การตรวจสอบยีนไนไทรตรีดักเทสในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

นางสาวเก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 974-17-5775-1
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF GENES ENCODING NITRITE REDUCTASE IN DENITRIFYING BACTERIA BY PCR-RFLP TECHNIQUE.

Miss Kejkarn Smartivutikoon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5775-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบยีนไนไทรต์รีดักเทสในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี
โดย	นางสาวเก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยุธ และ ดร.สุนันท์ ศิริรักษ์โสภณ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยุธ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.สุนันท์ ศิริรักษ์โสภณ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ : การตรวจสอบยีนไนไทรตรีดักเทสในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี. (DETECTION OF GENES ENCODING NITRITE REDUCTASE IN DENITRIFYING BACTERIA BY PCR-RFLP TECHNIQUE.) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยุธ และ ดร.สุนันท์ ศิริรักษ์โสภณ. 119 หน้า. ISBN 974-17-5775-1.

ทำการคัดเลือกดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย (Denitrifying bateria) จากดินบริเวณพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา จังหวัดกาญจนบุรี ทั้งหมด 5 บริเวณ จำนวน 3 ครั้ง โดยการทำ soil dilution plate count บน nutrient agar จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification test) และทดสอบความสามารถในการเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) พบว่าได้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันทั้งหมด 16 ไอโซเลต และได้แบคทีเรียที่สามารถเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน 49 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตเดียวกับที่เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน 7 ไอโซเลต จากนั้นนำมาจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API พบว่าได้แบคทีเรียจากทั้งหมด 6 สกุล คือ *Pseudomonas Alcaligenes Burkholderia Agrobacterium Corynebacterium* และ *Micrococcus* เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการลดไนเทรตและไนไทรต์ใน nitrate broth พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่ลดปริมาณไนเทรตได้อย่างรวดเร็ว 1 ไอโซเลตที่มีการลดลงอย่างช้าๆ และ 11 ไอโซเลต ที่มีการสะสมไนไทรต์ จากการตรวจสอบยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) พบว่ามี 9 ตัวอย่างที่มียีนเป็น *nirK* และ 4 ตัวอย่างที่มียีนเป็น *nirS* ส่วนอีก 3 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจสอบยีนได้ ผลการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่มียีน *nirK* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ และยีน *nirS* ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....เก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372216523 : MAJOR GENETICS

KEY WORD : DENITRIFICATION / NITRITE REDUCTASE GENE / PHYLOGENETIC RELATIONSHIP

KEJKARN SMARTIVUTIKOON : DETECTION OF GENES ENCODING NITRITE REDUCTASE IN DENITRIFYING BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : JITTRA KANCHANAPRAYUDH, Ph.D. AND SUNUN SIRIRAKSOPHON, Ph.D., 119 pp. ISBN 974-17-5775-1

Soil specimens were collected from five different locations in three separated occasions from the area of Plant Germplasm-Royal Initiation project in Kanchanaburi Province. The isolation of denitrifying bacteria was conducted by soil dilution plate count on nutrient agar. All bacterial isolates were tested for denitrification in nitrate broth and the ability to grow on nitrate agar under anaerobic condition. It was found that 16 bacterial isolates were capable of denitrification and 49 isolates could grow on nitrate agar under anaerobic condition, of which 7 isolates were the same as those were positive with denitrification test. These bacterial isolates were identified by biochemical method, using API system. Six genera were identified, namely *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* and *Micrococcus*. Then the selected bacterial isolates were tested for ability to reduce nitrate and nitrite in nitrate broth. Four isolates were found to reduce nitrate content rapidly whereas one isolate could do it slowly. Another eleven isolates were found to accumulate nitrite. These bacterial isolates were then detected for nitrite reductase genes by PCR technique. Nine isolates were found to contain *nirK* gene while the other four contained *nirS* gene. Three isolates could not be detected. Results from RFLP analysis could separate bacteria that contained *nirK* gene into 2 major groups and those with *nirS* gene into 3 groups which agree with the bacteria classifacation by biochemical method.

Department.....Botany..... Student's Signature.....Kejkarn Smartivutikoon.....

Field of study.....Genetics..... Advisor's Signature.....

Academic year.....2003..... Co-advisor's Signature.....Jittra Kanchanaprayudh.....

Co-advisor's Signature.....Sunun Siriraksophon.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยุธ และอาจารย์ ดร.สุนันท์ ศิริรักษ์โสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ประธานคณะกรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ กรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์ ที่ให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดิน

ขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ที่ให้พื้นที่ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา จังหวัดกาญจนบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่พักและให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดิน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนันท์ อังศุธนสมบัติ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสมิทธ์ เจตนจันทร์ ที่ได้ช่วยเหลือด้านการถ่ายภาพประกอบในวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆทุกคนในภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้การช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
3. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย
   3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน..... 26
   3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์จากดิน..... 27
   3.3 การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรีย
   ที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน..... 29
4. ผลการวิจัย..... 32
5. อภิปรายผลการวิจัย..... 83
6. สรุปผลการวิจัย..... 87

รายการอ้างอิง..... 89
ภาคผนวก..... 94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การแบ่งประเภทของแบคทีเรีย	6
2	แบคทีเรียสกุลต่างๆที่มีรายงานว่ามีสายพันธุ์ (strain) ที่สามารถทำให้เกิดการหายใจโดยใช้ไนเทรต (nitrate respiration)	7
3	แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเทรตและไนไทรต์	8
4	แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	9
5	ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ Cytochrome cd_1-Nir และ Cu-Nir	16
6	ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	17
7	เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี	32
8	เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี	33
9	ค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี	34
10	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g) และจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ (ไอโซเลต)	37
11	แบคทีเรียที่ทดสอบแล้วพบว่ามีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	39
12	ความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญบน nitrate agar	44
13	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ	45
14	ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20NE	51
15	ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Staph	53
16	ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Coryne	54
17	การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเทรตใน nitrate broth	57
18	การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไทรต์ใน nitrate broth	58
19	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	63
20	ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API 20NE (Reading Table)	104
21	ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API Staph (Reading Table)	108

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

22 ตารางอ่านผลการทดสอบในชุด API Coryne (Reading Table)..... 111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
1	วัฏจักรไนโตรเจน	4
2	กลุ่มของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ในแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri*	14
3	เอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Cu-containing nitrite reductase) จาก *Alcaligenes cycloclastes*	15
4	โครงสร้าง polypeptide fold และ subunit ของเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มี cytochrome *cd*, เป็นองค์ประกอบ (cytochrome *cd*, nitrite reductase) จาก *Paracoccus denitrificans* GB17	15
5	บริเวณเก็บตัวอย่างในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5	25
6	บริเวณเก็บตัวอย่างในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 3	25
7	บริเวณเก็บตัวอย่างบริเวณริมแม่น้ำแควน้อย	25
8	เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ	35
9	เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในช่วงเวลาต่างๆกัน	36
10	การทำ soil dilution plate count	38
11	ผลการสังเกตฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ	40
12	ผลการทดสอบไนไทรต์	41
13	ผลการทดสอบไนเทรต	42
14	ผลการทดสอบแอมโมเนีย	43
15	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม	46
16	การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเทรตใน nitrate broth	56
17	ความสามารถในการลดปริมาณไนเทรตและไนไทรต์ใน nitrate broth ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	59
18	การเปรียบเทียบปริมาณไนเทรต-ไนโตรเจนใน nitrate broth หลังจากบ่มเชื้อ 0 และ 14 วัน	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

19 การเปรียบเทียบปริมาณไนไทรต์-ไนโตรเจนใน nitrate broth หลังจากบ่มเชื้อ 0 และ 14 วัน..... 62

20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต B11-3..... 64

21 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C11-5..... 64

22 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-5..... 65

23 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-14..... 65

24 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-18..... 66

25 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-24..... 66

26 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-1..... 67

27 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-5..... 67

28 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-15..... 68

29 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต A31-18..... 68

30 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-2..... 69

31 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-5..... 69

32 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-6..... 70

33 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-7..... 70

34 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-13..... 71

35 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C33-1..... 71

36 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ..... 72

37 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *Hae*III..... 73

38 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *Hae*III..... 74

39 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *Msp*I..... 75

40 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *Msp*I..... 76

41 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *Hha*I..... 77

42 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *Hha*I..... 78

43 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *Msp*I..... 79

44 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *Msp*I..... 80

45 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirK*..... 81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
46	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirS*	82
47	ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม	100
48	ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง	101
49	ชุดทดสอบ API สำหรับจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง	101

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย