ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47317

ผลกระทบของการจัดการพื้นที่ต่อความหลากหลายของแมลงที่เรียในดิน ที่อำเภอหนองมาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

นางสาวอารยา คนธิคามี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00254803

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47317

ผลกระทบของการจัดการพื้นที่ต่อความหลากหลายของแบคทีเรียในดิน ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

นางสาวอารยา คนธิคามี

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872551123

IMPACT OF LAND MANAGEMENT ON SOIL BACTERIAL DIVERSITY AT THONGPHAPHUM DISTRICT, KANCHANABURI PROVINCE

Miss Araya Konthikamee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	IMPACT OF LAND MANAGEMENT ON SOIL BACTERIAL DIVERSITY AT THONGPHAPHUM DISTRICT, KANCHANABURI PROVINCE
By	Miss Araya Konthikamee
Field of Study	Zoology
Thesis Advisor	Nipada Ruankaew Disyatat, Ph.D
Thesis Co-advisor	Supawin Watcharamul, Ph.D

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Art-ong Pradatsundarasar, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Nipada Ruankaew Disyatat, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Supawin Watcharamul, Ph.D.)

..... Member
(Chatchawan Chaisuekul, Ph.D.)

อารยา คนธิคามี : ผลกระทบของการจัดการพื้นที่ต่อความหลากหลายของแบคทีเรียในดิน ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. (IMPACT OF LAND MANAGEMENT ON SOIL BACTERIAL DIVERSITY AT THONGPHAPHUM DISTRICT, KANCHANABURI PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร. นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. ศุภวิน วัชรมูล. 159 หน้า.

E 47317

จากการศึกษาผลกระทบของการจัดการพื้นที่ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี โดยเลือกศึกษาพื้นที่ในบริเวณใกล้กัน ที่มีการจัดการแตกต่างกัน 3 แบบ คือ พื้นที่เกษตรอินทรีย์ พื้นที่เกษตรที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช และพื้นที่ป่าธรรมชาติ โดยศึกษาปัจจัยต่างๆของดินและความหลากหลายทางชนิดของแบคทีเรียในดิน จากการวิเคราะห์ปัจจัยกายภาพของดินพบว่า ความชื้น ค่าความเป็นกรดด่างของดิน และธาตุอาหารในดิน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพื้นที่ศึกษา ซึ่งสรุปได้ว่าเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการจัดการของพื้นที่ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาโครงสร้างสังคมชีวิตของแบคทีเรียด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อ โดยเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมด (CFU) และนำค่าจำนวนโคโลนีมาคำนวณหาค่า Ecophysiological Index (EPI) เพื่อใช้เปรียบเทียบการกระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจำนวนโคโลนีทั้งหมดและค่า EPI ในแต่ละพื้นที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคโลนีทั้งหมดกับค่าปัจจัยทางกายภาพของดิน พบว่าจำนวนโคโลนีจะมีค่าสูงเมื่อธาตุอาหาร ในดินมีค่าสูงด้วย และทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา เริ่มจากการ สกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และทำการโคลน ต่อจากนั้นนำไปหาลำดับเบสบางส่วน เพื่อนำ มาวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic analysis) ซึ่งแบคทีเรียส่วนมากที่พบจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (unculturable) (57.14%) และพบแบคทีเรียกลุ่มหลัก ได้แก่ *Alpha* (8.57%), *Beta* (2.86%), และ *Gamma* (7.14%) *Proteobacteria*, *Firmicutes* (12.86%), *Actinobacteria* (8.57%), *Bacteriodes* (1.43%), และ *Planctomycetes* (1.43%) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า แบคทีเรียที่พบมีความหลากหลายสูงและแตกต่างจาก ที่เคยมีการศึกษามาก่อน ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างระหว่างสังคมชีวิตของแบคทีเรียในพื้นที่ที่มีการจัดการแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างทางด้านชนิดของแบคทีเรีย นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับการจัดการพื้นที่ที่แตกต่างกันยังมีปัจจัยอื่นอีกมากมายที่เกี่ยวข้อง เช่นสารเคมีตกค้างในพื้นที่ ซึ่งควรทำการศึกษาระยะยาวต่อไป เพื่อจะบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงที่มาจากผลกระทบของการจัดการพื้นที่อย่างแท้จริง

ภาควิชา	ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....อารยา คนธิคามี.....
สาขาวิชา	สัตววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ศุภวิน วัชรมูล.....

4872551123 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: bacterial diversity / PCR / cloning / sequencing / 16S rDNA / soil

ARAYA KONTHIKAMEE : IMPACT OF LAND MANAGEMENT ON SOIL BACTERIAL DIVERSITY AT THONGPHAPHUM DISTRICT, KANCHANABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR : NIPADA RUANKAEW DISYATAT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : SUPAWIN WATCHARAMUL, Ph.D., 159 pp.

E 47317

Variations in soil properties and bacterial diversity in soil samples were noted for different land management, namely a chemically-intensive farm, an organic farm, and a forest at Thongphaphum District, Kanchanaburi Province. Significant differences in soil physical factors (soil moisture and pH) and nutrients (organic matter, organic carbon, total nitrogen, and available phosphorus contents) were found in sampling sites. Soil texture among three sites was classified as sandy loam. Forest had significantly higher organic matter and nutrient content than other sites. The analysis of soil bacterial community structure showed that the bacterial communities obtained from soils in 3 different sites were dominated by the *r*-strategist bacteria. No significant difference was found in bacterial numbers in both between sites and seasons, however, the colony forming unit (CFU) values were positively correlated with soil pH and soil nutrients. Ecophysiological index (EPI) values were not significantly different between sites and seasons. Despite no change in numbers of bacteria and EPI, there may be changes in bacterial function relating to land management. Finally, impacts of land management on bacterial diversity were analyzed. Total soil DNA were isolated from soil collected from 3 sites. The 16S rDNA was amplified with universal bacterial primers and cloned into plasmid vectors. Seventy clones were obtained. Phylogenetic analysis based on partial sequences (~379 bp) established with the neighbor-joining method and bootstrapped at 1,000 replications revealed the presence of major and minor groups that fell into several of the established lines of bacteria. Most of the clones belonged to the unidentified uncultured bacteria (57.14%) Moreover, *Alpha* (8.57%), *Beta* (2.86%), and *Gamma* (7.14%) *Proteobacteria*, *Firmicutes* (12.86%), *Actinobacteria* (8.57%), *Bacteriodes* (1.43%), and *Planctomycetes* (1.43%) were also found in this study. The majority of the clones (62.86%) had sequences that were 1-15% different from those current databases and 14.29% of the clones differed by more than 15% in sequence from the database. The results suggest that these Thongphaphum-derived clones are very diverse in phylogeny, and that many probably reflect new genera or families. From the results of bacterial diversity, different land management could affect the bacterial diversity because there were large numbers of unique phylotypes in each site. Although there was no significant difference between bacterial community structures among sites, it does not mean the land management practices have no impact to bacterial diversity. Furthermore, impacts of land management are also related to other factors, such as chemicals remaining in the area; and long-term studies should be implemented to examine absolute changes caused by land management.

Department .....Biology..... Student's signature..... Araya Konthikamee

Field of study.....Zoology..... Advisor's signature.....

Academic year.....2007..... Co-advisor's signature..... Supawin Watcharamul

ACKNOWLEDGEMENTS

I am truly grateful to my advisor, Dr. Nipada Ruankaew Disyatat, for her encouragement, valuable guidance, suggestions and supports throughout my study. Together with this, I am grateful to my co-advisor, Dr. Supawin Watcharamul, for his advice and provision of materials for this study. Special thanks are also extended to the thesis committee, Assistant Professor Dr. Art-ong Pradatsundarasar and Dr. Chatchawan Chaisuekul, for their valuable discussion and suggestions.

Many thanks are expressed to all teachers and friends at the Department of Biology for their friendly assistance, especially Assistant Professor Dr. Orawan Satayalai, Assistant Professor Dr. Sureerat Deowanish, and Ms. Tipwan Suppasat for their kind assistance at giving information and providing essential chemicals and instruments for this thesis. The Department of General Science is also acknowledged for providing instruments for molecular analysis

I wish to extend my sincere gratitude to Ms. Sucheera Insuan for her inspiration, great support and encouragement throughout the entire study. I also thank Ms. Wachiraporn Phoonan for her great assistance.

In addition, appreciation is also extended to the Graduate School of Chulalongkorn University and Biodiversity Research and Training Program (BRT T_150017) for granting partial financial support to conduct this research. This thesis was also supported by the Thai government budget 2007, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_M_33_2007).

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI	iv
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	**1**
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	**4**
2.1 Soil	4
2.2 Soil bacteria	5
2.3 Soil bacteria in relation to the soil properties	8
2.4 Assessment of soil bacterial diversity	10
2.5 The use of 16S rDNA to estimate bacterial diversity	18
2.6 Phylogenetic analysis of soil bacterial diversity	19
2.7 Molecular bacterial diversity of soil samples	20
2.8 Bacterial diversity in agroecosystems and land management	23
CHAPTER III GENERAL MATERIALS AND METHODS	**27**
3.1 Study site description	27

Page

3.2 Soil sampling and collection 32

CHAPTER IV SOIL ANALYSIS **33**

4.1 Introduction 33

4.2 Material and methods..... 34

4.3 Results and discussion..... 43

4.3.1 Soil physical factors 43

4.3.2 Soil nutrients 47

4.3.3 Impacts of land management on soil physical factors and soil nutrients 51

4.3.4 Seasonal differences in soil physical factors and soil nutrients. 53

4.4 Conclusion..... 55

CHAPTER V BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE: CULTURE-DEPENDENT STUDY **56**

5.1 Introduction 56

5.2 Material and methods..... 57

5.3 Results and discussion..... 58

5.3.1 Soil bacterial counts 58

5.3.2 Soil bacterial community structure 60

5.4 Conclusion..... 65

Page

CHAPTER VI MOLECULAR ANALYSIS OF SOIL BACTERIAL DIVERSITY **66**

6.1 Introduction 66

6.2 Material and methods..... 68

6.3 Results and discussion..... 72

6.3.1 Soil DNA extraction 72

6.3.2 Optimization of PCR conditions 75

6.3.3 Impact of land management on soil bacterial diversity..... 78

6.4 Conclusion 91

CHAPTER VII CONCLUSIONS..... **98**

REFERENCES..... **101**

APPENDICES..... **129**

VITAE **159**

LIST OF TABLES

Page

Table 4.1 Soil physical factors, presented as average ± standard deviation (n=6), for each study site in dry season. Different letters indicate significant differences (ANOVA, $p<0.05$) among averages..... 46

Table 4.2 Soil physical factors, presented as average ± standard deviation (n=6), for each study site in wet season. Different letters indicate significant differences (ANOVA, $p<0.05$) among averages..... 46

Table 4.3 Soil nutrients presented as average ± standard deviation (n=6) for each study site in dry season Different letters indicate significant differences (ANOVA, $p<0.05$) among averages..... 50

Table 4.4 Soil nutrients, presented as average ± standard deviation (n=6), for each study site in wet season. Different letters indicate significant differences (ANOVA, $p<0.05$) among averages..... 50

Table 6.1 Diversity of the chemically-intensive farm soil 16S rDNA clones and sequences in dry season..... 83

Table 6.2 Diversity of the chemically-intensive farm soil 16S rDNA clones and sequences in wet season..... 84

Table 6.3 Diversity of the organic farm soil 16S rDNA clones and sequences in dry season..... 85

Table 6.4 Diversity of the organic farm soil 16S rDNA clones and sequences in wet season..... 86

Table 6.5 Diversity of the forest soil 16S rDNA clones and sequences in dry season..... 87

Page

Table 6.6 Diversity of the forest soil 16S rDNA clones and sequences in wet season..... 88

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 3.1	Map of Thailand showing the location of Thongphaphum District, Kanchanaburi Province.....	28
Figure 3.2	The organic farming, Vimandin farm.....	30
Figure 3.3	Chemically-intensive farming, Durian orchard.....	31
Figure 3.4	The forest, Thongphaphum National park study site.....	31
Figure 4.1	Chart showing the percentages of clay, silt, and sand in the basic textural classes.....	38
Figure 4.2	Soil temperature in each study site and season.....	43
Figure 4.3	Soil moisture content in each study site and season.....	44
Figure 4.4	Soil pH in each study site and season.....	45
Figure 4.5	Soil water-holding capacity in each study site and season.....	45
Figure 4.6	Soil organic carbon in each study site and season.....	47
Figure 4.7	Soil organic matter in each study site and season.....	48
Figure 4.8	Total soil nitrogen in each study site and season.....	48
Figure 4.9	Available phosphorus in soil in each study site and season.....	49
Figure 4.10	C/N ratio in each study site and season.....	49
Figure 5.1	Comparison of colony forming unit (CFU) counts of soil bacterial populations from different sites, grown on nutrient agar plate, presented as average ± standard error (n=6).....	59
Figure 5.2	Bacterial community structures of soil bacteria from 3 sites in the dry season (A) and wet season (B). Data derived from bacterial colonies appearing on NA over a period of 10 days. (n=6) Each point and error bar represents the averages ± SE.....	62

Page

Figure 5.3 Comparison of ecophysiological index (EPI) values of soil bacterial populations from different sites, grown on nutrient agar plate, presented as average ± standard error (n=6)..... 63

Figure 6.1 Gel electrophoresis of high molecular weight total DNA extracted from soil samples and subjected to 0.7% agarose gel electrophoresis at 100 V for 1 hour..... 74

Figure 6.2 Gel electrophoresis of 16S rDNA generated during PCR amplification of total DNA extracted from soil samples..... 77

Figure 6.3 Abundance of rDNA clones of different bacteria group. Phylogenetic distribution of 16S rRNA genes amplified from DNA extracted from 3 different soils..... 80

Figure 6.4 Neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences cloned showed the relationship of bacteria from 3 sites in dry and wet season... 94

Figure 6.5 Neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences cloned from chemically-intensive farm soil showed the relationship of bacteria from chemically-intensive farm in dry and wet season.. 95

Figure 6.6 Neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences cloned from forest soil showed the relationship of bacteria from forest in dry and wet season..... 96

Figure 6.7 Neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences cloned from organic farm soil showed the relationship of bacteria from organic farm in dry and wet season..... 97

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, C, G	nucleotide containing the base adenosine, thymine, cytosine and guanine, respectively
bp	base pair
°C	degree Celsius
CFU	colony forming unit
cm	centimeter
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	ecophysiological index
g	gram (s)
HCl	hydrochloric acid
Kb	Kilobase
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
SSU	small subunit
Tris	tris (hydroxyl methyl) aminomethane
UV	ultraviolet
V	volt

wt/vol	weight by volume
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar