บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัฏจักรไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกในเซลล์ของจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช (Bitton, 1999) มีปริมาณมากที่สุดในบรรยากาศ คิดเป็น 78.08 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (โยธิน สุริยพงศ์, 2542) ส่วนในดินและในแหล่งน้ำธรรมชาติพบว่ามีอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น สิ่งมีชีวิตไม่สามารถนำก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศไปใช้โดยตรงได้ จนกว่าจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียเสียก่อน แต่ไนโตรเจนก็เป็นธาตุที่มีความเสถียรมาก เปลี่ยนรูปได้ยาก ยกเว้นในภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงหรือในกรณีที่เกิดฟ้าผ่าขึ้นเท่านั้น จุลินทรีย์จึงมีบทบาทเป็นอย่างมากในการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแบคทีเรียจะเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย โดยกระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (ammonification) จากนั้นในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) แอมโมเนียมจะถูกออกซิไดซ์ (oxidise) ไปเป็นไนไทรต์และไนเทรตตามลำดับ โดยกระบวนการไนทริฟิเคชัน (nitrification) ซึ่งมีออกซิเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอน และแอมโมเนียมเป็นสารให้อิเล็กตรอน แล้วไนเทรตก็จะถูกรีดิวซ์ (reduce) ต่อไป โดยกระบวนการรีดิวซ์ไนเทรตทางชีวภาพที่สำคัญที่สุด 2 กระบวนการ (Tiedje, 1988 อ้างถึงใน Bitton, 1999) คือ

1. กระบวนการรีดิวซ์ไนเทรตแบบแอสสิมิเลชัน (Assimilatory nitrate reduction)

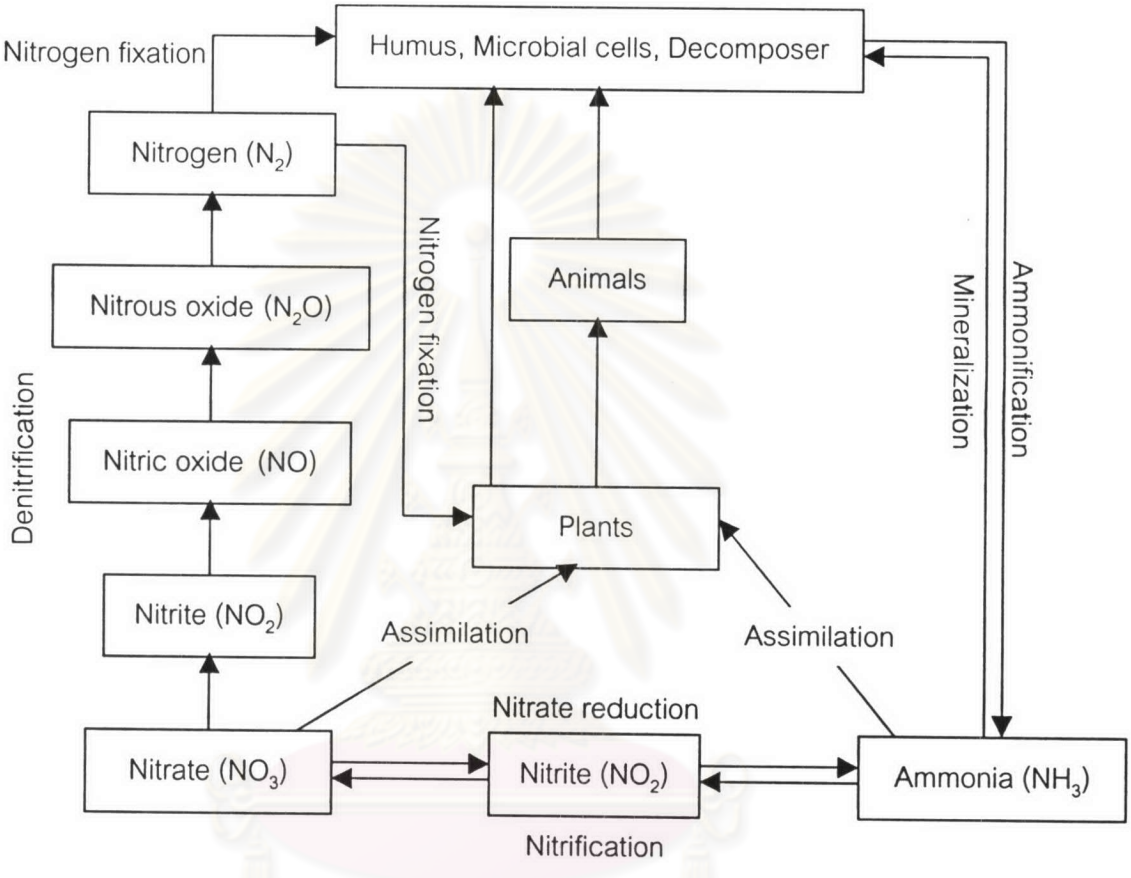
เป็นกระบวนการที่พืชและจุลินทรีย์รีดิวซ์ไนเทรตกลับไปเป็นแอมโมเนีย เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก โดยอาศัยเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสแบบแอสสิมิเลชัน (assimilatory nitrate reductase) หลายชนิด ซึ่งออกซิเจนไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ กระบวนการนี้เกิดขึ้นน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการแบบดิสสิมิเลชัน

2. กระบวนการรีดิวซ์ไนเทรตแบบดิสสิมิเลชัน (Dissimilatory nitrate reduction)

เป็นกระบวนการที่แบคทีเรียรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ในภาวะไร้ออกซิเจน โดยมีไนเทรตเป็นสารรับอิเล็กตรอน และมีสารอินทรีย์คาร์บอนเป็นสารให้อิเล็กตรอน อาจเรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (denitrification)

จุลินทรีย์ทั่วไปจะมีทั้งเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสแบบแอสสิมิเลชันและแบบดิสสิมิเลชัน โดยที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะถูกควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน (Sias, Stouthamer และ Ingraham, 1980 อ้างถึงใน Bitton, 1999)

แอมโมเนียที่ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนไทรต์และไนเทรต จะถูกพืชและสาหร่ายนำไปใช้ได้โดยง่าย พืชและสาหร่ายจะกลายเป็นอาหารของสัตว์ในวงจรชีวิตอีกขั้นหนึ่ง เมื่อพืชและสัตว์ตายลงซากของมันจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียกลับมาเป็นแอมโมเนีย ขณะเดียวกันสัตว์ก็สามารถขับถ่ายสารอินทรีย์ออกมาซึ่งแปรรูปไปเป็นแอมโมเนียได้อีกเช่นกัน (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544)



ภาพที่ 1 วัฏจักรไนโตรเจน (ดัดแปลงจาก วิทยา มะเสนา, 2526)

กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification)

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญ มีผลทางนิเวศวิทยาทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมทางบกและทางน้ำ และส่งผลทางชีวภาพให้ได้พลังงานออกมาในรูป ATP จากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์จะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ไนเทรต ทำให้ไนเทรตถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไทรต์ ซึ่งจะกลายมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวใหม่ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นไนทริกออกไซด์ ไนทรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนในที่สุด กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) (Delwiche, 1981) สารไนโตรเจนออกไซด์ (Nitrogen oxide) ต่างๆที่เป็นตัวรับ

อิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระหว่างกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้น ดังสมการ (Payne, 1973 อ้างถึงใน Delwiche, 1981)

$$\text{ไนเทรต } (NO_3^-) \xrightarrow[\text{Reductase}]{\text{Nitrate}} \text{ไนไทรต์ } (NO_2^-) \xrightarrow[\text{Reductase}]{\text{Nitrite}} \text{ไนทริกออกไซด์ } (NO)$$

$$\xrightarrow[\text{Reductase}]{\text{Nitric}} \text{ไนทรัสออกไซด์ } (N_2O) \xrightarrow[\text{Reductase}]{\text{Nitrous oxide}} \text{ไนโตรเจน } (N_2)$$

ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส (Nitrogen oxide reductase) ต่างชนิดกัน ซึ่งแต่ละชนิดจะทำหน้าที่ถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากกระบวนการไปสู่ตัวกลางที่เหมาะสมแล้วให้พลังงานออกมา ดังนั้นถ้าในสิ่งแวดล้อมมีสารไนโตรเจนออกไซด์ที่เป็นตัวกลางของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันอยู่ แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสเพียง 1 ชนิด จะสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสม ทำให้เกิดขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้น (Delwiche, 1981)

ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) หรือ ดีไนทริฟายเออร์ (Denitrifier)

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา (Physiology) และอนุกรมวิธาน (Taxonomy) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ต่างๆกัน (Bitton, 1999) โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ตามแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ใช้ ดังสรุปในตารางที่ 1

แบคทีเรียที่พบในกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นพวกแอโรบิกออโททรอฟ (aerobic autotrophs) หรือแอโรบิกเฮเทอโรทรอฟ (aerobic heterotrophs) ที่สามารถสลับการเจริญไปเป็นแบบไร้ออกซิเจนได้ เมื่อมีการใช้ไนเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในภาวะที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียที่สามารถหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจนได้เท่านั้นที่จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้น ในทางทฤษฎีดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียควรเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันครบทุกขั้นตอนตั้งแต่รีดิวซ์ไนเทรตจนได้ก๊าซไนโตรเจนเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือบางขั้นตอนของกระบวนการก็ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันทั้งหมดขึ้นได้ ดังนั้นในทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียใดๆที่ทำให้เกิดเพียงขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการ ก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นได้ เรียกแบคทีเรียเหล่านั้นว่า ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วน (partial denitrifying bacteria) (Bitton, 1999)

ตารางที่ 1 การแบ่งประเภทของแบคทีเรีย (ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2544; กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2545)

ประเภทของแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	แหล่งพลังงาน (Energy source)
Heterotrophs (Organotrophs)		
-Photoheterotrophs	สารอินทรีย์	แสง
-Chemoheterotrophs	สารอินทรีย์	ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันของสารอินทรีย์
Autotrophs (Lithotrophs)		
-Photoautotrophs	สารอนินทรีย์ (CO_2)	แสง
-Chemoautotrophs	สารอนินทรีย์ (CO_2)	ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันของสารอนินทรีย์

กระบวนการดีไนทริฟิเคชันแบบบางส่วน (Partial denitrification) เกิดขึ้นจากสาเหตุทางสรีรวิทยาหรือทางพันธุกรรม ดังต่อไปนี้คือ

1. ตัวกลางในกระบวนการ เมื่อไม่มีไนเทรตอยู่ด้วย

2. ภาวะทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือความเข้มข้นของตัวกลางในกระบวนการ เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือหลายขั้นตอนไม่เกิดขึ้น

3. เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสแต่ละชนิด กระตุ้นขั้นตอนที่แตกต่างกันในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ดังนั้นจึงปรากฏขึ้นในเซลล์ในเวลาที่ต่างกัน แล้วแต่ว่าการกระตุ้นขั้นตอนใดจะเริ่มต้นขึ้น (ในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ ภาวะที่กระตุ้นและยับยั้งกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจะเกิดขึ้นสลับกันเสมอ)

4. ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส ในทุกขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นบางส่วน สามารถแบ่งตามรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม (Delwiche, 1981) ดังนี้

1. **แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ได้เท่านั้น**

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส ไนทริกออกไซด์รีดักเทส และไนทรัสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งเรียกกระบวนการรีดิวซ์ไนเทรตแบบดิสสิมิเลชันที่จำกัดอยู่แค่นี้ว่า กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเทรต (nitrate respiration) เกิดขึ้นในแบคทีเรียหลายชนิด

และพบว่ามีดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียและดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วน อยู่ในกลุ่มนี้มากที่สุด Hall (1978) ได้รวบรวมแบคทีเรียในสกุล (genera) ต่างๆตาม Bergey's manual ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 8 ที่สามารถเกิดกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเทรตได้ไว้ ดังตารางที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาอย่างมาก

ตารางที่ 2 แบคทีเรียสกุลต่างๆ ที่มีรายงานว่ามีสายพันธุ์ (strain) ที่สามารถทำให้เกิดการหายใจโดยใช้ไนเทรต (nitrate respiration) (Delwiche, 1981)

Actinobacillus	*Escherichia*	*Peptococcus*
Actinomyces	*Eubacterium*	*Photobacterium*
Aeromonas	*Flavobacterium*	*Planobispora*
Agrobacterium	*Fusobacterium*	*Planomonospora*
Alcaligenes	*Geodermatophilus*	*Plesiomonas*
Arachnia	*Haemophilus*	*Propionibacterium*
Arthrobacter	*Halobacterium*	*Proteus*
Bacillus	*Halococcus*	*Pseudomonas*
Bacterionema	*Hyphomicrobium*	*Rhizobium*
Bacteroides	*Hyphomonas*	*Rothia*
Beneckea	*Klebsiella*	*Salmonella*
Bordetella	*Lactobacillus*	*Selenomonas*
Branhamella	*Leptothrix*	*Serratia*
Brucella	*Listeria*	*Shigella*
Campylobacter	*Lucibacterium*	*Simonsiella*
Cellulomonas	*Microbispora*	*Spirillum*
Chromobacterium	*Micrococcus*	*Sporosarcina*
Citrobacter	*Micromonospora*	*Streptomyces*
Clostridium	*Moraxella*	*Streptosporangium*
Corynebacterium	*Mycobacterium*	*Thiobacillus*
Cytophaga	*Neisseria*	*Thiomicrospira*
Dactylsporangium	*Nocardia*	*Veillonella*
Enterobacter	*Paracoccus*	*Vibrio*
Erwinia	*Pasteurella*	

2. **แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนทรัสออกไซด์ได้เท่านั้น**

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนทรัสออกไซด์รีดักเทส บางครั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Aquaspirillum itersonii* และ *Pseudomonas fluorescens* บางสายพันธุ์ จะถูกนำไปเลี้ยงในห้องทดลอง ทำให้ไม่แน่ชัดว่ากระบวนการดีไนทริฟิเคชันบางส่วนลักษณะนี้เกิดขึ้นในสายพันธุ์แท้ (wild type strain) หรือเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation) หลายๆครั้ง แล้วทำให้เอนไซม์ไนทรัสออกไซด์รีดักเทสหายไป อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่มีรายงานว่ารีดิวซ์ไนเทรตและไนไทรต์โดยไม่ผลิตก๊าซจัดอยู่ในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการขึ้นบางส่วนกลุ่มนี้

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเทรตและไนไทรต์ (สมศักดิ์ วังใน, 2524)

Bacillus pyocyaneus (Pseudomonas aeruginosa)	*Micrococcus denitrificans*
Thiobacillus denitrificans	*Pseudomonas denitrificans*
Bacillus subtillis	*Escherichia coli*
Pseudomonas stutzeri	

แบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพวกเฮทเทอโรโทรฟ บางพวกก็เป็นคีโมออโตโทรฟ เช่น *Micrococcus denitrificans* และ *Thiobacillus denitrificans*

3. **แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่รีดิวซ์ไนเทรตเป็นก๊าซไนโตรเจน**

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Neisseria* และ *Pseudomonas* บางสายพันธุ์ ในการศึกษาทางนิเวศวิทยาแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถแยกออกมาได้อย่างชัดเจน เนื่องจากในการทดสอบทางจุลชีววิทยาทั่วไปพบว่าไม่สามารถผลิตก๊าซจากไนเทรตได้ จึงถูกมองว่าไม่ใช่ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าเมื่อนำการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้มารวมกับของพวกที่หายใจโดยใช้ไนเทรตแล้ว จะทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่สมบูรณ์ก็ตาม

4. **แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ และไนทริกออกไซด์ไปเป็นไนทรัสออกไซด์**

ในทางพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส และไนทรัสออกไซด์รีดักเทส มีเพียงรายงานเดียวที่บอกว่า *Bacillus licheniformis* จัดอยู่ในกลุ่มนี้ กระบวนการดีไนทริฟิเคชันแบบบางส่วนลักษณะนี้อาจพบน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางนิเวศวิทยา แต่เป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแต่ละขั้นตอน ถึงแม้ว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จะ

สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันที่สมบูรณ์ได้ แต่ก็ยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอีกมากที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้เพียงบางขั้นตอนของกระบวนการเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้มีเอนไซม์ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทสที่ค่อนข้างหลากหลาย

แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน สรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Delwiche, 1981)

A. Phototrophic bacteria	
1. *Rhodopseudomonas sphaeroides*	การเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน
B. Gliding bacteria	
2. *Cytophaga johnsonae*	การเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จากการศึกษาใน 16 สายพันธุ์ พบ 4 สายพันธุ์รีดิวซ์ที่ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ ซึ่งในจำนวนนั้นมี 1 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนไทรตไปเป็นก๊าซ
3. *Lysobacter antibioticus*	
4. *Simonsiella muelleri*	จากการศึกษาใน 18 สายพันธุ์ พบ 9 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนเทรต ซึ่งในจำนวนนั้นมี 4 สายพันธุ์ที่รีดิวซ์ไนไทรต์โดยมีหรือไม่มีการผลิตก๊าซ
C. Budding bacteria	
5. *Hypomicrobium* spp.	ดีไนทริฟายแบบเมธิโลทรอฟ
D. Spiral and curved bacteria	
6. *Aquaspirillum itersonii*	ผลิตไนทรัสออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
7. *Aquaspirillum psychrophilum*	ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้ (visible gas) เป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
8. *Aquaspirillum dispar*	ไม่ผลิตก๊าซเป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
9. *Azospirillum lipoferum*	การเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ บางสายพันธุ์ผลิตไนทรัสออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน
10. *Campylobacter sputorum*	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

E. Gram-negative bacteria	
11. *Pseudomonas aeruginosa*	
12. *Pseudomonas fluorescens*	บางสายพันธุ์ผลิตไนทรัสออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน
13. *Pseudomonas chlororaphis*	บางสายพันธุ์ผลิตไนโตรเจนเป็นผลิตผลสุดท้ายของกระบวนการ
14. *Pseudomonas aureofaciens*	
15. *Pseudomonas stutzeri*	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนทรัสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
16. *Pseudomonas mendocina*	
17. *Pseudomonas mallei*	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
18. *Pseudomonas pseudomallei*	ทำให้เกิดโรคในสัตว์
19. *Pseudomonas caryyophylli*	ทำให้เกิดโรคในพืช
20. *Pseudomonas lemoignei*	
21. *Pseudomonas solanacearum*	ทำให้เกิดโรคในพืช
22. *Pseudomonas pickettii*	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนทรัสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
23. *Pseudomonas pseudoflava*	เป็นแฟคคัลเททีฟคีโมลิโธทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
24. *Pseudomonas denitrificans*	
25. *Pseudomonas perfectomarinus*	แบคทีเรียที่พบในทะเล
26. *Pseudomonas nautica*	แบคทีเรียที่พบในทะเล
27. *Pseudomonas* spp.	
28. *Alcaligenes faecalis*	บางสายพันธุ์รีดิวซ์ไนไทรต์ไปเป็นก๊าซแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ได้
29. *Alcaligenes eutrophus*	เป็นแฟคคัลเททีฟคีโมลิโธทรอฟ (ไฮโดรเจน แบคทีเรีย)
30. *Agrobacterium tumefaciens*	ทำให้เกิดโรคในพืช บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนทรัสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย
31. *Agrobacterium radiobacter*	บางสายพันธุ์เจริญโดยมีไนทรัสออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

F. Gram-negative facultatively anaerobic bacteria	
32. *Chromobacterium violaceum*	โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนไทรต์หรือไนเทรต
33. *Chromobacterium lividum*	โดยปกติก๊าซที่มองเห็นได้ไม่ได้ผลิตจากไนไทรต์หรือไนเทรต
34. *Flavobacterium* spp.	บางสายพันธุ์ไม่สามารถรีดิวซ์ได้
G. Gram-negative cocci and coccobacilli	
35. *Neisseria sicca*	สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต
36. *Neisseria subflava*	สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต
37. *Neisseria flavescens*	สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต
38. *Neisseria mucosa*	สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต
39. *Neisseria animalis*	การรีดิวซ์ไนเทรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
40. *Neisseria cavie*	การรีดิวซ์ไนเทรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยปกติจะไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้
41. *Neisseria denitrificans*	สามารถรีดิวซ์ไนไทรต์แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต
42. *Branhammella catarrhalis*	การรีดิวซ์ไนเทรตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อาจผลิตหรือไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้
43. *Acinetobacter* spp.	
45. *Paracoccus denitrificans*	ไนทรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเทรต เป็นแฟคคัลเททีฟคีโมลิโธทรอฟ (ไฮโดรเจนแบคทีเรีย)
46. *Paracoccus halodenitrificans*	ไนทรัสออกไซด์และไนโตรเจนผลิตจากไนเทรต
H. Gram-negative chemolithotropophic sulfur bacteria	
47. *Thiobacillus denitrificans*	บางสายพันธุ์รีดิวซ์ไนทริกออกไซด์และไนทรัสออกไซด์ไปเป็นไนโตรเจน
48. *Thiomicrospira denitrificans*	ไม่เจริญในภาวะมีออกซิเจน เป็นออบลิเกตดีไนทริฟายเออร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

49. *Thermothrix thioparus*	ไม่ผลิตก๊าซที่มองเห็นได้จากไนเทรต แต่รีดิวซ์ไนไทรต์ เป็นเทอร์โมฟิลิกแฟคคัลเททีฟคีโมลิโธทรอฟ
I. Gram-positive spore-forming bacteria	
50. *Bacillus licheniformis*	
51. *Bacillus cereus*	
52. *Bacillus polymyxa*	
53. *Bacillus macerans*	
54. *Bacillus stearothermophilus*	
55. *Bacillus laterosporus*	
56. *Bacillus pasteurii*	
57. *Bacillus pantothenticus*	
58. *Bacillus pulvifaciens*	
59. *Bacillus nitrollens*	
60. *Bacillus azotoformans*	คัดเลือกโดยอาหารที่อุดมด้วยไนทรัสออกไซด์
J. Gram-positive non-spore-forming bacteria	
61. *Corynebacterium nephridii*	ค้นพบเพียง 1 สายพันธุ์ ผลิตไนทรัสออกไซด์เป็นผลิตผลสุดท้าย
62. *Propionibacterium acidi-propionici*	การเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์
K. Others	
63. *Halobacterium* sp.	

นอกจากนี้ยังอาจแบ่งดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียออกตามความสำคัญของไนเทรตได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ (สมศักดิ์ วังใน, 2524)

1. **แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้โดยไม่ขึ้นกับไนเทรต** เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่มีไนเทรต แต่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนหรืออาศัยกระบวนการแอมโมนิฟิเคชันหรือกระบวนการอื่นในการเจริญเติบโต

2. **แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้โดยขึ้นกับไนเทรต** เป็นแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ได้โดยต้องมีไนเทรตอยู่ด้วย เช่น แบคทีเรียบางสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Micrococcus* และ *Thiobacillus denitrificans*

3. **แบคทีเรียที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้เป็นบางครั้งเมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม** เช่น *Chromobacterium, Mycoplana, Seratia* และ *Vibrio*

แบคทีเรียทีทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้มากที่สุดในดินทั่วๆไป คือ *Pseudomonas* และ *Achromobacter* ทั้ง 2 สกุลนี้ จึงเป็นมีความสำคัญมาก ส่วน *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในดิน แต่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ 2 สกุลข้างต้น

ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียพบได้เกือบ 130 สปีชีส์ (species) ในแบคทีเรียกว่า 50 สกุล โดยส่วนใหญ่เป็นพวก Pseudomonads (Zumft, 1992 อ้างถึงใน Hallin และ Lindgren, 1999) และทุกตัวเป็นพวกแอโรบิกแบคทีเรีย ยกเว้น *Propionibacterium* sp. (Delwiche, 1981)

เจษฎา โพธิรัตน์ (2541) ทำการศึกษาโดยคัดเลือกดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย จากดินบริเวณแหล่งน้ำในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา มาทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ไนเทรต พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* เช่นกัน

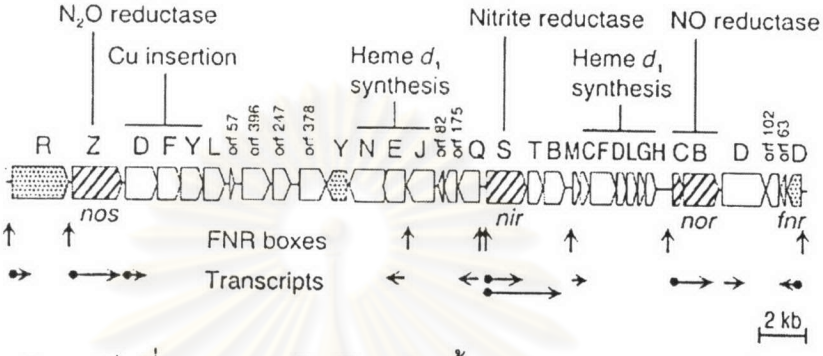
ในบางกรณีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการออกซิไดส์แอมโมเนีย เช่น *Nitrosomonas europaea* ก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นได้ โดยใช้ไนไทรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนกระบวนการหายใจไปเป็นแบบอื่น เหมือนกับที่เกิดขึ้นในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย

นอกจากกระบวนการดีไนทริฟิเคชันจะเกิดขึ้นในแบคทีเรียแล้ว ปัจจุบันยังพบว่ารา (fungi) (Kobayashi และ Shoun, 1995) และแอคทิโนมัยซิส (actinomyces) (Shoun และคณะ, 1998) ก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้นมาได้

พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

ยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน พบครั้งแรกจากการทำแผนที่คอนจูเกชันและทรานสดักชัน (conjugational and transductional mapping) ในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Zumft, 1997; van Hartingsveldt และ Stouthamer, 1973; Jeter, Sias และ Ingraham, 1984) ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มีลักษณะเป็นกลุ่มของยีน (gene cluster) โดยกลุ่มของยีน *nar nir nor* และ *nos* จะควบคุม

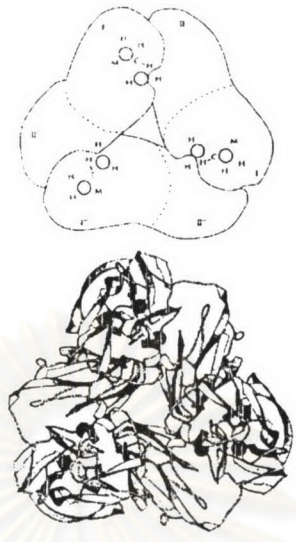
เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส เอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส เอนไซม์ไนทริกออกไซด์รีดักเทส และเอนไซม์ไนทรัสออกไซด์รีดักเทส ตามลำดับ (Philippot และคณะ, 2001) ดังภาพที่ 2 ยีนเหล่านี้อาจพบอยู่บนโครโมโซม (chromosome) หรือเอนโดจีนัสพลาสมิด (endogenous plasmid) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย



ภาพที่ 2 กลุ่มของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ในแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* (Zumft, 1997)

กลไกการแสดงออกของยีนโครงสร้าง *nar*G *nir*S *nor*B และ *nos*Z มีการศึกษาด้วย mRNA โดยวิธี Dot Blot Hybridization ถึงแม้ว่าการศึกษาลำดับเบสที่สมบูรณ์บนจีโนมของแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้น แต่ยีนโครงสร้างทั้งสี่นี้ไม่เคยถูกอธิบายลักษณะได้ในแบคทีเรียชนิดเดียว (Philippot และคณะ, 2001)

ขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน คือ ขั้นตอนการรีดิวซ์ไนไทรต์ด้วยเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ใช้ในการแยกดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียที่หายใจโดยใช้ไนเทรต (nitrate respirer) และเป็นขั้นตอนที่ผลิตก๊าซตัวแรกของกระบวนการ คือ ไนทริกออกไซด์ออกมา เอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสมี 2 ชนิด ชนิดแรกมี ทองแดง (copper) เป็นองค์ประกอบ (Cu-Nir หรือ NirK) ควบคุมโดยยีน *nirK* (ภาพที่ 3) ส่วนชนิดที่สองมี cytochrome heme *c* และ heme d_1 เป็นองค์ประกอบ (cd_1-Nir หรือ NirS) ควบคุมโดยยีน *nirS* (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 เอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Cu-containing nitrite reductase) จาก *Alcaligenes cycloclastes* ภาพบนแสดงไตรเมอร์ (trimer) และตำแหน่งของอะตอมทองแดง วงกลมแทนทองแดง 6 อะตอม ที่เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine (C)), (histidine (H)) และเมไธโอนีน (methionine (M)) ส่วน I และ II เชื่อมอยู่กับส่วน I', I" และ II', II" โดย crystallographic threefold axis ทองแดงชนิดที่ 2 เชื่อมอยู่กับฮิสติดีน 3 โมเลกุล ที่อยู่ระหว่างผิวสัมผัสของ subunit ภาพล่างแสดง polypeptide fold ของ Cu-NIR trimer วงกลมสีดำแสดงตำแหน่งของอะตอมทองแดง (Zumft, 1997)

ภาพที่ 4 โครงสร้าง polypeptide fold และ subunit ของเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มี cytochrome *cd*$_1$ เป็นองค์ประกอบ (cytochrome *cd*$_1$ nitrite reductase) จาก *Paracoccus denitrificans* GB17 (เดิม "*T. pantotropha*") ภาพบนแสดงด้านข้างของโปรตีนไดเมอร์ (protein dimer) ซึ่งมี heme C อยู่ส่วนบน ภาพล่างแสดงด้านหลังของ heme D_1-binding domain มี heme D_1 อยู่ที่แกนของ eight-bladed propeller-like structure (Zumft, 1997)

แม้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีโครงสร้างที่ต่างกัน แต่ในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย เอนไซม์จะมีหน้าที่ทางกายภาพและลักษณะทางสรีรวิทยาที่เหมือนกัน มีรายงานว่ายีน *nirK* ของ *Pseudomonas aureofaciens* สามารถแสดงออกได้ใน *Pseudomonas stutzeri* ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สูญเสียยีน *nirS* (Glockner, Jüngst และ Zumft, 1993 อ้างถึงใน Hallin และ Lindgren, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าเอนไซม์ทั้งคู่ต่างก็มีความเฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าชนิดของเอนไซม์ในแบคทีเรียสกุลเดียวกัน หรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกันจะแตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียจะมีเอนไซม์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ยีน *nirS* พบได้มากกว่าในธรรมชาติ เนื่องจากมีการกระจายตัวกว้างกว่า ดังนั้นจึงพบเอนไซม์ NirS เป็นหลักในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย ในขณะที่ยีน *nirK* พบเพียงร้อยละ 30 ของดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย ที่มีการศึกษากันมา แต่ยีน *nirK* จะพบในกลุ่มทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียได้หลายกลุ่มกว่า เอนไซม์ NirK มีความหลากหลายในน้ำหนักโมเลกุลและระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า (immunological reaction) นอกจากนี้ยังพบในสายพันธุ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกันทางอนุกรมวิธานได้มากกว่าด้วย (Casciotti และ Ward, 2001; Grüntzig และคณะ, 2001; Michotey, Méjean และ Bonin, 2000; Hallin และ Lindgren, 1999; Braker, Fesefeldt และ Witzel, 1998) เอนไซม์ NirK มีการศึกษาได้ไม่ดีเท่า NirS

ตารางที่ 5 ดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ Cytochrome cd_1–Nir และ Cu-Nir (Delwiche, 1981; Coyne, 1989)

Cytochrome cd_1-Nir	Cu-Nir
Thiobacillus denitrificans	*Achromobacter cycloclastes*
Pseudomonas aeruginosa	*Alcaligenes sp.*
Paracoccus denitrificans	*(Achromobacter xylosoxidans)*
Alcaligenes faecalis	*Alcaligenes faecalis* S6
Pseudomonas stutzeri	*Nitrosomonas europaea*
Micrococcus (Paracoccus) denitrificans	*Rhodopseudomonas sphaeroides*
Paracoccus halodenitrificans	*(Rhodobacter sphaeroides)*

ตารางที่ 6 ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Zumft, 1997)

