



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล
ในแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟเออร์จากการวิเคราะห์
ไนโตรที่รีดักทีสียีน โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

โดย

วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล

มีนาคม ๒๕๔๘

รพ
วท 15
012738



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล ในแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟเออร์จากการวิเคราะห์ไนไตรท์รีดักเตสยีน

โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

Molecular Genetics Relation among Denitrifying Bacteria from PCR-RFLP analysis of Nitrite

Reductase Genes

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล

มีนาคม

2548

สถาบันวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล ในแบคทีเรียกลุ่มดีไนตริไฟเออร์จากการวิเคราะห์
ไนโตรที่รีดักทีสอินโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วรุฒิ จุฬาลักษณ์นากุล

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ มีนาคม 2548

บทคัดย่อ

ดีไนตริฟายอิงแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) ที่ได้คัดเลือกจากดินบริเวณพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์
พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี กองการเกษตรและ
สหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา จังหวัดกาญจนบุรี ทั้งหมด 16 ไอโซเลต จากการ
จำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API พบว่าได้แบคทีเรียจากทั้งหมด 6 สกุล คือ *Pseudomonas*
Alcaligenes *Burkholderia* *Agrobacterium* *Corynebacterium* และ *Micrococcus* จากการตรวจสอบยีนโดย
เทคนิค พีซีอาร์ (PCR) พบว่ามี 9 ตัวอย่างที่มียีนเป็น *nirK* และ 4 ตัวอย่างที่มียีนเป็น *nirS* ส่วนอีก 3 ตัวอย่างไม่
สามารถตรวจสอบยีนได้ ผลการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่มียีน *nirK* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ และ
ยีน *nirS* ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่	จก 15
เลขทะเบียน	012738
วัน, เดือน, ปี	27 ก.ค. 49

Project Title Molecular Genetics Relation among Denitrifying Bacteria from PCR-RFLP
analysis of Nitrite Reductase Genes

Name of the Investigation Associated Dr. Warawut Chulalaksananukul

Year March 2005

Abstract

Denitrifying bacteria were screened from soil specimens in the area of Plant Germplasm-Royal Initiation project in Kanchanaburi Province. It was found that 16 bacterial isolates were capable of denitrification. These bacterial isolates were identified by biochemical method, using API system. Six genera were identified, namely *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* and *Micrococcus*. 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 classification by biochemical method.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตารางประกอบ	v
สารบัญภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัย	14
อภิปรายผลการวิจัย	31
ข้อสรุป	33
รายการอ้างอิง	34
ภาคผนวก	38



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญัตราสารประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	ดีไนทริฟายอิงแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ Cytochrome cd_1 -Nir และ Cu-Nir	6
2.1	ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน	6
2.2	ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)	7
2.3	ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)	8
2.4	ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)	9
3	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	19



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้าที่
1	กลุ่มของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ในแบคทีเรีย <i>Pseudomonas stutzeri</i>	4
2	เอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ	4
3	โครงสร้าง polypeptide fold และ subunit ของเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มี cytochrome <i>cd</i> , เป็น องค์ประกอบ	5
4.1	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม	14
4.2	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)	15
4.3	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)	16
4.4	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)	17
5	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต B11-3 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	20
6	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C11-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	20
7	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	21
8	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-14 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	21
9	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-18 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	22
10	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-24 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	22
11	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-1 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	23
12	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	23
13	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-15 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	24
14	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต A31-18 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	24
15	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-2 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	25
16	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	25
17	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-6 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	26
18	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-7 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	26
19	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-13 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	27
20	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C33-1 ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	27
21	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ด้วยไพรเมอร์ nirK-1F-nirS6R	28
22	การตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirK</i> ด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	29
23	แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirK</i> ด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i>	30
24	การตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirK</i> ด้วยเอนไซม์ <i>MspI</i>	31
25	แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirK</i> ด้วยเอนไซม์ <i>MspI</i>	32
26	การตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirS</i> ด้วยเอนไซม์ <i>HhaI</i>	33

ภาพที่		หน้าที่
27	แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirS</i> ด้วยเอนไซม์ <i>HhaI</i>	34
28	การตัดชิ้นส่วนของยีน <i>nirS</i> ด้วยเอนไซม์ <i>MspI</i>	35
29	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน <i>nirK</i>	36
30	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน <i>nirS</i>	37



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์อยู่มากมายหลากหลาย และในจำนวนนั้นมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตให้กลายเป็นไนโตรเจนอิสระหรือก๊าซไนโตรเจน (N_2) หรือสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา denitrification ขึ้นได้ รวมอยู่ด้วย แบคทีเรียในกลุ่มนี้เรียกว่า denitrifying bacteria หรือ denitrifier (สมศักดิ์ วัจโน, 2524) จึงมีการนำวิธีทางชีวภาพมาใช้ ตามปกติก๊าซไนโตรเจนจะละลายน้ำได้น้อยมาก จึงถูกขับหรือไล่ออกจากมวลของน้ำได้ง่าย โดยจะระเหยสู่อากาศได้ดี การกำจัดไนโตรเจนจึงเกิดขึ้นได้ไม่ยาก ถ้าสารประกอบไนโตรเจนในรูปต่างๆ เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของไนเตรต denitrifying bacteria ก็จะสามารถเปลี่ยนไนเตรตให้กลายเป็นก๊าซไนโตรเจนได้ และสามารถกำจัดคาร์บอนเนชั่นของสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ รวมทั้งไนเตรตในแหล่งน้ำได้ด้วย (ธงชัย พรธนะ สวัสดิ์, 2544) ในการทำวิจัยที่ได้รายงานมาก่อน คณะผู้วิจัยได้ศึกษาดีเอ็นเอของแบคทีเรียในดินจากบริเวณแหล่งน้ำในพื้นที่ป่าตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา จังหวัดกาญจนบุรี ปรากฏว่าสามารถแยกและจัดจำแนกชนิดเชื้อที่สามารถลดไนเตรตในน้ำจนสมบูรณ์จำนวนหนึ่ง ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Chryseomonas luteola*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas stutzeri* เป็นต้น อย่างไรก็ตามกลุ่มจุลินทรีย์ denitrifier ที่ได้คัดแยกมาไว้จำนวนประมาณ 20 ชนิดในประเทศไทยซึ่งมีประสิทธิภาพสูง บางชนิดยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าเป็นกลุ่ม denitrifier บางชนิดยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ นอกจากนี้ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ยังไม่ได้มีการศึกษาลงในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะการศึกษาถึงยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ denitrification

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

การเปลี่ยนแปลงไนเตรตไปเป็น ดีไนโตรเจนแก๊ส เรียกว่าการเกิดปฏิกิริยาดีนิตริฟิเคชัน นับเป็นวัฏจักรไนโตรเจนที่สำคัญหนึ่งและเป็นลำดับต้นของกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย นอกจากความสำคัญของสมดุลไนโตรเจนของโลก ปัจจุบันมีความวิตกกังวลปัญหาสิ่งแวดล้อมโลกในเรื่องปริมาณของ ไนเตรต และไนโตรเจนออกไซด์ ซึ่งเป็นมลพิษในน้ำใต้ดิน เช่นเดียวการเกิดไดไนโตรเจนออกไซด์ ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก (Dickinson and Cicerone, 1986) กิจกรรมหลายชนิดสามารถเป็นเหตุให้เกิดแหล่ง ไนโตรเจนออกไซด์ เช่นเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอุตสาหกรรม (Thiemens and Trgler, 1991 ; Zumft, 1997) ผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการ ไนโตรรีดักชันบางส่วนนี้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเป็นปัญหาทำให้ลดลงของสิ่งมีชีวิตในการเปลี่ยนแปลงสารโลหะหนัก เช่น ยูเรเนียม (Tiedje, 1988 ; Zumft, 1992; Senko et al., 2002)

กระบวนการ denitrification โดยแบคทีเรียมี 4 ขั้นตอน อาศัยเอนไซม์ 4 ชนิดคือ nitrate reductase (Nar), nitrite reductase (Nir), nitric oxide reductase (Nor) และ nitrous oxide reductase (Nos) ซึ่งควบคุมด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) 4 ยีน คือ *nar*, *nir*, *nor* และ *nos* ตามลำดับ (Philippot et al., 2001) แต่ยีนจะมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม หรือเอนโดจีนัสพลาสมิด (endogenous plasmid) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ

แบคทีเรีย การศึกษา plasmid content และการระบุตำแหน่งของยีน อาจทำได้โดยการสร้าง oligonucleotide probe ขึ้นมาจากเอนไซม์ทั้งสี่ แล้วนำไป hybridize กับ genomic DNA หรือ plasmid DNA ที่มีการถ่ายไปสู่ nylon membrane ไว้ (Schwintner et al., 1998) ขั้นตอนที่สำคัญของ denitrification pathway คือขั้นตอนการรีดิวซ์ไนโตรัสด้วยเอนไซม์ nitrite reductase เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ใช้ในการแยก denitrifier ออกจาก nitrate respirer เอนไซม์ nitrite reductase มี 2 ชนิด ชนิดแรกมี heme c และ heme d_f เป็นองค์ประกอบ (cd_f -nir) ส่วนชนิดที่สองมีทองแดง (copper) เป็นองค์ประกอบ (Cu-nir) การตรวจสอบ nitrite reductase genes (*nir*) ของ denitrifying bacteria มีการศึกษาโดยออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับบริเวณ cd_f -nir gene (*nirS*) และ Cu-nir gene (*nirK*) ขึ้น แล้วอาศัยเทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA (DNA fragment) ผลผลิต PCR (PCR product) ที่ได้ นำมาทำ Southern blot โดยใช้ probe ที่สร้างจากบริเวณ cd_f -nir gene และ Cu-nir gene ผลการศึกษาที่ได้พบว่า primer และ probe ที่สร้างขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสอบ nitrite reductase genes ของ denitrifying bacteria ได้หลายสายพันธุ์ (Hallin and Lindgren, 1999) นอกจากนี้ยังมีการนำผลผลิต PCR ของยีนทั้งสองมาทำการศึกษาต่อไปด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยตัดผลผลิต PCR ของ cd_f -nir gene ด้วยเอนไซม์ *HhaI* และ *MspI* และตัดผลผลิต PCR ของ Cu-nir gene ด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *MspI* แล้วนำผลที่ได้มาจัดกลุ่มเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีนนี้ใน denitrifier แต่ละสายพันธุ์ (Braker et al., 2000) มีงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสของ nirK และ nirS เป็นประโยชน์ต่อความเข้าใจองค์ประกอบของสังคัมสิ่งมีชีวิต denitrifier (Braker et al., 1998; Hallin and Lindgren, 1999; Braker et al., 2000; Prieme et al., 2002). เพื่อศึกษาว่าไนโตรัส และสิ่งปลอมปนอื่นๆ มีผลต่อสังคัม denitrifier อย่างไร การศึกษาความหลากหลายของ nir K และ nir S ของแบคทีเรียบริเวณต่างๆ อาจบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตนี้และสภาพแวดล้อม

จากข้อมูลข้างต้นงานวิจัยนี้จึงสนใจดำเนินการวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยเดิม โดยตรวจสอบ nitrite reductase genes และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลในดีเอ็นเอที่เรียกแบคทีเรีย ที่ได้คัดแยกไว้แล้ว โดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP

วัตถุประสงค์ของโครงการ

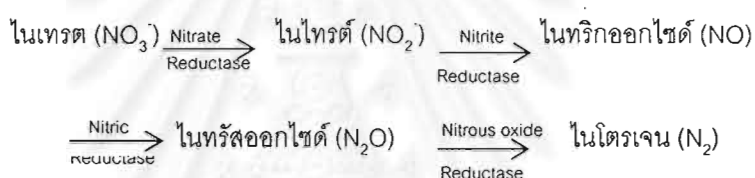
หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลและจัดกลุ่มดีเอ็นเอที่เรียกแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ nitrite reductase genes ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification)

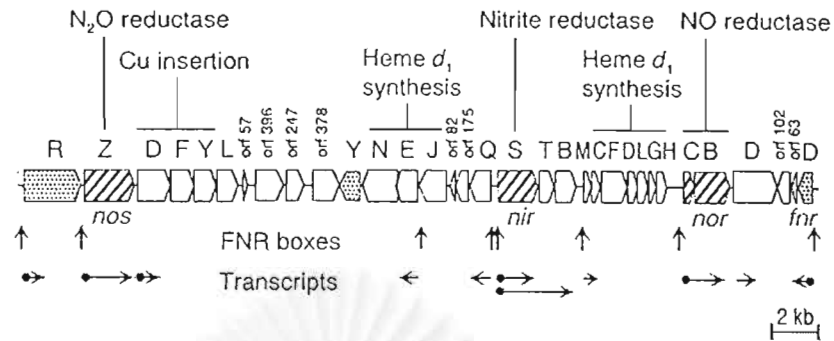
กระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญ มีผลทางนิเวศวิทยาทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมทางบกและทางน้ำ และส่งผลกระทบต่อสภาพให้ได้พลังงานออกมาในรูป ATP จากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์จะ ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ไนเตรต ทำให้ไนเตรตถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ ซึ่งจะกลายมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวใหม่ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจนในที่สุด กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) (Delwiche, 1981) สารไนโตรเจนออกไซด์ (Nitrogen oxide) ต่างๆที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระหว่างกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน จะทำให้เกิดกระบวนการ ดีไนทริฟิเคชันขึ้น ดังสมการ (Payne, 1973 อ้างถึงใน Delwiche, 1981)



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

พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

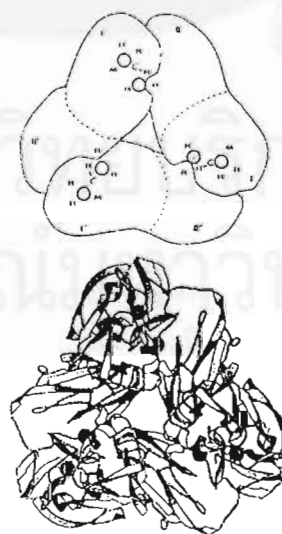
ยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน พบครั้งแรกจากการทำแผนที่คอนจูเกชันและ ทรานสดักชัน (conjugal and transductional mapping) ในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Zumft, 1997; van Hartingsveldt และ Stouthamer, 1973; Jeter, Sias และ Ingraham, 1984) ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มีลักษณะเป็นกลุ่มของยีน (gene cluster) โดยกลุ่มของยีน *nar nir nor* และ *nos* จะควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส เอนไซม์ไนตริกออกไซด์รีดักเทส และเอนไซม์ ไนตรัสออกไซด์รีดักเทส ตามลำดับ (Philippot และคณะ, 2001) ดังภาพที่ 1 ยีนเหล่านี้อาจพบอยู่บนโครโมโซม (chromosome) หรือเอนโดจีนัสพลาสมิด (endogenous plasmid) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย



ภาพที่ 1 กลุ่มของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน ในแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* (Zumft, 1997)

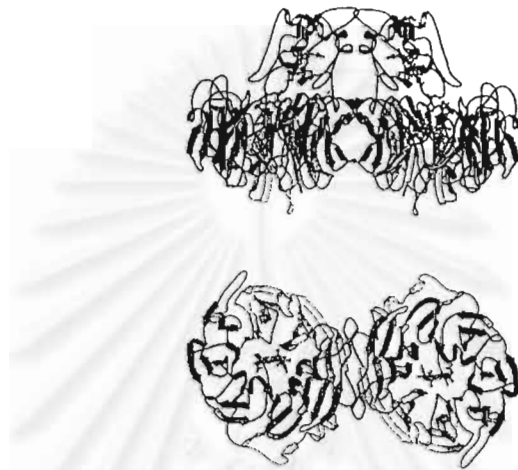
กลไกการแสดงออกของยีนโครงสร้าง *narG nirS norB* และ *nosZ* มีการศึกษาด้วย mRNA โดยวิธี Dot Blot Hybridization ถึงแม้ว่าการศึกษาลำดับเบสที่สมบูรณ์บนจีโนมของแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้น แต่ยีนโครงสร้างทั้งสี่นี้ไม่เคยถูกอธิบายลักษณะได้ในแบคทีเรียชนิดเดียว (Philippot และคณะ, 2001)

ขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน คือ ขั้นตอนการรีดิวซ์ไนโตรตด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ใช้ในการแยกดีไนทริฟายจิ้งแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียที่หายใจโดยใช้ไนเตรต (nitrate respirer) และเป็นขั้นตอนที่ผลิตก๊าซตัวแรกของกระบวนการ คือ ไนตริกออกไซด์ออกมา เอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสมี 2 ชนิด ชนิดแรกมี ทองแดง (copper) เป็น องค์ประกอบ (Cu-Nir หรือ NirK) ควบคุมโดยยีน *nirK* (ภาพที่ 2) ส่วนชนิดที่สองมี cytochrome heme c และ heme *d*₁ เป็นองค์ประกอบ (*cd*₁-Nir หรือ NirS) ควบคุมโดยยีน *nirS* (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Cu-containing nitrite reductase) จาก *Alcaligenes cycloclastes* ภาพบนแสดงไตรเมอร์ (trimer) และตำแหน่งของอะตอมทองแดง วงกลมแทน

ทองแดง 6 อะตอม ที่เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine (C)), (histidine (H)) และเมไทโอนีน (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 3 โครงสร้าง polypeptide fold และ subunit ของเฮนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มี cytochrome *cd*, เป็นองค์ประกอบ (cytochrome *cd*, nitrite reductase) จาก *Paracoccus denitrificans* GB17 (เดิม "*T. pantotropha*") ภาพบนแสดงด้านข้างของโปรตีนไดเมอร์ (protein dimer) ซึ่งมี heme C อยู่ส่วนบน ภาพล่างแสดงด้านหลังของ heme D₁-binding domain มี heme D₁ อยู่ที่แกนของ eight-bladed propeller-like structure (Zumft, 1997)

แม้ว่าเฮนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีโครงสร้างที่ต่างกัน แต่ในดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย เฮนไซม์จะมีหน้าที่ทางกายภาพและลักษณะทางสรีรวิทยาที่เหมือนกัน มีรายงานว่ายีน *nirK* ของ *Pseudomonas aureofaciens* สามารถแสดงออกได้ใน *Pseudomonas stutzeri* ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สูญเสียยีน *nirS* (Glockner, Jüngst และ Zumft, 1993 อ้างถึงใน Hallin และ Lindgren, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าเฮนไซม์ทั้งคู่ต่างก็มีความเฉพาะเจาะจงกับ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าชนิดของเฮนไซม์ในแบคทีเรียสกุลเดียวกัน หรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกันจะแตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรียจะมีเฮนไซม์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ยีน *nirS* พบได้มากกว่าในธรรมชาติ เนื่องจากมีการกระจายตัวกว้างกว่า ดังนั้นจึงพบเฮนไซม์ NirS เป็นหลักในดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย ในขณะที่ยีน *nirK* พบเพียงร้อยละ 30 ของ ดีไนโตรฟายอิงแบคทีเรีย ที่มีการศึกษากันมา แต่ยีน *nirK* จะพบในกลุ่มทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียได้หลายกลุ่มกว่า เฮนไซม์ 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 1 ดีไนทริฟายอิงแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ Cytochrome *cd*₁-Nir และ Cu-Nir (Delwiche, 1981; Coyne, 1989)

Cytochrome <i>cd</i> ₁ -Nir	Cu-Nir
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	<i>Achromobacter cycloclastes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	(<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> S6
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Micrococcus (Paracoccus) denitrificans</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	(<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)

ตารางที่ 2.1 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	<i>anr</i>	27.1	<i>P. aeruginosa</i> FNR-like global redox regulator for expression of denitrification genes
	<i>dnr</i> , <i>fnrD</i>	24.5 – 26.2	<i>Pseudomonas</i> FNR-like regulators; affect the expression of <i>nirS</i> and <i>norCB</i>
	<i>fixK2</i>		<i>B. japonicum</i> FNR-like regulator; affects anaerobic growth on nitrate
	<i>fnrP</i>	28	<i>Paracoccus</i> FNR-like regulator; affects the expression of <i>narGH</i>
	<i>narL</i>	24.4	Nitrate-responsive transcription factor of <i>Pseudomonas</i> of a NarXL two component system
	<i>nirI</i>	73.1	A membrane protein with similarity to NosR; affects <i>nirS</i> expression
	<i>nirR</i>	25.6	<i>Pseudomonas</i> locus; affects NirS synthesis
	<i>nirY</i> (<i>orf286</i>)	32.7	LysR-like regulator
	<i>nnr</i> , <i>nnrR</i>	26	<i>Paracoccus</i> and <i>Rhodobacter</i> FNR-like regulators; affect <i>nirS</i> and <i>norCB</i> expression

ตารางที่ 2.2 ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)

Category of affected process	Gene or locus ^a	Mol mass (kDa) of gene product ^b	Encoded gene product, function, or observation
	<i>nnrS</i>		Activates transcription of <i>nirK</i> and <i>nor</i> genes in <i>R. sphaeroides</i>
	<i>nosR</i>	81.9	Membrane-bound regulator required for transcription of <i>nosZ</i>
	<i>rpoN</i>	54.8	Sigma factor σ^{54} affects denitrification; essential for <i>R. eutropha</i>
Nitrate respiration	<i>narD</i>		Plasmid-borne locus for <i>R. eutropha</i> respiratory nitrate reduction
	<i>narG</i>	139	Large or α subunit of nitrate reductase; binds MGD
	<i>narH</i>	57.3	Small or β subunit of respiratory nitrate reductase; binds Fe-S clusters
	<i>narI</i>	26.1	Cytochrome b subunit of respiratory nitrate reductase
	<i>narJ</i>	25	Protein necessary for nitrate reductase assembly
Periplasmic nitrate reduction	<i>napA</i>	92.6 – 93.3	Large subunit of periplasmic nitrate reductase; binds MGD and Fe-S cluster
	<i>napB</i>	17.8 – 18.9	Small subunit of periplasmic nitrate reductase; a diheme cytochrome c
	<i>napD</i>	12.1	Cytoplasmic protein with presumed maturation function; homologous to <i>E. coli</i> NapD (YojF)
	<i>napE</i>	6.6	Putative monotopic membrane protein; no known homologs
Nitrite respiration	<i>nirB</i>	30.4	Cytochrome c_{552}
	<i>nirC</i>	11.9	Mono-heme cytochrome c with putative function in NirS maturation
	<i>nirK, nirU</i>	36.9 – 41	Cu-containing nitrite reductase
	<i>nirN, orf507</i>	55.5	Affects anaerobic growth and in vivo nitrite reduction; similarity to NirS
	<i>nirQ</i>	29.2	Gene product affects catalytic function of NirS and NorCB
	<i>nirS (denA)</i>	62	Cytochrome cd , nitrite reductase
Heme D ₁ biosynthesis	<i>nirD</i>	16.9	Gene product affects heme D ₁ biosynthesis or processing
	<i>nirE</i>	29.6	S-Adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase
	<i>nirF</i>	43.1	Required for heme D ₁ biosynthesis or processing; similarity to NirS

ตารางที่ 2.3 ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)

Category of affected process	Gene or locus ^a	Mol mass (kDa) of gene product ^b	Encoded gene product, function, or observation
Heme D ₁ biosynthesis	<i>nirG</i>	16.6	Gene product affects heme D ₁ biosynthesis or processing
	<i>nirH</i>	18.8	Gene product affects heme D ₁ biosynthesis or processing
	<i>nirJ</i> , <i>orf393</i>	44.4	Affects heme D ₁ biosynthesis or processing; similarity with PqqE, NifB and MoaA
	<i>nirL</i>	19.6	Gene product affects heme D ₁ biosynthesis or processing
NO respiration	<i>norB</i>	52 –53.1	Cytochrome <i>b</i> subunit of NO reductase
	<i>norC</i>	16 – 17	Cytochrome <i>c</i> subunit of NO reductase
	<i>norD</i> , <i>orf6</i>	69.7	Affects viability under denitrifying conditions
	<i>norE</i> , <i>orf2</i> , <i>orf175</i>	17.7 – 19.5	Membrane protien; homologous with COX III
	<i>norF</i>	8.2	Affects NO and nitrite reduction
	<i>norQ</i>	30.5	Affects NirS and NorCB function; homolog of NirQ
	<i>norZ</i>	84.5	Chromosomally encoded <i>R. eutropha</i> NO reductase
N ₂ O respiration	<i>fhp</i>	44.8	<i>R. eutropha</i> flavohemoglobin affects N ₂ O and/or NO reduction
	<i>nosA</i> , <i>oprC</i>	74.9 – 79.2	Channel-forming outer membrane protien; affects Cu-processing for NosZ
	<i>nosD</i>	48.2	Periplasmid protien involed in Cu insertion into NoaZ
	<i>nosF</i>	33.8	ATP/GTP-binding protien involedin Cu insertion into NosZ
	<i>nosL</i>	20.4	Part of <i>nos</i> gene cluster; putative outer membrane lipoprotien
	<i>nosX</i>	34.1	Affects nitrous oxide reduction in <i>S. meliloti</i>
	<i>NosY</i>	29.4	Inner membrane protien involed in Cu processing for NosZ
	<i>nosZ</i>	70.8	Nitrous oxide reductase
Electron transfer	<i>azu</i>	16	Azurin
	<i>cycA</i>	11.7 – 15.5	Cytochrome <i>c</i> ₂ (<i>c</i> ₅₅₀)
	<i>napC</i>	27.2	Tetraheme cytochrome <i>c</i> ; homologous to NirT
	<i>nirM</i> (<i>denB</i>)	10.8	Cytochrome <i>c</i> ₅₅₁
	<i>nirT</i>	22.8	Putative membrane-anchored tetraheme <i>c</i> -type cytochrome

