACCCAAA GTTCGTGAGC TAACCGCGCA AGCGNGGCAG CGACCTAAGG 1400
1401 TAGGGTCAGC GATTGGTTGA AGTTGTANNG TTTGANT      1437
```

ลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ SC-THA ความยาว 1434 bp

```
   1 ATCGAGNCTA CCTGCNTATC GAGCGATGAA GTTCCTTCGG GAACGGATTA 50
  51 GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTCAT AGAGGGGAAT 100
 101 AGCCTTTCGA AAGGAAGATT AATACCGCAT AAGATTGTAG TGCCGCATGG 150
 151 CATAGCAATT AAAGGAGTAA TCCGCTATGA GATGGACCCG CGTCGCATTA 200
 201 GCTAGTTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGATGCG TAGCCGACCT 250
 251 GAGAGGGTGA TCGGCCACAT TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG 300
 301 GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGGGAAACCC TGATGCAGCA 350
 351 ACGCCGCGTG AGTGATGACG GTCTTCGGAT TGTAAAGCTC TGTCTTCAGG 400
 401 GACGATAATG ACGGTACCTG AGGAGGAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG 450
 451 CAGCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT TGTCCGGATT TACTGGGCGT 500
 501 AAAGGGAGCG TAGGTGGATA TTTAAGTGGG ATGTGAAATA CTCGGGCTTA 550
 551 ACCTGGGTGC TGCATTCCAA ACTGGATATC TAGAGTGCAG GAGAGGAAAG 600
 601 TAGAATTCCT AGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGAGATTAGG AAGAATACCA 650
 651 GTGGCGAAGG CGACTTTCTG GACTGTAACT GACACTGAGG CTCGAAAGCG 700
 701 TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG 750
 751 AATACTAGGT GTAGGGGTTG TCATGACCTC TGTGCCGCCG CTAACGCATT 800
 801 AAGTATTCCG CCTGGGGAGT ACGGTCGCAA GATTAAAACT CAAAGGAATT 850
 851 GACGGGGGCC CGCACAAGCA GCGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG 900
 901 CGAAGAACCT TACCTAGACT TGACATCTCC TGAATTACCC TTAATCGGGG 950
 951 AAGCCCTTCG GGGCAGGAAG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT 1000
1001 GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTATTGTTA 1050
1051 GTTGCTACCA TTTAGTTGAG CACTCTAGCG AGACTGCCCG GGTTAACCGG 1100
1101 GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GTCTAGGGCT 1150
1151 ACACACGTGC TACAATGGCT GGTACAGAGA GATGCTAAAC CGTGAGGTGG 1200
1201 AGCCAAACTT TAAAACCAGT CTCAGTTCGG ATTGTAGGCT GAAACTCGCC 1250
1251 TACATGAAGC TGGAGTTGCT AGTAATCGCG AATCAGAATG TCGCGGTGAA 1300
1301 TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG AGAGTTGGCA 1350
1351 ATACCCAAAG TTCGTGAGCT AACGCGCAAG CGAGGCAGCG ACCTAAGGTA 1400
1401 GGGTCAGCGA TTGGTAGAAG TCGNANCNGT AAAN             1434
```

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn เพื่อนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสต่างๆ ใน GenBank พบว่า ทั้ง 7 ไอโซเลต มีลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมดังแสดงในตารางที่ 6

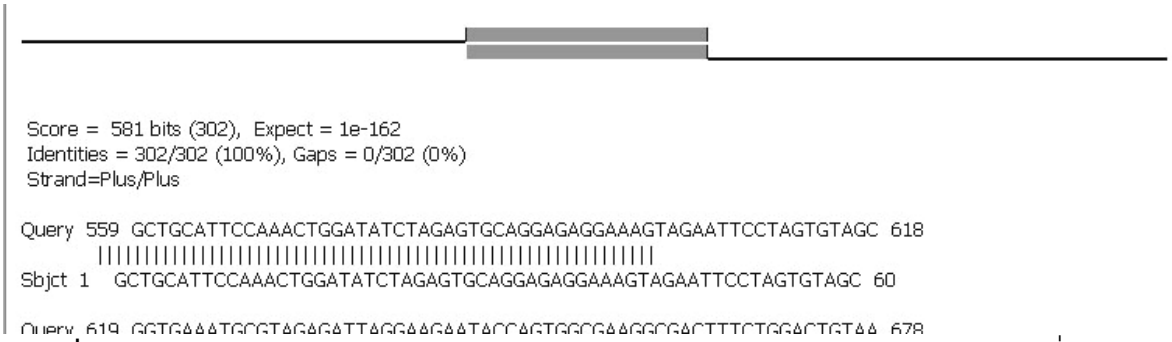
ตารางที่ 6 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ คล้ายกับลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของทั้ง 7 ไอโซเลต

จุลินทรีย์คัดเลือก	สายพันธุ์จุลินทรีย์	% ความเหมือน	score	Accession number ใน GenBank
DECO-THA	*Clostridium diolis* strain DSM 5431	98	2557	AJ458418
DECOM-PA	*Clostridium diolis* strain DSM 5431	98	2577	AJ458418
DECOM-PB	*Clostridium* sp. Kas106-4	99	2738	AB114263
DECOM-PE	*Clostridium diolis* strain DSM 5431	99	2734	AJ458418
FEA-PC	*Clostridium* sp. Kas106-4	*99 / 99	*1637 / 1104	AB114263
MIX-P2	*Clostridium diolis* strain DSM 5431	99	2734	AJ458418
SC-THA	*Clostridium diolis* strain DSM 5431	99	2732	AJ458418

*เนื่องจาก FEA-PC มีลำดับเบสช่วงหนึ่งที่ไม่คล้ายคลึงลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล ทำให้ได้ส่วนที่มีความคล้ายคลึงกับ *Clostridium* sp. Kas106-4 แบ่งเป็นสองบริเวณ

จากการเตรียมดีเอ็นแม่แบบ (template) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีการต้มเดือด การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์ 27f เป็น forward primer และ ไพร์เมอร์ 1492r เป็น reverse primer ซึ่งทั้ง 27f และ 1492r เป็น universal primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ prokaryote (Gillan และคณะ, 1998) พบว่าเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและได้ผลดี

จากการทดลองใช้ไพร์เมอร์ตัวเดียวในการหาลำดับเบสคือ forward primer 27f นั้น สามารถหาลำดับเบสได้ประมาณ 840-880 bp เท่านั้น จึงจำเป็นต้องใช้ reverse primer คือ 1492r ด้วย เพื่อให้ได้ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ครบทั้งสายพอดี ดังแสดงในภาพที่



ภาพที่ 12 ผลการ alignment ส่วนต้นของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของ DECOM-PB ที่ได้จาก ไพร์เมอร์ 27f (สายดีเอ็นเอ สายบน) กับส่วนท้ายของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ได้จาก ไพร์เมอร์ 1492r (สายล่าง) และบริเวณแถบสีเทาคือ ส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน

จากผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม blastn พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%identities) กับ *Clostridium diolis* strain DSM 5431 และ *Clostridium* sp. Kas106-4 ถึง 98-99% โดย *Clostridium diolis* strain DSM 5431 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยน Glycerol ซึ่งเป็น by product ของกระบวนการ saponification หรือ transesterification ไปเป็น 1,3-propanediol ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Biebl และคณะ, 1992)

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงในอันดับรองลงมาจากการ blast พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต ก็มีความคล้ายคลึงกับคลอสทริเดียม สายพันธุ์ที่มีความสามารถในกระบวนการหมัก (ABE fermentation) เช่น *C. acetobutylicum, C. beijerinckii*, *C. butylicum* และ *C. sacchroacetobutylicum* เป็นต้น จึงสรุปได้ว่าคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้นั้นเป็นกลุ่มเดียวกันกับคลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการหมักจริงๆ

โดยทั่วไปแล้วเมื่อ alignment แล้วมีความแตกต่างกันไม่เกิน 1% จะถือว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน และถ้าหากมีความแตกต่างกันไม่เกิน 3% ถือว่าเป็นสกุลเดียวกัน โดยห้ามมีลำดับเบสที่เป็น N อยู่เกินกว่า 1% จากลำดับทั้งหมด (Drancourt et al., 2000) แต่ในบางงานวิจัยก็แสดงให้เห็นว่า ความแตกต่างที่ไม่เกิน 1% นั้นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น interoperon, interstrain หรือ interspecific level กันแน่ (Clayton และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของคลอสทริเดียมในกลุ่มที่มีความสามารถในการหมักนี้มีความคล้ายคลึงกันสูงมากๆ โดยสังเกตจากลำดับเบสในฐานข้อมูลพบว่าแตกต่างกันเพียงไม่กี่เบส

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตมาทำ Multiple Sequence Alignments ด้วยโปรแกรม ClustalW version 1.83 จากเวปไซต์ของ Kyoto University Bioinformatics center (http://align.genome.jp/) เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอกันเอง โดยเลือก *Clostridium tetani* และ *Clostridium botulinum* เป็นตัวแทนของกลุ่มที่เป็น pathogen *Clostridium* sp. Kas106-4 และ *Clostridium diolis* เป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับทั้ง 7 ไอโซเลตมากที่สุดจากผลของการ blast และ *Bacillus subtilis* เป็น out group เพื่อพิสูจน์ว่าคลอสทริเดียมในกลุ่มที่มีความสามารถในการหมักนี้ มีความคล้ายคลึงกันสูงมากๆ แต่ก็มีความแตกต่างจากกลุ่มที่เป็น pathogen หรือต่างจากแบคทีเรียสกุลอื่น

ผลการ Multiple Sequence Alignments พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต กับ *Clostridium diolis* strain DSM 5431 และ *Clostridium* sp. Kas106-4 มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มที่เป็น pathogen เพียง 80-90% และมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* เพียง 70-80% (ภาคผนวก ข) และเมื่อพิจารณาผลการ blast ควบคู่กับการทำ Multiple Sequence Alignments และผลของลักษณะและคุณสมบัติที่ทดสอบ อาจสรุปได้ว่าทั้ง 7 ไอโซเลตนั้นคือสปีชีส์เดียวกัน และเป็น dominant species กลุ่ม DECO DECOM ที่พบในดินบริเวณวังสวนจิตรลดา แต่อาจเป็นคนละสายพันธุ์ โดยตัวที่ต่างจากตัวอื่นๆ มากที่สุดคือ FEA-PC

ปัจจุบันการใช้ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ในการจัดจำแนกคลอสทริเดียมในระดับสปีชีส์ หรือระดับสายพันธุ์สามารถทำได้ โดยการนำเทคนิคอื่นมาช่วย เช่น การจำแนก pattern ของ band จากการทำ Pulsed-field gel electrophoresis (Montaya และคณะ, 2001) หรือ Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Anne-Gaëlle Le Bourhis และคณะ, 2004)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

จากการนำไอโซเลตที่เป็นแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม ที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อที่ 4.3 มาวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ และกรดอินทรีย์ที่สร้างได้จากกระบวนการหมักในซับสเตรทที่ต่างกัน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB ที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMB ที่ใส่กลูโคสแทนเซลลูโลส ซึ่งบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ใช้ *Clostridium butylicum* จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัย-วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เป็นตัวเปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้จากการหมัก) ได้ผลการทำแก๊สโครมาโทกราฟี ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่คลอสทริเดียมผลิตในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Glucose	concentration (g/L)				
Isolate	Ethanol	Acetone	Acetic acid	Butanol	Butyric acid
C. butylicum	0.267	0.296	2.728	0.583	2.562
DECO-THA	0.604	0.06	2.08	0.141	2.387
DECOM-PA	0.524	0.564	2.483	1.964	1.79
DECOM-PB	0.445	0.152	2.225	0.561	3.632
DECOM-PE	0.181	0.242	2.221	0.723	2.008
FEA-PC	0.169	0.019	3.554	0.069	4.663
MIX-P2	0.834	0.435	2.976	1.125	1.693
SC-THA	0.583	0.006	1.787	0.198	3.659

จากตารางพบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถสร้างสารละลายได้ทั้ง 5 ชนิด โดย MIX-P2 เป็นไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างสารมากที่สุด

ตารางที่ 8 ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่คลอสทริเดียมผลิตในอาหารที่ใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

Cellulose	concentration (g/L)				
Isolate	Ethanol	Acetone	Acetic acid	Butanol	Butyric acid
C. butylicum	0.032	0.009	2.371	0.041	-
DECO-THA	0.042	-	2.176	-	-
DECOM-PA	0.027	-	2.304	-	-
DECOM-PB	0.027	-	2.069	-	-
DECOM-PE	0.013	-	2.33	-	-
FEA-PC	0.043	-	ND	0.032	-
MIX-P2	0.056	-	3.45	0.040	-
SC-THA	0.032	-	2.293	0.029	-

จากตารางพบว่า แนวโน้มของปริมาณสารที่สร้างขึ้นในอาหารที่ใส่เซลลูโลส มีความสอดคล้องกับอาหารที่ใส่กลูโคส โดยทั้ง 7 ไอโซเลตสามารถสร้างเอทานอล FEA-PC เป็นไอโซเลตเดียวที่ไม่พบกรดอะซิติก FEC-PC MIX-P2 และ SC-THA สามารถสร้างบิวทานอลได้ และ MIX-P2 เป็นไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างสาร Ethanol ได้มากที่สุด

จากการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว และใช้สารตั้งต้นปริมาณน้อย แต่อาจไม่สามารถเปรียบเทียบความสามารถในการหมักกับสายพันธุ์ที่มีการใช้งานจริงอยู่แล้ว เช่น *Clostridium acetobutylicum* เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการหมักนั้นต่างกัน และไม่สามารถนำคลอสทริเดียมที่มีการใช้งานจริงมาใช้ในงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
ข้อสรุป

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกองปุ๋ยหมัก ชานอ้อยหมัก และอุจจาระวัว จากวังสวนจิตรลดา จังหวัดกรุงเทพฯ สามารถคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียได้จากทั้ง 3 แหล่ง จากนั้นนำกลุ่มแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ และความสามารถในการสร้างเอ็นโดสปอร์ จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ไปทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการพีซีอาร์ หาลำดับเบส และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต คือ DECO-THA DECOM-PA DECOM-PB DECOM-PE FEA-PC MIX-P2 และ SC-THA

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีโคโลนีที่มีขนาดและลักษณะที่ใกล้เคียงกัน สีของโคโลนีมีความแตกต่างกันบ้าง

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ความสามารถในการเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์ และความสามารถในการสร้างเอ็นโดสปอร์ พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์มีเพียง DECOM-PB และ SC-THA ที่ไม่สามารถเปลี่ยนซัลไฟต์เป็นซัลไฟด์

ถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้จำแนกถึงระดับสปีชีส์ได้ แต่เพื่อการยืนยันความถูกต้องระดับสปีชีส์ต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ มาช่วยในการจัดจำแนกร่วมด้วย โดยงานวิจัยนี้ใช้ ไพร์เมอร์ 27f เป็น forward primer และ ไพร์เมอร์ 1492r เป็น reverse primer ผลจากการเตรียมดีเอ็นแม่แบบ (template) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีต้มเดือด การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส พบแถบของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากนั้นจึงส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และไพร์เมอร์ทั้งสองเพื่อหาลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ กับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn พบว่า DECO-THA DECOM-PA DECOM-PE MIX-P2 และ SC-THA มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% identities) กับ *Clostridium diolis* strain DSM 5431 เท่ากับ 98 98 99 99 และ 99 ตามลำดับ และ DECOM-PB กับ FEA-PC มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ *Clostridium* sp. Kas106-4 เท่ากับ 99 จากผลการ blast สามารถสรุปได้ว่าทั้ง 7 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมและสามารถระบุต่อไปถึงสปีชีส์ได้

จากการวิเคราะห์ตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ 96 ชั่วโมง โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าอาหารที่ใส่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้ง 7 ไอโซเลตผลิตเอทานอล อะซีโตน บิวทานอล และกรดบิวทิริค ส่วนอาหารที่ใส่เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า DECO-THA DECOM-PA DECOM-PB และ DECOM-PE ผลิตเอทานอล ส่วน FEA-PC MIX-P2 และ SC-THA ผลิตเอทานอลและบิวทานอล และ MIX-P2 เป็นไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างสาร Ethanol สูงถึง 0.834 g/l ซึ่งน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า กระบวนการที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ มีประสิทธิภาพในการคัดแยกแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการหมัก (ABE fermentation) และการวิเคราะห์บน 16 เอส-ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของคลอสทริเดียม ได้ผลที่น่าเชื่อถือ สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม มีการศึกษาวิจัยมานาน ทำให้มีลำดับเบสในฐานข้อมูลมากเพียงพอที่จะจัดจำแนกในระดับสปีชีย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
ข้อเสนอแนะ

ในการคัดแยกแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม อาจทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดอื่นๆ เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ของคลอสทริเดียมที่คัดแยกได้กับไอโซเลตที่ได้ในงานวิจัยนี้

ในการเตรียมดีเอ็นแม่แบบ (template) อาจเปลี่ยนวิธีการการเตรียมดีเอ็นแม่แบบ เพื่อเปรียบเทียบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ

ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 bp นั้น มีความยาวมากเกินไปที่จะสามารถใช้ forward primer ตัวเดียวในการหาลำดับเบสของทั้งหมด อาจแก้ปัญหาโดยการใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ในการเพิ่มจำนวน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ คือคู่แรกทำการเพิ่มลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอช่วงครึ่งแรก และอีกคู่เพิ่มลำดับเบสช่วงครึ่งหลัง หรือตัดส่วนของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ เป็นช่วงแล้วโคลนเข้าไปใน พลาสมิด ก่อนที่จะนำไปหาลำดับเบส

ในการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี อาจทำการทดลองต่อว่าปริมาณสารที่สร้างได้หลังจากการหมักมากกว่า 96 ชั่วโมงนั้นมีปริมาณเท่าใด เช่น วิเคราะห์หลังจากที่หมักไว้ 6 8 10 12 และ 14 วัน เพื่อดูว่า ไอโซเลตไหนสามารถสร้างสารได้มากที่สุด ในเวลาที่เร็วที่สุด หรือทดลองเปลี่ยนซับสเตรทให้หลากหลายยิ่งขึ้น เพื่อดูว่าไอโซเลตไหนมีความสามารถในการย่อย และสร้างตัวทำละลายอินทรีย์และกรดอินทรีย์จากการหมักด้วยซับสเตรทที่หลากหลายได้ดีกว่ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Anne-Gaëlle Le Bourhis., Saunier, K., Joël Doré.,Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R., and Tholozan, J. L. 2004. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 71:29-38.

Arthi, K., Appalaraju, B., and Parvathi, S. 2003. Vanomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to Gram staining of bacteria. Indian J Med Microbiol. 21:121-123.

Biebl, H., Marten, S., Hippe, H., and Deckwer, W. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. Appl Microbiol Biotechnol. 36:592-597.

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 17:840-862.

Clayton, R. A., Sutton, G., Hinkle, P. S., Bult, C., and Fields, C. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. Int. J. syst. Bacteriol. 45:595-599.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J., and Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. 38:3623-3630.

Gillan, D. C., Speksnijder, A. G. C. L., Zwart, G., and Chantal de Ridder. 1998. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64:3464-3472.

Guedon, E., Desvaux, M., and Petitdemange, H. 2002. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. Appl. Environ. Microbiol. 68:53-58.

Lee, S. F., Forsberg, C. W., and Gibbins, L. N.1985. Cellulolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol. 50:220-228.

Maddox, I. S., Qureshi, N., and Gutierrez, N. A. 1993. Utilization of whey by Clostridia and process technology. In Woods, D. R. (ed.). The Clostridia and biotechnology. pp. 343-369. Maryland: Butterworth-Heinemann.

McGinnis, S., and Madden, T. L. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 32:20-25.

Montaya, D., Arevalo, C., Gonzales, S., Aristizabal, F., and Schwarz, W. H. 2001. New solvent producing *Clostridium* sp. Strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butylicum.* J Ind Microbiol Biotechnol. 27:329-335.

Morris, J. G. 1993. History and future potential of the Clostridia in biotechnology. In Woods, D. R. (ed.). The Clostridia and biotechnology. pp. 1-23. Maryland: Butterworth-Heinemann.

Weaver, R. F. 2003. Molecular biology. 2nd edition; International edition. pp. 92-94; 105-109. Boston : WCB/McGraw-Hill.

Weenk, G., Fitmaurice, E., and Mossel, D. A. A. 1991. Selective enumeration of spores of Clostridium species in dried foods. J. Appl. Bact. 70:135-143.

Wistreich, G. A. 2003. Microbiology laboratory : fundamentals and applications. 2nd edition. pp.141-143; 160-164. Upper Saddle River, N.J.: Prentice-Hall.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อารหารเลี้ยงเชื้อเหลว cellulose medium broth (สูตร 1 ลิตร)

1. ชั่งสารดังนี้

- Magnesium sulfate	0.220	กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate	0.550	กรัม
- Potassium hydrogen phosphate	0.550	กรัม
- Ferrous sulfate	0.011	กรัม

เติมน้ำกลั่น แล้วละลายส่วนผสมทั้งหมด

2. เติม - Resazurin (1 g/L)	1.0	มิลลิลิตร
- Acetic acid (conc.)	2.3	มิลลิลิตร

3. ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 6.5 ($\pm$0.2) ด้วยแอมโมเนีย

4. เติม - PABA (1.6 g/L)	5.0	มิลลิลิตร
- Biotin (0.02 g/L)	4.0	มิลลิลิตร

5. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปต้มจนเดือด (ได้ media สีฟ้า)

6. เติมอาหารเหลวที่ได้ลงในขวดแก้วเลี้ยงเชื้อขวดละ 30 มิลลิลิตร (สำหรับขั้นตอนการคัดแยกเชื้อให้ใส่อาหารเหลวที่ได้ 27 มิลลิลิตรกับบิวทานอล 3 มิลลิลิตร) โดยแต่ละขวดใส่

- Avicel	0.60	กรัม
- Calcium carbonate	0.05	กรัม

7. ปิดฝาแต่ละขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ หรือ ปิดจุกยางแล้วครอบฝาโลหะ ล็อคฝาโลหะด้วยคลิมเปอร์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ได้ media สีชมพูหรือชมพูอมม่วง ถ้าใส่ glucose แทน avicel จะได้ media สีชมพูแดง)

8. ก่อนลงเชื้อ 1 วันให้เติม 15 g/L cysteine ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 1 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง cellulose medium agar (สูตร 1 ลิตร)

1. ชั่งสารดังนี้

- Magnesium sulfate	0.220	กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate	0.550	กรัม
- Potassium hydrogen phosphate	0.550	กรัม
- Ferrous sulfate	0.011	กรัม

เติมน้ำกลั่น แล้วละลายส่วนผสมทั้งหมด

2. เติม - Resazurin (1 g/L) 1.0 มิลลิลิตร

- Acetic acid (conc.) 2.3 มิลลิลิตร

3. ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 6.5 (±0.2) ด้วยแอมโมเนีย

4. เติม - PABA (1.6 g/L) 5.0 มิลลิลิตร

- Biotin (0.02 g/L) 4.0 มิลลิลิตร
- Avicel 20 กรัม
- Agar 15 กรัม

5. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปอุ่น และคนให้ agar ละลายจนหมด (Avicel เป็นผงสีขาวไม่ละลายน้ำ) จากนั้นนำไปใส่ในขวดแก้วทนความร้อน หรือขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยสำลี

6. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. เวลาเท plate ให้เขย่าก่อนเท (แต่ละ plate จะได้มี Avicel เท่าๆ กัน)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง differential clostridia agar (สูตร 1 ลิตร)

1. ชั่งสารดังนี้

- Peptone from casein 5.0 กรัม
- Peptone from meat 5.0 กรัม (or Universal peptone)
- Meat extract 8.0 กรัม
- Yeast extract 1.0 กรัม
- Starch 1.0 กรัม
- D (+) glucose 1.0 กรัม
- L-cystenium chloride 0.5 กรัม
- Resazurin 0.002 กรัม

เติมน้ำกลั่น ละลายส่วนผสมทั้งหมด

2. ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 7.6 (±0.2) ด้วยแอมโมเนีย

3. เติม - Agar 20 กรัม

4. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปอุ่น และคนให้ agar ละลายจนหมด จากนั้นนำไปใส่ในขวดแก้วทนความร้อน หรือขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยสำลี

5. เตรียม solution ที่ต้องใช้ คือ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

- Ferric (III) ammonium citrate ความเข้มข้น 2.0 กรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร
- Sodium sulfite x $7H_2O$ ความเข้มข้น 1.5 กรัมในน้ำ 15 มิลลิลิตร

6. นึ่งฆ่าเชื้อทั้ง media และ solution ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 (ได้ media สีน้ำตาล)

7. ก่อนจะเท plate ให้เติม (ต่ออาหาร 1 ลิตร)

- Ferric (III) ammonium citrate	5.0	มิลลิลิตร
- Sodium sulfite x $7H_2O$	7.5	มิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Reinforced Clostridial Medium (สูตร 1 ลิตร) เป็น enriched media ใช้กระตุ้นให้เชื้อเติบโตได้รวดเร็ว

1. ชั่งสารดังนี้

- Meat extract	10.0	กรัม
- Peptone	5.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- D (+) glucose	5.0	กรัม
- Starch	1.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium acetate	3.0	กรัม
- L-cystenium chloride	0.5	กรัม
- Agar	0.5	กรัม

2. เติมน้ำกลั่น ละลายส่วนผสมทั้งหมด

3. ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 6.8 ($\pm$0.2) ด้วยแอมโมเนีย

4. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

5. ตวงใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตรปิดด้วยสำลี หรือ ใส่ขวดแก้วเลี้ยงเชื้อขวดละ 30 มิลลิลิตร ปิดฝาแต่ละขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ หรือ ปิดจุกยางแล้วครอบฝาโลหะ ล็อคฝาโลหะด้วยคลิมเปอร์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ได้ media ใสสีน้ำตาลเหลือง)

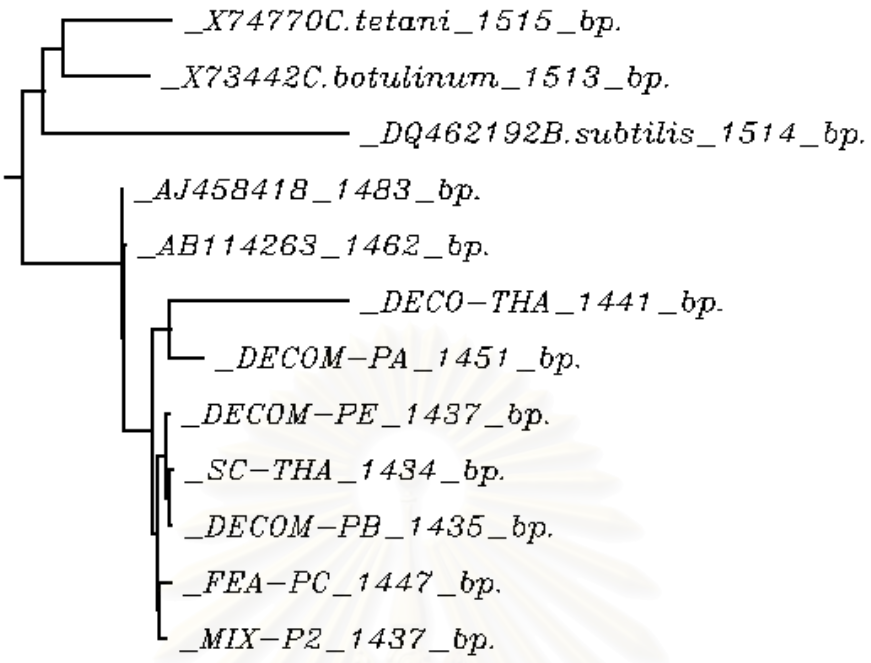
ภาคผนวก ข

Multiple Sequence Alignments ของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต

นำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตมาทำ Multiple Sequence Alignments ด้วยโปรแกรม ClustalW version 1.83 จากเวปไซต์ของ Kyoto University Bioinformatics center (http://align.genome.jp/) เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบน 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ โดยเลือก *Clostridium tetani* (Accession number :X74770) และ *Clostridium botulinum* (Accession number : X73442) เป็นตัวแทนของกลุ่มที่เป็น pathogen *Clostridium* sp. Kas106-4 (Accession number : AB114263)และ *Clostridium diolis* (Accession number : AJ458418) เป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับทั้ง 7 ไอโซเลตมากที่สุดจากผลของการ blast และ *Bacillus subtilis* (Accession number : DQ462192) เป็น out group โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ Multiple Sequences Alignment ของทั้ง 7 ไอโซเลตดังแสดงในตารางที่ และได้ phylogenetic tree จากการเปรียบเทียบทั้ง 12 ลำดับเบสดังแสดงในภาพที่

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัล ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ Multiple Sequences Alignment

	DECO-THA	DECOM-PA	DECOM-PB	DECOM-PE	FEA-PC	MIX-P2	SC-THA
DECO-THA	100	91	90	90	90	89	90
DECOM-PA	91	100	96	96	95	96	95
DECOM-PB	90	96	100	99	98	98	98
DECOM-PE	90	96	99	100	98	98	99
FEA-PC	90	95	98	98	100	98	98
MIX-P2	89	96	98	98	98	100	98
SC-THA	90	95	98	99	98	98	100
C. diolis	89	94	98	97	96	98	97
C. sp.Kas106-4	89	94	98	97	96	98	97
C. tetani	81	85	88	88	87	88	90
C. botulinum	81	85	89	89	87	89	89
B. subtilis	71	77	80	80	79	80	80

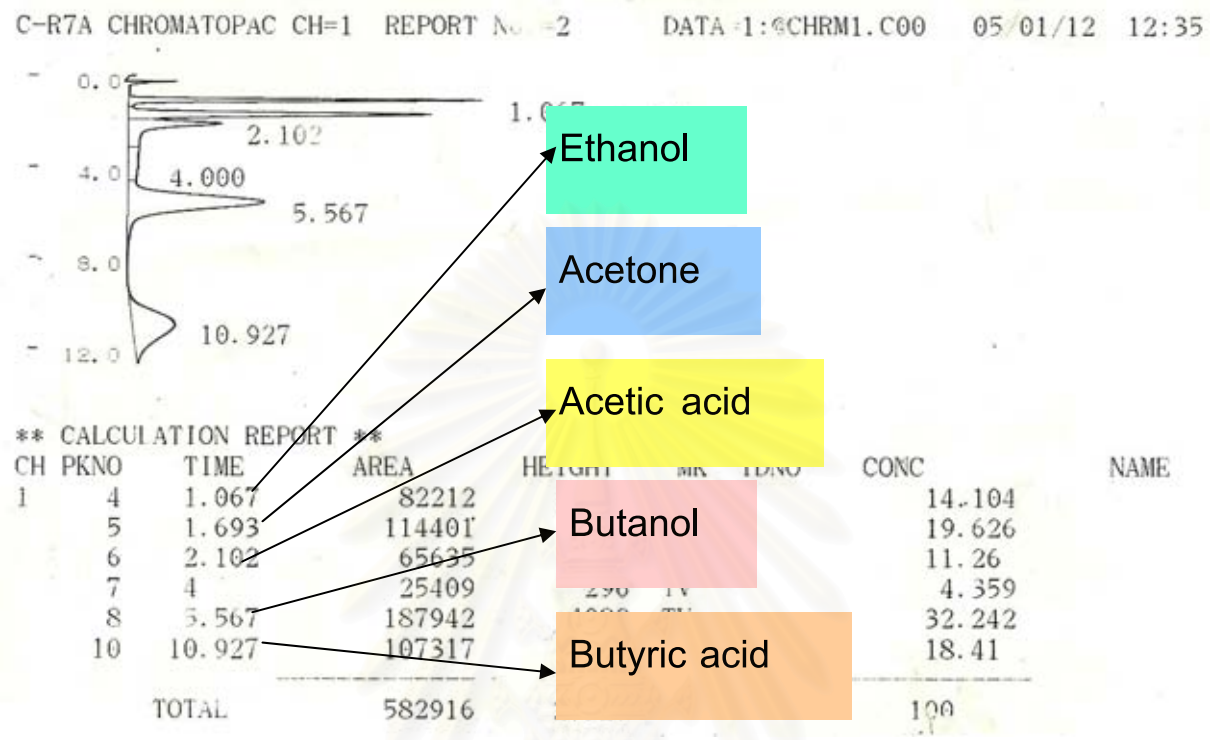


ภาพที่ 13 phylogenetic tree ของทั้ง 12 ลำดับเบส ที่มาพร้อมกับการทำ Multiple Sequence Alignments ด้วยโปรแกรม ClustalW version (1.83) จากเวปไซต์ของ Kyoto University Bioinformatics center (http://align.genome.jp/)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ข้อมูลเกี่ยวกับส่วนของการทำแก๊สโครมาโทกราฟี

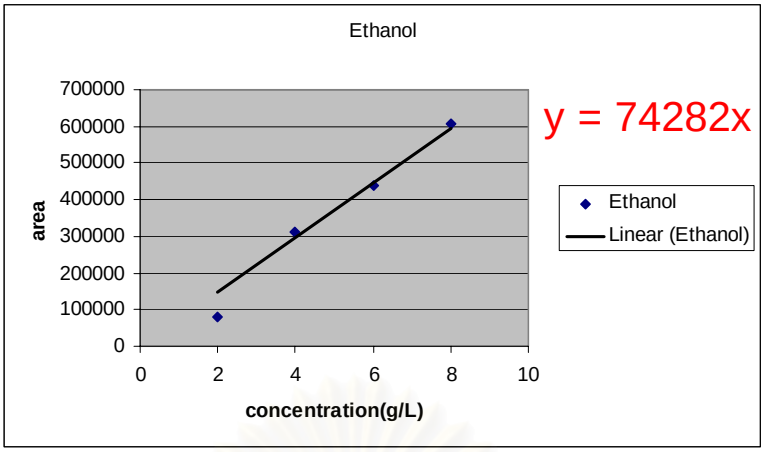


ภาพที่ 14 Chromatogram ของ standard ความเข้มข้น 2 g/l โดย ethanol acetone acetic acid butanol และ butyric acid มี retention time คือ 1.067 1.693 2.102 5.567 และ 10.927 ตามลำดับ

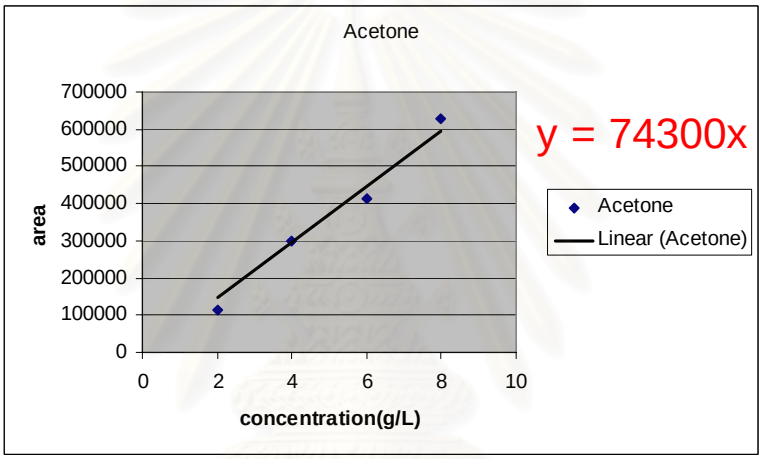
ตารางที่ 10 พื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 g/l

concentration	area				
(g/L)	Ethanol	Acetone	Acetic acid	Butanol	Butyric acid
2	82212	114401	65635	187942	107317
4	309982	300931	159153	454043	288890
6	439917	412025	202690	563343	363569
8	608744	626422	265639	882607	551223

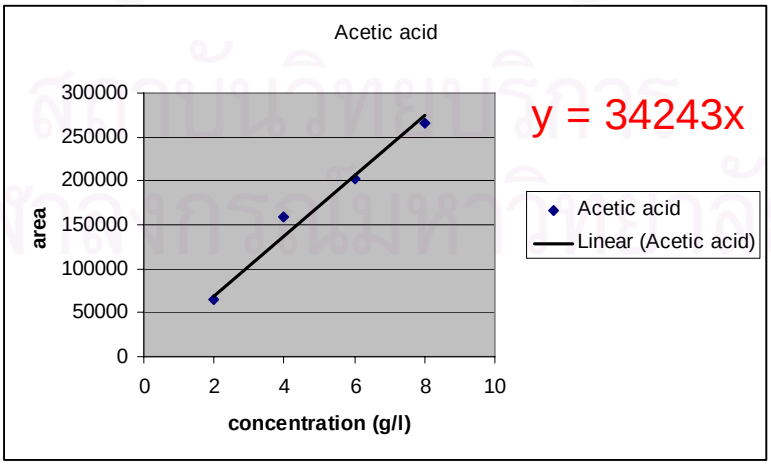
จากพื้นที่ใต้ peak นำมา plot เป็น standard curve ได้ดังนี้



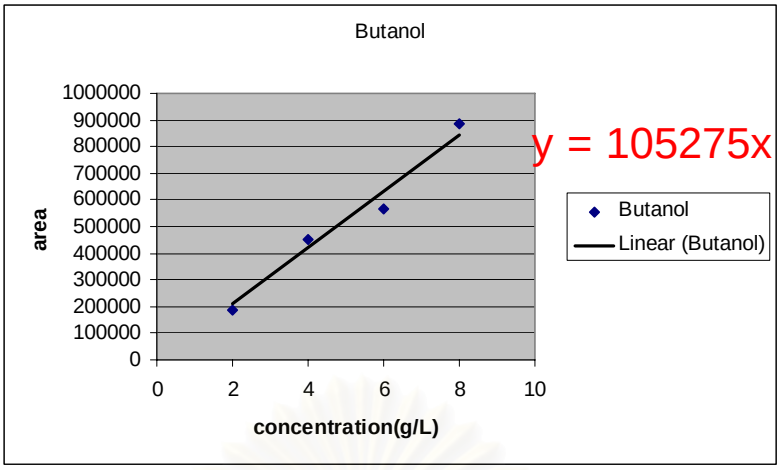
ภาพที่ 15 Standard curve ของ ethanol



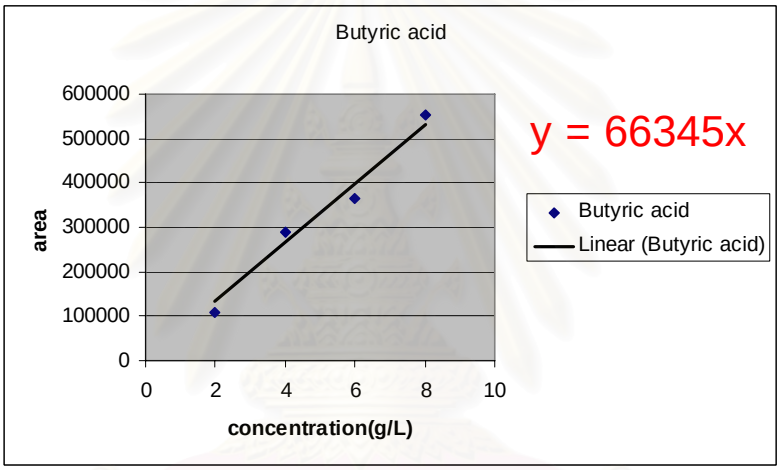
ภาพที่ 16 Standard curve ของ acetone



ภาพที่ 17 Standard curve ของ acetic acid



ภาพที่ 18 Standard curve ของ butanol



ภาพที่ 19 Standard curve ของ butyric acid

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย