175512

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

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

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....	ลายมือชื่อนิสิต.....เก็จกาญจน์ สมาธิวุฒิคุณ.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2546	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372216523 : MAJOR GENETICS **175512**

KEY WORD : DENITRIFICATION / NITRITE REDUCTASE GENE / PHYLOGENETIC RELATIONSHIP

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

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

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

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

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

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