ตารางที่ 2.4 ยีนและหน้าที่ของยีนในกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน (ต่อ)

Category of affected process	Gene or locus ^a	Mol mass (kDa) of gene product ^b	Encoded gene product, function, or observation
Electron transfer	<i>paz</i>	15.7	Pseudoazurin
Functionally unassigned	<i>orf396</i>	43.1	A putative 12-span membrane protien of <i>P. stutzeri</i> ; homologous to NnrS
	<i>nirX</i>	32.4	A <i>Paracoccus</i> putative cytoplasmic protien; homologous to NosX
	<i>orf7, orf63</i>	7.3	<i>Pseudomonas</i> genes imediately downstream of <i>dnr</i> and <i>fnrD</i>
	<i>orf247</i>	25.8	Putative member of the short-chain alcohol dehydrogenase family

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

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

Coyne และคณะ (1989) ใช้ polyclonal antibodies ในการจำแนกเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสในแบคทีเรียที่มีองค์ประกอบเป็น cytochrome *cd*, หรือทองแดง พบว่าเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มี cytochrome *cd*, เป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่พบใน *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ส่วนเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ พบได้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกันทางอนุกรมวิธาน

Braker และคณะ (1998) ได้ออกแบบชุดของไพรเมอร์สำหรับยีน *nirK* และยีน *nirS* ขึ้นมาเมื่อนำมาทำพีซีอาร์แล้ว พบว่ามีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ ของทั้ง 2 ยีน ที่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดได้

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

Michotey และคณะ (2000) พัฒนาไพรเมอร์ของพีซีอาร์ (PCR primer) ขึ้นมา 2 กลุ่มเพื่อใช้ตรวจสอบและหาปริมาณของเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่มี cytochrome *cd*, 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* โดยทดสอบใน ห้องทดลอง แล้วจึงนำไปใช้ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เพื่อตรวจสอบยีน *nirS* ของ *Pseudomonas stutzeri* พบว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำในการนำไปใช้ศึกษา ยีน *nir* ของ *P. stutzeri* ที่มีอยู่ใน ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

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

van Pelt และคณะ (1999) ใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจำแนก (identify) แบคทีเรีย *Burkholderia spp.* ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาคลินิก 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 *Nocardia* ในห้องปฏิบัติการ และสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ไม่ได้มีอยู่ทั่วไป

Braker และคณะ (2000) ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของดีไนทริฟายอิงแบคทีเรียจากชั้นตะกอนทางตะวันตกเฉียงเหนือของมหาสมุทรแปซิฟิก บริเวณนอกชายฝั่งมลรัฐวอชิงตันและพูเกตซาวด์ (Puget Sound) มลรัฐวอชิงตัน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *nirK* และยีน *nirS* ซึ่งใช้เป็น molecular marker สำหรับดีไนทริฟายอิงแบคทีเรีย 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* ที่สัมพันธ์กับการกระจายตัวของไนโตรตและไนเตรต ในบริเวณชายฝั่งของคาบสมุทร อาราบีย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ได้จากตัวอย่างในน้ำที่มีความเข้มข้นของไนโตรตสูง ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนต่ำ แต่จะสามารถเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นจากน้ำที่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือมีปริมาณออกซิเจนสูง แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของตัวอย่าง ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไนโตรต

อย่างไรก็ตามจากการค้นหาและตรวจสอบเอกสารการวิจัยในประเทศไทยในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนทริฟายอิงแบคทีเรียจนปี 2004 ไม่พบเลย

วิธีการวิจัย

1 การสกัดดีเอ็นเอ (Ausubel และคณะ, 1996)

ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเชื้ออิ่มตัว นำเชื้อที่อิ่มตัว 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกระทั่งเกิดตะกอนขึ้น ทิ้งส่วนใสแล้วนำตะกอนมาทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน TE buffer ปริมาตร 567 ไมโครลิตร เติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม NaCl ความเข้มข้น 5 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม CTAB/NaCl solution ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม Chloroform/Isoamyl alcohol ปริมาตรเท่ากันโดยประมาณ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นด้วย microcentrifuge เป็นเวลา 4-5 นาที นำส่วนใสไปใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ เติม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ปริมาตรเท่ากันลงไป แล้วนำไปปั่นด้วย microcentrifuge เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าหลอดไปข้างหน้าและข้างหลัง จนกระทั่งเริ่มเห็นสายดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยง ทิ้งส่วนใส แล้วเติมเอทานอล 70% เพื่อล้าง CTAB ออกจากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสออกอย่างระมัดระวัง แล้วทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว จากนั้นละลายตะกอนของดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *nirK* และ *nirS* ด้วยไพรเมอร์ (primer) 2 คู่ (Braker และคณะ, 1998) ดังต่อไปนี้คือ

คู่ที่ 1 : nirK1F- nirK5R สำหรับยีน *nirK* มีลำดับเบส ดังนี้

nirK1F (5' → 3') 17 bp

GGAATGGTGCCCTGGCA

nirK5R (5' → 3') 18 bp

GCCTCGATCAGATTATGG

คู่ที่ 2 : nirS1F- nirS6R สำหรับยีน *nirS* มีลำดับเบสดังนี้

nirS1F (5' → 3') 18 bp

CCTACTGGCCGCCACAAT

nirS6R (5' → 3') 16 bp

CGTTGAACTTACCGGT

โดยในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) 200 ไมโครโมลาร์ *Taq* polymerase 1.0 U ไพรมอร์สายละ 1 ไมโครโมลาร์ bovine serum albumin 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และตัวอย่างดีเอ็นเอ 10-100 นาโนกรัม หลังจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ว ก็ทำ touch down PCR 35 รอบ ประกอบไปด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing step 1 นาที และ extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ในระหว่าง 10 รอบแรก อุณหภูมิของ annealing step จะลดลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ 56 องศาเซลเซียส จนถึง 51 องศาเซลเซียส จากนั้นอีก 25 รอบ อุณหภูมิจะคงที่ที่ 54 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 35 รอบ แล้วก็บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 7 นาที ดังนี้

denaturation step		95 °C	5 นาที	
touch down PCR				
denaturation step	95 °C	1 นาที		
annealing step	56 – 51 °C	1 นาที	→ 10 รอบ	} 35 รอบ
	54 °C	1 นาที	1 นาที	
extension step	72 °C	1 นาที		
incubation		72 °C	7 นาที	

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และย้อมด้วย ethidium bromide ชิ้นส่วนของยีน *nirK* จะมีขนาด 514 bp ส่วนชิ้นส่วนของยีน *nirS* จะมีขนาด 890 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกมา แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit (QIAGEN) (ภาคผนวก ค.)

3 การศึกษา RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *MspI* และตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI* และ *MspI* เอนไซม์แต่ละชนิดทำปฏิกิริยาแยกจากกัน โดยในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบด้วย 10x buffer 1 μ l, bovine serum albumin 0.1 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอ 7 ไมโครโมลาร์ วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 3% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ และย้อมด้วย ethidium bromide

4 การวิเคราะห์ผล RFLP

หาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้โดยใช้โปรแกรม แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip Version 3.6 beta ซึ่งใช้สมการของ Nei และ Li (1979) ในการคำนวณ แล้วสร้าง Phylogenic tree ขึ้นมา ด้วยโปรแกรม TreeView (win32) Version 1.6.6

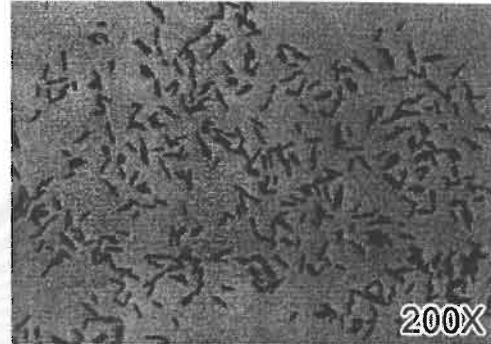


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

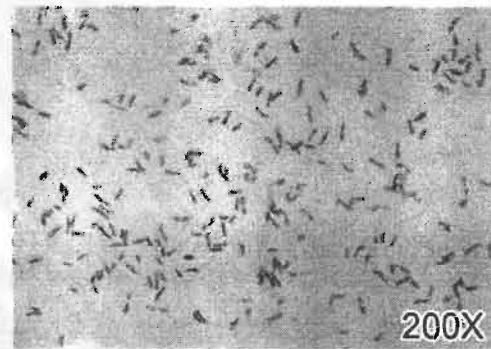
ผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาวิจัย

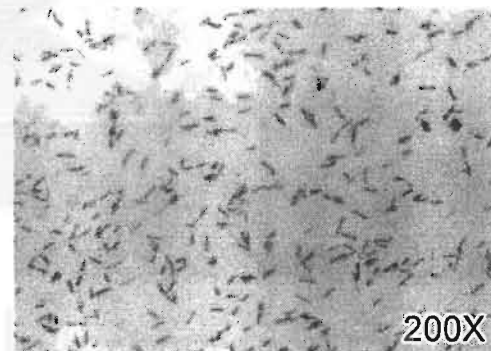
B11-3



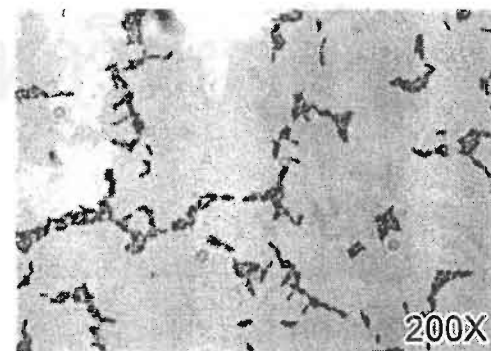
C11-5



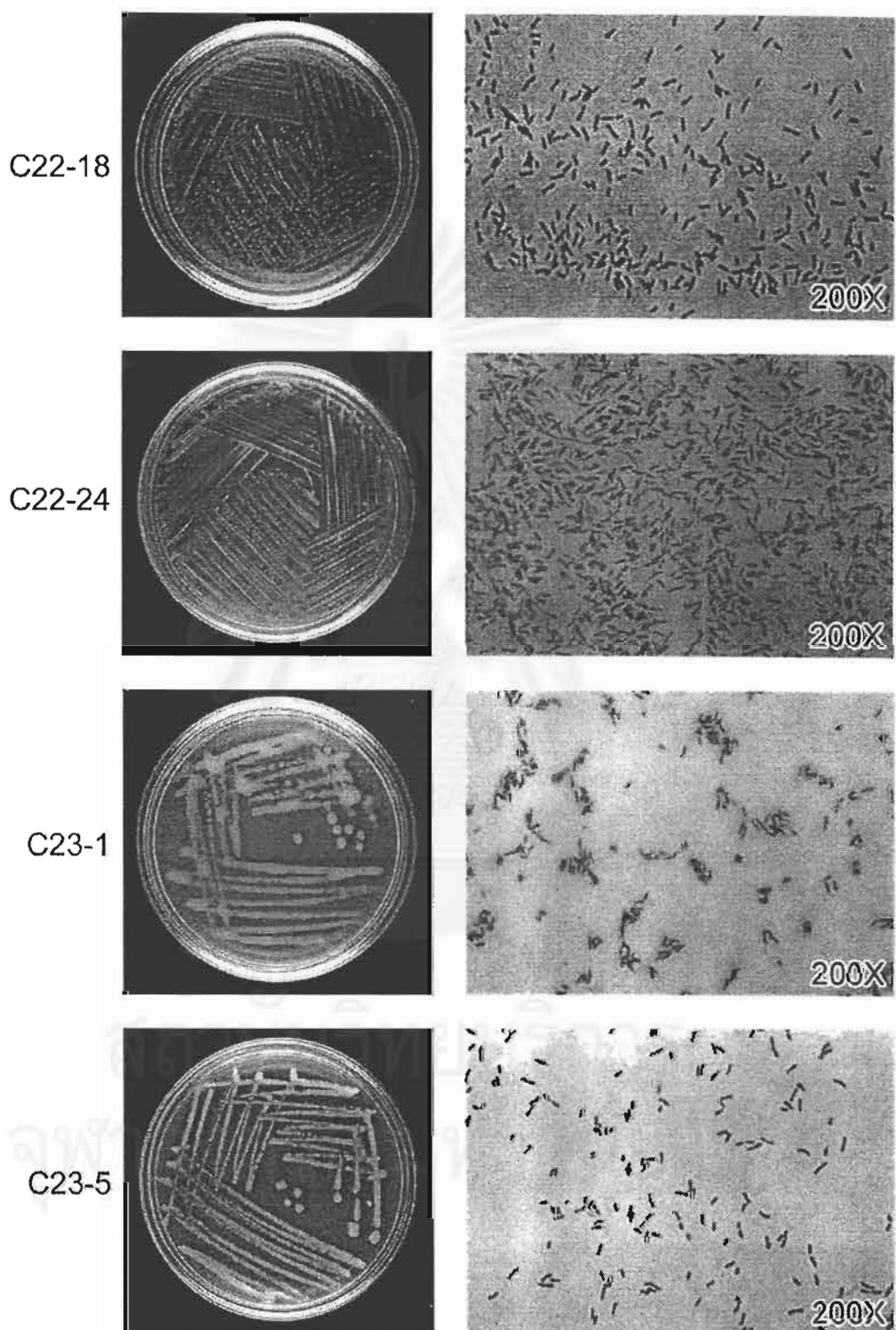
C22-5



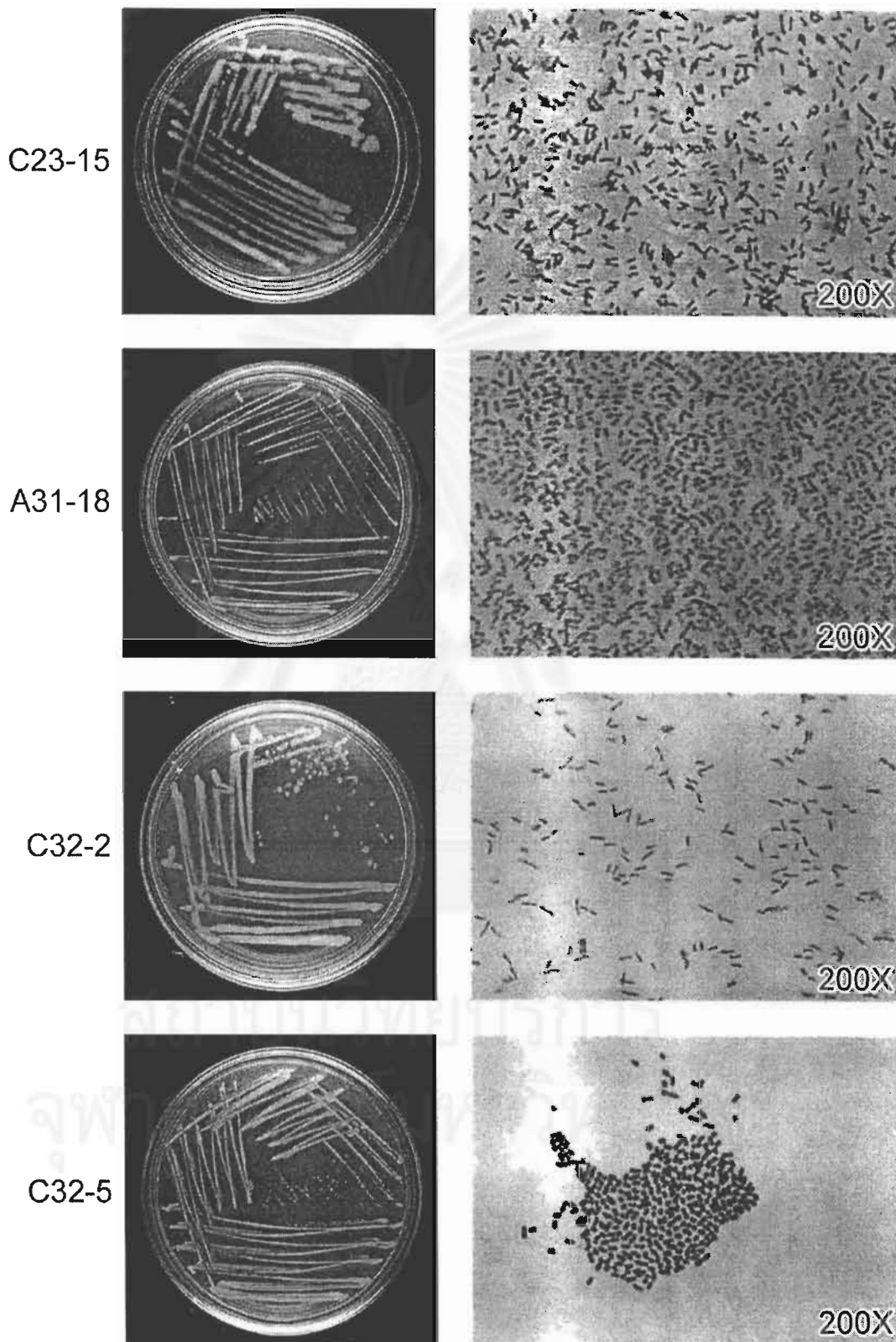
C22-14



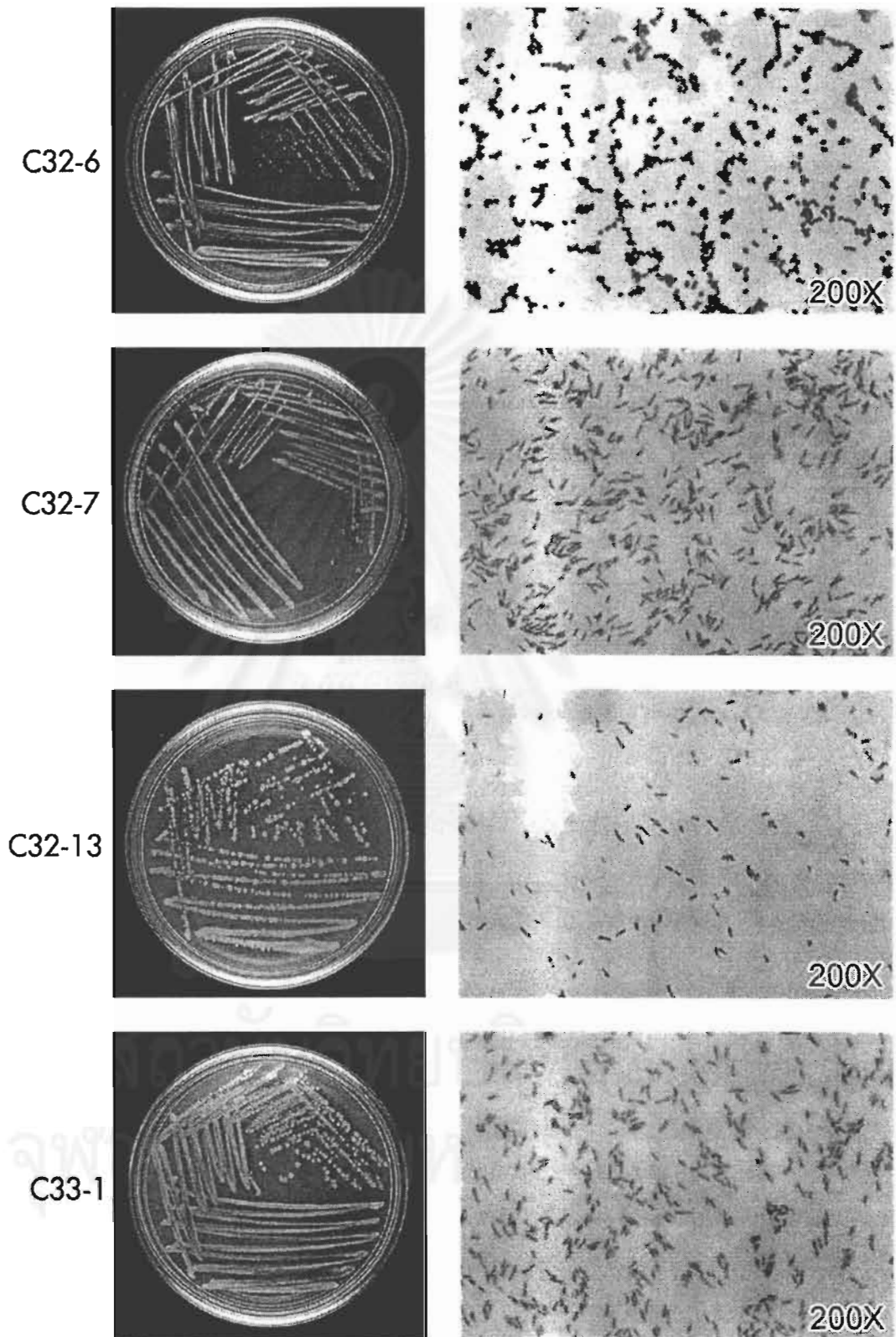
ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)



ภาพที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม (ต่อ)

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลต จากการศึกษาในโครงการเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาพันธุกรรมของดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สามารถลดไนเตรทในน้ำ ในปีงบประมาณ 2545 มีดังนี้

B11-3	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C11-5	=	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>
C22-5	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C22-14	=	<i>Burkholderia cepacia</i>
C22-18	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C22-24	=	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
C23-1	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C23-5	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C23-15	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
A31-18	=	<i>Corynebacterium propinquum</i>
C32-2	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C32-5	=	<i>Micrococcus lylae</i>
C32-6	=	<i>Micrococcus lylae</i>
C32-7	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C32-13	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C33-1	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

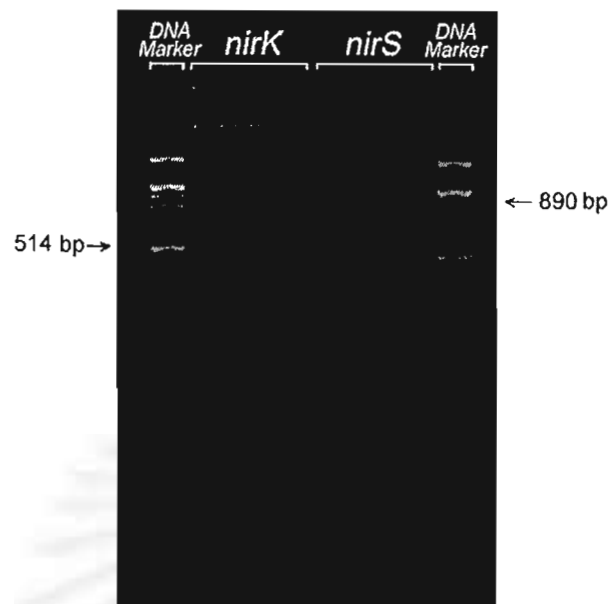
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R แล้วนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาด 514 bp ของยีน *nirK* ในแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ nirS1F-nirS6R พบแถบดีเอ็นเอขนาด 890 bp ของยีน *nirS* ในแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ดังสรุปในตารางที่ 1 (ภาพที่ 5 - ภาพที่ 21) นอกจากนี้เมื่อนำตัวแทนแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ซึ่งสะสมไนโตรเจนแต่ไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจนไม่สะสมไนโตรเจนแต่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน สะสมไนโตรเจนและเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน และไม่สะสมไนโตรเจนและไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน มาศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการได้ ดังภาพที่ 21

ตารางที่ 3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ไอโซเลต	ยีน <i>nirK</i>	ยีน <i>nirS</i>
B11-3	-	+
C11-5	+	-
C22-5	-	-
C22-14	-	-
C22-18	+	-
C22-24	-	-
C23-1	+	-
C23-5	+	-
C23-15	+	-
A31-18	-	+
C32-2	+	-
C32-5	-	+
C32-6	-	+
C32-7	+	-
C32-13	+	-
C33-1	+	-

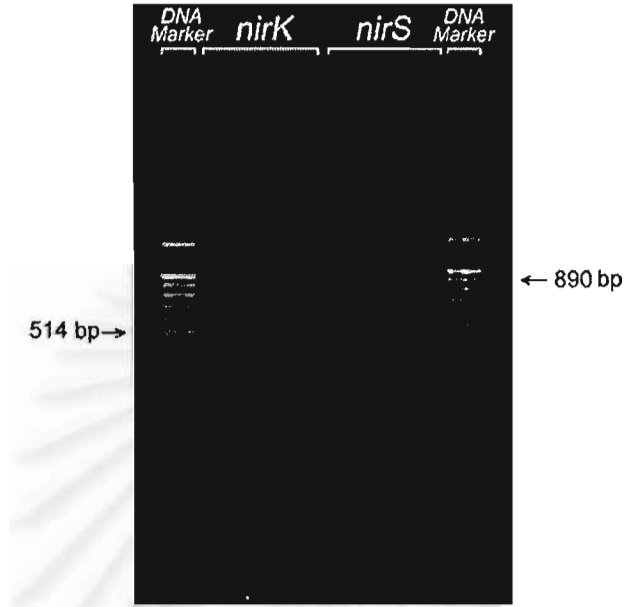
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



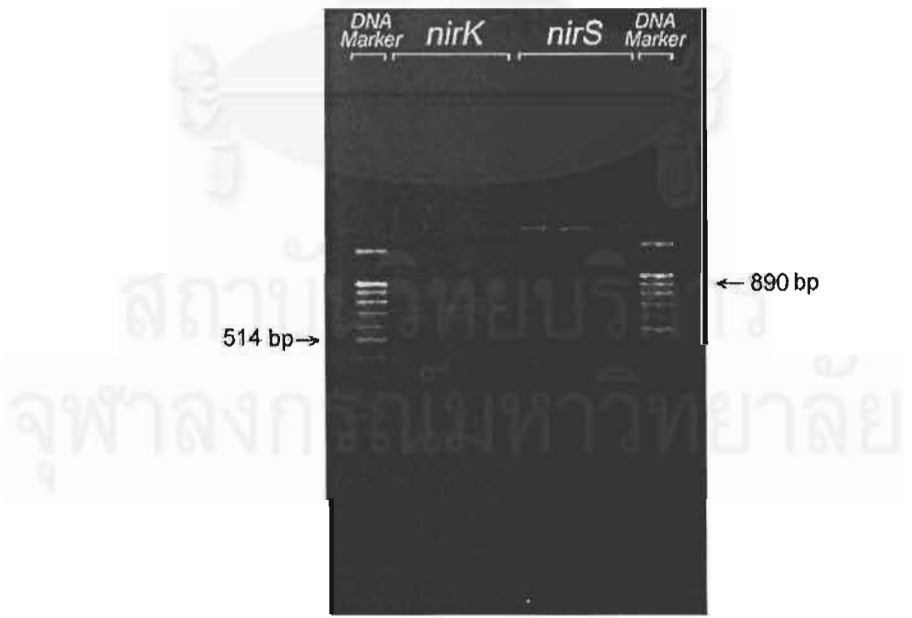
ภาพที่ 5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต B11-3 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C11-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



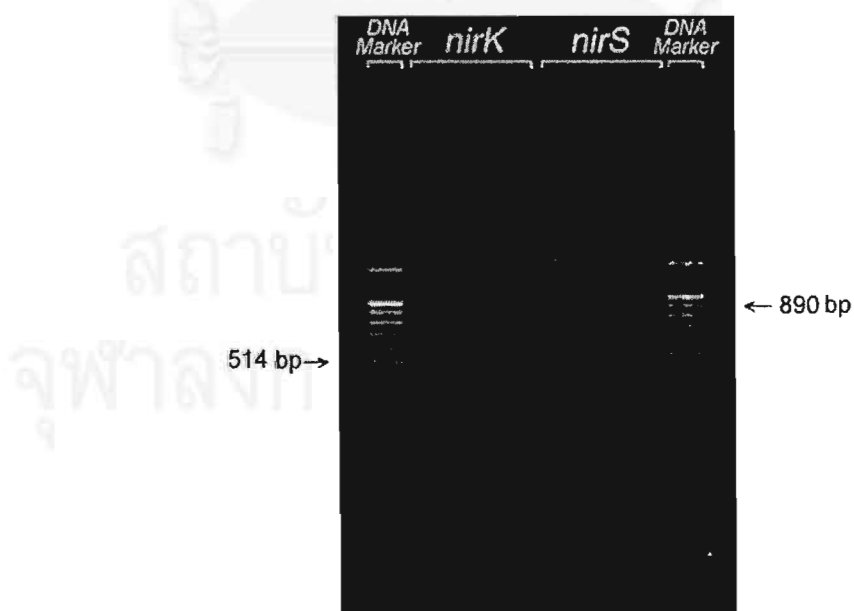
ภาพที่ 7 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-5 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



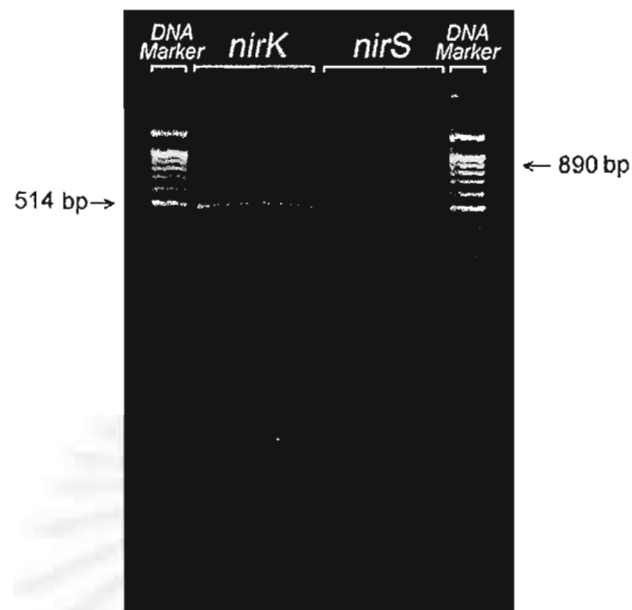
ภาพที่ 8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-14 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-18 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



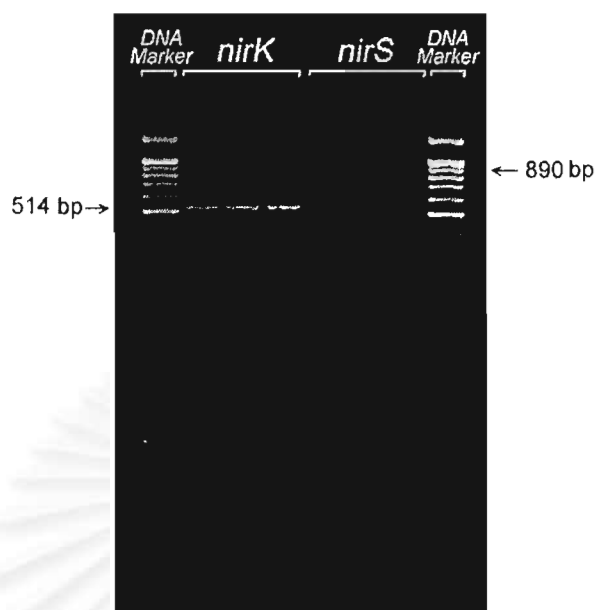
ภาพที่ 10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-24 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-1 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



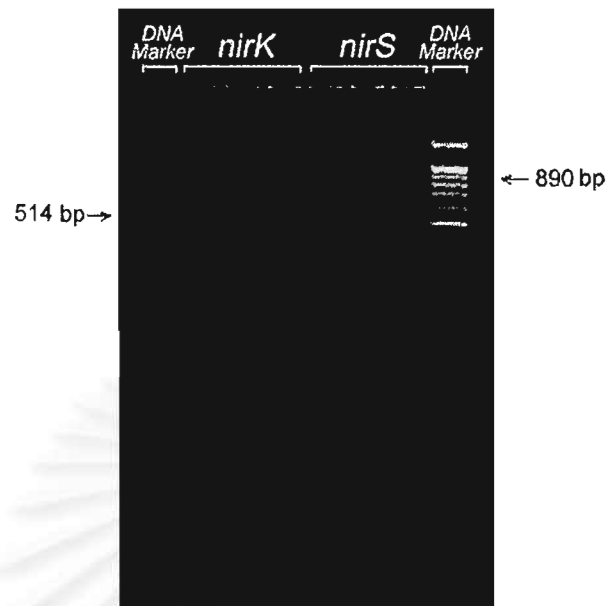
ภาพที่ 12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-15 ด้วยไพรเมอร์ *nirK*1F-*nirK*5R และ *nirS*1F-*nirS*6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



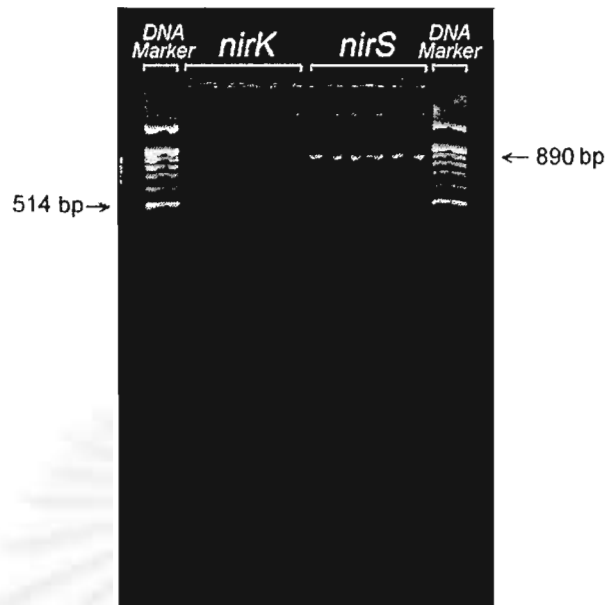
ภาพที่ 14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต A31-18 ด้วยไพรเมอร์ *nirK*1F-*nirK*5R และ *nirS*1F-*nirS*6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



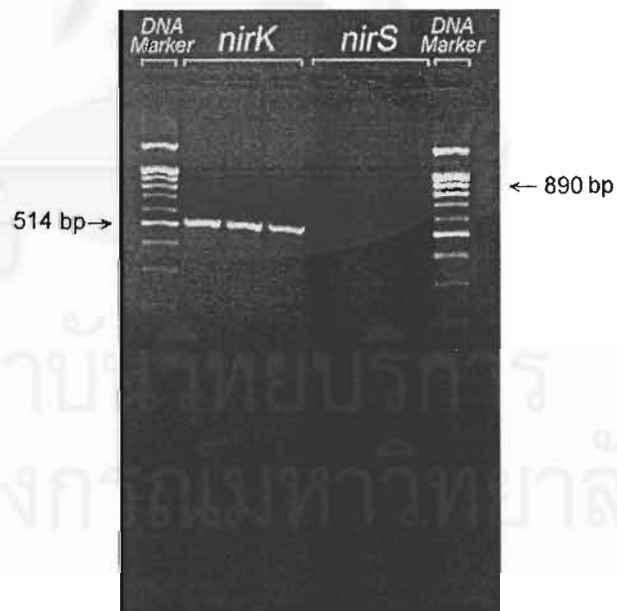
ภาพที่ 15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-2 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



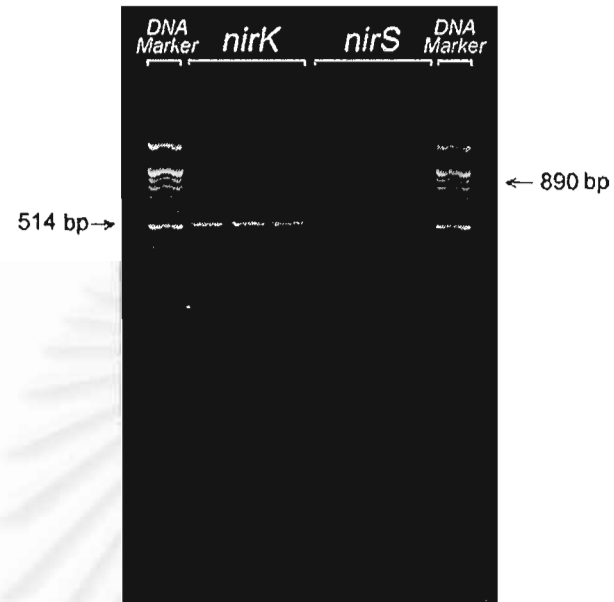
ภาพที่ 16 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 17 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฮโซเลต C32-6 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 18 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฮโซเลต C32-7 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 19 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-13 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C33-1 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 21 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R (ซ้าย) และ nirS1F-nirS6R (ขวา) ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 100 bp

lane ที่ 2 คือ แบคทีเรียที่สะสมไนไตรต์ แต่ไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 3 คือ แบคทีเรียที่ไม่สะสมไนไตรต์ แต่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 4 คือ แบคทีเรียที่สะสมไนไตรต์ และเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 5 คือ แบคทีเรียที่ไม่สะสมไนไตรต์ และไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 6 คือ negative control

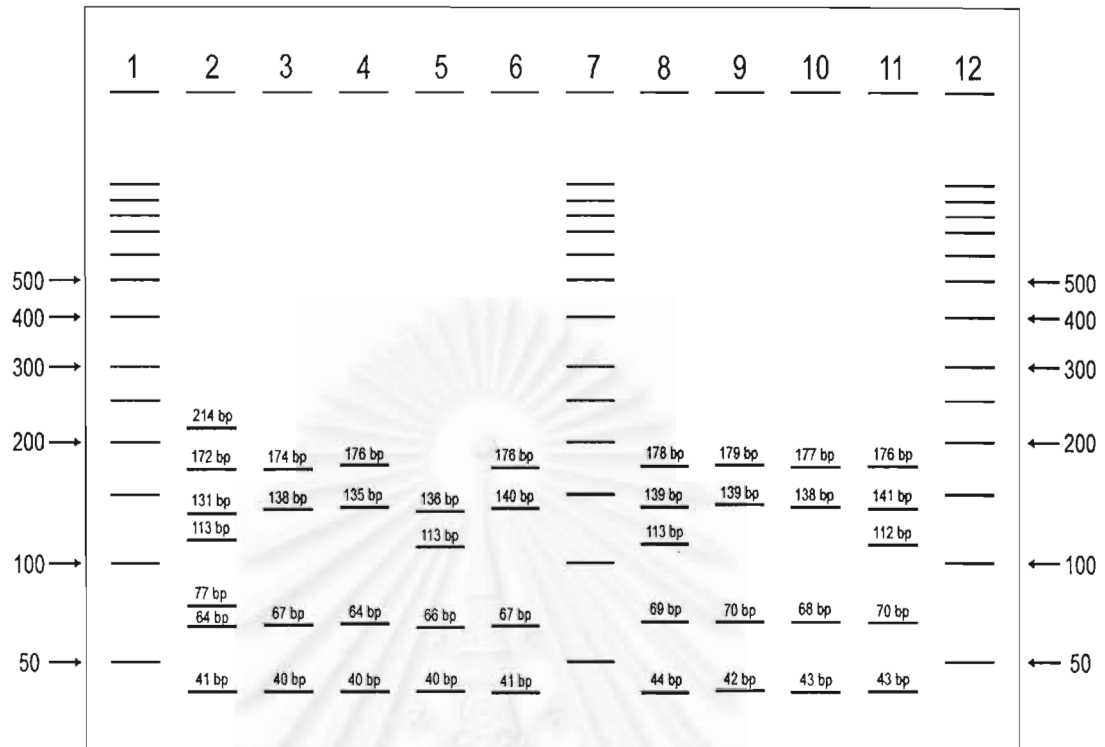
การทำ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

เมื่อตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *MspI* จะได้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันดังภาพที่ 22 และภาพที่ 24 ตามลำดับ และเมื่อตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI* และ *MspI* จะได้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันเช่นกัน ดังภาพที่ 26 และภาพที่ 28



ภาพที่ 22 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

- lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)
- lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)
- lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)
- lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)
- lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)
- lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)
- lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)
- lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)
- lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)
- lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 23 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)

lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)

lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)

lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)

lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)

lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

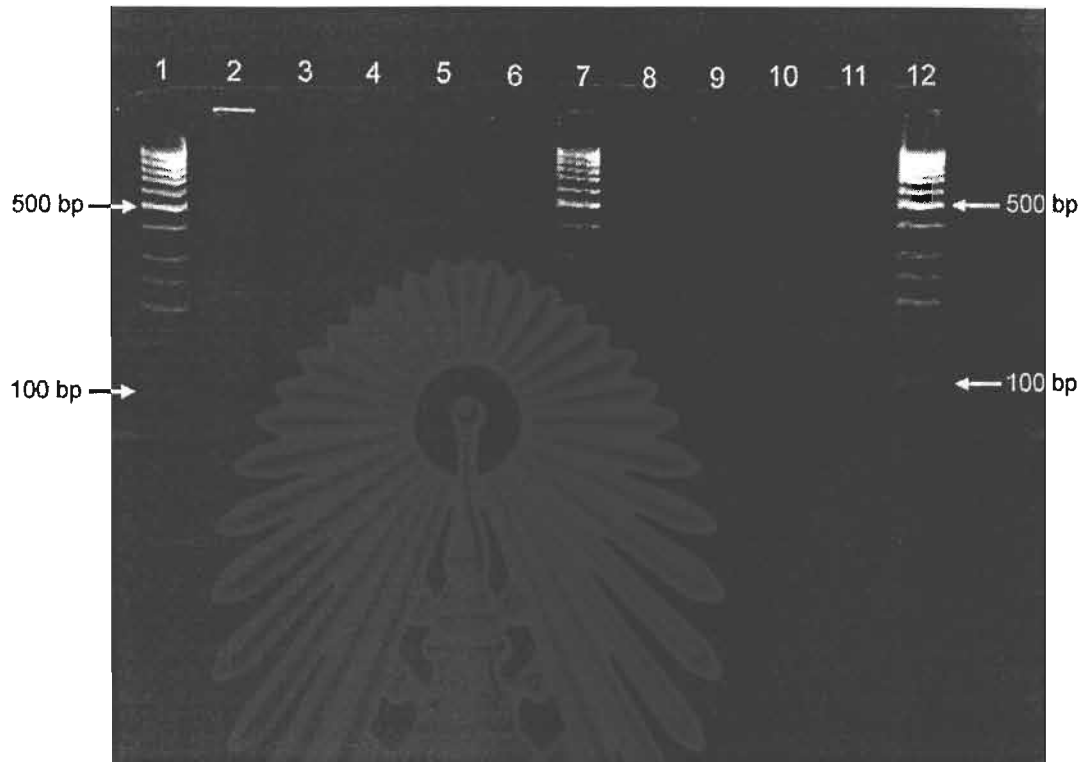
lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)

lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)

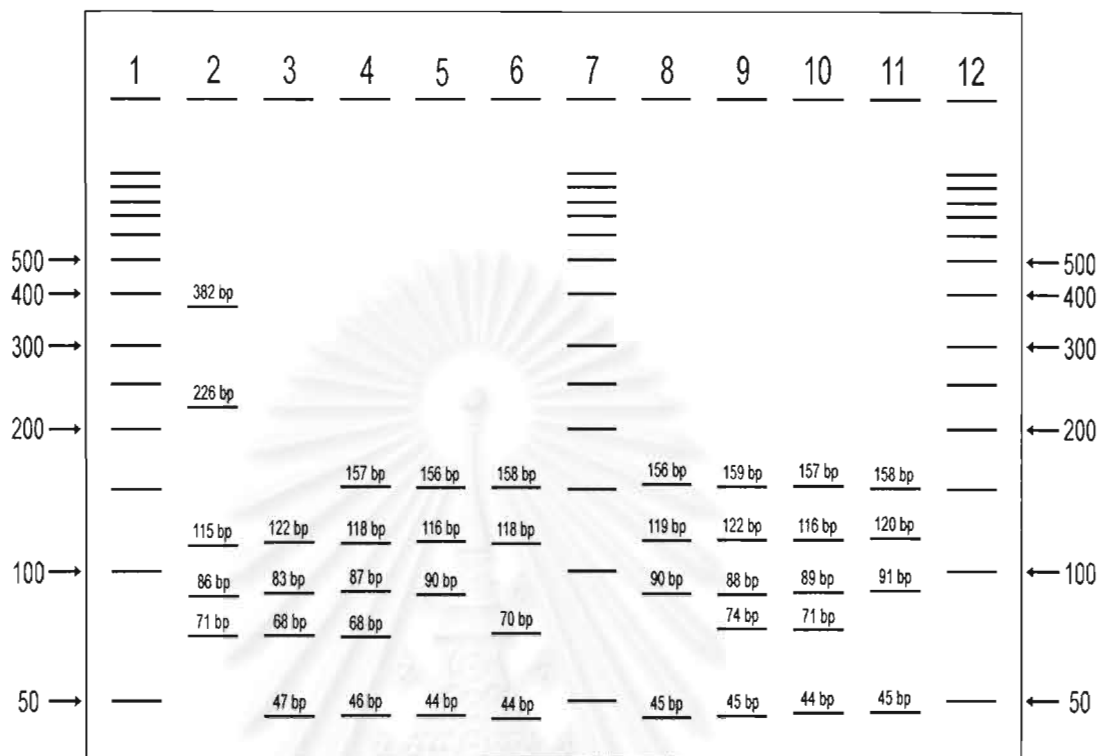
lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)

lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 24 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

- lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)
- lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)
- lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)
- lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)
- lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)
- lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)
- lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)
- lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)
- lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)
- lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 25 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)

lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)

lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)

lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)

lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)

lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

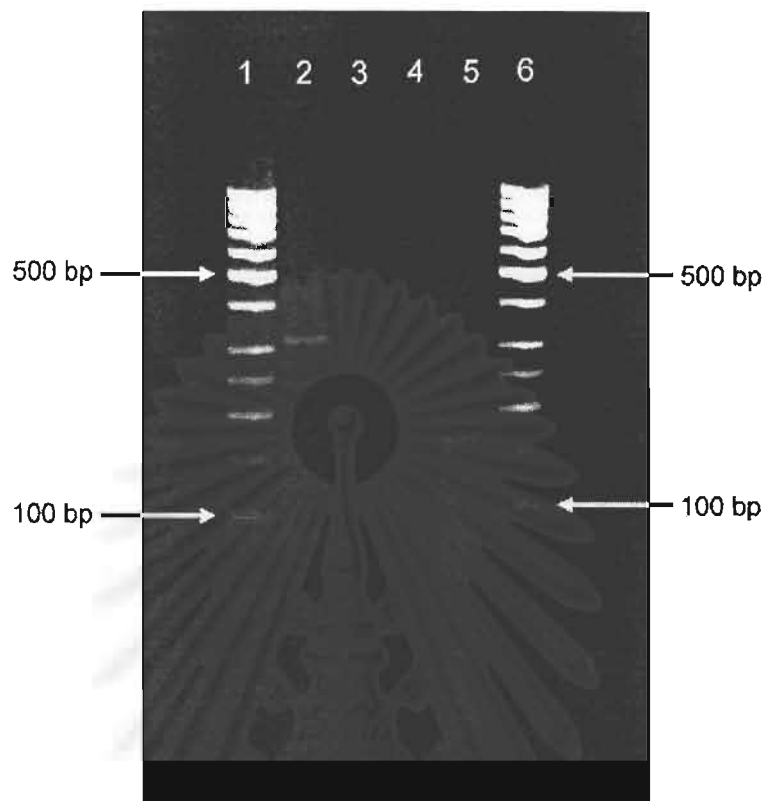
lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)

lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)

lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)

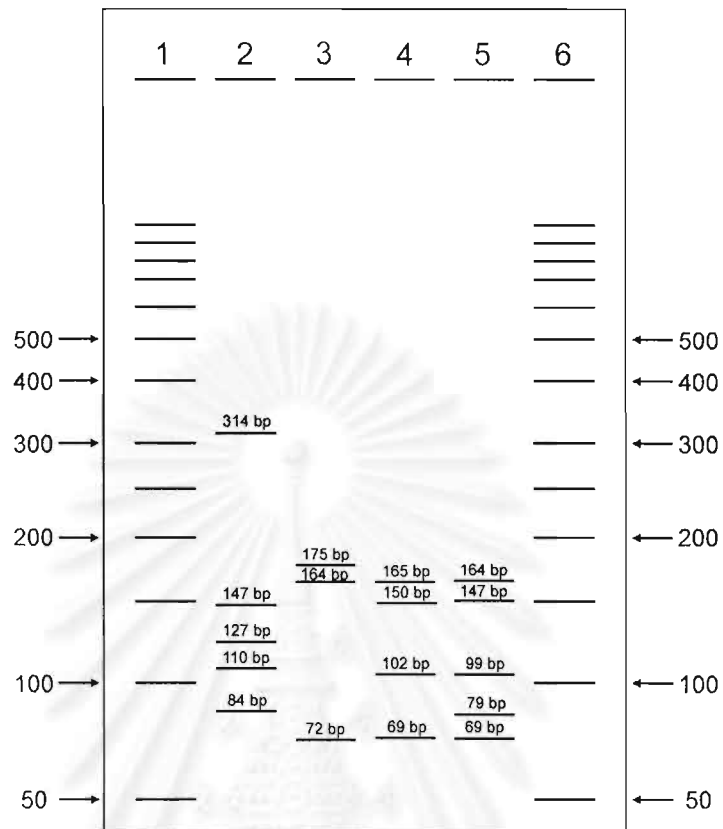
lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 26 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

- lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)
- lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)
- lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)
- lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)
- lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 27 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

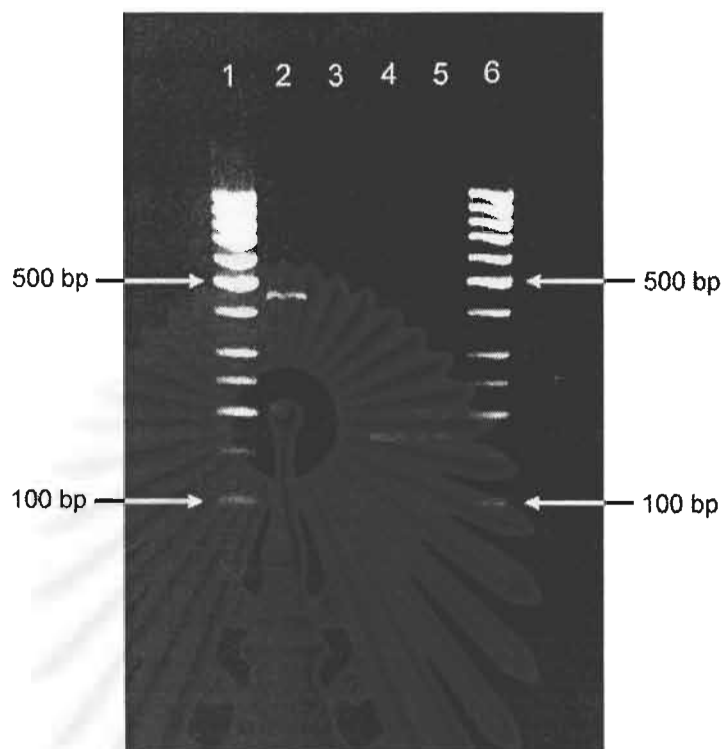
lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 28 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

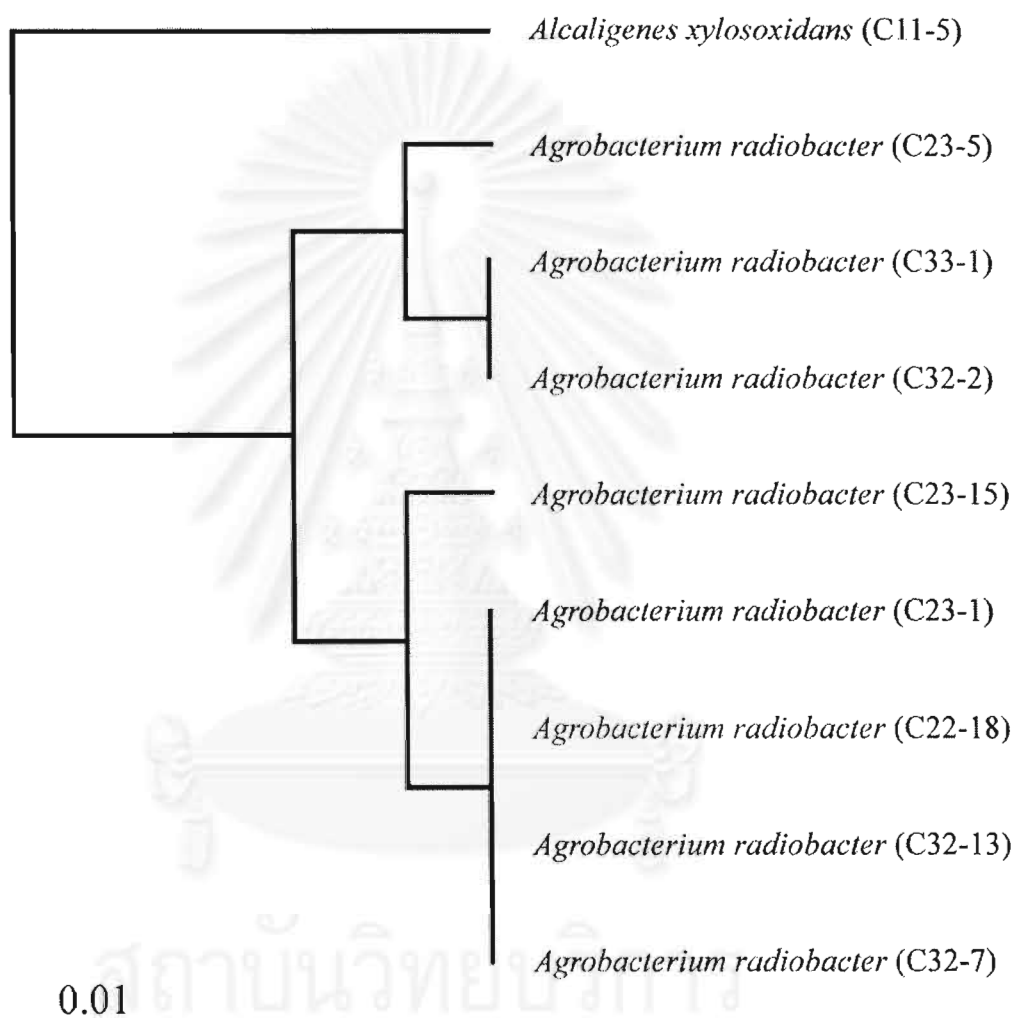
lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

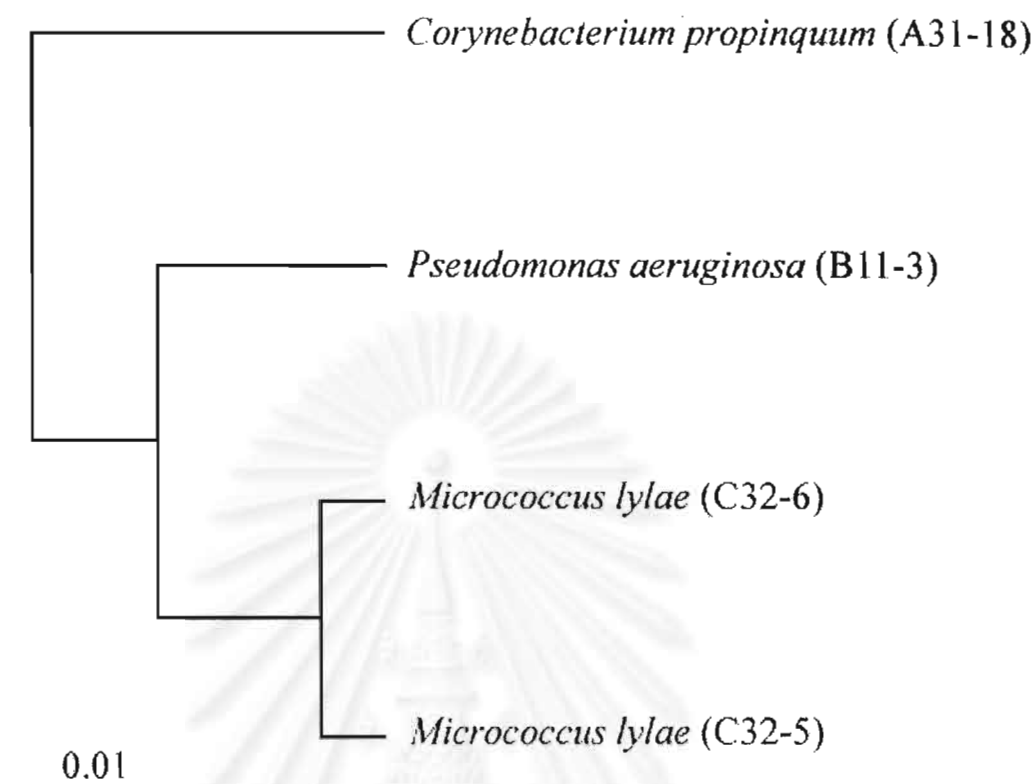
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ผล RFLP

เมื่อนำรูปแบบการตัดเอนไซม์ของยีน *nirK* และ *nirS* ในข้อ 3 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip Version 3.6 beta โดยใช้สมการของ Nei และ Li (1979) จะสามารถสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม TreeView (win32) Version 1.6.6 ได้ดังภาพที่ 29 และภาพที่ 30 ตามลำดับ



ภาพที่ 29 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirK*



ภาพที่ 30 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirS*

จากภาพที่ 29 และภาพที่ 30 สามารถแบ่งแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน *nirK* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* ซึ่งสามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีก 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-5) กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C33-1) และ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2) กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-15) และกลุ่มย่อยที่ 4 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-1) *Agrobacterium radiobacter* (C22-18) *Agrobacterium radiobacter* (C32-13) และ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

ส่วนแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน *nirS* สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Corynebacterium propinquum* (A31-18) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3) ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Micrococcus lylae* (C 32-5) และ *Micrococcus lylae* (C32-6)

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

ยีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงไนเตรตมีหลายยีน การวิจัยนี้สนใจการตรวจสอบยีน *nirK* และ *nirS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสที่สำคัญ 2 ชนิด เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญยิ่งต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน จึงมีความสนใจในการตรวจสอบยีนทั้งสองและความหลากหลายของยีนทั้งสองนี้ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่พบในพื้นที่ วิธีการที่ใช้คือการศึกษา RFLP ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* พบแถบดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายของทั้ง 2 ยีน คือ 514 bp และ 890 bp ตามลำดับ ผลการศึกษาพบยีน *nirK* ในแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต คือ *Acaligenes xylosoxydans* (C11-5) และ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18, C23-1, C23-5, C23-15, C32-2, C32-7, C32-13 และ C33-1) และยีน *nirS* ในแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-4), *Corynebacterium propinquum* (A31-18) และ *Micrococcus lylae* (C32-5 และ C32-6) ส่วนอีก 3 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (C22-5), *Burkholderia cepacia* (C22-14) และ *Pseudomonas stutzeri* (C22-24) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายได้ ซึ่งอาจเกิดจากการโค้งงอของดีเอ็นเอเป้าหมายกลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับได้ ซึ่งได้ตรงกับการทดลองวิจัยในเรื่องเดียวกับของเชื้อในกลุ่มนี้บางชนิดโดย Hallin และ Lindgren (1999) ดังนั้นเชื้อทั้งสามไอโซเลตจึงยังไม่มีข้อสรุปรายละเอียดแน่นอนว่ายีนที่เกี่ยวข้องของกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นยีน *nir* เดียวกันหรือไม่ จึงควรศึกษามากขึ้นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ต่อไป เพื่อศึกษาลึกลงไปถึงขนาดและความแตกต่างของลำดับเบสของยีนนี้ในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์ทั้งหมด

ในแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้พบว่ามียีน *nir* เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ไม่พบว่ามีทั้งสองยีนนี้อยู่พร้อมกัน อย่างไรก็ตาม Hallin และ Lindgren (1999) ได้รายงานการพบยีน *nirK* ใน *Paracoccus denitrificans* สายพันธุ์ PD1222 ซึ่ง de Boer *et al.*, 1994 ได้เคยรายงานไว้ว่าพบยีน *nirS* ด้วย และไม่เคยมีการรายงานการพบยีน *nirK* ในสายพันธุ์นี้มาก่อน แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะพบยีนทั้งคู่อยู่ในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันได้เช่นกัน ในการวิจัยนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific band) เกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนทั้งคู่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสกุลหรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกัน การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้เพิ่มปริมาณยีน *nir* ของดีไนทริฟายเออร์แบคทีเรียได้ทุกตัวจึงเป็นไปได้ (Hallin และ Lindgren, 1999) การสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ให้สามารถใช้ได้ในวงกว้าง (broad-range primer) ทำได้ยากกว่าการสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *nirK* (Ward *et al.*, 1993)

ผลการวิเคราะห์ RFLP สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มียีน *nirK* ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Alcaligenes xylosoxydans* และ *Agrobacterium radiobacter* ในส่วนของ *Agrobacterium radiobacter* สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย แสดงให้เห็นว่ายีน *nirK* มีความแปรปรวนทั้งในระดับสกุล และสปีชีส์ (ภาพที่ 26) ส่วนการจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่มียีน *nirS* พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามสกุล (ภาพที่ 27) และพบว่าในสปีชีส์

เดียวกันก็มีความแปรปรวนของยีนนี้เช่นเดียวกับยีน *nirK* ซึ่งผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับที่ Braker *et al.*, 2000 ได้ทำการศึกษายีน *nirK* และ *nirS* ในดินในทวีปเอเชียแบคทีเรียจากบริเวณนอกชายฝั่งมลรัฐวอชิงตันและพุกเกตชาวด์

มลรัฐวอชิงตัน ในเรื่องความแปรปรวนของยีนทั้งคู่ภายในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ RFLP ของยีน *nirK* และ *nirS* ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมีในระดับสกุลด้วย กล่าวคือแบคทีเรียที่ได้จัดจำแนกศึกษาชนิดจากคุณสมบัติทางชีวเคมีและรูปร่างสปอร์ด้วยวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ตรงกับการจัดกลุ่มความใกล้เคียงจากแผนแบบแผนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลของแบบแผน อาร์ เอฟ แอล พี ของเฉพาะยีน *nirK* และ *nirS* ดังแสดงในรูปที่ 26 และ 27



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R พบแถบดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายของทั้ง 2 ยีน คือ 514 bp และ 890 bp ตามลำดับ ผลการศึกษาพบยีน *nirK* ในแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต คือ *Acaligenes xylosoxydans* (C11-5) และ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18, C23-1, C23-5, C23-15, C32-2, C32-7, C32-13 และ C33-1) และยีน *nirS* ในแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-4), *Corynebacterium propinquum* (A31-18) และ *Micrococcus lylae* (C32-5 และ C32-6) ส่วนอีก 3 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (C22-5), *Burkholderia cepacia* (C22-14) และ *Pseudomonas stutzeri* (C22-24) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายได้

ในแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้พบว่ามียีน *nir* เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ไม่พบว่ามีทั้งสองยีนนี้อยู่พร้อมกัน ในการวิจัยนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific band) เกิดขึ้นด้วย

ผลการวิเคราะห์ RFLP สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มียีน *nirK* ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Alcaligenes xylosoxydans* และ *Agrobacterium radiobacter* ในส่วนของ *Agrobacterium radiobacter* สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย สำหรับการจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่มียีน *nirS* พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามสกุล นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ RFLP ของยีน *nirK* และ *nirS* ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมีในระดับสกุลด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เจษฎา โพธิ์รัตน์. 2541. การคัดเลือกเชื้อดีในตรีฟองค์แบคทีเรีย เพื่อลดไนเตรดในน้ำ. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติกร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสไตร์.
- ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2544. การกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2536. จุลชีววิทยา ปฏิบัติกร. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โยธิน สุริยพงศ์. 2542. โครงการตำราวิชาการราชภัฏเฉลิมพระเกียรติ เนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมพรรษา 6 รอบ: พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อม. นครราชสีมา: โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครราชสีมา.
- โรงงานอุตสาหกรรม, กรม. 2545. ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.
- สมศักดิ์ วังโน. 2524. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุธีลา ตูลยะเสถียร, โกศล วงศ์สุวรรณ และ สกิต วงศ์สุวรรณ. 2544. มลพิษสิ่งแวดล้อม (ปัญหาสังคมไทย). กรุงเทพมหานคร: รวมสาส์น(1977).

ภาษาอังกฤษ

- Alexander, M. 1997. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. 1996. Current protocols in molecular biology. 3 Vols. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Beishir, L. 1996. Microbiology in practice: A self-instructional laboratory course. 6th ed. New York: HarperCollins College Publishers.
- Bitton, G. 1999. Wastewater microbiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Braker, G., Fesefeldt, A., and Witzel, K.-P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3769-3775
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., and Tiedje, J. M. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2096-2104
- Delwiche, C. C. 1981. Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Casciotti, K. L., and Ward, B. B. 2001. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2213-2221
- Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P., and Witebsky, F. G. 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of amplified portion of the 16s rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 38: 158-164
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., and Tiedje, J. M. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd*, and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2924-2931
- Finegold, S. M., Martin, W. J., and Scott, E. G. 1978. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 5th ed. Saint Louis: Mosby.
- Glockner, A. B., Jüngst, A., and Zumft, W. G. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd*₁-free background (*NirS*) of *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 160: 18-26 Cited in Hallin, S., and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657
- Grüntzig, V., Nold, S. C., Zhou, J., and Tiedje, J. M. 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67: 760-768

- Hall, J. B. 1978. Nitrate-reducing bacteria. pp. 296-298. Cited in Schlessinger, D., ed. 1978. Microbiology. USA: American society for microbiology
- Hallin, S., and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657
- van Hartingsveldt, J., and Stouthamer, A. H. 1973. Mapping and characterization of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* affected in nitrate respiration in aerobic or anaerobic growth. J. Gen. Microbiol. 74: 97-106 Cited in Vollack, K.-U., Xie, J., Härtig, E., Römling, U. and Zumft, W. G. 1998. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 144: 441-448
- Jayakumar, D. A., Francis, C.A., Naqvi, S. W. A., and Ward, B.B. 2004. Diversity of nitrite reductase genes (*nirS*) in the denitrifying water column of the coastal Arabian sea. Aquatic Microbial Ecology. 34: 69-78.
- Jeter, R. M., Sias, S.R., and Ingraham, J. L. 1984. Chromosomal location and function of genes affecting *Pseudomonas aeruginosa* nitrate assimilation. J. Bacteriol. 157: 673-677
- Kobayashi, M., and Shoun, H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. J. Biol. Chem. 270: 4146-4151
- Michotey, V., Méjean, V., and Bonin, P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd₁*-denitrifying bacteria in environmental marine samples. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1564-1571
- Nei, M., and Li, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.
- van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H. F., Vos, M. C., Tümmeler, B., Segonds, C., Reubsæet, F., Verbrugh, H., and van Belkum, A. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: Comparison of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol. 37: 2158-2164
- Philippot, L., Mirleau, P., Mazurier, S., Siblot, S., Hartmann, A., Lemanceau, P., and Germon, J. C. 2001. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes. Biochim. Biophys. Acta. 1517: 436-440
- Priemé A., Braker, G., and Tiedje, J. M. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragment in forested upland and wetland soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1893-1900
- Schwintner, C., Sabaty, M., Berna, B., Cahors, S., and Richaud, P. 1998. Plasmid content and localization of the genes encoding the denitrification enzymes in two strains of *Rhodobacter sphaeroides*. FEMS Microbiol. Lett. 165: 313-321

- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N. and Matsuo, M. 1998. Denitrification by Actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. J. Bacteriol. 180: 4413-4415
- Sias, S. R., Stouthamer, A. S., and Ingraham, J. L. 1980. The assimilatory and dissimilatory nitrate reductase of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes. J. Gen. Microbiol. 118: 229-234. Cited in Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. 2nd ed. USA: Wiley-Liss, Inc.
- Smith, G. B., and Tiedje, J. M. 1992. Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as probe for denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 376-384
- Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. pp. 179-244. In: Zehnder, A. J. B. ed. Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & sons, New York. Cited in Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Taroncher-Oldenburg, G. 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1159-1171
- Ward, B. B., Cockcroft, A. R., and Kilpatrick, K. A. 1993. Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater. J. Gen. Microbiol. 139: 2285-2293.
- Wistreich, G. A., and Lechtman, M. D. 1988. Laboratory exercises in microbiology. 6th ed. New York: Macmillan Publishing Company.
- Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes, p. 554-582. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. ed. The Prokaryotes. New York: Springer Verlag. Cited in Hallin, S. and Lindgren, P.-E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1652-1657
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (Difco)

Nutrient broth	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

สารที่ใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

Tris-Cl (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), 1 M

ละลาย Tris base 121 กรัม ลงในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย HCl แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 M (pH 8.0)

ละลาย EDTA 186.1 กรัม ลงในน้ำ 700 มิลลิลิตร ตั้งบนบน magnetic stirrer ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Tris / EDTA buffer (TE buffer)

10 mM Tris-Cl : pH 8.0	10.0	มิลลิลิตร
1 mM EDTA : pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 100 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.2 ด้วย HCl เข้มข้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Proteinase K, 20 mg/ml

ละลาย proteinase K 20 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

NaCl, 5 N

ละลาย NaCl 292.215 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร นำไปหนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

CTAB/NaCl solution (10% CTAB in 0.7 M NaCl)

ละลาย NaCl 4.1 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร และเติม CTAB 10 กรัม อย่างช้าๆ พร้อมกับให้ความร้อน และคนให้ละลาย ถ้าจำเป็นให้อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

5x TBE buffer (Stock solution)

Tris-base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

5x loading buffer (BJ II)

Sucrose	6.2	กรัม
0.5 M EDTA	1.0	มิลลิลิตร
0.05% Bromphenol blue		
น้ำกลั่น	9.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันดี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

Ethidium bromide, 10 mg/ml (Stock solution)

ละลาย ethidium bromide 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Bovine serum albumin, 20 mg/ml

ละลาย bovine serum albumin 20 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ไพรเมอร์ (Primer) (Braker และคณะ, 1998)

Primer	Position	Primer sequence (5'-3')
nirK1F	526-542	GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA
nirK5R	1023-1040	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG
nirS1F	763-780	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T
nirS6R	1638-1653	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) (Promega)

MspI

Description	C [↓] CGG
	G G C C
Storage Condition	Store at -20 °C
Storage Buffer	10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.
Incubation Condition	Buffer B. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
75-100%	100%	75-100%	25-50%	25-50%

HhaI

Description	G CG [↓] C
	C [↑] GC G
Storage Condition	Store at -20 °C
Storage Buffer	10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.
Incubation Condition	Buffer C. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
50-75%	75-100%	100%	50-75%	75-100%

HaeIII

Description	GG [↓] CC
	CC [↑] GG
Storage Condition	Store at -20 °C
Storage Buffer	10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.
Incubation Condition	Buffer C. 37 °C

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	MULTI-CORE™
75-100%	75-100%	100%	50-75%	75-100%



QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)

ตัด gel บริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดที่สะอาดและคม ใส่ลงใน microtube เติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนัก gel (100 mg ~ 100 μ l) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่ง gel ละลายหมด เพื่อช่วยให้ gel ละลายดีขึ้น ให้ผสมโดยใช้ vortex ทุกๆ 2-3 นาที ตรวจสอบสีของสารละลายว่าเป็นสีเหลืองเหมือนสีของบัฟเฟอร์หรือไม่ ถ้าสีเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีม่วง แสดงว่า pH สูงขึ้น ให้เติม 3 M Sodium acetate pH 5.0 ปริมาตร 100 μ l ลงไป แล้วผสมให้เข้ากัน สีของสารละลายจะกลับมาเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนัก gel ลงไปใน microtube ผสมให้เข้ากัน แต่ห้ามปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แล้วใส่ตัวอย่างลงใน QIAquick column โดยปริมาตรของตัวอย่างจะต้องไม่เกิน 800 μ l (ถ้าเกินให้ทำ 2 รอบ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ membrane ที่ส่วนที่ผ่าน column ลงมา แล้วเติม QG buffer อีก 0.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เพื่อกำจัด agarose gel ออกให้หมด เติม PE buffer ปริมาตร 0.75 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง DNA ให้สะอาด ที่ส่วนที่ผ่าน column ลงมา แล้วปั่นเหวี่ยง column เปล่าๆ อีก 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่าน column ลงมา นำ column วางลงใน microtube ขนาด 1.5 ml ที่สะอาด เติม EB buffer ปริมาตร 25 μ l ลงตรงกลางของ membrane ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงมาสู่ microtube แล้วเก็บดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส