รหัสโครงการ SUT3-304-38-24-09

รายงานการวิจัย

การพัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรียในดินโดยใช้เทคนิค ดีเอ็นเอ ติดตาม

Development of detection system for soil bacteria using DNA probe technique

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-38-24-09

รายงานการวิจัย

การพัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรียในดินโดยใช้เทคนิค ดีเอ็นเอ ติดตาม

Development of detection system for soil bacteria using DNA probe technique

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์.ดร.นันทกร บุญเกิด

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2538-2539

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2544

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง และเครื่องมือในการวิเคราะห์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณ คุณธัญวลี สุขสงวน ที่ช่วยดำเนินการวิจัย จนโครงการดำเนินการได้จนแล้วเสร็จ

บทคัดย่อ

การพัฒนาความรู้ทางอณูชีววิทยาได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ยากแก่การแยกเชื้อมาเพาะเลี้ยงให้ห้องทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินโดยตรง พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินด้วยวิธีที่ใช้ไลโซไซม์ และโปรทีเนส-เค ตามด้วยสารละลายด่าง สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณสูง ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีปริมาณ 4 ไมโครกรัมต่อกรัมดินนาข้าว (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งเมื่อใช้โปรทีเนส-เคจะให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ 82.34% การสกัดโดยวิธีนี้ใช้เวลาเพียง 5 ชั่วโมง โดยจากตัวอย่างที่มีสารประกอบอินทรีย์ในช่วง 0.73 ถึง 62.77% สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้จะปนเปื้อนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ได้ และสามารถกำจัดออกโดยอาศัย Agarose gel electrophoresis และ Sephacryl S-300 column chromotography จากนั้นทำการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ RISA primer จากการศึกษาผลของการยับยั้งสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับสารละลายดีเอ็นเอต่อการยับยั้งกระบวนการ PCR ผลพบว่าสารอินทรีย์ที่มีอยู่จะยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในกระบวนการ PCR ในระดับหนึ่งและยับยั้งมากขึ้นเมื่อมีในปริมาณที่มากขึ้น (5 ไมโครลิตร) ในการศึกษานี้ยังได้ใช้ RISA primer เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ทำการสกัดจากแหล่งดินต่าง ๆ อีกด้วย ในส่วนของประสิทธิภาพความไวในการตรวจสอบพบว่าเมื่อใช้ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ปลูกเชื้อลงไปในตัวอย่างดินต่าง ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำนวนของเซลล์เท่ากับ 1 , 10, 10^3, 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อกรัมของตัวอย่างที่มีปริมาณสารอินทรีย์ปนเปื้อน 0.73% (ดินร่วนปนทราย), 1.07% (ดินเหนียว), 3.38 (ดินทราย), 4.25% (ดินร่วน) และ 62.77% (พีท) ตามลำดับ

Abstract

The development of molecular biology is allowed scientists to realize that microbial populations in the natural environment are much more diverse than microorganisms, so far isolated in the laboratory. In this study, a rapid method for the direct extraction of DNA from soil was developed. The methodology was developed by using lysozyme and proteinase-K followed by alkali treatment. This approach provides relatively highest yield of DNA recovery. Purified DNA was 4 μg per gram soil (dry weight) sample collecting from rice field. This rapid procedure took at least 5 hours for completion. Extraction efficiency was evaluated based on percentage of bacterial survival. When applied proteinase-K in this extraction protocol the bacterial cell destruction efficiency was 82.34%. By using agarose gel electrophoresis followed by Sephacryl S-300 column chromatography able to separate organic matter and other enzyme inhibitors for extracted DNA in samples which contained high concentrations of organic matter (range between 0.73 to 62.77%). Then it was used as a template in order to determine the inhibitory effect on PCR condition. It was found that the inhibitory effect was increased when using higher amount of DNA template (more than 5 μl). Moreover, RISA primer was also used to demonstrate the DNA diversification patterns from various soil samples. To determine the detection limit or sensitivity of this system, various numbers of certain amounts of *Pseudomonas aeruginosa* were inoculated into sterilized soil samples prior to direct extraction from soil. It was found that the detection limits of this system were 1, 10, 10^3, 10^4, and 10^5 cells per gram soil (dry weight) that contained the amount of organic matter of 0.73% (loamy sand), 1.07% (clay), 3.38% (sand), 4.25% (sandy clay loam), and 62.77% (peat), respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญคำย่อ	ฌ
บทที่ 1. บทนำ	1
บทที่ 2. อุปกรณ์และวิธีการ	14
2.1 อุปกรณ์	14
2.1.1 ตัวอย่างดิน	14
2.1.2 สารเคมี	14
2.2 วิธีการ	16
2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการcell extraction	16
2.2.2 วิธีการ DNA direct extraction	17
2.2.3 Gel electrophoresis	21
2.2.4 ความสามารถในการสกัดแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน	21
2.2.5 การทำ DNA ให้บริสุทธิ์และการวัดปริมาณ	21
2.2.6 การทดสอบการยับยั้งกระบวนการ PCR โดยการใช้ rRNA intergenic spacer ในการวิเคราะห์	22
2.2.7 ข้อจำกัดในการตรวจสอบ	23
2.2.8 Southern hybridization analysis	23
2.2.9 การตรวจสอบโดยใช้ primer amplification อื่น	24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 25

3.1 การตรวจสอบลักษณะตัวอย่างดิน 25

3.2 การพัฒนาวิธีการสกัด DNA 26

3.3 การพัฒนาวิธีการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ 38

3.4 การยับยั้งผลของการปนเปื้อนของ DNA ในกระบวนการ PCR 41

3.5 การวิเคราะห์ ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ 45

3.6 ข้อจำกัดของการตรวจสอบ 48

3.7 การตรวจสอบโดยใช้ primer amplification อื่น 51

บทที่ 4. สรุปผลการทดลอง 53

บทที่ 5. เอกสารอ้างอิง 55

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

สารบัญภาพ

รูปภาพ		หน้า
2.1	ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ cell extraction methodology	17
2.2	ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบแรก	18
2.3	ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบที่สอง	19
2.4	ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบที่สาม	20
2.5	ขั้นตอนของวิธีการ purification methodology	25
3.1a	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากนาข้าวด้วยวิธีการ direct extraction procedure แบบที่หนึ่ง	27
3.1b	การสกัดดีเอ็นเอจากดินจากป่าที่ยังไม่มีการรบกวน และไร่มันสำปะหลังด้วยวิธีการ direct extraction procedure แบบที่หนึ่ง	27
3.2	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากนาข้าวด้วยวิธีการ direct extraction แบบที่สอง	30
3.3	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินจากนาข้าวด้วยวิธี direct extraction procedure แบบที่สาม	33
3.4	สีที่เกิดขึ้นแตกต่างกันหลังจากการเติมสาร phenol	35
3.5	แบคทีเรียซึ่งยังมีชีวิตรอดได้หลังจากขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดดีเอ็นเอ	36
3.6	ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากตัวอย่างดินที่ได้จากนาข้าวซึ่งสกัดด้วยวิธีการ direct extraction แบบที่สาม	39
3.7	ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินจากนาข้าวซึ่งถูกเติม DNAซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110	42
3.8	ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินต่างๆซึ่งถูกเติมDNA ซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110	43
3.9a	ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินต่างๆซึ่งถูกเติมDNA ซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Pseudomonas aeruginosa*	44
3.9b	ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก 100-fold dilution DNA ซึ่ถูกสกัดโดยตรงจาก peat samples ซึ่ง ถูกเติมด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจาก pure cultureของ *Pseudomonas aeruginosa*	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปภาพ **หน้า**

3.10 การย้อม RISA-PCR product ด้วยวิธี Silver staining 46

3.11 แสดง detection limit โดยใช้ RISA-PCR จากแหล่งดินต่าง ๆ 49

3.12 Southern blot hybridization ของ RISA-PCR product โดย DNA ได้มาจากดินนาข้าว ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปลูกเชื้อด้วย *P. aeruginosa* ในปริมาณต่าง ๆ 50

3.13 *nif*D-PCR product ที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง Lane 1: 100 bp marker, Lane 2-3:PCR Product 51

3.14 STRR-PCR product ที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากนาข้าว Lane 1:100 bp marker, Lane 2: PCR product (template เป็น DNA จาก pure culture ของ Cyanobacteria), Lane 3: PCR product (template เป็น DNA ที่สกัดจากดิน) 52

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	ตัวอย่างของการใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกตัวอย่างจากธรรมชาติ	7
3.1	ลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างดิน	25
3.2	ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในดินในขั้นตอนต่างๆของวิธีการ direct DNA extraction แบบที่หนึ่ง	28
3.3	เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct extraction DNA แบบที่หนึ่ง	29
3.4	ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในดินในขั้นตอนต่างๆของวิธีการ direct DNA extraction แบบที่สอง	31
3.5	เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct extraction DNA แบบที่สอง	32
3.6	ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในตัวอย่างดินจากนาข้าวในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct DNA extraction procedure แบบที่สาม	34
3.7	เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการdirect extraction DNA procedure แบบที่สาม	38
3.8	แสดงตัวอย่างของการใช้เทคนิค PCR แสดงถึงระบบต่างๆในสิ่งแวดล้อม	50

สารบัญคำย่อ

bp	base pair	°C	degree Celsius
cm	centimeter	e.g.	for example
et al.	et alia (and others)	g	gram
Fig.	Figure	min	minute
hr.	hour	ml	milliliter
mg	milligram	nmol	nanomole
µl	microliter	µg	microgram
ng	nanogram	mM	millimolar
%	percent	rpm	round per minute
pp	page	UV	ultraviolet

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

ขั้นตอนวิธีการการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในดินภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการที่ใช้ในการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม แม้ว่าวิธีการนี้มีความสามารถไม่เพียงพอที่จะสามารถตรวจสอบได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อจำกัดด้วยการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์ อันได้แก่ (1) ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ของแบคทีเรียมีขนาดเล็กเกินไปที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการพิสูจน์และจำแนกชนิด และ (2) จุลินทรีย์อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเมื่อศึกษาภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน (Roszak and Colwell, 1987) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง อย่างเช่น เทคนิค viable plate count และ most-probable-number (MPN) ถูกใช้ในการแสดงจำนวนของเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม อาหารที่ใช้เลี้ยงในขบวนการนี้มักจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นผลของการทดลองจึงมักจะมีความผิดพลาดและลำเอียงต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (หรือเรียกว่า cultivation bias) ในสภาวะกดดัน แบคทีเรียอาจสามารถอยู่รอดได้แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Oliver *et al.*, 1991; Roszak *et al.*, 1987) ปัญหาจากการตรวจสอบด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์ดังกล่าวมีความผิดพลาดมากกว่า รวมไปถึงการตรวจสอบแบคทีเรียในสภาวะที่ใหญ่กว่าในจานเลี้ยงเชื้อ (Ferguson *et al.*, 1984; Jones, 1977; Torsvik *et al.*, 1990) ในวิธีการทดลองต่างๆที่ใช้การตรวจสอบด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเก่านั้น จะมีความสามารถในการตรวจสอบจำกัดซึ่งทำได้เฉพาะในสภาพแวดล้อมเล็กๆเท่านั้น

ตัวอย่างของดินที่เก็บได้จากสิ่งแวดล้อมมีส่วนประกอบต่างๆมากมายซึ่งได้แก่ส่วนประกอบที่อยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลวและก๊าซ ส่วนประกอบหลักที่อยู่ในดินประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ (ทราย, ตะกอน และ โคลน) และสารอินทรีย์ (ฮิวมิก : humic matter) ซึ่งมีปริมาณที่ผกผันขึ้นอยู่กับแหล่งของดิน สิ่งมีชีวิตในดินซึ่งประกอบไปด้วย จุลินทรีย์ดิน อย่างเช่น bacteria, fungi และ protozoaจะอาศัยอยู่ในโพรงส่วนต่างๆของอนุภาคดิน โดยสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ในส่วนต่างๆเช่น ส่วนแข็งของดิน เช่น โคลน/สารประกอบอินทรีย์, ในโพรงดิน ซึ่งเป็นสิ่งที่กำหนดความอยู่รอดของจุลินทรีย์ แม้ว่าแบคทีเรียจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีรูปแบบและความหลากหลายมากบนโลก แต่ความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของความสัมพันธ์ และการเปลี่ยนแปลงของประชากรยังมีอยู่น้อง ประมาณ 80 ถึง 90% ของจุลินทรีย์ในดินยังไม่ได้ถูกระบุชนิด (Amann *et al.*, 1994) แม้ว่าข้อมูลจากการตรวจสอบจุลินทรีย์ในดินที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จะมีอยู่มากโดย

การใช้วิธีการพื้นฐานโดยการทำ plate count เป็นวิธีการที่สามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้โดยตรงแต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องปริมาณ ทำให้ความสามารถในการตรวจสอบในเชิงคุณภาพที่ทำได้ต่ำ นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันว่าลักษณะตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ในดินยังไม่เป็นที่เข้าใจกันอย่างแน่ชัด ซึ่งเป็นเพราะจุลินทรีย์ดินส่วนมากไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้นี้มักจะมีลักษณะเล็ก หรือถูกระบุว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้แต่มีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้เกิดการ recalcitrant ในการเพาะเลี้ยง (Rondon *et al.*, 1999) ซึ่งการสร้างสภาวะเลียนแบบที่เหมาะสมส่วนใหญ่ไม่ประสบผลสำเร็จในการเรียนแบบสภาวะที่จุลินทรีย์ต้องการ และจุลินทรีย์ส่วนมากมักจะเกาะอยู่กับอนุภาคดินทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ดังนั้นจึงมีความพยายามคิดค้นวิธีการใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดที่มีอยู่ ซึ่งได้ถูกใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ดินมาในช่วง 2 ทศวรรศน์ที่ผ่านมา โดยนักจุลชีววิทยาได้เริ่งใช้วิธีการทางโมเลกุลและดีเอ็นเอ ซึ่งก็คือส่วน 16S rRNA framework (Amann *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986)ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามธรรมชาติ

วิธีการทางโมเลกุลได้เปิดโอกาสใหม่ในการวิเคราะห์โครงสร้างและ species ต่างๆของจุลินทรีย์ดินโดยที่ไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยง ดีเอ็นเอจะถูกสกัดโดยตรงจากจากจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงทำให้สามารถหลีกเลี่ยงความผิดพลาดอันอาจจะเกิดจากการเพาะเลี้ยงได้ วิธีการสกัดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินนี้ให้ประโยชน์เป็นอย่างมาก (Trevors and Van Elsas, 1989) กล่าวคือ ประการแรก วิธีการนี้สามารถตรวจสอบความหลากหลายของยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งทำให้สามารถทำความเข้าใจในเรื่องการคัดเลือกตามธรรมชาติของกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงภายใต้สภาวะของดินในสภาพต่างๆ ประการที่สอง เมื่อใช้ 16S/18S หรือ 23S/28S ribosomal DNA sequences ซึ่งเป็น signature molecules (biomarkers) ในการตรวจสอบจะสามารถทำให้สามารถแสดงความเกี่ยวข้องของจุลินทรีย์ในด้านโครงสร้างประชากรได้ (Gerard *et al.*, 1993; Holger *et al.*, 1997; Schwieger and Tebbe, 1998; Virginia *et al.*, 1999) วิธีการดังกล่าวสามารถประสบผลสำเร็จโดยการใช้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือ denaturing gradient gel electrophoresis (TGGE หรือ DGGE) ในขบวนการ PCR products ซึ่งใช้ conserved primers ซึ่งสามารถให้ผลลัพธ์ที่แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ของโครงสร้างข้อมูลซึ่งยังไม่เคยแสดงมาก่อน (Ferris *et al.*, 1996; Gerard *et al.*, 1993, Holger, *et al.*, 1997) ประโยชน์ของการใช้วิธีการตรวจสอบยีนนี้คือ (1) จะทำให้สามารถแสดงความสัมพันธ์ของทุกสิ่งมีชีวิตที่มียีนเดียวกันได้ (Woese, 1987), (2) ความแตกต่างของลำดับของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆสามารถเก็บไว้เป็นฐานข้อมูล (Maidak *et al.*, 1999), (3) universal PCR primers สามารถถูกออกแบบให้สามารถขยายลำดับที่มี

ความจำเพาะเจาะจงสูงได้หลายๆลำดับ และ (4) เซลล์แบคทีเรียสามารถถูกตรวจสอบได้โดยวิธีการ *in situ* hybridization ในหลายตำแหน่งใน ribosomes ในเซลล์ การใช้ 16S rDNA sequences นี้ ถูกทดลองอย่างแพร่หลาย โดยแบคทีเรียสามารถถูกจำแนกออกเป็นกลุ่ม phylogenetic groups และใช้จำแนกประชากรตาม phylogenetic classification และสุดท้ายประโยชน์ของวิธีการ microbial community DNA extraction methodologies จะทำให้สามารถจำแนกเซลล์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งมีอยู่มากมายในดิน

วิธีการสกัดเซลล์ (Cell extraction method)

วิธีการการสกัดเซลล์เป็นการแยกเซลล์ของจุลินทรีย์ออกจากอนุภาคดิน ตามด้วยการทำลายเซลล์และสกัดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด (Holben *et al.*, 1988). วิธีการนี้ได้ถูกรายงานโดย Faegri และคณะ ในปี ค.ศ. 1977; Torsvik และ Goksoyr ในปี ค.ศ. 1978 ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดิน ขั้นตอนของวิธีการนี้จะรวมการแยกเซลล์แบคทีเรียจากดินโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่างๆ และตามด้วยการทำลายเซลล์และสกัดส่วนที่เป็นดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ออกจากส่วน organic carbon โดย chromatographic separations เช่นเดียวกับวิธีการดั้งเดิมทั้งหมด วิธีการนี้ใช้เวลามากและมีประสิทธิภาพไม่สูงนัก วิธีการนี้ต้องการตัวอย่างขนาดในปริมาณมากถึง 60-90 g และใช้เวลาอย่างน้อย 3 วันกว่าจะสำเร็จ (Trosvik, 1980). Holben และคณะ (1988) ได้ใช้วิธีการพื้นฐานนี้ แต่ได้พัฒนาวิธีการด้วยการใช้ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ในการกำจัดสารอินทรีย์ในดินในการเตรียมเซลล์ และได้สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ hydroxyapatite column chromatography ตามขั้นตอนการ repetitive cesium chloride density gradient ultracentrifugation purification steps วิธีการนี้สามารถให้เซลล์แบคทีเรียจากตัวอย่างประมาณ 33% และดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ในการนำไปใช้ในการทำ gene probe detection ของลักษณะที่มีความจำเพาะเจาะจงของกลุ่มของแบคทีเรียในดิน และเตรียมในการทำ restriction enzyme และ Southern blot analysis

วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรง (Direct DNA isolation method)

วิธีการนี้ต้องการตัวอย่างในการสกัดน้อยลง ซึ่งช่วยให้ตรวจสอบได้หลายตัวอย่างขึ้น (Kuske *et al.*, 1998; Tsai and Olson, 1991) ขั้นตอนทั้งหมดจะเน้นหนักในส่วนของการทำลายเซลล์ซึ่งมีอยู่ในดินโดยตรง (มากกว่าการแยกครั้งแรกจากอนุภาคของทราย, ตะกอน หรือโคลน) ตามด้วยการสกัดกรดนิวคลิอิกจากตัวอย่างดิน วิธีการที่ใช้นี้มักจะรวมวิธีการย่อยๆดังนี้คือ: physical disruption, chemical lysis, และ enzymatic lysis.

วิธีการทางกายภาพที่แตกต่างกันทั้งสี่วิธีอันได้แก่ freeze-thawing (Hugenholtz *et al.*, 1998; Kuske *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1991), bead mill homogenization (Kuske *et al.* 1998; Liesack และ Stackebrandt, 1992; Steffan *et al.*, 1988), ultrasonication (Picard *et al.*, 1992), และ grinding under liquid nitrogen (Volossiouk *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996), อย่างไรก็ตาม freeze-thaw disruption และ bead mill homogenization เป็นวิธีการที่มีความนิยมที่สุด เป็นที่ทราบกันว่าวิธีการ bead mill homogenization ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า freeze-thaw (Kuske *et al.*, 1998, More *et al.*, 1994) และทำให้กรด humic ที่ปนเปื้อนถูกสกัดออกมาด้วย (Leff *et al.*, 1995; Ogram *et al.*, 1987; Smalla *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามในบางครั้ง ดีเอ็นเอจะเกิดการขาด (Leff *et al.*, 1995) การแตกเซลล์ด้วยสารเคมีซึ่งใช้ในวิธีการนี้มักจะมีความไม่สม่ำเสมอ การแตกเซลล์โดยสารเคมีผสมสามารถแยกออกเป็นส่วนประกอบได้คือ detergent (either sodium dodecyl sulfate [SDS] [Kuske, 1998; Ogram, 1998; Zhou *et al.*, 1996] หรือ Sarkosyl [Holben, 1994; Smith และ Tiedje, 1992]) สารเคมีผสมที่มี NaCl, สารเคมีผสมที่มีบัฟเฟอร์ต่าง ๆ (มักจะใช้ Trisor phosphate, pH 7 ถึง 8) นอกจากการพัฒนาสารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการทำลายเซลล์นี้ยังรวมถึงการใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า (60°C จนกระทั่งสารละลายเดือด) (Kuske *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1992) phenol (Smalla *et al.*, 1993, Tsai *et al.*, 1991) หรือ chloroform (Herrick *et al.*, 1996) ขั้นตอนการสกัด, และการยับยั้ง chelation agents (EDTA และ Chelex 100) ในการยับยั้งเอ็นไซม์ nucleases ทำให้อนุภาคของดินกระจายออก (Jacobsen และ Rasmussen, 1992) นอกจากนี้ความสามารถในการแตกเซลล์ในขั้นตอนต่างๆ ยังถูกรายงานไว้คร่าวๆ (More *et al.*, 1994) ขั้นตอนสุดท้ายในการสกัดดีเอ็นเอส่วนใหญ่คือการใช้เอ็นไซม์ในการสกัด เอ็นไซม์ Lysozyme (Herrick *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1991), proteinase (Zhou *et al.*, 1996), achromopeptidase (DeGrang และ Bardin, 1995), และ pronase E (Holben, 1994) ได้ถูกใช้ในขบวนการการทำลายเซลล์ และเอ็นไซม์ lysozyme ได้ถูกใช้มากที่สุด

การสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดิน หรือ sediments และองค์ประกอบที่ได้จากสิ่งแวดล้อมอื่น (Holben *et al.*, 1988; Holger *et al.*, 1997; Ogram *et al.*, 1987) เป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแยกจุลินทรีย์ออกจากตัวอย่าง ก่อนที่จะทำการแตกเพื่อสกัดดีเอ็นเออีกปัจจัยหนึ่งซึ่งถูกกล่าวถึงเช่นเดียวกับการสกัดโดยตรงได้ถูกพัฒนาโดย Ogram *et al.* (1987) ในการสกัดดีเอ็นเอออกจาก sediments วิธีการต่างๆอย่างเช่นการใช้ physical disruption โดยไม่ทำการแยกเซลล์ออกจากตัวอย่าง แล้วตามด้วยการสกัดดีเอ็นเอด้วย alkaline extraction และทำดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ได้ถูกดำเนินการโดย cesium chloride density gradient centrifugation, และ hydroxyapatite column chromatography (Steffan *et al.*, 1988).

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA purification)

แม้ว่าการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยตรงและทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มาบริสุทธิ์จะให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สูงกว่าวิธีการ cell fractionation แต่วิธีการนี้จะสกัดส่วนที่เป็น humic ออกมามากกว่าวิธีการ cell fractionation ด้วย (Torsvik, 1980) Humic substances เป็นสารประกอบที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เกิดจากการรวมกันของสารอินทรีย์ที่มีสีเหลืองจนถึงสีดำหลายตัวและมีความสามารถยับยั้งการแยกตัว (Aiken *et al.*, 1985) Humic มีส่วนประกอบที่เป็นหมู่ anionic (ตัวอย่างเช่น partially deprotonated phenolic และ carboxylic groups) และยังเป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็น hydrophobic components (aromatic และ aliphatic moieties) (Stumm และ Morgan, 1996) ได้มีการรายงานไว้ก่อนแล้วว่าปริมาณของ humic สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการใช้เทคนิคทางพันธุกรรม เช่น endonuclease ซึ่งจะย่อยดีเอ็นเอที่สกัดได้โดย restriction enzymes หรือ PCR (Steffan *et al.*, 1988; Tsai *et al.*, 1992a), โดยจะขัดขวางโดยการแสดงลักษณะสารยับยั้งออกมาในตัวอย่าง อุปสรรคหลักของการทำ PCR ในตัวอย่างดินที่ได้จากธรรมชาติคือ สาร humic หรือสารประกอบอื่นอย่างเช่น iron ซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยา polymerase activities หรือจับกับ primers ทำให้ลดประสิทธิภาพของการตรวจสอบลง (Tsai *et al.*, 1992a) และยังเป็นสาเหตุให้เกิดผลที่ผิดพลาด (false-negative results) จากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ถูกสกัดออกมาซึ่งอาจไม่ถูกกำจัดออกด้วยเทคนิคทั่วไป ดังนั้นการพัฒนาส่วนมากจึงมุ่งเน้นในการลดการปนเปื้อนของ humic

การพัฒนาขบวนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันได้มุ่งเน้นในการทำให้บริสุทธิ์โดยการขจัดสารประกอบ humic (Herrick *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1992a; Young *et al.*, 1993) วิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการลดสารประกอบ humic นั้นประกอบด้วยขบวนการ selective precipitations และ extractions (Guo *et al.*, 1997), การใช้ chromatographic matrices ต่าง ๆ (ซึ่งรวมถึง ion exchange, size exclusion, และ hydrophobic interaction matrices) (Ogram, 1998) จับยึดด้วย agarose gels (Young *et al.*, 1993), และ magnetic beads (Jacobsen, 1995) ซึ่งใช้เวลาในขบวนการนี้ประมาณ 4 ถึง 12 ชม.

เทคนิคหนึ่งซึ่งใช้กันโดยทั่วไปคือ spin columns ซึ่ง packed ด้วย matrices ต่างๆ packing gel ที่มักใช้กันทั่วไปคือ Sephadex G-200 ซึ่งสามารถแยกสารประกอบ humic ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เพียงพอ แม้ว่าจะต้องใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติม (Tsai *et al.*, 1992b) ในปี ค.ศ. 1997 Jackson และคณะ

ได้รายงานการเปรียบเทียบประสิทธิภาพเมื่อใช้สารสามตัว (Sepharose 4B, Sephadex G-200, และ Sephadex G-50) โดยหาส่วนของ humic ที่ยังตกค้างในดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างจากธรรมชาติ การทดลองแสดงว่า Sepharose 4B สามารถแยกดีเอ็นเอออกจาก humics ได้มากที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าวิธีการอื่นๆ

ในปัจจุบันบริษัทบางบริษัท (อย่างเช่น MoBio, www.mobio.com; Bio101, www.Bio101.com) ได้ผลิตชุด kits ซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากตัวอย่างต่างๆได้อย่างรวดเร็ว (น้อยกว่า 30 นาที) (Ogram, 2000).

แม้ว่าจะได้มีการพัฒนาความสามารถและความรวดเร็วในการสกัดดีเอ็นเอจากดิน แต่วิธีการก็ยังมีข้อจำกัดในหลายๆส่วน วิธีการการสกัดดีเอ็นเอจากดินส่วนใหญ่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของดินซึ่งทำให้ไม่สามารถใช้ตรวจสอบดินได้ทุกชนิด (Zhou *et al.*, 1996) ดินนั้นมีความหลากหลายทั้งทางกายภาพและทางเคมีซึ่งช่วยป้องกันสารอินทรีย์คาร์บอน(organic carbon) การกำจัดสารอินทรีย์คาร์บอนอย่างเช่น พวกกรด humic และ fulvic จะทำให้สามารถเพิ่มความบบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอซึ่งส่งผลดีต่อขบวนการ PCR ได้ วิธีการในการแยกสารประกอบ humic ในดินชนิดหนึ่งอาจไม่สามารถใช้ได้ในดินอีกชนิดหนึ่ง (Ogram, 2000) ความแตกต่างของการจัดการในการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละห้องทดลองก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของปริมาณและคุณภาพในการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละห้องทดลองจะได้รับการตรวจสอบในบางครั้งเท่านั้น

การพัฒนาวิธีการในการประเมินการแยกเซลล์และการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์สามารถช่วยพัฒนาวิธีการที่สามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอได้โดยไม่มีข้อจำกัด วิธีการต่างๆได้ถูกใช้ ซึ่งได้แก่การใช้ exogenous labeled nucleic acids (Lee *et al.*, 1996; Ogram *et al.*, 1995) หรือเซลล์ (Steffan *et al.*, 1988) เติมลงในตัวอย่างรวมถึงการประมาณปริมาณดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่มีอยู่ในดีเอ็นเอซึ่งสกัดได้จากตัวอย่าง (Sandaa *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1996)

ระบบการตรวจหา (The detection system)

การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตพวก prokaryotic ไม่ประสบผลสำเร็จในช่วงหลายปีที่ผ่านมาอันเนื่องมาจากความยากในการจำแนกสิ่งมีชีวิตก่อนการแยกไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความจำเพาะ ข้อจำกัดของขบวนการดังกล่าวส่งผลให้ไม่สามารถทำความเข้าใจและ

ไม่สามารถคาดคะเนความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด ข้อมูลที่ไม่เพียงพอเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อน ส่งผลให้ไม่สามารถทำความเข้าใจในโครงสร้างความเกี่ยวข้องในระดับจุลินทรีย์ของสิ่งแวดล้อมได้ อย่างไรก็ตามสถานะการได้เปลี่ยนไปในช่วงสิบปีที่ผ่านมา ขบวนการ PCR ได้ช่วยให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ในระดับยีนจากตัวอย่างซึ่งไม่จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยง ซึ่งทำให้ขบวนการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยตรงและกว้างขวางยิ่งขึ้น สิ่งสำคัญสิ่งหนึ่งในการศึกษาด้วยขบวนการนี้ก็คือการเลือกยีนที่จะถูกใช้เป็นหลักในการตรวจสอบ (amplified) (ตารางที่ 1.2) (Garcia-Martinez *et al.*, 1999).

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างของการใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกตัวอย่างจากธรรมชาติ

Microorganism	Gene probe	Habitat	Detection limit (cells per g soil or per 100 ml water)	Reference
E. coli	16S ribosomal gene	Sediment Soil	Less than 10 Less than 3	Tsai *et al.*, 1992a
E. coli	16S ribosomal gene	Sediment	Less than 1	Tsai *et al.*, 1992b
Rhizobium Leguminosarum	*npt II*	Soil	1-10	Pillai *et al.*, 1991
Pseudomonas Fluorescens R2f	*pat*	Soil	0.602	Van Elsas *et al.*, 1991
Frankia spp.	16S ribosomal gene	Soil	0.2×10^5 genomes	Picard *et al.*, 1992
P. putida VNM43	*mer A*	Soil	4.3×10^4	Tsai *et al.*, 1991

ขบวนการ PCR มีประโยชน์อย่างมาก, มีความจำเพาะเจาะจง และวิธีการที่ว่องไวนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบได้หลายรูปแบบ เช่น molecular biology, clinical diagnosis, forensic analysis, และ population genetics วิธีการหนึ่งที่จะทำให้สามารถศึกษาความซับซ้อนของระบบนิเวศที่ได้คือการศึกษาส่วนย่อยของ taxa ซึ่งเป็นความหวังในการทำความเข้าใจในลักษณะของกลุ่มย่อยต่างๆจนไปถึงกลุ่มสังคมใหญ่ ถ้ายีนที่มีความจำเพาะเจาะจงถูกใช้ในการตรวจสอบจากกลุ่มของดีเอ็นเอ ถ้ายีนที่มีความจำเพาะถูกเพิ่มจำนวนขึ้นจากประชากรดีเอ็นเอ แสดงว่าลำดับนั้นมีอยู่อย่างมากมายแสดงว่ามียีนดังกล่าวอยู่จริง การประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในช่วงหลังของศตวรรศที่ 20 เมื่อ Norman Pace (Hugenholtz *et al.*,1998) ได้แปลความหมายของ Carl Woese's concepts of rRNA phylogeny (Woese, 1987) ในการอธิบายความสัมพันธ์ของประชากรจุลินทรีย์ ได้ช่วยเพิ่มความรู้ในความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งเป็นฐานในการใช้สร้างวิธีการตรวจสอบความหลากหลายในปัจจุบัน วิธีการต่างๆเกือบทั้งหมดจะอาศัยหลักการของการหาลำดับ 16S rDNA ที่แสดงในตัวอย่างรวมถึงการโคลนนิ่งและตรวจสอบลำดับเบส(Liesack *et al.*, 1992) amplified rDNA restriction analysis (Moyer *et al.*, 1994), denaturing gradient gel electrophoresis (Muyzer *et al.*, 1993) และ terminal-restriction fragment length polymorphism analysis (Liu *et al.*, 1997) วิธีการดังกล่าวมีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ความหลากหลาย (ตัวอย่างเช่นจำนวนของ species) ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในดินโดยใช้ PCR primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงที่สามารถแสดง phylogenetic subset ของประชากรทั้งหมดได้ตัวอย่างเช่น α-Proteobacteria

ในปัจจุบันความหลากหลายของลำดับเบสของ rRNA ได้ถูกตรวจสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ทาง phylogenetic ระหว่างจุลินทรีย์ต่างๆ และเพื่อการออกแบบ specific nucleotide probes ในการตรวจสอบ microbial taxa ต่างๆในสภาพแวดล้อม เทคนิคนี้ได้ถูกประยุกต์ใช้อธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรจุลินทรีย์ และใช้บ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โดยได้โคลน ribosomal DNA ที่จำลองแบบมา หรือ PCR-amplified ribosomal DNA (rDNA) และหาลำดับของตัวอย่างทีโคลนนี้ (Dunbar *et al.*, 1999; McCaig *et al.*, 1999) ในการหาความหลากหลายของแบคทีเรีย 16S rRNA gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงได้ถูกใช้ในการการทดลองหลายๆการทดลองเช่น Wang, GC.-Y., และ Wang, Y. ในปี 1997 และ Munson *et al.* ในปี 1997 พื้นฐานของเทคนิค PCR อย่างเช่น polymerase chain reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), reverse transcription PCR (RT-PCR), competitive PCR (cPCR) ได้ถูกใช้ในการหาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์

กลุ่มต่าง ๆ ในสภาพแวดล้อมต่างๆกัน (Barns *et al.*, 1999; Felske *et al.*, 1998; และ Johnsen *et al.*, 1999, ตามลำดับ)

ยีนส่วนที่เป็น 16S rRNA เป็นส่วนที่ถูกใช้มากที่สุด เพราะลำดับดังกล่าวมีทั้งส่วนที่ไม่มีความแปรผันและมีส่วนที่มีความผันแปรสูงซึ่งทำให้ง่ายต่อการออกแบบ PCR primer (Stackebrandt และ Rainey, 1995; Gurtler และ Stanisich, 1996) และข้อมูลของลำดับเบสที่ได้ของยีนนี้ยังใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียอื่นที่มีความใกล้เคียง หรือถ้าไม่สามารถตรวจสอบได้ ลำดับเบสที่ได้ยังสามารถใช้ในการเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นเพื่อหาความใกล้เคียงทางสายพันธุกรรม หรือเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาที่ใกล้เคียงกัน (Amann *et al.*, 1995)

อย่างไรก็ตาม การใช้ 16S rDNA ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพอาจต้องมีข้อที่ต้องระมัดระวัง ประการหนึ่งก็คือ ขนาดของยีนของโมเลกุล 16S rDNA มีขนาดที่คงที่ (คือความยาวเฉลี่ย 1550 pb โดยมีความผันแปรประมาณ 200 bp [Linton *et al.*, 1994a; Linton *et al.*, 1994b; Rainey *et al.*, 1996]) ดังนั้นจึงยากที่จะเปรียบเทียบยีนโดยใช้ความแตกต่างของขนาด ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการตรวจสอบจุลินทรีย์ในจำนวนมากซึ่งจำเป็นต้องใช้การเปรียบเทียบขนาด และในหลายๆกรณีต้องใช้การตรวจสอบลำดับที่ทำได้ยุ่งยากและมีราคาแพงอื่นที่ใกล้เคียงในการเปรียบเทียบ บางครั้งในลำดับ 16S sequence ซึ่งมีความแตกต่างน้อยจึงไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน อย่างเช่น ใน species ต่าง ๆ ของ genus เดียวกัน (Normand *et al.*, 1996) ซึ่งสามารถกำจัดปัญหาทั้งสองประการนี้ได้โดยการเพิ่ม spacer region ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างยีน 16S และ 23S rRNA ในขบวนการ PCR amplification ลำดับดังกล่าวนี้มีความผันแปรของขนาดและลำดับแม้แต่ในกลุ่มที่มีลักษณะทางกายภาพที่ใกล้เคียงกัน (Gurtler *et al.*, 1996) ซึ่งทำให้มีความเหมาะสมต่อการจำแนกมากกว่า ลักษณะขนาดสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของประชากร Bacteria หรือ Archaea ยีนปกติที่สามารถแสดงความแตกต่างที่ได้รับการยอมรับคือ 16S-23S-5S ตามลำดับ (Gurtler *et al.* 1996; Pisabarro *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998) ลักษณะโครงสร้างดังกล่าวนี้มักพบใน small-genome bacteria (Andersson และ Krland, 1998) ซึ่งหมายความว่าระหว่างยีน 16S และ 23S และระหว่างยีน 23S และ 5S มีลำดับของ intergenic spacer regions ที่มีความยาวแตกต่างกัน ขนาดของ spacer จะมีความแตกต่างในแต่ละ species และในระหว่าง operons ที่ต่างกัน (Condon *et al.*, 1995)ความแตกต่างของความยาวนี้เกิดเนื่องจากมี functional units ต่างๆแทรกอยู่อย่างเช่น tRNA genes ซึ่งในสิ่งมีชีวิตต่างๆจะมีอยู่ประมาณ 1 ถึง 2 ยีนต่อ spacer (Gurtler *et al.*, 1996; Normand *et al.*, 1996)

โครงสร้างโมเลกุล 16S นี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ (โดยใช้ primer ซึ่งอยู่ในยีน 16S)โดยยีนให้ครอบคลุมส่วนที่มี 16S อยู่ และเนื่องจากยีน 16S มีขนาดใหญ่และข้อมูลในลำดับมากกว่า 5S ดังนั้นการหาลำดับ 23S-5S spacers จึงถูกใช้น้อยกว่า (Yoon *et al.*, 1997)

ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค rRNA intergenic spacer analysis (RISA) ซึ่งจะทำงานบนส่วน intergenic spacer ระหว่าง small (16S) subunit และ large (23S) subunit ของ rRNA genes (Borneman และ Triplett, 1997) เรียกวิธีการนี้ว่า fingerprinting methods ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มย่อย หรือประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดเช่นเดียวกับการใช้ selected primers (Muyzer, 1998) วิธีการนี้มีความสามารถแสดงความสัมพันธ์ของประชากรจุลินทรีย์ที่ซับซ้อน, สามารถตรวจสอบได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความแตกต่าง, ใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยและมีเครื่องมือช่วยที่มีประสิทธิภาพเช่น small-subunit rRNA gene clone library construction (Ranjard *et al.*, 2000) การใช้ Fingerprinting methods โดยอาศัยลำดับของ DNA หรือ rRNA เป็นหลักเช่น sequence-dependent separation ของ fragments ใน denaturing หรือ temperature-gradient gel electrophoresis (DGGE and TGGE), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), และ rRNA intergenic spacer analysis (RISA) เป็นวิธีการที่สามารถใช้ศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีความซับซ้อนอย่างเช่นจุลินทรีย์ดั้งเดิมในดิน (Engelen *et al.*, 1998; Ovreas และ Torsvik, 1999; Smit *et al.*, 1997) ในวิธีการต่างๆที่กล่าวมา วิธีการตรวจสอบด้วย RISA fingerprinting เป็นวิธีการที่ถูกเลือกใช้เพราะว่าเป็นวิธีที่ง่ายต่อการทำ, สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างได้หลากหลายและสามารถทำได้โดยที่ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง (Acinas *et al.*, 1999; Borneman *et al.*, 1997; Robleto *et al.*, 1998).

ในปี ค.ศ. 1997 Borneman และคณะได้รายงานไว้ว่าการใช้ RISA สามารถแสดงความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินจากป่าและดินจากทุ่งหญ้าที่อยู่ถัดไปของ amazonia ตะวันออกได้ ดินแต่ละชนิดแสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีความโดดเด่นและมีความจำเพาะต่อสภาพแวดล้อมนั้น ความแตกต่างที่เห็นได้นี้อาจเกิดจากความแตกต่างของลักษณะของดินที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นทุ่งหญ้า และในปี ค.ศ. 1998 Robleto ได้รายงานว่าได้มีการใช้ RISA ในการวิเคราะห์ผลของการรบกวนต่อความหลากหลายทางชีวภาพ อย่างเช่น การใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถสร้าง antibiotic ในดิน

RISA ถูกใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทางสังคมของแบคทีเรียในดินที่มีสถาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Ranjard *et al.*, 2000) ซึ่งพบว่าลักษณะของ fingerprinting ที่ใช้ในการศึกษาอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการประมาณการความหลากหลายในลักษณะการเพิ่มขึ้นหรือการคงที่ทั้งนี้เพราะ

1. เฉพาะลักษณะที่มีความหลากหลายเท่านั้นที่ได้รับการตรวจสอบ
2. ลำดับเบสหลายลำดับบรรจุอยู่ในแบนของ RISA เพียงแบนเดียว (Fisher และ Triplett, 1999)
3. สิ่งมีชีวิตเดียวสามารถแสดงแบนของ RISA ได้หลายแบน (Jensen *et al.*, 1993) ทำให้เป็นข้อจำกัดในการศึกษาโดยใช้การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุศาสตร์ของประชากรทั้งหมดในดิน และจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (microenvironment pools)

ได้มีความพยายามในการรวบรวมวิธีการในการหาโครงสร้างของความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์โดยการใช้ denaturating gradient gel electrophoresis และ temperature gradient gel electrophoresis analysis (DGGE/TGGE) เพิ่มเติมในการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ (Muyzer, 1999; Muyzer *et al.*, 1993) การแยกโดย DGGE ได้ถูกใช้เพื่อลดการใช้ electrophoretic mobility ในการรวมตัวของโมเลกุลของ stranded DNA ในการแยกโดย polyacrylamide gels ซึ่งมี linear gradient ของ DNA denaturants (DGGE) หรือ temperature gradient (TGGE) ซึ่งสามารถลดลงได้เมื่อเปรียบเทียบกันการทำให้เกิด helical ของโมเลกุลทั้งหมด การรวมตัว (melting) ของดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะคู่ base pairs ซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ melting ที่จำเพาะซึ่งเกิดนี้ถูกเรียกว่า melting domains โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับต่างกันอาจจะมีลักษณะการรวมตัวที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงแสดงตำแหน่งที่แตกต่างกันในการแยกด้วยเจล สิ่งหนึ่งที่เกิดขึ้นของ melting domain ที่อุณหภูมิต่ำสุดของการรวมตัวคือจะเกิดการแยกเป็นตำแหน่งเฉพาะเมื่อแยกด้วย DGGE gel การเปลี่ยนสภาพของโมเลกุล helical ไปเป็น melted molecules จะเกิดขึ้น และการเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะหยุด ความแปรปรวนของลำดับเบสของแต่ละ domains เป็นสิ่งที่ทำให้ melting temperatures มีความแตกต่างกัน ดังนั้นลำดับของแต่ละ fragments จะหยุดการเคลื่อนที่ในตำแหน่งที่ต่างกันใน denaturing gradient ดังนั้นจึงสามารถแยกโดยใช้ DGGE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเมื่อต้องการตรวจสอบโครงสร้างประชากรที่มีลักษณะ temporal และ spatial dynamics ซึ่งมักจะไม่สามารถทำการ cloning และ sequencing ได้

เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบความหลากหลายของลำดับเบสในยีนต่าง ๆ จากจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน วิธีการ DGGE นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ genomic DNA จากสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับ

เบสนับล้านเบสได้โดยตรง ซึ่งสามารถทำได้โดยการส่งถ่ายลักษณะของลำดับเบสที่สามารถแยกได้ไปยัง hybridization membranes ซึ่งมี capillary blotting และ modified gel media หรือโดยการทำ electroblotting แล้วตามด้วยการวิเคราะห์ด้วย DNA probes (Heuer *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 1999) นอกจากนั้น ขบวนการ PCR ยังสามารถนำมาใช้ในการเลือกเพิ่มจำนวนลำดับเบสที่สนใจก่อนที่จะผ่านขบวนการ DGGE (El Fantroussi *et al.*, 1999) ได้มีการรายงานไว้ว่าการใช้ PCR-RFLP ร่วมกับ DGGE สามารถใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่ม *Nitrosospira* และ *Nitrosomonas* โดยทำ hybridization ร่วมกับ hierarchical set ของ oligonucleotide probes ซึ่งถูกออกแบบให้ตรวจสอบ ammonia oxidizer-like sequence clusters (Kowalchuk et al. 1999)

อีกวิธีการหนึ่งที่เป็นประโยชน์ที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์คือ terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ 16S rDNA fragments (Liu *et al.*, 1997; Marsh; 1999). วิธีการนี้จะแสดง 16S rDNA fragments ซึ่งจะคำนึงถึงลักษณะของ restriction endonuclease digestion patterns มากกว่าลำดับเบส ซึ่งมีประโยชน์มากกว่า D/TGGE เนื่องจากให้ผล และมีความง่ายในการจำแนกมากกว่า

Khan และคณะ (1998) ได้รายงานเกี่ยวกับผลสำเร็จของการใช้ขบวนการ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจาก GEMs ในดินและ sediments ซึ่งได้ทำตามขั้นตอนคือ cell lysis, การสกัดดีเอ็นเอออกจากดินหรือ sediment, การสกัดกรด humic และ phenolic substances ออกก่อนที่จะใช้ขบวนการ PCR ในการเพิ่มจำนวน แสดงให้เห็นว่าการทำตามขั้นตอนต่างๆดังขบวนการนี้จะช่วยลดขั้นตอนการทดลองลง วิธีการใหม่นี้ได้ลดขั้นตอนต่างๆลงหลายขั้นตอนและเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบได้มากกว่าวิธีการดั้งเดิม

ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการในการสกัดดีเอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์จากวิธีการที่มีอยู่หลายวิธีในปัจจุบันจึงเป็นปัญหาสำคัญในการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการนี้คือจะพัฒนาขั้นตอนขบวนการในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่อยู่ในดินออกมาโดยตรงซึ่งจะช่วยให้ได้ดีเอ็นเอสูงขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการทำดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ขึ้น และลดข้อจำกัดต่างๆของวิธีการนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตรวจสอบแบคทีเรียจากดินโดยตรงได้โดยไม่ต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง
2. พัฒนา Detection limit ให้อยู่ในระดับต่ำถึง 1-10 เซลล์/กรัมดิน (น้ำหนักแห้ง)
3. ได้ Biosafety monitoring system ที่เหมาะสมในการตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นทั้ง Indigeneous และ GEMs (Genetically engineered microorganisms) ในแง่ของการประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพสูง

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่างดิน (Soil samples)

ตัวอย่างของดินชนิดต่างๆได้ถูกเก็บรวบรวมดังนี้: จากนาข้าว (rice field) (เขตจังหวัดขอนแก่น), จากไร่มันสำปะหลัง (cassava field) (เขตจังหวัดนครราชสีมา), จากบริเวณป่าที่ไม่ได้รับการรบกวน (เขตจังหวัดปราจีนบุรี) และ sediment (เขตจังหวัดนครราชสีมา) การจำแนกชนิดของตัวอย่างดินได้ถูกแยกตามวิธีการพื้นฐานของ Black (1965)

2.1.2 สารเคมี (Chemicals and reagents)

การแตกเซลล์ (Cell lysis)

- skim milk powder solution

milk powder	0.1	g
H_2O	25	ml

- SDS extraction buffer

SDS	3	g
NaCl	8.18	g
Sodium acetate	4.10	g
H_2O	1,000	ml

การสกัดโดยตรง (Direct extraction)

- lysis buffer

NaCl	2.92	g
Na_2EDTA	3.72	g
Tris-HCl	7.88	g
SDS	10	g
H_2O	1,000	ml

- proteinase-K (Boehringer, Mannheim, Germany)

  : final concentration = 0.28 mg/ml in water

- lysozyme (Fulka, USA)

  : final concentration = 20 mg/ml in water

- phenol:chloroform:*iso*-amylalcohol

  ; 25:24:1, vol/vol/vol

- 10% SDS in water

- 0.2 N NaOH in water

การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation)

- 70% EtOH in water

- 99.7% Isopropanol

- 3 M Sodium acetate in water

- Rnase A (BioLab, USA)

เจลอีเล็กโตรโฟเรซีส (Gel electrophoresis)

- Tris-borate EDTA (TBE)

  : 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA

- 1% agarose gel in TBE

- 10% acrylamide gel

- Ethidium bromide (<0.5 mg/ml)

- Silver sequence DNA staining reagent

  fix/stop solution: 10% glacial acetic acid

  staining solution : 0.1% silver nitrate, 0.056% formaldehyde

  developing solution: 0.3% sodium carbonate, 0.056% formaldehyde, 0.0002% sodium thiosulfate

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA purification)

- MicroSpin Sephacryl S-300 columns (Pharmacia Biotech, USA)

- Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column (Bio-Rad, USA)

ขบวนการ PCR

- *Taq* polymerase Kit (Promega, USA): the concentrations of reagent are depending on type of primer

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Bacteria cultivation)

- Plate count agar (PCA)

: 5% tryptone, 2.5% Yeast extract, 1% Dextrose and 1.5% agar

ชนิดของแบคทีเรีย (Bacterial strains)

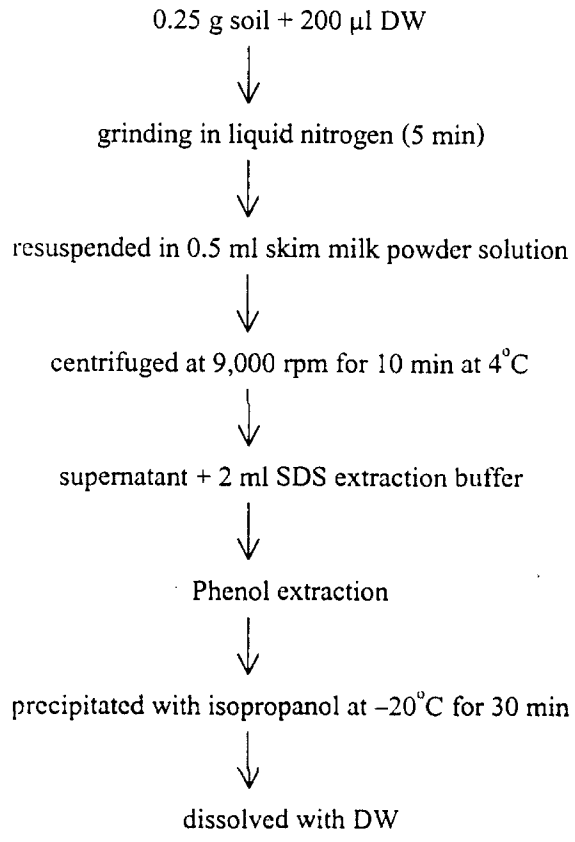
- *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110
- *Pseudomonas aeruginosa*

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การแยกดีเอ็นเอโดยวิธีการ cell extraction

เช่นเดียวกับได้อธิบายไว้ในรูปที่ 2.1 ตัวอย่างดินชนิดต่างๆประมาณ 0.25 g ถูกเทลงใน liquid nitrogen และบดด้วย mortar และ pestle เป็นเวลา 5 นาทีหรือจนได้เป็นแป้ง แล้วแป้งดินจะถูกผสมกับสารละลาย skim milk powder ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการทำ vortexing หลายๆครั้ง ตะกอนดินที่ไม่ต้องการจะถูกกำจัดออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 10 min ภายใต้สภาวะ 4°C ส่วนใส (supernatant) จะถูกผสมกับ SDS extraction buffer ปริมาตร 2 ml และทำให้เข้ากันด้วยการ vortexing

หลังจากนั้นนำ phenol ปริมาตรเท่ากันจะถูกเติมลงไปและผสมให้เข้ากันด้วยการ vortexing เป็นเวลา 2 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง และแยกส่วนประกอบด้วยการปั่นที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 10 min ส่วนที่เป็น nucleic acid ที่แขวนลอยอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวจะถูกทำให้ตกตะกอนด้วย 100% isopropanol ปริมาตร 2 volumes เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีที่อุณหภูมิ -20°C ส่วนที่ตกตะกอนนี้จะถูกแยกด้วยการปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นตะกอนจะถูกล้างสองครั้งด้วย 70% ethanol โดยการปั่นที่ความเร็วและเวลาเดียวกัน ตะกอนที่แห้งจะถูกเติมด้วย sterilized deionized water ปริมาตร 250 µl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งจะนำมาใช้ต่อไป (Volossiouk *et al.*, 1995)

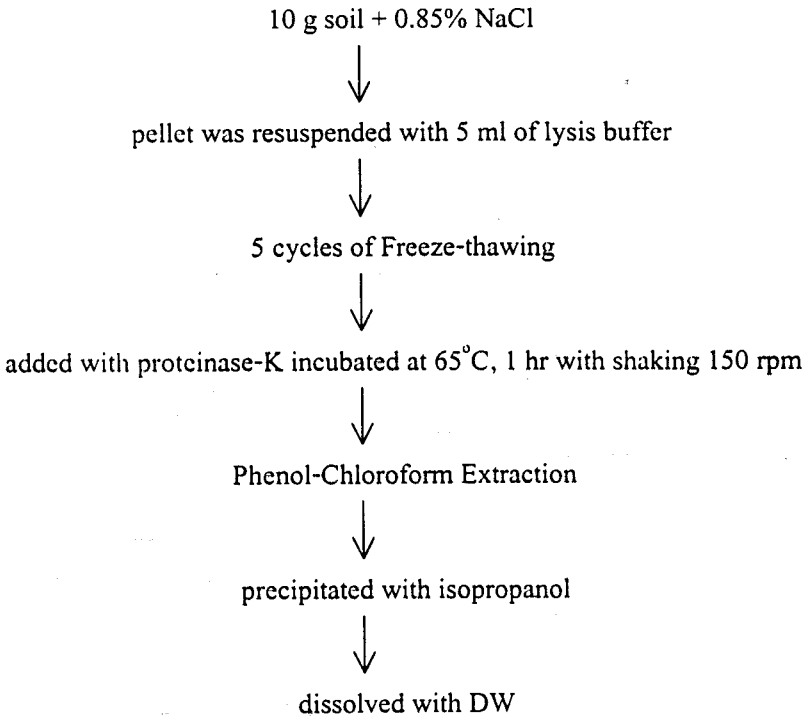


รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดเซลล์

2.2.2 วิธีการ DNA direct extraction

การทดลองนี้ได้มีการพัฒนาเป็นสามวิธีการ ในวิธีการแรก ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดินจะถูกสกัดเช่นเดียวกับวิธีการที่เคยทำมาก่อนแล้ว (Schwieger *et al.*, 1998) นำตัวอย่างดินปริมาตร 10 g เติมด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปั่นที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีและแยกส่วนใสทิ้งไป และส่วนที่เป็นตัวอย่างดินจะถูกเติมด้วย lysis buffer ปริมาตร 5 ml สารละลายที่ได้จะถูกนำไปทำ freeze-thawing ห้ารอบ โดยแต่ละรอบจะประกอบด้วยการ freezing ใน liquid nitrogen เป็นเวลา 5 นาที การ thawing โดยแช่ใน water bath อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที และ vortex เป็นเวลา 10 วินาทีด้วยความเร็วสูงสุด จากนั้นเติม Proteinase-K (ความเข้มข้นสุดท้าย = 0.28 mg/ml ในน้ำ) ลงไปในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นนำหลอดทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ใน water bath เป็นเวลา 1 ชม ตัวอย่างจะถูกแช่ในน้ำแข็งก่อนสกัด

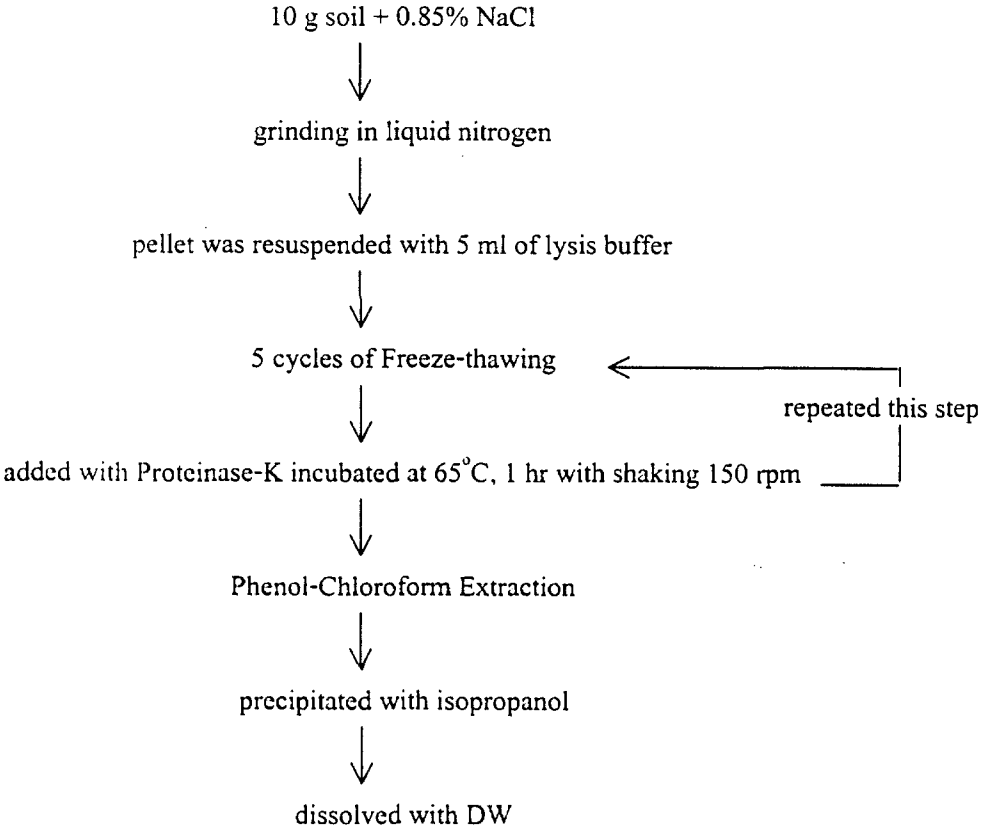
ด้วย phenol:chloroform:*iso*-amylalcohol (25:24:1, vol/vol/vol) หลังจากนั้นสารละลายจะถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 9,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่อยู่ด้านบนจะถูกถ่ายอย่างระมัดระวังไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ml จากนั้นสารละลายดีเอ็นเอนี้จะถูกตกตะกอนด้วย isopropanol ปริมาตร 2 เท่า ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที ดีเอ็นเอที่ถูกตกตะกอนออกมาจะถูกแยกด้วยการปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ตะกอนจะถูกล้างด้วย 70% ethanol ที่เย็น ปล่อยให้แห้งภายใต้อุณหภูมิห้อง, และเติมด้วย sterilized deionized water เช่นเดียวกับที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.2.



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบแรก

วิธีการที่สองได้ถูกพัฒนาและเปลี่ยนแปลงจากวิธีการแรก ขั้นตอนการล้างทำเช่นเดียวกับขบวนการที่หนึ่ง จากนั้นตัวอย่างที่ทำการล้างแล้วจะแช่ใน liquid nitrogen และเติมด้วยสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 5 ml สารละลายจะถูกทำการ freeze-thawing ห้ารอบ และตามด้วยการเติม proteinase-K (ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับวิธีการแรก) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทคนิคทั้งสองวิธีการนี้จะถูก

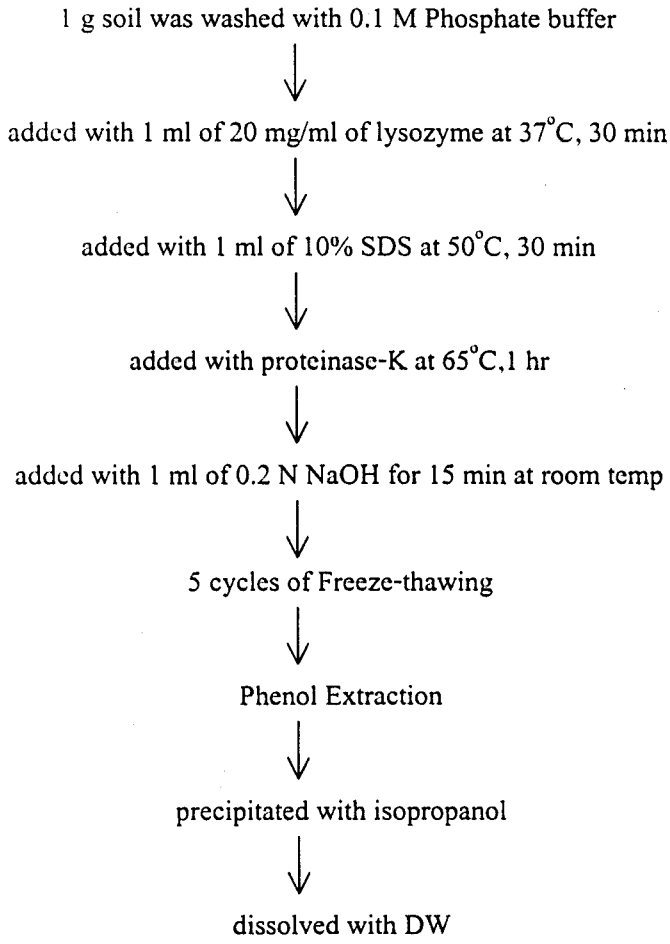
ทำซ้ำสามรอบ หลังจากการ freeze-thawing และขบวนการการเติม proteinase-K รอบสุดท้าย ขั้นตอนต่อไปทำเช่นเดียวกับในวิธีการแรก (รูปที่ 2.3).



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบที่สอง

วิธีการที่สาม ได้มีการเพิ่มการเติม lysozyme และ NaOH เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำลายเซลล์ (รูปที่ 2.4) ตัวอย่างดินน้ำหนักสด 1 g จะถูกล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7) หลังจากการปั่นแยก ตะกอนจะถูกเติมด้วย lysozyme solution (ความเข้มข้นสุดท้าย 20 mg/ml) และทิ้งไว้ภายใต้สภาวะ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตัวอย่างดินจะถูกเติมด้วย 10% SDS ปริมาตร 1 ml และทิ้งไว้ภายใต้สภาวะ 50°C เป็นเวลา 30 นาที ตะกอนดินที่ได้จะถูกเติมด้วยสารละลาย proteinase-K solution ก่อนเก็บไว้ภายใต้สภาวะ 65°C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นสารละลายที่ได้หลังจากการเติม 0.2 N NaOH ปริมาตร 1 ml จะถูกเขย่าภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดินจะถูก freezing ใน liquid nitrogen และ

thawing ที่อุณหภูมิ 70°C สามรอบ เติมสาร phenol ปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทันที และปั่นแยกด้วยความเร็ว13,000 rpm 10 นาที nucleic acid ในส่วนที่เป็นสารละลายจะถูกตกตะกอนด้วย isopropanol ปริมาตร 2 เท่า และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที หรือข้ามคืน ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการปั่นแยกจะถูกล้างด้วย 70% ethanol และทำให้แห้ง จากนั้นตะกอนดีเอ็นเอจะถูกละลายด้วย sterilized deionized water



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนของวิธีการ direct extraction methodology แบบที่สาม

2.2.3 เจลอีเล็กโตรโพเรซีส (Gel electrophoresis)

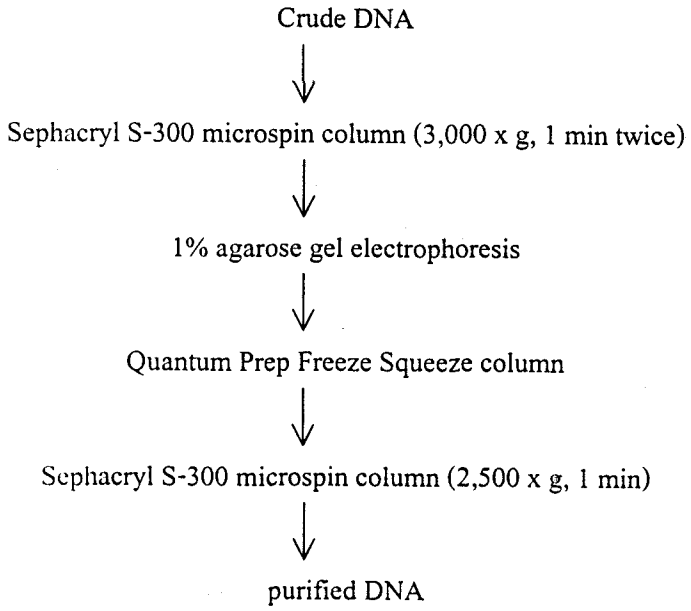
การสกัดดีเอ็นเออาจจะได้ส่วนที่เป็นอาเอ็นทีที่ปนเปื้อนออกมาด้วย ดังนั้นการเติม RNase ในระหว่างการสกัดจึงมีความจำเป็น Tsai และคณะ (1991) ได้รายงานไว้ว่าสิ่งปนเปื้อนในการสกัดอย่างเช่น humic materials ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอ็นไซม์ RNase หรือ DNase แต่อาจจะกระทบต่อความสามารถในการเกิด DNA hybridization ดังนั้นการสกัดและบอกขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดินด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 80 V เป็นเวลา 30 นาทีจึงจะทำหลังจากการเกิดปฏิกิริยาของ RNase A (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml) และกระตุ้นภายใต้สภาวะ 55°C เป็นเวลา30 นาที

2.2.4 การหาความสามารถในการสกัดแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน (Determination of bacterial extraction efficiency)

การหาปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่ได้จากดินตัวอย่างในขั้นตอนต่าง ๆ ของการสกัดดีเอ็นเอทำได้โดยการทำ serial dilution ของตัวอย่าง และตามด้วยการนับบน plate count agar (PCA) ซึ่งจะสามารถแสดงจำนวนแบคทีเรียที่ยังคงอยู่ และความสามารถในการทำลายเซลล์ การเลี้ยงเซลล์จะทำได้โดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะ 30°C เป็นเวลา 3-5 วันก่อนการตรวจสอบ

2.2.5 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวัดปริมาณ (DNA purification and quantification)

เช่นเดียวกับที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.5 ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากขั้นตอนการสกัดจะถูกเติมด้วย RNase และทีการแยกอีกครั้งด้วย MicroSpin Sephacryl S-300 columns (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) (Edgcomb *et al.*, 1999) สองครั้งก่อนที่จะทำการแยกด้วย agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้จาก agarose gel จะถูกแยกออกด้วย Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column และแยกต่อด้วย Sephacryl S-300 microspin column (Bio-Rad, Hercules. CA) อีกครั้ง ทั้งดีเอ็นเอบริสุทธิ์และดีเอ็นเอที่ยังไม่ทำการแยกจะถูกวัดปริมาณด้วยการเปรียบเทียบค่า fluorescence intensities ของ ethidium bromide ซึ่งถูกเติมลงในแบนของตัวอย่างดีเอ็นเอใน agarose gel



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

2.2.6 การยับยั้งขบวนการพีซีอาโดยใช้ rRNA intergenic spacer ในการวิเคราะห์ (PCR inhibition assay by using rRNA intergenic spacer analysis (RISA) as target sequence)

การยับยั้งกระบวนการ PCR ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน ในการทดลองนี้ได้ใช้ลำดับ intergenic spacer region ระหว่าง SSU และ large-subunit ของ rRNA genes ซึ่งมีความแปรผันทั้งขนาดและลำดับและมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะทาง taxonomy (Borneman *et al.*, 1997) สภาพในการเพิ่มจำนวน (amplification) ใน 25 µl PCR mixtures ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายหรือปริมาณทั้งหมดดังนี้: 500 ng ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดิน, 50 mM Tris (pH 8.3), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTPs, 400 nM (each) primer, และ 2.5 U ของ *Taq* polymerase. PCR primers ที่ถูกใช้คือ 1406F (5'-TGYACACA CCGCCCGT-3') (universal rRNA small subunit) และ 23SR (5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3') (bacterial 23S rRNA large subunit) (B = G, C or T; R = A or G; Y = C or T) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดินปริมาณต่างจะถูกเติมด้วยดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pure culture ปริมาณ 50 ng และถูกใช้เป็น template สารทั้งหมดจะถูกรวมและกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ดีเอ็นเอจะขบวนการ PCR ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer-ABI 9700 thermocycler system (Perkin-Elmer, Singapore) ทั้งหมด 35 รอบที่

อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 56°C เป็นเวลา 30 วินาที,และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที, และตามด้วยขบวนการ elongation ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาต่างๆของขบวนการ PCR จะถูก loaded ในเลนส์ของ 1% gel electrophoresis.

2.2.7 ข้อจำกัดในการตรวจสอบ (Investigation of detection limit)

Pseudomonas aeruginosa ปริมาตร 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 และ 1 เซลล์จะถูกเติมลงในตัวอย่างดินที่ผ่านการ autoclaved ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง และทำการสกัดด้วยวิธีการที่สาม หลังจากนั้นจะถูกทำให้บริสุทธิ์ดังขบวนการที่ได้อธิบายผ่านมาแล้ว ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกใช้เป็น template โดยใช้ RISA primer ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จาก RISA-PCR ในแต่ละตัวอย่างจะถูกตรวจสอบด้วยการแยกด้วย 10% acrylamide gel electrophoresis ด้วยการใช้ minislab gel (gel size, 90 by 80 by, 0.75 mm.; Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, Calif.) เจลจะถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้าขนาด 80 V เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือจนกระทั่ง bromophenol blue ซึมลงไปถึงเจลด้านในสุด ย้อมเจลด้วย silver stain โดยที่ SILVER SEQUENCE DNA staining reagents (Promega, Madison, USA) (Borneman *et al.*, 1997; Robelto *et al.*, 1998) หรือตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้โดย Bassam และคณะ (1991)

2.2.8 การวิเคราะห์ด้วย Southern hybridization (Southern hybridization analysis)

ดีเอ็นเอที่ได้จากขบวนการ RISA-PCR จากดีเอ็นเอที่ถูกสกัดจาก pure culture ของ *P. aeruginosa* จะถูกใช้เป็น probe ในการจำแนกดีเอ็นเอที่ผ่านขบวนการ PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดิน การทำ Southern blotting เริ่มต้นจากการแยกดีเอ็นเอที่ได้จากขบวนการ PCR บน 1% agarose gel ดีเอ็นเอจะถูกส่งผ่านไปยังขั้ว nylon membrane ขบวนการ Hybridization ใช้ที่อุณหภูมิ 58°C Anti-Digoxygenin-AP, Fab fragments (Boehringer Mannheim, Germany) ในการตรวจสอบ probe ของ DNA-target DNA hybrids ตามคำแนะนำของ manufacturer's instructions (DIG DNA Labeling และ Detection Nonradioactive, Boehringer Mannheim, Germany) probes สร้างขึ้นด้วยเทคนิค DIG-High Prime ตามคำแนะนำของ manufacturer's instructions (DIG-High Prime; Boehringer Mannheim, Germany).

2.2.9 การตรวจสอบโดยใช้ primer amplification อื่น

DNA primer ได้ถูกทดลองเพื่อเปรียบเทียบ ลำดับของ *nifD* ที่ได้จาก *Azotobacter vinelandii* M. 20568 คือ 5'-TARTCCCANGAGTGCATYTGNCGGA-3' และ 5'-ATSGARTW CAACTTCTTCGG-3'(Young, 1993) การทดลองใช้ template DNA 10 ng เป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิ 72°C และ 0.5 นาทีที่อุณหภูมิ 94°C, 3 นาทีที่อุณหภูมิ 72°C และ ∞ อุณหภูมิ 4°C ทั้งหมด 30 รอบ primer ของ Short tendemly repeated repetitive sequence (STRR) คือ 5'-CCARTCCCCARTCCCC-3'. reaction mixture ปริมาตร 25 µl มีส่วนผสมที่มีความเข้มข้นสุดท้ายหรือ ความเข้มข้นทั้งหมดคือ : 500 ng ของ DNA 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.9670 pM ของแต่ละ primer, และ 2.5 U ของ *Taq* polymerase สารเคมีดังกล่าวถูกผสมและกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 6 นาที ขบวนการ PCR ถูกทำทั้งหมด 30 รอบ ภายใต้สภาวะ 94°C เป็นเวลา 1 นาที, 56°C เป็นเวลา 1 นาที, และ 65°C เป็นเวลา 5 นาที และตามด้วย 65°C เป็นเวลา 16 นาที (Rasmussen and Svening, 1998)

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การตรวจสอบลักษณะของตัวอย่างดิน (Soil characterization)

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอนี้ได้ใช้ตัวอย่างดินหลายชนิดซึ่งเก็บจากนาข้าว (โคลน), ดินจากป่าที่ยังไม่มีการรบกวน (ตะกอนโคลนทราย), และพื้นที่การปลูกมันสำปะหลัง (ทราย) ลักษณะเฉพาะของตัวอย่างดินต่างๆได้ถูกสรุปไว้ในตารางที่ 3.1 ในตัวอย่างดินต่างๆนี้ sediment (ตะกอนทราย) มีองค์ประกอบของสารจำพวก organic matter เซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตต่ำที่สุด (0.73% และ 6.5 x 10^5 CFU/g soil ตามลำดับ) ตัวอย่างดินซึ่งได้มาจากป่าที่ยังไม่ได้รับการรบกวนมีองค์ประกอบ organic matter สูงที่สุด(4.25%) และดินจากนาข้าวมีปริมาณแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตสูงที่สุด (9.7 x 10^5 CFU/g soil) ค่า pH ของตัวอย่างดินมีค่าอยู่ในช่วง 4.9 ถึง 7.3 ในขณะที่อีกสองตัวอย่าง (sediment และ peat) ซึ่งมีความแตกต่างกันของ organic matter สูงถูกใช้ในการวิเคราะห์ความไม่บริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA impurity assay)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างดิน

Soil sample	pH	Particle distribution			Humic content (%)	Organic content (%)	Total viable bacterial count (CFU/g soil)
		Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)			
1. Rice field	7.3	20.87	28.67	50.46	0.20	1.07	9.7 x 10^5
2. Undisturbed forest	4.9	62.71	17.43	19.87	0.55	4.25	7.2 x 10^5
3. Cassava cultivation area	7.0	92.39	9.41	1.81	0.42	3.38	8.3 x 10^5
4. Sediment	6.3	79.3	9.5	11.2	0.08	0.73	6.5 x 10^5
5. Peat	7.0	ND			ND	62.77	5 x 10^4

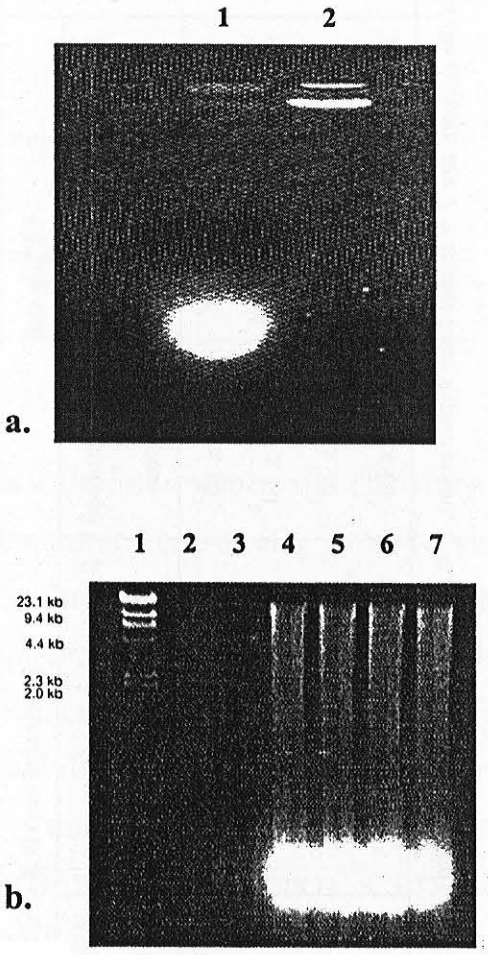
Notes ND = Non Determined

3.2 การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอ (Development of DNA extraction methodology)

วิธีการในการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงตามวิธีการแรกได้ใช้ buffer, freeze-thawing, proteinase-K treatment, และสกัดโดย phenol:chloroform:*iso*-amylalcohol ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากนาข้าวได้ประมาณ 7 ng DNA ต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง) (รูปที่ 3.1a), ไม่พบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินที่ได้จากป่าที่ยังไม่มีการรบกวน และสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงจากตัวอย่างดินจากไร่มันสำปะหลัง แต่ดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในสภาพฉีกขาด (รูปที่ 3.1b). ดังที่แสดงในเลนที่ 4-7 ของรูปที่ 3.1b ขนาดของการกระจายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (มากกว่า 9.4 kb ถึงน้อยกว่า 2.0 kb) ของตัวอย่างดินที่ได้จากไร่มันสำปะหลังโดยการแยกด้วย gel electrophoresis แสดงให้เห็นลักษณะการฉีกขาดซึ่งเป็นข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในขบวนการการสกัด ได้มีการรายงานว่าขั้นตอนทางกายภาพ (physical treatments) อาจสามารถทำให้ดีเอ็นเอฉีกขาดจนเหลือขนาด 5 ถึง 10 kb หรือน้อยกว่า (Holben *et al.*, 1988; Ogram *et al.*, 1987) การทดลองอย่างน้อยหนึ่งการทดลองแสดงขนาดเฉลี่ยประมาณ 100 ถึง 500 bp เมื่อทำการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (Simonet *et al.*, 1991) ดังนั้นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจึงอาจไม่เหมาะสมเมื่อใช้ *Taq* DNA PCR เพราะอาจเกิดความเสี่ยงในการเกิด chimeric products ขึ้นกับ template DNA ขนาดเล็ก (Liesack *et al.*, 1991) นอกจากนั้นสารประกอบ humic substances ยังมีปริมาณสูงซึ่งแสดงลักษณะเป็น bright blue green fluorescent band ภายใต้แสง UV-light ซึ่งบดบังดีเอ็นเอเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis (เช่นเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 3.1a-b)

ความสามารถในการตรวจสอบแบคทีเรียในดินถูกตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบกับปริมาณของแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในแต่ละขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอ การจำแนกแบคทีเรียถูกทำโดยการดูดของเหลวที่สกัดได้ปริมาตร 0.1 ml จากแต่ละขั้นตอน และเลี้ยงบน PCA medium ความสามารถในการตรวจสอบได้สรุปไว้ในตารางที่ 3.2 ความสามารถของการสกัดในแต่ละขั้นตอนของตัวอย่างดินทั้ง 3 ตัวอย่างมีความผกผัน ในตัวอย่างดินที่ได้จากไร่มันสำปะหลังและป่าที่ยังไม่ถูกรบกวนซึ่งมีส่วนที่เป็นโคลนน้อยกว่าตัวอย่างดินจากนาข้าว พบว่าในขั้นตอนการทำ freezing-thawing นั้นมีผลกระทบต่อแบคทีเรียจากดินมากกว่าขั้นตอนอื่น ซึ่งทำให้ผลการทดลองของตัวอย่างดินจากนาข้าวซึ่งใช้ proteinase-K treatment มีประสิทธิภาพที่สูงกว่า ดังนั้นลักษณะองค์ประกอบของดินจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสามรถในการตรวจสอบเซลล์ ขั้นตอนการดำเนินการนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ physical treatments ร่วมกับ enzymatic treatments สามารถให้จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดอยู่ในช่วง 10 - 4.48 x 10^2 cells ต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง) และใช้เวลา

เพียง 3 ชั่วโมงครึ่งในการทำ (ตารางที่ 3.3) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่แสดงผลเช่นเดิมเมื่อทำการทดลองซ้ำ



รูปที่ 3.1 (a.) การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากนาข้าวด้วยวิธีการ direct extraction procedure แบบที่หนึ่ง Lane 1: crude DNA (humic ที่ปนเปื้อนจะแสดงให้เห็นเป็นbright blue green fluorescent band แทรกอยู่เหนือ DNA), Lane 2: λ DNA marker

(b.) การสกัดดีเอ็นเอจากดินจากป่าที่ยังไม่มีการรบกวน และไร่มันสำปะหลังด้วยวิธีการ direct extraction procedure แบบที่หนึ่ง Lane 1: λ DNA marker ถูกออกแบบให้มี Hind III, Lane 2-3: crude DNA จากตัวอย่างจากดินจากป่าที่ยังไม่มีการรบกวน, Lane 4-7: crude DNA จากตัวอย่างดินจากไร่มันสำปะหลัง

ตารางที่ 3.2 ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในดินในขั้นตอนต่างๆของวิธีการ direct DNA extraction แบบที่หนึ่ง

Step of DNA extraction*	CFU/g soil			Bacterial survival (%)			Recovery efficiency (%)		
	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest
1	9.7×10^5	8.3×10^5	7.2×10^5	100	100	100	0	0	0
2	6.41×10^5	2.33×10^5	1.09×10^4	66.08	28.07	1.51	33.93	71.98	98.49
3	1.2×10^4	5.73×10^3	7.2×10^3	1.24	0.69	1.00	65.06	27.33	0.51
4	1.64×10^2	4.48×10^2	3.6×10^1	0.017	0.054	0.005	1.23	0.636	0.995

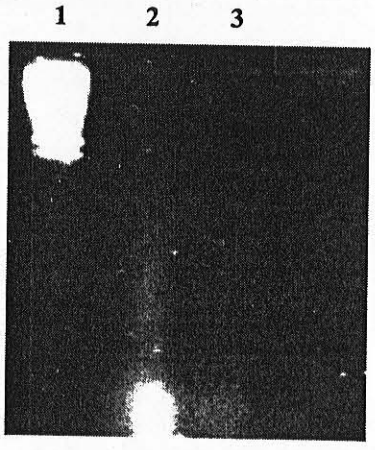
(*) Numbers in the column are 1 = Initial total viable count, 2 = After 5 cycles of freeze- thawing, 3 = After proteinase-K treatment and incubated at 65°C, 1 hr, and 4 = After phenol-chloroform extraction.

ตารางที่ 3.3 เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct extraction DNA แบบที่หนึ่ง

Step	Time consumption
Washing	15 min
Freeze-thawing	50 min
Proteinase K treatment	60 min
Phenol-chloroform treatment	10 min
DNA precipitation and RNase treatment	75 min
Total	3 hrs 30 min

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพของเทคนิค (วิธีการสกัดที่สอง) ตัวอย่างดินถูกบดใน liquid nitrogen และผ่านขั้นตอนการ freeze-thawing หลายครั้ง จากนั้นได้พัฒนาขั้นตอนการใช้ proteinase-K ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง สองครั้ง ด้วยวิธีการนี้ทำให้ได้ปริมาณของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นสามเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการก่อนหน้านี้ (รูปที่ 3.2) ปริมาณที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดขึ้นเพราะในวิธีการที่สองมีการใช้ขั้นตอนในการสกัดมากกว่าวิธีการแรก ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความสามารถของแต่ละขั้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.4 ขั้นตอนในการบดแสดงประสิทธิภาพสูงที่สุดในตัวอย่างดินทุกตัวอย่าง และปริมาณของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตจากตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างยังสามารถพบได้แต่น้อยกว่าในวิธีการแรก (เซลล์อยู่ในช่วง of 3.32- 7.92 x 10^2 cells ต่อกรัมดิน) อย่างไรก็ตามในการนำวิธีการนี้เมื่อนำไปปฏิบัติพบว่ามีความยุ่งยากและต้องใช้ความพยายามมากกว่า เช่น ในขั้นตอนที่การเติมดินลงใน liquid nitrogen นอกจากนั้นวิธีการนี้ยังมีความยากลำบากในการสกัดดีเอ็นเอปริมาณมาก ซึ่งต้องใช้เวลามากโดยเฉพาะในขั้นตอนการทำ freeze-thawing 5 รอบ ถึง 3 ครั้ง และการใช้ Proteinase-K ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 7 ชั่วโมงครึ่ง (ตารางที่ 3.5) การประมาณความสามารถในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ direct lysis method นี้ถูกรายงานว่าสูงถึง 90% จากการใช้ sediments ซึ่งมีโคลน 19 ถึง 44% และ organic carbon 3 ถึง 16.5% (Steffan *et al.*, 1988) จุลินทรีย์ดั้งเดิมในดินและ sediments จะถูกทำให้แตกโดยการใช้ lysozyme และเมื่อใช้ขั้นตอน freeze-thaw ซึ่งได้รายงานไว้โดย Tsai และคณะในปี 1991 ส่วนที่แตกนี้จะถูกสกัดด้วย SDS และ phenol-chloroform ในการเพิ่มความสามารถให้สูงขึ้นนี้ (>90%) ปริมาณของดีเอ็นเอจะสูงขึ้นเป็น 38 และ 12 μg/g (น้ำหนักสด)ใน sediments และดินตามลำดับ วิธีการนี้ยังทำให้ดีเอ็นเอมีการ

ขาดน้อยดังนั้นจึงสามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบที่อาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพ,ทางเคมี และผลจากเอ็นไซม์ได้



รูปที่ 3.2 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากนาข้าวด้วยวิธีการ direct extraction แบบที่สอง Lane 1: λ DNA marker ที่มี Hind III, Lane 2-3: crude DNA ที่สกัดได้

ตารางที่ 3.4 ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในดินในขั้นตอนต่างๆของวิธีการ direct DNA extraction แบบที่สอง

Step of DNA extraction*	CFU/g soil			Bacterial survival (%)			Recovery efficiency (%)		
	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest	Rice field	Cassava cultivation area	Undisturbed forest
1	9.7×10^5	8.3×10^5	7.2×10^5	100	100	100	0	0	0
2	2.65×10^4	6.86×10^4	8.64×10^4	2.73	8.26	12	97.25	91.71	87.98
3	1.6×10^4	3.97×10^4	3.47×10^4	1.64	4.78	4.8	1.1	3.49	7.22
4	1.12×10^4	1.44×10^4	3.37×10^4	1.15	1.74	4.68	0.49	3.05	0.12
5	4.85×10^3	5.73×10^3	3.89×10^3	0.5	0.69	0.54	0.66	1.06	4.14
6	4.17×10^3	2.32×10^3	3.6×10^3	0.43	0.28	0.5	0.06	0.41	0.04
7	3.78×10^3	1.83×10^3	2.6×10^3	0.39	0.22	0.36	0.05	0.07	0.14
8	3.59×10^3	1.58×10^3	1.22×10^3	0.37	0.19	0.17	0.02	0.02	0.19
9	6.79×10^2	3.32×10^2	7.92×10^2	0.07	0.04	0.11	0.3	0.15	0.06

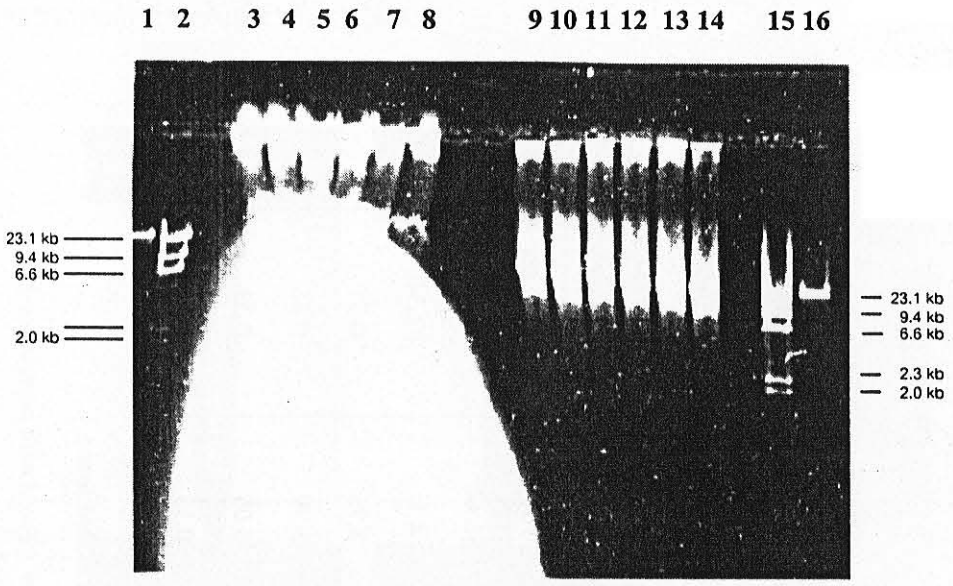
(*) Numbers in the column are 1 = Initial total viable count, 2 = After grinding in liquid nitrogen, 3 = After 1st freeze-thawing, 4 = After 1st treated with proteinase K, 5 = After 2nd freeze-thawing, 6 = After 2nd treated with proteinase K, 7 = After 3rd freeze-thawing, 8 = After 3rd treated with proteinase K, and 9 = After phenol-chloroform extraction

ตารางที่ 3.5 เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct extraction DNA แบบที่สอง

Step	Time consumption
Washing	15 min
Grinding in liquid nitrogen	15 min
1st round of Freeze-thawing	50 min
1st round of Proteinase K treatment	60 min
2nd round of Freeze-thawing	50 min
2nd round of Proteinase K treatment	60 min
3rd round of Freeze-thawing	50 min
3rd round of Proteinase K treatment	60 min
Phenol-chloroform treatment	10 min
DNA precipitation and RNase treatment	75 min
Total	7 hrs 25 min

เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาข้างต้น อนุภาคของโคลนสามารถป้องกันแบคทีเรียจากผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมได้ (Frostegard *et al.*, 1999) ดังนั้นดินจากนาข้าวจึงน่าจะเป็นตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้ยากที่สุด ในปี ค.ศ. 1999 Miller และคณะได้รายงานไว้ว่าควรมีการเพิ่มขั้นตอนการใช้ chloroform หรือ phenol ในการสกัดซึ่งจะให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่มีการใช้สารละลายอินทรีย์สองตัวนี้ นอกจากนี้การทดลองนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการที่สองเพิ่มขึ้นเป็นวิธีการที่สามเพื่อลดความลำบากและเวลาที่ใช้ในการสกัด ในการทดลองนี้พบว่าในวิธีการที่สามซึ่งสกัดตัวอย่างดินด้วย lysozyme, 10% SDS, proteinase-K, NaOH, freeze-thawing, และ phenol ตามลำดับในปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกันวิธีการก่อนหน้านี้ นอกจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดินการสกัดยังทำให้เกิด humic ปนเปื้อนออกมาด้วย ดังที่แสดงในรูปที่ 3.3 เลนที่ 3-8 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากนาข้าว การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอถูกขัดขวางด้วยสิ่งปนเปื้อนเป็นปริมาณมากซึ่งแสดงออกมาให้เห็นได้ในลักษณะ bright blue green band บดบังดีเอ็นเอ และในเลนที่ 9-14 ได้แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้ซึ่งได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ sephacryl S-300 microspin column ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีมากขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงว่าสารประกอบ humic ไม่เพียงแต่ขัดขวางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอแต่ยังบดบังความสามารถในการมองเห็นของดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

ดินที่ได้จากนาข้าว อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis มีประมาณ 50 ng ซึ่งสูงกว่าวิธีการที่หนึ่งและที่สอง ความสามารถในการสกัดและปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตของวิธีการที่สามนี้ได้ถูกสรุปไว้ในตารางที่ 3.6 ในวิธีการนี้ขั้นตอนของการสกัดด้วย 10% SDS ให้ความสามารถได้สูงที่สุด



รูปที่ 3.3 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินจากนาข้าวด้วยวิธี direct extraction procedure แบบที่สาม Lane 1 และ 16: λ DNA marker, Lane 2 และ 15: λ DNA marker ที่มี Hind III, Lane 3-8: crude DNAที่สกัดได้, Lane 9-14: DNA ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephacryl S-300 microspin column สองรอบ

ตารางที่ 3.6 ปริมาณเซลล์แบคทีเรียในตัวอย่างดินจากนาข้าวในแต่ละขั้นตอนของวิธีการ direct DNA extraction procedure แบบที่สาม

Step of DNA extraction	CFU/g soil	Bacterial survival (%)	Recovery efficiency (%)
1	9.7×10^5	100	0
2	8.38×10^5	86.44	13.56
3	3.98×10^4	4.1	82.34
4	3.62×10^4	3.73	0.37
5	3.29×10^4	3.39	0.35
6	2.96×10^4	3.05	0.33
7	1.26×10^3	0.13	2.92

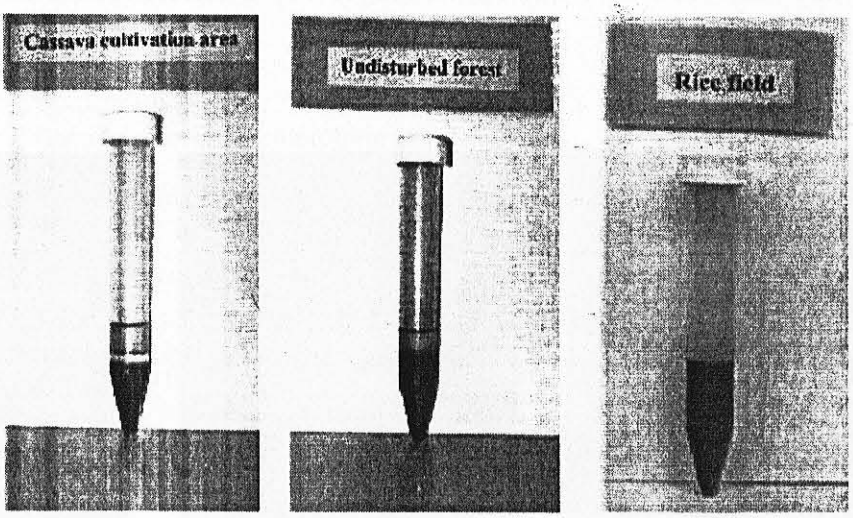
(*) Numbers in the column are 1 = Total viable count,

2 = After treated with lysozyme, 3 = After treated with proteinase-K,

4 = After treated with 10%SDS, 5 = After treated with NaOH,

6 = After freeze-thawing, and 7 = After phenol extraction

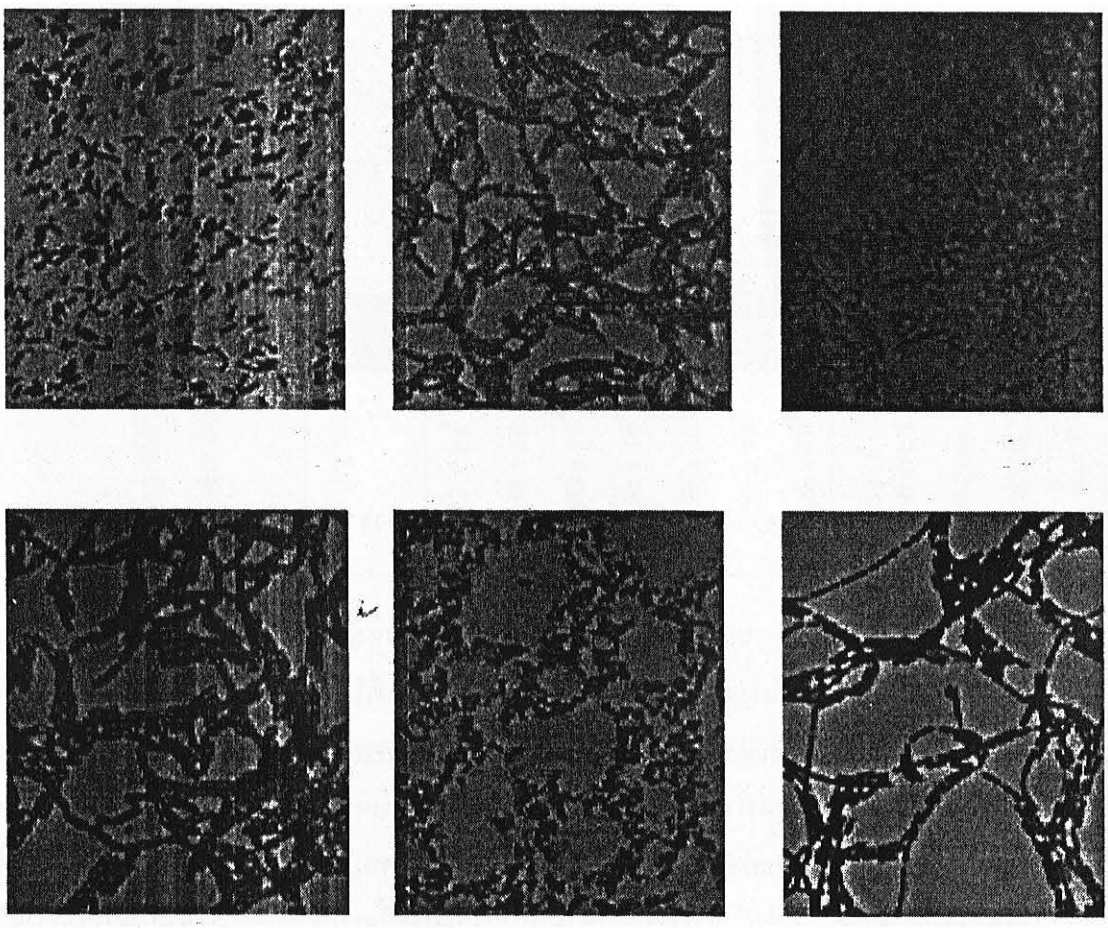
เปอร์เซนต์ปริมาณแบคทีเรียดินที่ยังมีชีวิตในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งถูกกระตุ้นด้วย phenol reagent ของวิธีการสกัดโดยตรงแบบที่หนึ่ง ที่สอง และที่สาม ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบ พบว่าความสามารถของการกระตุ้นด้วย pure phenol สองครั้งและตามด้วย chloroform ในวิธีการที่สามให้ความสามารถสูงกว่าการใช้ phenol-chloroform treatment เนื่องจากผลกระทบจากค่าความเป็นกรดที่สูงกว่า (Miller *et al.*, 1999) สีที่แสดงออกจากตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างซึ่งถูกกระตุ้นด้วย phenol ก็แสดงความแตกต่างเช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 สีที่เกิดขึ้นแตกต่างกันหลังจากการเติมสาร phenol

ความแปรปรวนของผลของการแตกเซลล์เกิดจากลักษณะของดินที่มีความแตกต่างและปริมาณประชากรแบคทีเรียที่ปรากฏ ตัวอย่างเช่น ในดินที่ให้ผลของการแตกเซลล์ต่ำจะมีสัดส่วนของแบคทีเรียชนิด gram-positive สูงกว่า (Zhou. *et al.*, 1996) เมื่อตรวจสอบแบคทีเรียที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดดีเอ็นเอพบว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียประเภท endospore-forming cells (รูปที่ 3.5) ซึ่งมีความทนทานสูงเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง (Frostegard *et al.*, 1999) การทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธีการนี้จะมีความเหมาะสมมากกว่าถ้าใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียในดินที่เป็น gram negative มากกว่าแบคทีเรียที่เป็น gram positive การทดลองควรตรวจสอบต่อไปโดยทดสอบการเติมแบคทีเรียพวก gram positive ลงไปในดินที่มีแบคทีเรียชนิดต่างๆอยู่เพื่อทำการเปรียบเทียบ วิธีการที่สามสามารถรบกวนแบคทีเรียกสุ่ม gram positive ได้เพียงแค่ทำให้เซลล์ไม่สามารถเกิด endospore-forming ได้ อย่างไรก็ตามการทดลองได้ทำการเปรียบ

เทียบปริมาณของแบคทีเรียที่ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้จากตัวอย่างจากนาข้าวในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดแต่ละวิธีการ เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่คือ 0.017, 0.07, และ 0.13% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าในวิธีการที่สามปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่มีสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการทั้งสามวิธี แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่สามมีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยง หรือดีเอ็นเออิสระซึ่งมีอยู่ในดินได้ดีกว่าอีกสองวิธีการ และนอกจากนั้นวิธีการนี้ยังใช้เวลาเพียง 5 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.7) ผลการทดลองแสดงว่าวิธีการในการสกัดในการทดลองนี้มีความสามารถในการสกัดได้อย่างรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ค่อนข้างรวดเร็วอื่น



รูปที่ 3.5 แบคทีเรียซึ่งยังมีชีวิตรอดได้หลังจากขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3.7 เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของวิธีการdirect extraction DNA procedure แบบที่สาม

Step	Time consumption
Washing	15 min
Lysozyme treatment	30 min
10% SDS treatment	30 min
Proteinase K treatment	60 min
NaOH treatment	15 min
Freeze-thawing	30 min
Phenol followed by chloroform extraction	30 min
DNA precipitation and RNase treatment	75 min
Total	4 hrs 45 min

ไม่เพียงเฉพาะวิธีการสกัดโดยตรง (direct extraction procedure) ในการทดลองนี้ได้มีการพัฒนาการสกัดจากเซลล์ (extraction methodology) ตามวิธีการของ Volossiouk et al. (1995) การทดลองได้ใช้ข้อดี skim milk ซึ่งเป็นตัวนำพา (carrier) ซึ่งสามารถลดลักษณะเงาและ humic ที่ปนเปื้อนได้ เพราะพบว่าดีเอ็นเอไม่สามารถตรวจสอบได้เมื่อเพิ่มปริมาณของตัวอย่างดินเป็น 10 กรัม หรือประยุกต์ขั้นตอนในการ freeze-thawing 2 ครั้งก่อนการเติม liquid nitrogen ซึ่งเกิดขึ้นในหลายการทดลองรวมทั้งการทดลองนี้ด้วย

เมื่อใช้วิธีการทั่วไปในการสกัดพบว่าต้องใช้เวลานานโดยวิธีการดั้งเดิมต้องใช้ปริมาณตัวอย่าง 60-90 กรัมและต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วันกว่าจะสำเร็จ (Trosvik, 1980) ได้มีการสกัดจากเซลล์ที่ใช้การแยกชั้นของแบคทีเรียซึ่งพัฒนาโดยการใช้เทคนิค fractionated-centrifugation (ถูกแสดงครั้งแรกโดย Faegri *et al.*, 1977) fractionated centrifugation จะทำให้เนื้อดินผสมเข้าอย่างดีกับ buffer salt solution ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำซึ่งจะตกตะกอนอนุภาคดินและ mycelia ของราเหลือไว้เฉพาะเซลล์แบคทีเรียในส่วนของเหลว เซลล์จะถูกทำให้แตกด้วย lysozyme และ SDS ที่อุณหภูมิสูง ดีเอ็นเอถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย hydroxyapatite column (Trosvik, 1980) อุปสรรค์อีกข้อหนึ่งก็คือการกระจายของเซลล์จาก aerosolization และไม่ได้มีการป้องกันการหกในระหว่างการบดและ ขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง (Jacobsen *et al.*, 1992)

ความยากที่เกิดขึ้นเกิดจากความแตกต่างของคุณลักษณะของเซลล์และอนุภาคของดินที่ช่วยปกป้องไม่ให้เซลล์จากขบวนการการแตกเซลล์ (Forstegard *et al.*, 1999) กลุ่มแบคทีเรียที่ต่างกันจะมีประสิทธิภาพในการยึดติดกับอนุภาคดินได้แข็งแรงแตกต่างกัน (Prieme *et al.*, 1996) ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแสดงส่วนประกอบของสังคมแบคทีเรียในตัวอย่าง ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนวิธีการสกัดจากการสกัดจากเซลล์ (cell extraction) เป็นการสกัดโดยตรง (direct extraction) (เช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น) ซึ่งมีรายงานไว้ว่าสามารถลดปัญหาโดยสามารถแตกเซลล์ที่มีลักษณะต่างกันได้ (Briglia *et al.*, 1996).

3.3 การพัฒนาวิธีการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (Development of DNA purification protocol)

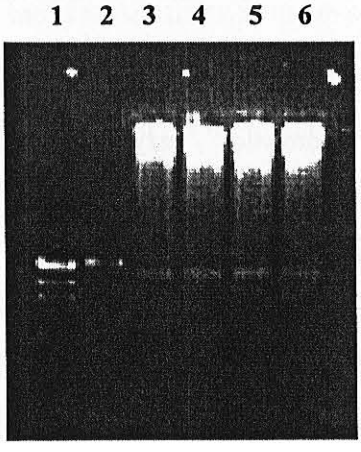
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมมักจะมีการปนเปื้อนของสารประกอบอินทรีย์ ขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดินคือการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ซึ่งจะช่วยให้ดีเอ็นเอสามารถถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ restriction endonuclease (Zhou *et al.*, 1996) hybridization analysis (Alm, Zheng, and Raskin, 2000), และการเพิ่มปริมาณด้วยขบวนการ PCR (Jackson *et al.*, 1997)ได้ดีขึ้น สารประกอบอินทรีย์สามารถสกัดออกมาได้พร้อมกับดีเอ็นเอ ดังนั้นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จึงมีความสำคัญในการตรวจหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอ ความสามารถในการแยกดีเอ็นเอออกจากสารประกอบอินทรีย์จะแปรผันในขั้นตอนต่างๆซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการจับกับ polymeric matrix หรืออนุภาคที่มีขนาดต่างกันของสารประกอบอินทรีย์และดีเอ็นเอ วิธีการนี้มีประสิทธิภาพสูง มีความรวดเร็วและง่ายต่อการทำ

ในปี ค.ศ. 1996 Zhou และคณะได้อธิบายว่าการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย single- หรือ double-minicolumn จะได้ดีเอ็นเอถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ restriction endonuclease ได้ไม่สมบูรณ์และไม่เหมาะสมในการทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการ PCR เพราะจะได้ประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีราคาถูกและรวดเร็ว Zhou และคณะได้รายงานว่าการใช้วิธีการ gel plus column จะให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่า

จากข้อมูลดังกล่าวการทดลองนี้ได้ใช้ Sephacryl S-300 microspin column gel electrophoresis ร่วมกับ Freeze N Squeeze microspin column ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพราะวิธีการดังกล่าวมีความรวดเร็ว พบว่า DNA eluent จาก spin column ไม่สามารถถูกกำจัดสีได้สมบูรณ์

และผลของดีเอ็นเอแสดงออกมาเป็นสีน้ำตาลแกมเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการปนเปื้อนของกรด humic ดังนั้นในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ควรทำโดยการใช้ 2nd Sephacryl column

เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ DNA eluent จาก spin column ถูกทดสอบโดย agarose gel electrophoresis และสกัดออกจากเจลโดย Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column การใช้ Gel electrophoresis ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบโดยการส่องใต้ UV-light intensities จะสามารถประมาณปริมาณของดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ได้ ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเนื่องจากการลดลงของกรด humic ในการใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น 4 ug ต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง)



รูปที่ 3.6 ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากตัวอย่างดินที่ได้จากนาข้าวซึ่งสกัดด้วยวิธีการ direct extraction แบบที่สาม Lane 1: λ DNA marker ที่มี Hind III, Lane 2: λ DNA marker, Lane 3-6: DNA บริสุทธิ์ (ซึ่งได้จากดิน 0.25 g ต่อ lane)

ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินจากนาข้าวประมาณว่ามีดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 9 fg ต่อเซลล์ (Ingraham *et al.*, 1983) ถ้าสมมุติให้ค่านี้สามารถใช้ได้กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างดินจากนาข้าวจะมีประมาณ 8.62 ng ของ DNA ต่อกรัมดินซึ่งสูงกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดคือประมาณ 3.992 ug ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากอาจมีดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตอื่นในตัวอย่างดินซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการเพาะด้วย PCA medium ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาซึ่งได้รายงานไว้ว่า มีแบคทีเรียตามธรรมชาติเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Amann *et al.*, 1994-5; Ferguson *et al.*, 1984; Rondon *et al.*, 1999;

Roszak *et al.*, 1987) ทฤษฎี 'viable but nonculturable' (VBNC) ได้เสนอไว้ว่าแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้อาจสามารถแสดงผลออกมาได้แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการปกติได้ (Barer *et al.*, 1993; Colwell, 1993) ปริมาณของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในระดับไมโครกรัมโดยใช้ตัวอย่างดินประมาณ 10 g โดยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่มีความสามารถในการตัดดีเอ็นเอเฉพาะที่ แต่ไม่สามารถแยกระหว่างดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในดินหรือดีเอ็นเออิสระได้ ประมาณว่า 99% ของดีเอ็นเอที่สามารถสกัดได้มาจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินที่ความหนาแน่นประมาณ 10^9-10^{10} เซลล์ต่อ 100 g ของตัวอย่างดิน อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมสามารถเพาะเลี้ยงได้เพียงน้อยกว่า 10% ภายใต้สภาพแวดล้อมที่จำลองขึ้นในห้องทดลอง ดีเอ็นเอจากทั้งที่อยู่ภายนอกเซลล์ และที่อยู่ภายในเซลล์อาจคงสภาพอยู่ในดินหรือในน้ำได้เป็นเวลานาน (Doblhoff-Dier *et al.*, 2000)

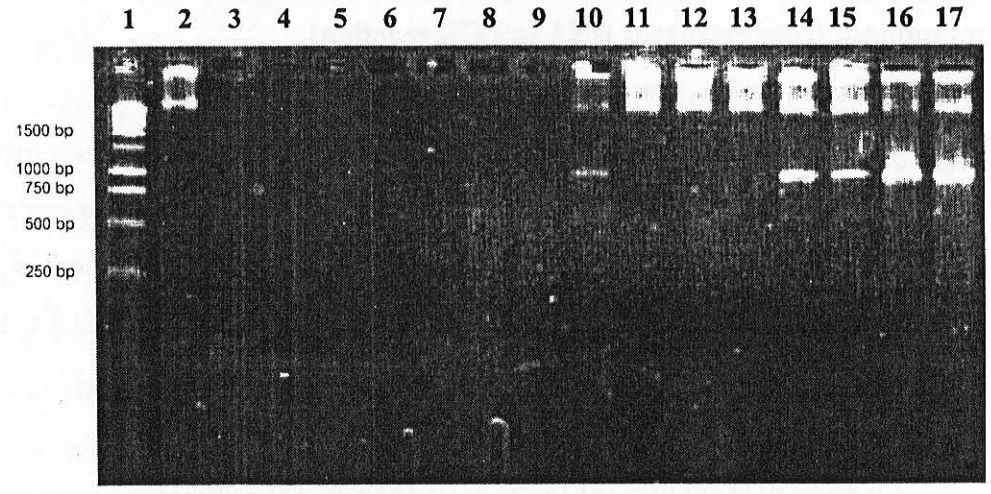
นอกจากนั้นผลของดีเอ็นเอที่ได้อาจมาจากเซลล์ที่ตายแล้วซึ่งดีเอ็นเอและโปรตีนถูกย่อยออกมาจากอิทธิพลของ hydrolytic enzymes ดีเอ็นเอย่อยอาจหลุดออกมาและมีสภาพเป็น depolymerization และอาจอยู่ในลักษณะที่เป็น oligomers ที่ขนาด 10^4 bp ในสภาพปกติเช่นในแบคทีเรียหรือในสิ่งมีชีวิตที่สูงกว่า ดีเอ็นเอจะจับตัวอยู่กับ ligands โดยเฉพาะโปรตีน ภายในเซลล์จะไม่มีดีเอ็นเออิสระหรือดีเอ็นเอเปล่า ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอออกมาภายนอกเซลล์ ดีเอ็นเอจะจับกับโปรตีนในดินหรือโครงสร้างของดินอย่างเช่นในโคลน ดังนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกเซลล์จึงไม่อยู่ในลักษณะที่หรือบริสุทธิ์ ลักษณะของ 'extracellular DNA' หรือ 'foreign DNA' จึงถูกใช้เปรียบเทียบเมื่อต้องการจำแนกออกจาก 'intracellular DNA' (Doblhoff-Dier *et al.*, 2000).

วิธีการนี้สามารถพัฒนาเพื่อตรวจสอบดินชนิดต่างๆได้แต่ควรมีการพัฒนาต่อไปเพราะ Sephacryl S-300 microspin column มีราคาแพง ในหนึ่งตัวอย่างต้องใช้ต้นทุนในส่วนนี้ประมาณ 750 บาท

3.4 การยับยั้งผลของการปนเปื้อนของ DNA ในกระบวนการ PCR (Inhibitory effect of contaminant from extracted DNA to PCR reaction)

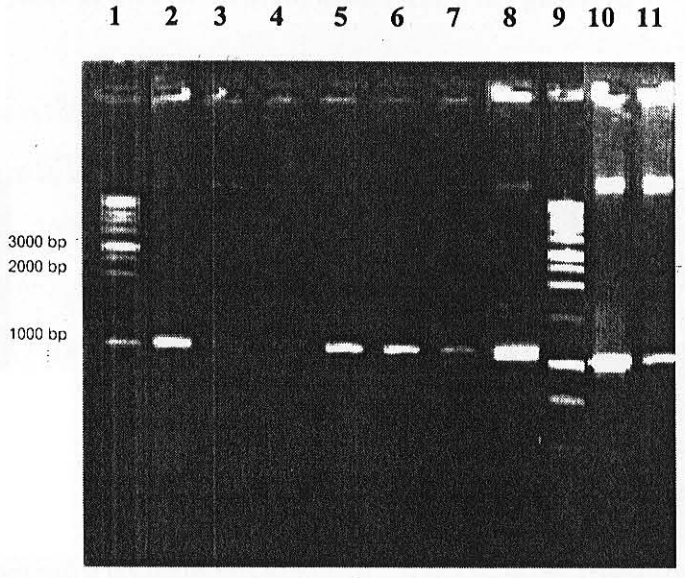
นับตั้งแต่พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีส่วนของสารอินทรีย์อื่นถูกสกัดปนเปื้อนออกมา (Moran *et al.*, 1993; Ogram *et al.*, 1995) จึงต้องมีการลดผลกระทบนี้ด้วยการใช้ขบวนการ quantitive PCR amplification เพื่อให้แน่ใจคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดออกจากตัวอย่างดินจึงมีการใช้ PCR inhibitory assay ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ถูกใช้เป็น template แต่ยังมีส่วนที่เป็นกรด humic ซึ่งอาจจะยับยั้งขบวนการ PCR

การทดลองนี้ได้ออกแบบโดยใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จาก *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 ผสมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดิน RISA primer ถูกใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินจากนาข้าว, ป่าที่ยังไม่มีการรบกวน,ไร่มันสำปะหลัง, sediment, และ peat จากผลของ gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าแบนหลักจากขบวนการมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง template DNA ในดิน สารที่เป็น PCR inhibitors ยังคงอยู่ในขบวนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ soil template ของขบวนการ PCR จะให้ผลดีเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินจากนาข้าวร่วมกับดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่เพราะเลี้ยงในปริมาณต่ำเท่านั้น (รูปที่ 3.7 ใน lane 10-13) จากผลการทดลองนี้ดีเอ็นเอที่ได้จึงถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้ Sephacryl S-300 microspin column เพื่อลดสารปนเปื้อนที่ยังคงอยู่หลังจากแยกด้วย gel electrophoresis อย่างเช่น loading dye, EtBr, และ salinity of buffer ซึ่งดีเอ็นเอจากขบวนการ RISA PCR ได้ถูกใช้ในการทำให้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินและดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินผสมกับดีเอ็นเอจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วย (รูปที่ 3.7 ใน lane 14-17).



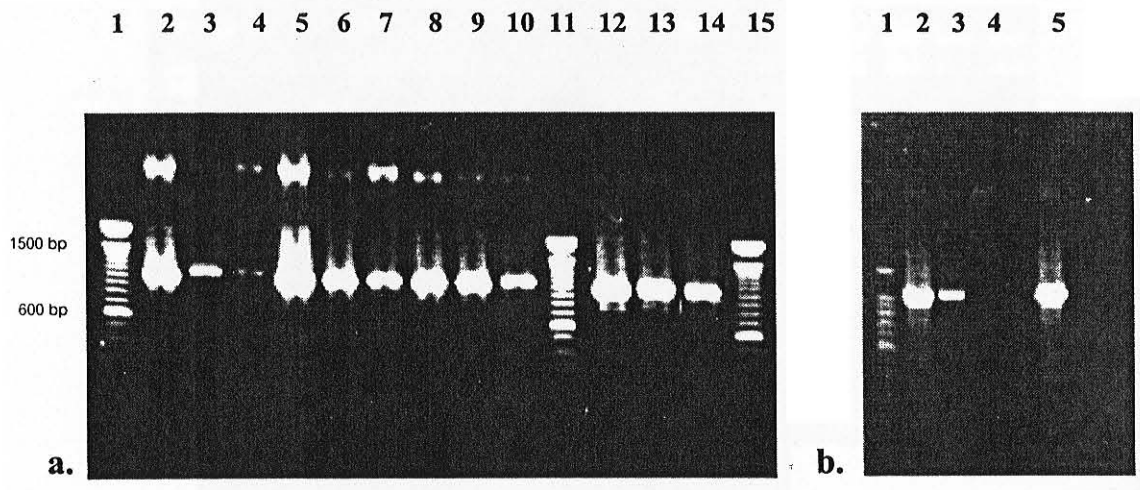
รูปที่ 3.7 ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินจากนาข้าว ซึ่งถูกเติมDNAซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 50 ng Lane 1: 1 kb marker, Lane 2 และ 17: positive control, Lane 3-5: PCR products from soil DNA as a template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 6-9: PCR products from soil DNA ซึ่งผ่าน 3rd Sephacry column (1, 3, 5, 7 µl, ตามลำดับ), Lane 10-13: PCR products from soil DNA ซึ่งถูกเติม DNA จาก pure culture เป็น template (1, 3, 5, 7 µl, ตามลำดับ), Lane 14-16: PCR products จาก soil DNA ซึ่งผ่าน 3rd Sephacry column และถูกเติมด้วย DNA จาก pure culture เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ)

ขบวนการ PCR ของ DNA template ต่างๆ แสดงผลเมื่อใช้ RISA-PCR ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด ดังนั้นจึงอาจสามารถเพิ่มผลได้เมื่อทำการ dilution เพราะสารยับยั้งที่ปนเปื้อนอยู่ถูกลดลง เมื่อพิจารณาถึงชนิดของตัวอย่างดิน กรด humic ที่ปนเปื้อนออกมาในดีเอ็นเอที่สกัดจากป่าที่ยังไม่ได้รับการรบกวนมีมากกว่าตัวอย่างดินอื่น แสดงว่ามีสารประกอบอินทรีย์ปนอยู่สูงกว่า แต่สารอินทรีย์มีผลยับยั้งขบวนการ PCR เพียงเล็กน้อยเท่านั้นซึ่งเห็นได้จากการทดลองที่แสดงปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่าในตัวอย่าง sediment (รูปที่ 3.8)



รูปที่ 3.8 ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินต่างๆซึ่งถูกเติมDNAซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 50 ng Lane 1 และ 9: 1 kb marker, Lane 2-4: DNA จากตัวอย่างดินจากป่าที่ยังไม่มีการรบกวนซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 5-7: DNA จากตัวอย่างดินจากไร่มันสำปะหลังซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 8,10, และ 11: DNA จาก sediment ซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ)

เมื่อใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าการใช้ sephacryl S-300 microspin column ร่วมกับ electrophoresis purification methods ให้ผลของขบวนการ PCR ที่สูงกว่าเมื่อใช้ตัวอย่างจากทุกตัวอย่างในปริมาณต่ำสุด และให้ผลลดลงเมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอสูงขึ้น (รูปที่ 3.9a) อย่างไรก็ตามตัวอย่างจาก peat จำเป็นต้องได้รับการเจือจางถึง 100 เท่า (รูปที่ 3.9b) ดังนั้นการใช้วิธีการที่แสดงนี้สามารถใช้ในการลด PCR inhibiting substances ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดลองพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถให้ผลการทดลองที่ดีแม้จะมีสารอินทรีย์ (ตารางที่ 3.1) ในทุกตัวอย่างดิน เมื่อดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่าง peat ซึ่งมีสารอินทรีย์อยู่มากที่สุดถูกทำให้บริสุทธิ์และใช้เป็น template ผลของขบวนการ PCR แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการทำ dilutions ซึ่งจะทำให้ได้ผลดีขึ้น อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอที่มีสารอินทรีย์อยู่ต่ำสามารถใช้ในขบวนการ PCR ได้เลยโดยที่ไม่ต้องทำการ dilution จากผลการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกันในตัวอย่างดินทั้งสามชนิดซึ่งมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในช่วง 1.07-4.25%



รูปที่ 3.9 (a.) ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก DNA ที่ถูกสกัดมาโดยตรงจากตัวอย่างดินต่างๆ ซึ่งถูกเติมDNAซึ่งสกัดจาก pure culture ของ *Pseudomonas aeruginosa* 50 ng . Lane 1, 11, และ 15: 100 bp marker, Lane 2-4: DNA จากตัวอย่างดินจากป่าที่ไม่มีการรบกวนซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 5-7: DNA จากตัวอย่างดินจากไร่มันสำปะหลังซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 8-10: DNA จากตัวอย่างดินจากนาข้าวซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 12-1: DNA จากตัวอย่าง sediment ซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ)

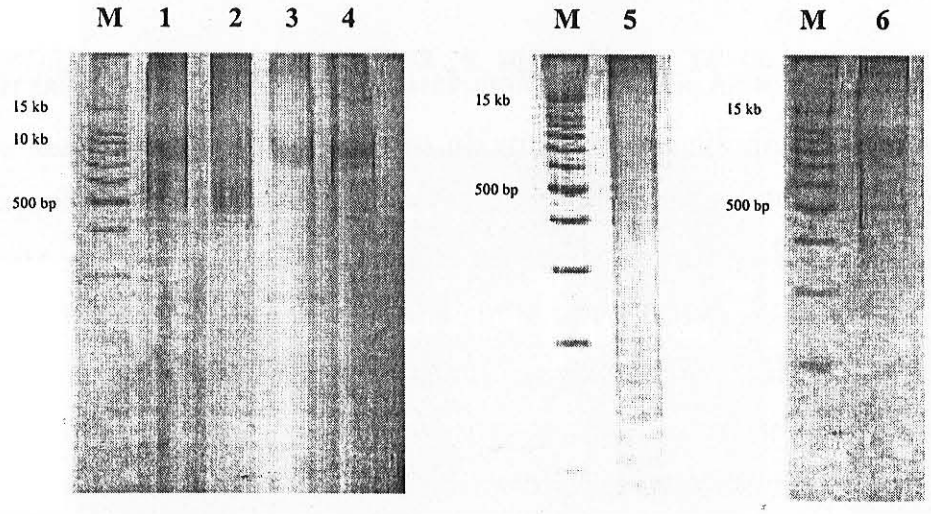
(b.) ผลของ RISA-PCR ที่ได้จาก 100-fold dilution DNA ซึ่งถูกสกัดโดยตรงจาก peat samples ซึ่งถูกเติมด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจาก pure culture ของ *Pseudomonas aeruginosa* 50 ng. Lane 1: 100 bp marker, Lane 2-4: DNA จากตัวอย่าง peat sample ซึ่งถูกใช้เป็น template (1, 3, 5 µl, ตามลำดับ), Lane 5: เฉพาะ DNA ที่สกัดได้จาก pure culture ของ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งถูกใช้เป็น template

3.5 การแสดงการวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์

ในทุกวันนี้การใช้ RISA primer เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย ซึ่งมีความรวดเร็วสำหรับใช้ตรวจโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินที่นิยมใช้ในหลายการวิจัย (Borneman *et al.*, 1997; Robleto *et al.*, 1988; Ranjard *et al.*, 2000) โดยระยะยืน 16S และ 23S จะมีช่วงว่างที่มีความผันแปรอย่างสูงทั้งในระดับเบสและความยาว ซึ่งทำให้สามารถนำมาเป็นเครื่องมือที่ดีและง่าย (Garcia-Martinez, Martinez-Murcia, Anton and Rodriguez-Velera, 1996) ความแตกต่างระหว่างประชากรของจุลินทรีย์ที่พบในบริเวณที่อยู่อาศัยต่าง ๆ ได้แก่ บริเวณทุ่งนา ป่าไม้ที่ยังไม่ถูกรบกวน ไร่มันสำปะหลัง ตะกอนดิน และพืช จะแสดงให้เห็นโดยแบน (banding) ของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ RISA ในแต่ละตัวอย่าง (รูปที่ 3.10) แต่ละชนิดของดินจะแสดงให้เห็นว่าดินแต่ละชนิดจะมีประชากรจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งแวดล้อม ซึ่งความแตกต่างนี้จะแสดงให้เห็นว่าแต่ละชนิดดินจะมีประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ และจะมีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างประชากรแบคทีเรีย

ข้อจำกัดสำคัญของเทคนิคนี้เกิดจากรูปแบบที่ไม่แน่นอนของขนาดช่องว่างในชุดยีนและสิ่งที่ไม่สามารถคาดเดาได้โดยบางสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมากสามารถมีขนาดเหมือนกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสก็จะเป็นสิ่งเพิ่มเติมที่สามารถจะแก้ปัญหาได้โดยส่วนมาก โดยการใช้วิธีนี้จะลดทั้งต้นทุนและเวลา สำหรับลายพิมพ์นิ้วมือของประชากรจุลินทรีย์ พบว่าความหลากหลายที่สามารถอธิบายลักษณะได้นั้น จะถูกจำกัดโดยจำนวนความแตกต่างของความยาวในระหว่างช่องว่างในชุดยีน ซึ่งจะทำให้เกิดข้อจำกัดสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในระบบบรรพบุรุษ ตัวอย่างเช่น กลุ่มแบคทีเรียหลักทั้งหมด เป็นต้น (Gercia-Maritinez *et al.*, 1999)

สำหรับการแก้ปัญหาบางปัญหา เช่น ขนาดที่เท่ากัน ก็จะมีการวิเคราะห์ขั้นต่อไปโดยใช้การแบ่งแยกด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic identification) ซึ่งทำได้โดยเมื่อได้แบนที่เกิดจากการใช้ไพเมอร์ RISA แล้วก็จะนำไปแยกด้วยอะกาโรสเจล แล้วตัดแบนที่เหมือนกันออกมา นำมาแยกให้บริสุทธิ์และทำการโคลนดีเอ็นเอ และทำ sequencing บริเวณ SSU rRNA อีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ก็คือ บริเวณส่วนมากของ SSU rRNA จะให้ข้อมูลที่ดีในการทำ phylogenetic โดยจะนำออกมาเป็นไพรเมอร์สำหรับทำ PCR โดยจะออกแบบให้สามารถจับได้กับลำดับเบสที่สนใจและเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ได้ดี (Universal rRNA primer) (Borneman *et al.*, 1997)



รูปที่ 3.10 การย้อม RISA-PCR product ด้วยวิธีการ Silver staining

Lane 1: DNA สกัดจากนาข้าว

Lane 2: DNA สกัดจากป่า

Lane 3: DNA สกัดจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง

Lane 4: DNA สกัดจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

Lane 5: DNA สกัดจาก sediment

Lane 6: DNA สกัดจาก peat

Lane M: DNA มาตรฐาน 100 bp

นอกจากนี้ก็ได้มีความพยายามเพื่อศึกษาภาพรวมของความหลากหลายของโครงสร้างในประชากรจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis และ Temporature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) มาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ (Muyzer *et al.*, 1993) เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างดินจึงมีการพัฒนาระบบต่าง ๆ เพื่อใช้ในการศึกษา ซึ่งวิธีการจะอาศัยพื้นฐานของการแยกดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอจะถูกแยกโดยสารเคมีต่าง ๆ เช่น ยูเรีย เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว และหลังจากนั้นก็นำไปทำ electrophoresis โดยใช้โพลีอะครีลามาย โดยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวในเจลจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างลำดับที่สองของดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกกำหนดโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปลี่ยนแปลงในการเคลื่อนที่ของวิธีนี้ Electrophoresis mobility) อาจจะเกิดจากการเกิดโครงร่างตาข่ายระหว่างเจลดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Kumeda และ Asao, 1996) ซึ่งทั้งสองเทคนิคนี้เคยมีรายงานว่าสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงและให้ข้อมูลเกี่ยวกับลายพิมพ์ที่ใกล้เคียงของประชากรจุลินทรีย์ (Heuer และ Smalla,

1997) ดังนั้น ทั้งสองวิธีก็เป็นแนวทางที่สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากรจุลินทรีย์ได้ นอกจากวิธี DGGE และ TGGE แล้ว Peters, Koschimsky, Schwieger และ Tebbe (2000) ยังได้พัฒนาวิธีการที่เรียกว่า Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP) (Hayashi, 1991; Orita, Iwahana, Kanazawa, Hayashi และ Sekyia, 1989) เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์โดยไม่ต้องมีการเลี้ยงเชื้อ (Schwieger *et al.*, 1998) ในทางกลับกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค DGGE และ TGGE แล้ววิธี SSCP ไม่จำเป็นต้องใช้ GC clamp หรือเครื่องมือในการทำ gradient gels ดังนั้นวิธีการ SSCP จึงมีศักยภาพและง่ายในการนำมาใช้มากกว่าทั้งสองวิธีการที่กล่าวมาแล้ว (Lee *et al.*, 1996)

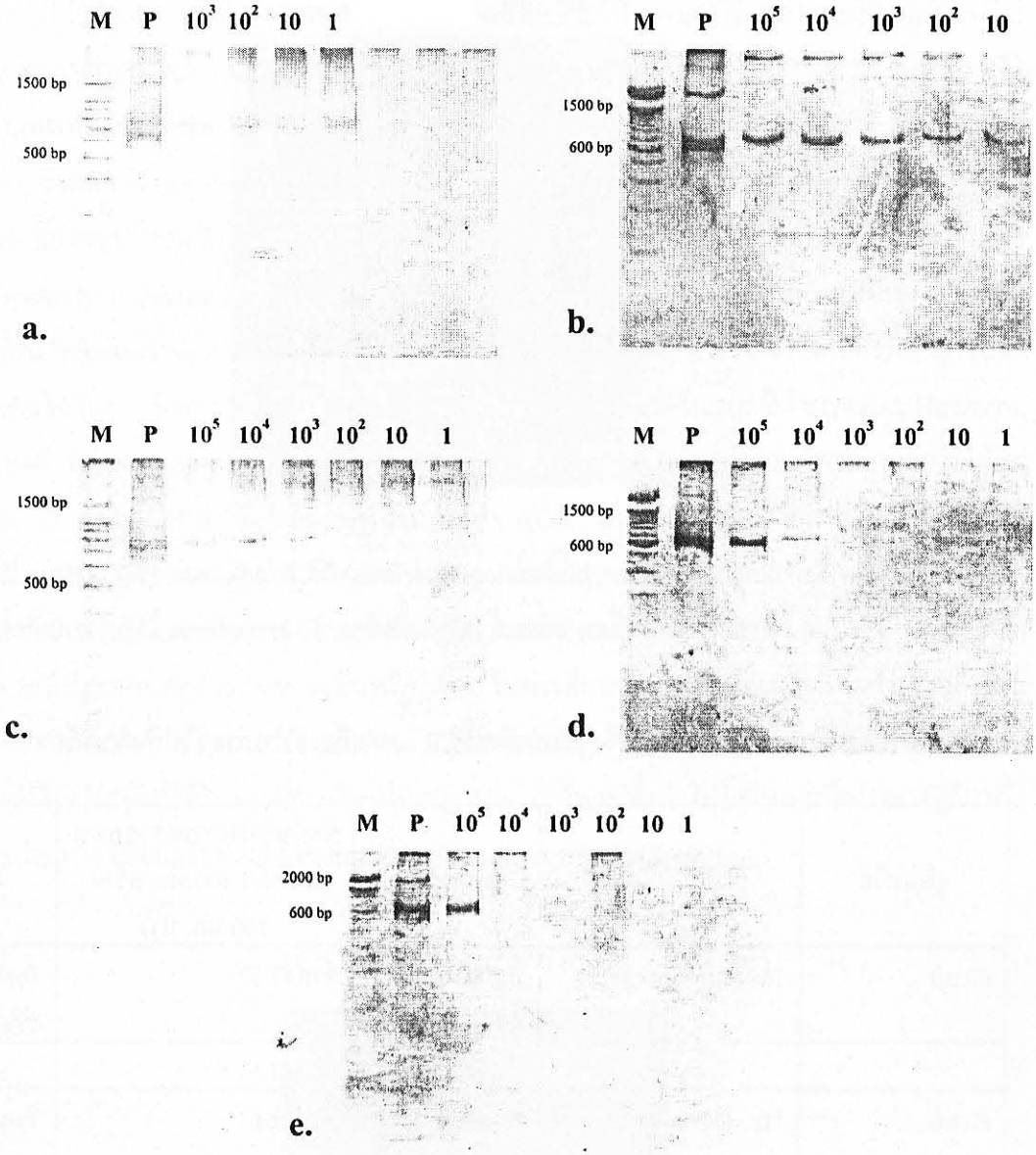
วิธีการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของประชากรจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ทั่วไปก็คือ การแยกผลของ PCR โดยใช้วิธี DGGE ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในระดับโมเลกุล (Muyzer *et al.*, 1993; Teske, Wawer, Muyzer และ Ramsing, 1996: Kowalchuck *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องการโพลีอะครีรามายเจลชนิดพิเศษ และใช้เครื่องมือในการทำ electrophoresis แบบเฉพาะเพื่อความสะดวก โดยทั่วไปขนาดของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วงประมาณ 300 ถึง 1500 bp ซึ่งดีเอ็นเอขนาดนี้ต้องการอะกาโรสที่มีความเหมาะสมจึงแนะนำไปใช้อะกาโรสที่มีความสามารถในการแยกได้ดี เช่น Nusieve^{R} หรือ Methaphor อย่างไรก็ตามการใช้อะคีรามายเจลหรือ automatic sequencer ก็จะทำให้ได้ผลที่ชัดเจนและสามารถนำมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบและแยกได้อย่างถูกต้อง (Hian *et al.*, 1997)

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือโดยใช้ไพรเมอร์ RISA สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบเป็นคู่ ๆ โดยใช้วิธี manual ได้ซึ่งจะดูจากผลที่เป็นลบ และเมตริกซ์ (โดยดูจากการมี และไม่มีแบน นอกจากนี้ก็ดูความสัมพันธ์ของแต่ละแบน) ในการวิเคราะห์แบบนั้นจะต้องคำนึงถึงความเข้มข้นด้วย ถ้าขนาดเท่ากัน แต่ความเข้มข้นไม่เท่ากันก็แสดงว่าไม่เท่ากัน หลังจากนั้นจะวัดระยะแบบ Euclidian โดยใช้คอมพิวเตอร์ และวิเคราะห์บรรพบุรุษของจุลินทรีย์ตามระบบ agglomerative second-order moment algorithm ซึ่งวิธีนี้จะเรียกว่า ทฤษฎีของ Ward (Ward, 1963)

3.6 ข้อจำกัดของวิธีการตรวจสอบ

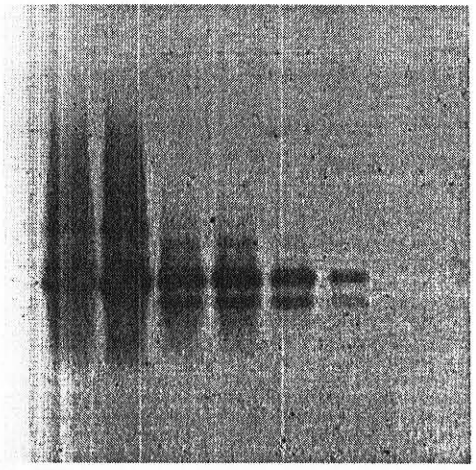
เมื่อกำหนดข้อจำกัดของวิธีการดังกล่าวมาแล้วนั้นจึงได้มีการนำเซลล์ *P. aerugimosa* มาใส่ในตัวอย่างดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 1 กรัม โดยจะมีการเพิ่มเซลล์ลงไปในตัวอย่างดินจำนวนแตกต่างกัน (ดูรายละเอียดในวัสดุอุปกรณ์และวิธีการ) หลังจากนั้นก็นำมาสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยทำตามขั้นตอนที่ 3 ดังได้แสดงไว้แล้ว โดยในรูปที่ 3.11 แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สนใจซึ่งจะมีค่า 1, 10, 10^3, 10^4 และ 10^5 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างข้อจำกัดในการตรวจสอบของ PCR กับจำนวนสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ PCR สามารถตรวจสอบได้ถึงจำนวนต่ำกว่า 1 เซลล์ต่อ 1 กรัมตัวอย่างดิน ในดินที่มีสารอินทรีย์อยู่โดยเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน

นอกจากนี้การใช้เทคนิค Southern blot hybridization เพื่อยืนยันผลที่เกิดจากวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RISA จากตัวอย่างดินบริเวณนาข้าวแทนวิธี sequencing ได้ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *P. aerugimosa* มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RISA มาทำเป็นดีเอ็นเอติดตาม (Probe) ซึ่งการทดลองนี้จะพิสูจน์ให้เห็นว่าแบนที่พบจากการทดลองข้อจำกัดของการตรวจสอบนั้นไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนจากสิ่งอื่น ๆ หรือเกิดจากเป้าหมายที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งผลการ hybridization จะลดลงเมื่อลดจำนวนเซลล์ที่ใส่ลงไปในตัวอย่าง ซึ่งผลก็จะสอดคล้องกับที่เกิดขึ้นจากการทดลองข้อจำกัดในการตรวจสอบ



รูปที่ 3.11 แสดง detection limit โดยใช้ RISA-PCR จากดินแหล่งต่าง ๆ (a.) sedimt (b.) นาข้าว (c.) พื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง (d.) พื้นที่ป่า (e.) Peat Lane M: 100 bp โดยมี DNA ของ *P. aeruginosa* เป็นแม่แบบ

P 10^5 10^4 10^3 10^2 10 1



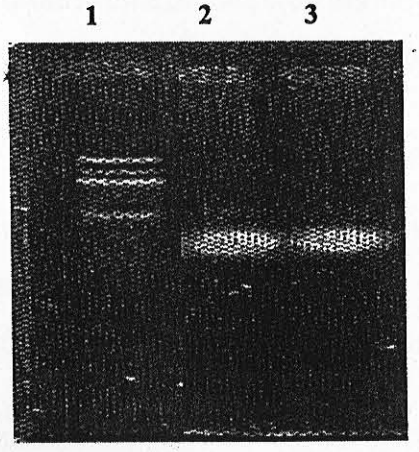
รูปที่ 3.12 Southern blot hybridization ของ RISA-PCR products โดย DNA ได้มาจากดินนาข้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปลูกเชื้อด้วย *P. aeruginosa* ในปริมาณต่าง ๆ

ตารางที่ 3.8 แสดงตัวอย่างของการใช้เทคนิค PCR แสดงถึงระบบต่างๆในสิ่งแวดล้อม

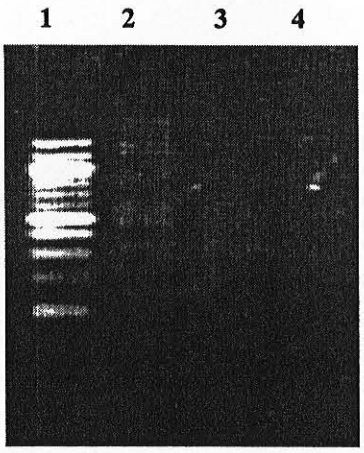
จุลินทรีย์	ยีนที่เป็นโพรบ	แหล่งที่อยู่	ข้อจำกัดในการตรวจสอบ (เซลล์/1 กรัมดิน หรือ/ 100 มล. น้ำ)	เอกสารอ้างอิง
E.coli	16s ribosomal gene	ตะกอนดิน	ต่ำกว่า 10	Tsai และคณะ 1992a
		ดิน	ต่ำกว่า 3	
E.coli	16s ribosomal gene	ตะกอนดิน	ต่ำกว่า 1	Tsia และคณะ 1992b
Raisobium	Npt II	ดิน	1-10	Pillai และคณะ, 1991
Pseudomonas Fluorescen R2f	Pat	ดิน	0.602	Van Elsas และคณะ, 1991
Framkia spp.	16s ribosomal gene	ดิน	0.2-10^5 genome	Picard และคณะ, 1992
P. putida Vam 13	Mer A	ดิน	4.3X 10^4	Tsai และคณะม 1991
P. aeruginosa	ช่องว่างที่อยู่ระหว่าง rRNA	ดิน, ตะกอนดิน, และพืช	1-10^5 ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของดิน	ในการทดลองนี้

3.7 การตรวจสอบโดยใช้ Primer amplification อื่น

อย่างไรก็ตาม ไพเมอร์ชนิดอื่นก็ถูกนำมาทดสอบโดยไม่ทราบสปีชีร์ของเซลล์ที่ใส่เพิ่มลงไป เพื่อตรวจสอบกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สนใจจากดีเอ็นเอที่ถูกสกัดมาแล้ว ใช้ไพเมอร์ *nif D* ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสที่มีความจำเพาะ เป็นเอกลักษณ์ ของแบคทีเรียที่ตรึงในโตรเจนแบบอิสระ *Azotobacter vinelandii* ซึ่งผลของ nif D-PCR สามารถที่จะใช้แบ่งแยกแผนภาพความหลากหลาย (Phylogenetic diversity) ของกลุ่มที่ตรึงในโตรเจนได้ (Aehr, Mellon และ Zani, 1998) ส่วนไพเมอร์ชนิดอื่น คือ Short Tendemly Repeated Repetitive sequence (STRR) ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสที่มีความเหมือนและซ้ำๆกัน (repeated repetitive sequence) ของ heterocygous cyanobacteria ซึ่งไพเมอร์นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกจำนวนมากของจีนัสและสปีชีส์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Mazel, Houmard, Castets และ Taodeau de Marsac, 1990) ในรูปที่ 3.13 และ 3.14 แสดงผลของ PCR จากการใช้ไพเมอร์ nif D และ STRR ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ PCR จะสกัดโดยตรงจากดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง และ นาข้าว ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าไม่เพียงแต่ไพเมอร์ RISA เท่านั้นที่สามารถใช้จำแนกดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ แต่ไพเมอร์อื่นๆก็สามารถนำมาใช้ในการศึกษาระบบนิเวศที่ประกอบอยู่ด้วยกันของจุลินทรีย์ได้ ในการศึกษาแบคทีเรียที่สนใจที่พบในตัวอย่างดินนั้น ต้องมีการเลือกใช้ไพเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าทฤษฎีของการใช้ไพเมอร์ที่มีความรวดเร็วนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาในหลายๆงาน รวมทั้งนำไปใช้ในการศึกษาทางจุลินทรีย์โมเลกุลและ การวินิจฉัยโรค (Geldrich, 1995; Volossiouk และคณะ, 1995)



รูปที่ 3.13 *nifD*-PCR products ที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง Lane 1: 100 bp marker, Lane 2-3: PCR Products



รูปที่ 3.14 STRR-PCR products ที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากนาข้าว Lane 1: 100 bp marker, Lane 2: PCR products (template เป็น DNA จาก pure culture ของ Cyanobacteria), Lane 3-4: PCR products (template เป็น DNA ที่สกัดจากดิน)

บทที่ 4
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดินโดยตรงโดยใช้ *in situ* cell lysis แล้วตามด้วยการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และการวัดปริมาณ (quantification) เป็นวิธีการใหม่ซึ่งสามารถใช้ศึกษาจุลินทรีย์ในดินโดยสามารถหลีกเลี่ยงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีปัญหาซึ่งขัดขวางการตรวจสอบความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในดิน อย่างเช่นขบวนการ lysis ไม่สามารถใช้ได้ในบางสิ่งมีชีวิตซึ่งอาจเป็นเพราะว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสกัดหรือ อาจเป็นเพราะว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวได้รับการปกป้องจากโครงสร้างของดิน ในการทดลองนี้ได้แสดงวิธีการที่เหมาะสมที่สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินชนิดต่างๆ วิธีการได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้เอ็นไซม์ lysozyme และ proteinase-K และตามด้วยขบวนการ alkali treatment และ physical disruption ขบวนการสกัดใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง ในการสกัดแบบThe direct extraction จะได้ปริมาณดีเอ็นเอบริสุทธิ์ประมาณ 4 μg ต่อกรัมของดิน (น้ำหนักแห้ง)

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Sephacryl S-300 microspin column เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ยังต้องได้รับการปรับปรุง โดยเฉพาะเมื่อศึกษาดินที่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์สูง ในการตรวจสอบผลของสารปนเปื้อนซึ่งมีผลยังยั้งต่อขบวนการการสกัดดีเอ็นเอและขบวนการ PCR พบว่าดีเอ็นเอซึ่งได้จากตัวอย่างในพีทแสดงการยับยั้งสูงที่สุดในขบวนการสกัดและตรวจสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากตัวอย่างอื่น ดีเอ็นเอจากพีทต้องการอย่างน้อย 100-folds dilution เพิ่มเติมเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในขบวนการ PCR ได้

ในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ในขบวนการ PCR ในการตรวจสอบตัวอย่างดินทุกๆตัวอย่างสามารถใช้ RISA primer ได้โดยใช้ 10% acrylamide electrophoresis ซึ่งจะสามารถแยกแยะความแตกต่างของความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ต่างๆในตัวอย่างดินจากสิ่งแวดล้อมได้

ในการทดลองนี้ได้มีการพัฒนาความละเอียดในการตรวจสอบ และความสามารถในการตรวจสอบสามารถตรวจสอบได้ในความละเอียดอย่างน้อย 1 เซลล์ ต่อกรัมดินเมื่อทดลองใน *P. aeruginosa.* ซึ่งทำให้วิธีการในการตรวจสอบโดยสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินนี้สามารถให้ผลการสกัดดีเอ็นเอที่สูง และสามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบจาก humic ที่ปนเปื้อนได้ ซึ่งทำให้ได้ผลจากแบคทีเรียที่ต้องการสูงกว่า จากขบวนการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงและขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ดังกล่าว วิธีการนี้สามารถให้ผลได้อย่างรวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับผู้ที่ตรวจสอบความสัมพันธ์ของยีนโดยวิธีการ *in situ* ได้ วิธีการดังกล่าวนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักวิทยาศาสตร์ที่ต้องการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ถูกเปลี่ยนทางพันธุกรรมเมื่อต้องการปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

Acinas, S.G., Anton, J., and Rodriguez-Valera, F. (1999). Diversity of free-living and attached bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 514-522.

Alm, E.W., Zheng, D., and Roskin, L. (2000). The presence of Humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4547-4554.

Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., and McCarthy, P. (1985). Appendix A. In John Wiley and Sons (eds.). **Humic substances in soil, sediment, and water.** NY: New York.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1994). Identification of Uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. **ASM News.** 60: 360-365.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** 59: 143-169.

Andersson, S.G.E., and Kurland, C.G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. **Trends Microbiol.** 6: 263-268.

Barer, M.R., Gribbon, L.T., Harwood, C.R., and Nwoguh, C.E. (1993). The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. **Rev. Med. Microbiol.** 4: 183-191.

Barns, S.M., Takala, S.L., and Kuske, C.R. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial Kingdom *Acidobacterium* in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1731-1737.

Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** 196: 80-83.

Black, C.A. (ed.). (1965). Methods of Soil Analysis. **American Society of Agronomy.** Madison. Wis: (n.p.).

Borneman, J., and Triplett, E.W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2647-2653

Briglia, M., Eugen, R.I.L., De Vos, W.M., and Van Elsas, J.D. (1996). Rapid and sensitive method for the detection of *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1 in soil based on 16S rRNA gene-targeted PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1478-1480.

Colwell, R.R. (1993). Nonculturable but still viable and potentially pathogenic. **Zentralbl. Bakteriol.** 279: 154-156.

Condon, C., Squires, C., and Squires, C.L. (1995). Control of rRNA transcription *in Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.** 59: 623-645.

DeGrang, V., and Bardin, R. (1995). Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. **Appl. Environ. Microbial.** 61: 2093-2098.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., and Kuske, C.R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1662-1669.

Edgcomb, V.P., McDonald, J.H., Devereux, R., and Smith, D.W. (1999). Estimation of bacterial cell numbers in Humic Acid-Rich Salt Marsh Sediments with probes directed to 16S Ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1516-1526.

El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., and Top, E.M. (1999). Effect of Phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 982-988.

Engelen, B., Meinken, K., Witzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, P.H., and Backhaus, H. (1998). Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by catabolic and genetic fingerprint in addition to conventional testing procedures. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2814-2821.

Faegri, A., Torsvik, V.L., and Goksoyr, J. (1977). Bacterial and fungal activities in soil separation of bacteria by a rapid fractionated centrifugation technique. **Soil Biol. Biochem.** 9: 105-112.

Ferris, M.J., Muyzer, G., and Ward, K.M. (1996). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a Hot Spring Microbial Mat community. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 340-346.

Felske, A., Akkermans, A.-D.L., and De Vos, W.M. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in Temperature Gradient Gel Electrophoresis Fingerprints. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4581-4587.

Ferguson, R.L., Buckley, E.N., and Palumbo, A.V. (1984). Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 49-55.

Fisher, M.M., and Triplett, E.W. (1999). Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to Freshwater bacterial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4630-4636.

Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clearc, S., Bernillon, D., le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., and Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5409-5420.

Garcia-Martinez, J., Martinez-Murcia, A.J., Anton, A.I., and Rodriguez-Valera, F. (1996). Comparison of the small 16S to 23S Intergenic Spacer Region (IRS) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. **J. Bacteriol.** 178: 6374-6377.

Geldreich, E.E. (1995). **Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems.** , Boca Raton, Fla: CRC Press.

Gerard, M., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.

Guo, C., Sun, W., Harsh, J.B., and Ogram, A. (1997). Comparison of concentrations of genes involved in aromatic hydrocarbon degradation in contaminated and non-contaminated soils. **Microb. Ecol.** 34: 178-187.

Gurtler,V., and Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA Spacer. **Microbiology.** 142: 3-16.

Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., and Rainey, F.A. (1997). Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacers. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 202-206.

Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA . **PCR Methods Appl.** 1: 34-38.

Herrick, J.B., Madsen, E.L., Batt, C.A., and Ghiorse, W.C. (1993). Polymerase Chain Reaction Amplification of Naphthalene-Catabolic and 16S rRNA gene sequences from Indigenous sediment bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 687-694.

Herrick, J.B., Miller, D.N., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C. (1996). Extraction, Purification, and Amplification of Microbial DNA from Sediments and Soils, In J.F. Burke (ed.), **PCR; essential techniques.** (pp. 130-133). New York. NY: John Wiley and Sons.

Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., and Smalla, K. (1999). Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1045-1049.

Heuer, H., and Smalla, K., (1997). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) for Studying Soil Microbial Communities. In J.D. van Elsas, E.M.H. Wellington, and J.T. Trevors (eds.). **Modern Soil Microbiology.** (pp. 353-373). NY: Marcel Dekker.

Holben, W.E. (1994). Isolation and Purification of Bacterial DNA from Soil. In R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum (eds.), **Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties.** (pp. 727-751). Madison, Wis: Soil Science Society of America.

Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., and Tiedje, J.M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 703-711.

Holger, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington, E.M.H. (1997). Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic separation in Denaturing Gradients. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3233-3241.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., and Pace, N.R. (1998). Impact of Culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bacteriol.** 180: 4765-4774.

Ingraham, J.L., Maaloe, O., and Neidhardt, F.C. (1983). **Growth of the Bacterial Cell.** (pp. 1-48) Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

Jackson, C.R., Happer, J.P., and Churchill, P.F. (1997). A Simple, efficient method for the separation of Humic substances and DNA from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4993-4995.

Jacobsen, C.S. (1995). Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3347-3352.

Jacobsen, S.C., and Rasmussen, O.F. (1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacterial from soil with cation-exchange resin. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2458-2462.

Jensen, M.A., Webster, J.A., and Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphism. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 945-952.

Johnsen, K., Enger, O., Jacobsen, C.S., Thirup, L., and Torsvik, V. (1999). Quantitative selective PCR of 16S Ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1786-1789.

Jones, J.G. (1977). The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of Planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. **Freshwater Biol.** 7: 67-91.

Khan, A.A., Jones, R.A., and Cerniglia, C.E. (1998). Rapid method for the detection of genetically engineered microorganisms by Polymerase Chain Reaction from soil and sediments. **J. Inds. Microbiol. Biochem.** 20: 90-94.

Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P-J.L., Felske, A., Stephen, J.R., and Arkhipchenko, I.A. (1999). Molecular analysis of Ammonia-Oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 396-403.

Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.L.M., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W. (1997). Analysis of Ammonia-Oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S Ribosomal DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1489-1497.

Kuske, C.R., Bonton, K.L., Adorada, D.L., Stark, P.C., Hill, K.K., and Jackson, P.J. (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2463-2472.

Kumeda, Y., and Asao, T. (1996). Single-Strand Conformation Polymerphism Analyis of PCR-amplified Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers to differentiate species of Aspergillus section flavi. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2947-2952.

Lee, D.H., Zu, Y.G., and Kim, S.J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-Single Strand Conformation Polymorphysm. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3112-3120.

Lee, S.-Y., Bollinger, J., Bezdicek, D., and Ogram, A. (1996). Estimation of the abundance of an Uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:3787-3793.

Leff, L.G., Dana, J.R., McArthur, J.V., and Shimkets, L.J. (1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1141-1143.

Liesack, W., and Stackebrandt, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. **J. Bacteriol.** 174: 5072-5078.

Liesack, W., Weyland H., and Stackebrandt, E. (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict Barophilic Bacteria. **Microb. Ecol.** 21: 191-198.

Linton, D., Dewhirst, F.E., Clewey, J.P., Owen, R.J., Burnens, A.P., and Stanley, J. (1994a). Two types of 16S rRNA gene are found in *Campylobacter helveticus*: analysis, applications and characterization of the intervening sequence found in some strains. **Microbiology.** 140: 847-855.

Linton, D., Clewey, J.P., Burnens, A., Owen, R.J., and Stanley, J. (1994b). An intervening sequence (IVS) in the 16S rRNA gene of the eubacterium *Helicobacter canis*. **Nucl. Acids Res.** 22: 1954-1958.

Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining Terminal Restriction Fragment Length Polymerphisms of genes encoding 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:4516-4522.

Lovell, C. R., and Piceno, Y. (1994). Purification of DNA from estuarine sediments. **J. Microbiol. Methods.** 10: 161-174.

Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Jr., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., and Woese, C.R. (1999). A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucl. Acids Res.** 27: 171-173.

Marsh, T.L. (1999). Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion Microbiol.** 2: 323-327.

Mazel, D., Houmard, J., Castets, A.M., and Taodeau De Marsac, N. (1990). Highly repetitive DNA sequences in Cyanobacterial genomes. **J. Bacteriol.** 172: 2755-2761.

McCaig, A.E., Glover, L.A., and Prosser, J.I. (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1721-1730.

Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4715-4724.

Moran, M., Torsvik, V.L., Torsvik, T., and Hodsen, R.E. (1993). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 915-918.

More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., and Madsen, E.L. (1994). Quantitaive cell Lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1572-1580.

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1994). Estimation of diversity and community structure through Restriction Fragment Length Polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, Hydrothermal Vent system, Loihi Seamonunt, Hawaii. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 871-879.

Munson, M.A., Nedwell, D.B., and Embley, T.M. (1997). Phylogenetic diversity of *Archaea* in sediment samples from a coastal salt marsh. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4729-4733.

Muyzer, G. 1998. Structure, Function and Dynamics of Microbial Communities: The Molecular Biological Approach. In G.R. Carvalho (ed.). **Advances in molecular ecology.** (pp. 87-118). Amsterdam, The Netherlands: IOS Press.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion Microbiol.** 2: 317-322.

Muyzer, G., De Wall, E., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.

Nold, S.C., Kopczynski, E.D., and Ward, D.M. (1996). Cultivation of Aerobic Chemoorganotrophic Proteobacteria and Gram-Positive bacteria from a Hot Spring Microbial Mat. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3917-3921.

Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M., and Simonet, P. (1996). ITS Analysis of Prokaryotes. **Molecular Microbial Ecology Manual.** (pp. 1-12). (n.p.).

Ogram. A. (1998). Isolation of Nucleic Acids from Environmental Sources. In: Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., Sayler, G. (eds.). **Techniques in Microbial Ecology.** (pp. 273-288). New York: Oxford University Press.

Ogram, A. (2000). Soil molecular microgial ecology at age 20: Mehodological challenges for the future. **Soil Biol. Biochem.** 32: 1499-1504.

Ogram, A., Sayler, G.S., and Barkay, T.J. (1987). DNA extraction and purification from sediments. **J. Microbiol. Meths.** 7: 57-66.

Ogram, A., Sun, W., Brockman, F.J., and Fredrickson, J.K. (1995). Isolation and characterization of RNA from low-biomass Deep-Subsurface sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 763-768.

Oliver, J.D., Nilsson, L., and Kjelleberg, S. (1991). Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2640-2644.

Olsen, G.J., Lane, D.L., Giovannoni, S.J., and Pace, N.R. (1986). Microbial ecology and evolution: A Ribosomal RNA approach. **Annu. Rev. Microbiol.** 40: 337-365.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekyia, T. (1989). Detection of Polymorphisms of human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphysms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 86: 2766-2770.

Ovreas, L., and Torsvik, V. (1999). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microb. Ecol.** 36: 303-315.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.L., and Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. **Adv. Microbiol. Ecol.** 9: 1-55.

Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P. (1992). Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and Polymerase Chain Reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2717-2722.

Pillai, S.D., Josephson, K.L., Bailey, R.L., Gerba, C.P., and Pepper, I.L. (1991). Rapid method for processing soil samples for Polymerase Chain Reaction Amplification of specific gene sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2283-2286.

Pisabarro, A., Correia, A., and Martin, J. (1998). Characterization of the *rrnB* Operon of the plant pathogen *Rhodococcus fascians* and targeted integrations of Exogenous genes at *rrn* Loci. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1276-1282.

Prieme, A., Sitaula, J.I.B., Klemedtsson, A.K., and Bakken, L.R. (1996). Extraction of Methan-Oxidizing bacteria from soil particles. **FEMS Microbiol. Ecol.** 21: 59-68.

Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H., and Stackebrandt, E. (1996). *Clostridium paradoxum* DSM 7308 contains multiple 16S rRNA genes with Heterogeneous Intervening Sequences. **Microbiology.** 142: 2087-2095.

Ranjard, L., Poly, F., and Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using Culture-Independent molecular techniques: Application to soil environment. **Res. Microbiol.** 151: 1-11.

Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, A.R., Gourbiere, F., Thioulonse, J., and Nazaret, S. (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA Fingerprinting approach (RISA). **Microbiol. Ecol.** 39: 263-272.

Rasmussen, U., and Svening, M.M. (1991). Fingerprinting of Cyanobacteria based on PCR with primers derived from Short and Long Tandemly Repeated Repetitive Sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 265-272.

Robleto, E.A., Borneman, E.A., and Triplett, E.W. (1998). Effects of bacterial antibiotic production on Rhizosphere microbial communities from a Culture-Independent perspective. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 5020-5022.

Rondon, M.R., Goodman, R.M., and Handelsman, J. (1999). The Earth's Bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity. **TIBTECH.** 17: 403-408.

Roszak, D.B., and Colwel, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiol. Rev.** 51: 365-379.

Roth, A., Fischer, M., Hamid, M.E., Machalke, S., Ludwig, W., and Mauch, H., (1998). Differentiation of Phylogenetically related slowly growing Mycobacteria based on 15S-23S rRNA gene Internal Transcribed Spacer sequences. **J. Clin. Microbiol.** 36: 139-147.

Sandaa, R.A., Enger, O., and Torsvik, V.L. (1998). Rapid method for Fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biol. Biochem.** 30: 265-268.

Schwieger, F., and Tebbe, C.C. (1998). A new approach to utilize PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4870-4876.

Selenska, S., and Klingmuller, W. (1991). DNA recovery and direct detection of *Tn5* sequences from soil. **Lett. Appl. Microbiol.** 13: 21-24.

Sievert, S.M., Brinkhoff, T. Muyzer, G., Ziebis, W., and Kuever, J. (1999). Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a Shallow Submarine Hydrothermal Vent near Milos Island (Greece). **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3834-3842.

Simonet, P., Grosjean, M.-C., Misra, A.K., Nazaret, S., Cournoyer, B., and Normand, P. (1991). Frankia genus-specific characterization by Polymerase Chain Reaction-Mediated Amplification. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3278-3286.

Smalla, K., Cresswell, N. Mendonca-Hagler, L.C., Wolters, A., and Van Elsas, J.D. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for Polymerase Chain Reaction-Mediated Amplification. **J. Appl. Bacteriol.** 74: 78-85.

Smit, E., Leeflang, P., and Wernars, K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by Copper contamination using Amplified Ribosomal DNA Restriction analysis. **FEMS Microbiol. Ecol.** 23: 249-261.

Smith, G.B., and Tiedje, J.M. (1992) Isolation and characterization of a Nitrite Reductase gene and its use as a probe for Denitrifying bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 376-384.

Stackebrandt, E., and Rainey, F.A. (1995). Partial and Complete 16S rDNA Sequences, Their use in Generation of 16S rDNA Phylogenetic Trees and Their Implications in Molecular *Ecological Studies.* ***Molecular Microbial Ecology Manual*** *(pp.* 1-17). Kluwer, Dordrecht. (n.p.).

Steffan, R.J., Goksoyr, J., Bej, A.K., and Atlas, R.M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2908-2915.

Stumm, W., and Morgan, J.J. (1996). In John Wiley & Sons (eds.). **Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters.** (3rd ed.). NY: New York.

Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., and Ramsing, N.B. (1996). Distribution of Sulfate-Reducing bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1405-1415.

Torsvik, V.L. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil. Biol. Biochem.** 12: 15-21.

Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L. (1990). High diversity of DNA of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 782-787.

Torsvik, V.L., and Goksoyr, J. (1978). Determination of bacterial DNA in soil. **Soil. Biol. Biochem.** 10: 7-12.

Trevors, J.T., and Van Elsas, J.D. (1989). A review of selected methods in environment microbial genetics. **Can. J. Microbiol.** 35: 895-902.

Tsai, Y.-l., and Olson, B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1070-1074.

Tsai, Y.-l., and Olson, B.H. (1992a). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by Polymerase Chain Reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 754-757.

Tsai, Y.-l., and Olson, B.H. (1992b). Rapid method for separation of bacterial DNA from Humic substances in sediments for Polymerase Chain Reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2292-2295.

Van Elsas, J.D., Van Overbeck, L.S., and Fochier, R. (1991). A specific marker, pat, for studying the fate of introduced bacteria and their DNA in soil using combination of detection techniques. **Plant and Soil.** 138: 49-60.

Virginia, P.E., McDonald, J.H., Devereux, R. and Smith, D.W. (1999). Estimation of bacterial cell numbers in Humic Acid-Rich Salt Marsh sediments with probes directed to 16S Ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1516-1523.

Volossiouk, T., Robb, E.J., and Nazar, R.N. (1995). Direct DNA extraction for PCR-Mediated Assay of soil organisms. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3972-3976.

Wagner, M., Amann, R., Lemme, H., and Schleife, K.H. (1993). Probing Activated Sludge with Oligonucleotide specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for describing microbial community structure. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1520-1525.

Wang, G.C.-Y. and Wang. Y. (1997). Frequency of formation of Chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial Genomes. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4645-4650.

Ward, J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize and objective function. **J. Am. Stat. Assoc.** 58: 236-244.

Woese, C. (1987). Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** 51: 221-271.

Yoon, J.-H. Lee, S.T., Kim, S.-B. Goodfellow, M., and Park, Y.-H. (1997). Inter- and Intraspecific Genetic Analysis of the Genus *Saccaharomonospora* with 16S to 23S Ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA Internally Transcribed Spacer Sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 661-669.

Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., and Hinton, S.M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-Agarose Gel Electrophoresis Purification of Polymerase Chain Reaction-Amplifiable DNA from soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1972-1974.

Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 316-322.

Zehr, J.P., Mellon, M.T., and Zani, S. (1998). New Nitrogen-Fixing microorganisms detected in Oligotrophic Oceans by amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 3444-3450.

CURRICULUM VITAE

NAME	: Associate Professor Dr.Neung Teaumroong
NATIONALITY	: Thai
SEX	: Male
DATE AND PLACE OF BIRTH	: July 21 1965, Bangkok
POSITION	: Head of Research Department Institute of Agicultural Technology (April 1999-present)
ADDRESS	: School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000 E-mail : neung@ccs.sut.ac.th Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

CURRENT RESEARCH

: Development of Detection System for Soil Bacteria by Using DNA Direct Extraction Method
: Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of Rhizobia
: Study of Rhizobial Behavior By Using the Molecular Genetics Approaches
: Biodiversity of N_2-Fixing Microorganisms and VAM in Thailand
: Biodiversity of Wild Mushrooms in North-East Area of Thailand
: Mannitol Production for Rhizobium Cultivation from Agricultural Waste
: Investigation of diazotrophic endophytic in Thai rices

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
"Breeding of Nitrogen Fixing Bacteria in Southeast Asia "
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
"Using Molecular Biology Techniques to Detect Rhizobium in Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
"Rhizobial Strain Improvement and on Farm Management for High N_2 Fixation in Forage Legumes"
: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
"Population Changes in N_2-Fixing Microorganisms as Affected by Changing in Ecosystem Process"
: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
"Mushroom Diversity in Tub-Lan National Park"
: Suranaree University of Technology (1993-2001)
"Using *Gus* Gene for Studying Rhizobial Behavior in Ecosystem"
"Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique"

"DNA Fingerprint of Wild Edible Mushrooms in Northeastern Part of Thailand"
"Biodivesity and selection of High effeciency Nitrogen Fixing Bacterial Endophyte in Rice"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (2000-2003)
"Development of techniqe for nitrogen fixing and phosphorus uptake microorganisms in legumes by using molecular genetics approaches."

PUBLICATIONS

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Teaumroong, N., K. Teamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada

University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and S. Rodtong. 2000. ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- Applied Microbiology
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- Biosafety
- Food Microbiology
- Fermented Food Products
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology
: Thai Inventor Association

SELECTED PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")
- International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), September 6-11, 1992. Barcelona, Spain. (**Poster presentation** in "DNA Direct Extraction from Soil to Detect DCD-Degrading Soil Bacterium.")
- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on " Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in " Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.
- 10th International Congress on Nitrogen Fixation. ST. Petersburg, Russia. May 28-June 3, 1995. (**Poster presentation**: in "Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of *Bradyrhizobium* spp. in Thailand")
- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation** : in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")
- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation** : "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation** : in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- 11th International Congress on Nitrogen Fixation. 20-25 Jul.1997 Institue Pasteur, Paris (**Poster presentation**: in "Using Gus Reporter Gene to Detect Applied *Bradyrhizobium* in the Field and Effect of Inoculantion Methods on Nodulation, N_2 fixation and Yield of Soybeans Under Field Condition.")

- Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 Junly 1998. Hua-Hin, Thailand. (**Poster presentation** : in "A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest.")
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC "Sustainable Development of Biotechnology in Tropics". 3-4 November 1998, Manila, Philipines. (**Oral presentation** : in "Characterization of *Desmanthus virgatus* Rhizobial Strains Isolated from Thai Soil.")
- 10th Annual Meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy". 25-27 November 1998, Bangkok, Thailand. (**Oral Presention** : in "The Prospectus of School of Biotechnology, SUT, Towards N_2-fixing Microbes Research in Thailand.")
- 10th Annual meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998, Bangkok. (**Poster presentation** : in "Characterization of Rhizobial Isolated from *Desmanthus virgatus"*)
- 12th International Congress on N_2-fixation 12-17 September 1999, Iguacu, Brazil. (**Poster presentation** : in "Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand.")
- 8th International Symposium on Nitrogen fixation with Non Legumes. 3-7 December 2000, The University of Sydney, NSW, Australia. (**Oral presentation** : in "Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under ecosystems of Thailand.")
- 8th International Symposium on Nitrogen fixation with Non Legumes. 3-7 December 2000, The University of Sydney, NSW, Australia. (**Poster presentation** : in "Population dynamics and polygenetic diversity of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from diversed soil ecosystems in Thailand.")
- Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, University of Hong Kong, Hong Kong, Chaina. (**Poster presentation** : in "Using Agricultural Wastes For *Tricholoma crassum* Production.")
- The Fifth ESAFS International Conference on Rice Environments and Rice Products 27-31 May 2001, Krabi, Thailand. (**Oral presentation** : in "The Diazotrophic Endophytic Bacteria In Thai Rice.")
- 13th International Congress on N_2-fixation 2-7 July 2001,Hamilton, Ontario, Canada. (**Poster presentation** : in "Application of Tree Legume Rhizobia for Reforestation Programme in Thailand:I. Selection and Management of Rhizobia for Tree Legumes")
- 13th International Congress on N_2-fixation 2-7 July 2001,Hamilton, Ontario, Canada. (**Poster presentation** : in "Application of Tree Legume Rhizobia for Reforestation Programme in Thailand:II. Biodiversity of Tree Legume Rhizobia in Thailand")

FELLOWSHIPS

- "UNESCO" : Post Graduate Programme (1989-1990) in Microbiology and Biotechnology. University of Tokyo.
- "MONBUSHO" : Research in "Molecular Genetic of Acid Tolerance *Rhizobium"*. Hiroshima University, Hiroshima, Japan. (October 24-December 23, 1994.)
- "AUSTRIA GOVERNMENT" : Research in "Investigation of Siderophores from Bacteria". University of Innsbruck, Austria. (May 1-June 30 1995)
- "JSPS" : Research in "Construction of Cholesterol Oxidase Gene for Using as Rhizobium Reporter Gene". Osaka University, Japan (12 Jan-25 Feb 1998)
- "MONBUSHO" : Research in "Construction of Green Fluorescent Protein Gene for Detecting Rhizobium" Osaka University, Japan.(December 7, 1998 - January 21, 1999)
- "JSPS" : Research in "Homologous recombination of GFPin Rhizobium" Osaka University, Japan (March 13, 2000- March 31, 2000)
- "The Royal Golden Jubilee program" (2000)