Category of affected process	Gene or locus[a]	Mol mass (kDa) of gene product[b]	Encoded gene product, function, or observation
Regulation	*anr*	27.1	P. aeruginosa FNR-like global redox regulator for expression of denitrification genes
	dnr , fnrD	24.5 – 26.2	Pseudomonas FNR-like regulators; affect the expression of nirS and norCB
	fixK2		B. japonicum FNR-like regulator; affects anaerobic growth on nitrate
	fnrP	28	Paracoccus FNR-like regulator; affects the expression of narGH
	narL	24.4	Nitrate-responsive transcription factor of Pseudomonas of a NarXL two component system
	nirI	73.1	A membrane protein with similarity to NosR; affects nirS expression
	nirR	25.6	Pseudomonas locus; affects NirS synthesis
	nirY (orf286)	32.7	LysR-like regulator
	nnr , nnrR	26	Paracoccus and Rhodobacter FNR-like regulators; affect nirS and norCB expression
	nnrS		Activates transcription of *nirK* and nor genes in R. sphaeroides
	nosR	81.9	Membrane-bound regulator required for transcription of nosZ
	rpoN	54.8	Sigma factor σ^{54} affects denitrification; essential for R. eutropha
Nitrate respiration	*narD*		Plasmid-borne locus for R. eutropha respiratory nitrate reduction
	narG	139	Large or α subunit of nitrate reductase; binds MGD
	narH	57.3	Small or β subunit of respiratory nitrate reductase; binds Fe-S clusters
	narI	26.1	Cytochrome b subunit of respiratory nitrate reductase
	narJ	25	Protein necessary for nitrate reductase assembly
Periplasmic nitrate reduction	*napA*	92.6 – 93.3	Large subunit of periplasmic nitrate reductase; binds MGD and Fe-S cluster
	napB	17.8 – 18.9	Small subunit of periplasmic nitrate reductase; a diheme cytochrome c
	napD	12.1	Cytoplasmic protein with presumed maturation function; homologous to E. coli NapD (YojF)
	napE	6.6	Putative monotopic membrane protein; no known homologs
Nitrite respiration	*nirB*	30.4	Cytochrome c_{552}
	nirC	11.9	Monoheme cytochrome c with putative function in NirS maturation
	nirK, nirU	36.9 – 41	Cu-containing nitrite reductase
	nirN, orf507	55.5	Affects anaerobic growth and in vivo nitrite reduction; similarity to NirS
	nirQ	29.2	Gene product affects catalytic function of NirS and NorCB
	nirS (denA)	62	Cytochrome *cd*$_1$ nitrite reductase

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Heme D_1 biosynthesis	*nirD*	16.9	Gene product affects heme D_1 biosynthesis or processing
	nirE	29.6	S-Adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase
	nirF	43.1	Required for heme D_1 biosynthesis or processing; similarity to NirS
	nirG	16.6	Gene product affects heme D_1 biosynthesis or processing
	nirH	18.8	Gene product affects heme D_1 biosynthesis or processing
	nirJ, orf393	44.4	Affects heme D_1 biosynthesis or processing; similarity with PqqE, NifB and MoaA
	nirL	19.6	Gene product affects heme D_1 biosynthesis or processing
NO respiration	*norB*	52 –53.1	Cytochrome *b* subunit of NO reductase
	norC	16 – 17	Cytochrome *c* subunit of NO reductase
	norD, orf6	69.7	Affects viability under denitrifying conditions
	norE, orf2, orf175	17.7 – 19.5	Membrane protien; homologous with COX III
	norF	8.2	Affects NO and nitrite reduction
	norQ	30.5	Affects NirS and NorCB function; homolog of NirQ
	norZ	84.5	Chromosomally encoded *R. eutropha* NO reductase
N_2O respiration	*fhp*	44.8	*R. eutropha* flavohemoglobin affects N_2O and/or NO reduction
	nosA, oprC	74.9 – 79.2	Channel-forming outer membrane protien; affects Cu-processing for NosZ
	nosD	48.2	Periplasmid protien involed in Cu insertion into NoaZ
	nosF	33.8	ATP/GTP-binding protien involedin Cu insertion into NosZ
	nosL	20.4	Part of *nos* gene cluster; putative outer membrane lipoprotien
	nosX	34.1	Affects nitrous oxide reduction in *S. meliloti*
	NosY	29.4	Inner membrane protien involed in Cu processing for NosZ
	nosZ	70.8	Nitrous oxide reductase
Electron transfer	*azu*	16	Azurin
	cycA	11.7 – 15.5	Cytochrome c_2 (c_{550})
	napC	27.2	Tetraheme cytochrome *c*; homologous to NirT
	nirM (denB)	10.8	Cytochrome c_{551}
	nirT	22.8	Putative membrane-anchored tetraheme *c*-type cytochrome
	paz	15.7	Pseudoazurin
Functionally unassigned	*orf396*	43.1	A putative 12-span membrane protien of *P. stutzeri*; homologous to NnrS
	nirX	32.4	A *Paracoccus* putative cytoplasmic protien; homologous to NosX
	orf7, orf63	7.3	Pseudomonas genes imediately dowmstream of *dnr* and *fnrD*
	orf247	25.8	Putative member of the short-chain alcohol dehydrogenase family

เอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสในราและแอคทิโนมัยซิส มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Kobayashi และ Shoun, 1995; Shoun และคณะ, 1998)

วิธีการต่างๆได้ถูกนำมาใช้เพื่อจำแนก (identify) และหาปริมาณ (quantify) ของดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย ซึ่งรวมถึงการออกแบบไพรเมอร์ (primer) หรือโพรบ (probe) (Smith และ Tiedje, 1992) ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชันหรือสำหรับยีนของ ribosomal DNA และการศึกษา immunofluorescence assays ซึ่งใช้ polyclonal antibodies ที่เฉพาะเจาะจงกับดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียหรือเอนไซม์ในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

Coyne และคณะ (1989) ใช้ polyclonal antibodies ในการจำแนกเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสในแบคทีเรียว่ามีองค์ประกอบเป็น cytochrome *cd*$_1$ หรือทองแดง พบว่าเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มี cytochrome *cd*$_1$ เป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่พบใน *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ส่วนเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ พบได้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกันทางอนุกรมวิธาน

Braker และคณะ (1998) ได้ออกแบบชุดของไพรเมอร์สำหรับยีน *nirK* และยีน *nirS* ขึ้นมา เมื่อนำมาทำพีซีอาร์แล้ว พบว่ามีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ ของทั้ง 2 ยีน ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดได้

Hallin และ Lindgren (1999) ออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมา 2 ชุดสำหรับยีน *nirS* และยีน *nirK* แล้วใช้ในการ ตรวจหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันขึ้น พบว่าไพรเมอร์มีความแม่นยำสูง สามารถเพิ่มปริมาณยีนที่ถูกต้องได้

Michotey และคณะ (2000) พัฒนาไพรเมอร์ของพีซีอาร์ (PCR primer) ขึ้นมา 2 กลุ่มเพื่อใช้ตรวจสอบและหาปริมาณของเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่มี cytochrome *cd*$_1$ เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับกันระหว่างเทคนิค MPN-PCR และ competitive PCR แล้วนำมาเทียบกับวิธี Classical cultivation method พบว่าการตรวจสอบและหาปริมาณด้วยเทคนิคทางโมเลกุลให้ผลที่ดีกว่า

Casciotti และ Ward (2001) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *nirK* แล้วนำมาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการออกซิไดส์แอมโมเนีย พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ก็มียีน *nirK* และเมื่อทำ phylogenetic tree จากยีน *nirK* พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกับ tree ของ 16s rRNA และ *amoA*

Grüntzig และคณะ (2001) ใช้ RT-PCR ในการหาปริมาณของ *nirS* โดยทดสอบในห้องทดลอง แล้วจึงนำไปใช้ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เพื่อตรวจสอบยีน *nirS* ของ *Pseudomonas stutzeri* พบว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำในการนำไปใช้ศึกษายีน *nir* ของ *P. stutzeri* ที่มีอยู่ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

Taroncher-Oldenburg (2003) ได้พัฒนาวิธี DNA microarray ขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบและหาปริมาณของ functional gene ในสิ่งแวดล้อม และมีการนำไปใช้ศึกษาเบื้องต้นกับยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน คือ *nirS* พบว่าปริมาณของดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียที่พบจากการตรวจสอบยีน *nirS* มีความแตกต่างกันตามความเค็ม สารอนินทรีย์ไนโตรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม

van Pelt และคณะ (1999) ใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจำแนก (identify) แบคทีเรีย *Burkholderia spp.* ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาคลีนิค เปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมีธรรมดา พบว่าวิธีที่เหมาะสมกว่า คือ การใช้เทคนิค PCR-RFLP

Conville และคณะ (2000) ได้เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดยีน 16s rRNA และยีน 6 kDa Heat Shock Protein (HGP) และวิธีทางชีวเคมี เพื่อจำแนก แบคทีเรีย *Nocardia sp.* พบว่าเทคนิค RFLP นั้นเป็นประโยชน์ทั้งกับการจำแนก *Norcadia* ในห้องปฏิบัติการ และสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ไม่ได้มีอยู่ทั่วไป

Braker และคณะ (2000) ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียจากชั้นตะกอนทางตะวันตกเฉียงเหนือของมหาสมุทรแปซิฟิก บริเวณนอกชายฝั่งมลรัฐวอชิงตันและพูเกตเซาวด์ (Puget Sound) มลรัฐวอชิงตัน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *nirK* และยีน *nirS* ซึ่งใช้เป็น molecular marker สำหรับดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรีย แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อศึกษารูปแบบ RFLP พบว่าสามารถแบ่งยีน *nirS* ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยแยกจากกัน ส่วนยีน *nirK* ก็แบ่งเป็นกลุ่มแยกจากกันเช่นกัน แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของยีน *nir* ที่มีสูงมาก ภายในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก

Priemé, Braker และ Tiedje (2002) ศึกษา genetic heterogeneity ของชิ้นส่วนของยีน *nirK* และ *nirS* ที่ได้จากดินที่ราบสูงและที่ลุ่ม โดยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าความแปรปรวนของยีน *nirK* ที่โคลนได้มีน้อยกว่ายีน *nirS*

Jayakumar และคณะ (2004) ศึกษาเกี่ยวกับความแปรปรวนและการกระจายตัวของยีน *nirS* ที่สัมพันธ์กับการกระจายตัวของไนไทรต์และไนเทรต ในบริเวณชายฝั่งของคาบสมุทรอาราเบีย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ได้จากตัวอย่างในน้ำที่มีความเข้มข้นของไนไทรต์สูง ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนต่ำ แต่จะสามารถเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นจากน้ำที่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือมีปริมาณออกซิเจนสูง แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของตัวอย่าง ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไนไทรต์

อย่างไรก็ตามจากการค้นหาและตรวจสอบเอกสารการวิจัยในประเทศไทยในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียจนปี 2004 ไม่พบเลย