ศศิธร อินทร์นอก : การประยุกต์ใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอเพื่อติดตามพฤติกรรมของไซยาโนแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (APPLICATION OF DNA TECHNIQUES TO MONITOR CYANOBACTERIAL BEHAVIOUR IN ENVIRONMENTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 291 หน้า. ISBN 974-533-551-7

ทำการตรวจสอบพฤติกรรมของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอ โดยการศึกษาครั้งนี้ แบ่งไซยาโนแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ microcystins และไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอในการติดตามความอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 *Microcystis viridis* สามารถผลิตสารพิษที่ชื่อว่า microcystins ในทะเลสาบเซนบะ ประเทศญี่ปุ่น จากการศึกษาการบำบัดน้ำโดยใช้ ultrasonic radiation และ jet circulation ร่วมกับการกำจัดน้ำออกโดยอาศัยน้ำในแม่น้ำ ซึ่งวิธีดังกล่าวจะทำลาย gas vacuole ของไซยาโนแบคทีเรีย ทั้งนี้ได้สกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินตะกอน เพื่อใช้ในการติดตามความคงอยู่ของ *M. viridis* ภายหลังจากการบำบัดน้ำแล้ว โดยใช้ primer 3 คู่ได้แก่ rRNA intergenic spacer (RISA), DNA dependent RNA polymerase (*rpo*C1) และ *rpo*C1 fragment ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Microcystis* มาใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจโดยเทคนิค PCR ผลการศึกษาจากแต่ละ primer จะแสดงโดยอาศัยพื้นฐานของ single strand conformation polymorphisms (SSCP) นอกจากนี้ยังใช้ *rpo*C1 fragment ที่จำเพาะกับ *Microcystis* มาทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) จากการศึกษา ไม่พบแบบแผน DNA ของ *Microcystis* ในตัวอย่างดินตะกอนที่นำมาศึกษา อย่างไรก็ตามยังได้ใช้เทคนิค terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) โดยใช้ชุดยีน 16S rRNA พบว่าแบบแผน DNA ของ 16S rRNA ในดินตะกอนมีขนาด 91 และ 477 bp ซึ่งพบในแบบแผน DNA ของ *Microcystis* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I และ *Msp*I แต่ไม่พบแบบแผน DNA ที่ขนาด 75 bp ซึ่งเป็น DNA หลักของ *Microcystis* โดยพบทั้งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I และ *Msp*I ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *M. viridis* น่าจะสลายไปจากทะเลสาบแห่งนี้ หลังจากมีการบำบัดด้วย ultrasonic radiation และ jet circulation

กลุ่มที่ 2 ศึกษา *Nostoc* sp. สายพันธุ์ VICCR1-1 ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงถึง 11 µmolC_2H_4/h/mg chlorophyll a ซึ่งแยกได้จากพื้นที่ปลูกข้าวสลับกับพืชไร่ โดยนำมากระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ heterocysts และ akinetes โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในสภาวะที่ขาด $CaCl_2$ จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ heterocysts สูงถึง 46.61% และหากนำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน มาเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนและ $CaCl_2$ พบว่าจะมีเซลล์ heterocysts เพิ่มสูงถึง 62.59% จากการศึกษาโปรตีนที่สร้างภายในเซลล์ในสภาวะที่ส่งเสริมการสร้างเซลล์ heterocysts พบ โปรตีนขนาด 72 KDa ซึ่งมี

เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ chaperonin GroEL (HSP60 family) และขนาด 140 KDa ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ phycobilisome core-linker protein ในสภาวะที่มี และไม่มีแหล่งอาหารไนโตรเจน ส่วนโปรตีนขนาด 45 KDa ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ outer membrane protein (porin) จะสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งอาหารไนโตรเจนและ$CaCl_2$ เมื่อทำการศึกษาการกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ akinetes พบว่าฟอสฟอรัสและเหล็ก มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ akinetes โดยเฉพาะในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารทั้งสองพร้อมกัน โดยจะมีการสร้างเซลล์ akinetes สูงถึง 21.17% เมื่อเปรียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสภาวะปกติ (อาหาร $BG11_0$)อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ heterocysts (*het*R) และ akinetes (*sod*F และ *ava*K) พบว่าการศึกษาการแสดงออกของ *het*R เพียงยีนเดียวไม่เพียงพอต่อการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง heterocysts ส่วน *sod*F และ *ava*K ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสร้าง akinetes ไม่สามารถตรวจวัดได้ในการศึกษานี้

ได้ทำการทดสอบการงอกของเซลล์ akinetes ในสภาวะเครียด พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถงอกได้ที่ pH ระหว่าง 3-10 อุณหภูมิสูงถึง 40°C และความเข้มข้นของเกลือที่ 0.5 M NaCl แม้จะอยู่ในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 7 วัน หากนำเซลล์ akinetes ไปผสมกับแร่ดินมอนต์มอริลโลไนต์ในอัตรา 4.0×10^6 cfu/กรัมของแร่ดินมอนต์มอริลโลไนต์ ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ในรูปดังกล่าวได้นานเป็นปี โดยในสัปดาห์ที่ 56 จะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ 3.3×10^5 cfu/กรัมของแร่ดินมอนต์มอริลโลไนต์ เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่นาด้วยจำนวน 2.8×10^6 cfu/ตารางเมตร (ตร.ม.) ผลผลิตหลังเก็บเกี่ยวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในแปลงที่มีปุ๋ยเคมีไนโตรเจน แปลงที่มีไซยาโนแบคทีเรีย และแปลงที่มีหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย เมื่อติดตามปริมาณของหัวเชื้อที่ใส่ในพื้นที่นาโดยวิธี MPN-DGGE บนชุดของยีน 16 S rRNAพบว่า หลังเก็บเกี่ยวจะยังคงมีเชื้อดังกล่าวอยู่ในจำนวน 1.0×10^7 cfu/ตร.ม., 2.5×10^5 cfu/ตร.ม. และ 1.62×10^6 cfu/ตร.ม. ในแปลงทดลองที่มีปุ๋ยเคมีไนโตรเจน แปลงที่มีไซยาโนแบคทีเรีย และแปลงที่มีหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย ตามลำดับ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา________
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา________
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม________

SASIDHORN INNOK : APPLICATION OF DNA TECHNIQUES TO MONITOR CYANOBACTERIAL BEHAVIOUR IN ENVIRONMENTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, DR. RER. NAT. 291 PP. ISBN 974-533-551-7

TOXIN-PRODUCING CYANOBACTERIA/N_2-FIXING CYANOBACTERIA/ DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)/TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP)/CYANOBACTERIAL INOCULUM

The cyanobacterial behaviours in environment were investigated on the basis of DNA techniques. Two groups of cyanobacteria were selected: microcystin producing cyanobacteria and N_2-fixing cyanobacteria. Firstly, *Microcystis*, known as toxic microcystin producing cyanobacteria, normally blooms in Senba Lake, Japan. Recently, this lake has been treated by ultrasonic radiation and jet circulation which were integrated with flushing with river water. This treatment was most likely sufficient for the destruction of cyanobacterial gas vacuoles. In order to confirm whether *M. viridis* still existed, a molecular genetic monitoring technique on the basis of DNA direct extraction from the sediment was applied. Three primer sets were used for polymerase chain reaction (PCR) based on a rRNA intergenic spacer analysis (RISA), the DNA dependent RNA polymerase (*rpo*C1) and a *Microcystis* sp.-specific *rpo*C1 fragment. The results from each primer were demonstrated on the basis of single strand conformation polymorphisms (SSCP). Moreover, the *Microcystis* sp.-specific *rpo*C1 fragment was further analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DNA pattern representing *M. viridis* could not be

detected in any of the sediment samples. However, the results were confirmed with another technique, terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP). Although T-RFLP patterns of 16S rDNA in sediment at 91 bp and 477 bp lengths were matched with the T-RFLP of *M. viridis* (*Hha*I and *Msp*I endonuclease digestion, respectively), the T-RFLP pattern of 75 bp length was not matched with *M. viridis* (both of *Hha*I and *Msp*I endonuclease digestion) which were the major T-RFLP pattern of *M. viridis*. Therefore, the results most likely indicated that *M. viridis* seems to have disappeared because of the addition of the ultrasonic radiation and jet circulation to the flushing treatment.

Secondly, *Nostoc* sp. strain VICCR1-1 was isolated from rice in rotation of other crops cultivation showed the highest nitrogen fixation efficiency about 11 µmol C_2H_4/h/mg total chlorophyll a. The *Nostoc* sp. strain VICCR1-1 was induced in order to form heterocysts and akinetes on basis of nutrient modification. Absence of $CaCl_2$ played the role of heterocyst differentiation which was induced as high as 46.61%. The number of heterocyst was induced up to 62.59% when transferred the cyanobacterial cells from BG11 to $BG11_0$ (without $CaCl_2$) medium. Proteins were extracted after heterocyst induction. There were 72 KDa and 140 KDa proteins expected to be chaperonin GroEL (HSP60 family) and phycobilisome core-membrane linker protein, respectively in both the medium with and with out N-source. Besides protein in size 45 KDa (expected to be outer membrane protein, porins) was up-regulated only when grown in $BG11_0$ (without $CaCl_2$) medium. In case of akinetes induction, phosphorus and iron were found to be the critical composition in akinete differentiation, especially when lack of both elements. The number of akinete cells could be increased up to 21.17% compared with culturing in normal condition ($BG11_0$ medium). The gene expression which involved heterocysts and akinetes

differentiation was observed based on *het*R (heterocyst differentiation), *sod*F and *ava*K (akinete development). The results suggested that only *het*R expression alone could not be the indicator for heterocyst development and *sod*F and *ava*K were not detected during akinete differentiation.

The germination of akinete cell was tested under various stress conditions. Cells could well germinate under the broad range of pH from 3 to 10, at high temperature as 40°C and high salinity as 0.5 M NaCl, eventhough grown on these conditions for 7 days. In order to prepare akinete inoculum, akinete cells were homogeneously mixed with montmorillonite clay at 4.0×10^6 cfu/g of montmorillonite clay. The akinetes could survive in the montmorillonite clay in constant number up to 1 year. The cells were still survived for 3.3×10^5 cfu/g of montmorillonite clay. To test the effect of *Nostoc* sp. strain VICCR1-1 as biofertilizer with rice, inoculum was applied in amount 2.8×10^6 cfu/m^2 in the field. After harvesting, the grain yields from chemical-N fertilizer, vegetative cells and akinete inoculum treatments were not significantly different. To monitor the persistence of *Nostoc* sp. strain VICCR1-1 after harvesting, the MPN-DGGE technique using 16S rRNA gene was employed. The results indicated that the remaining population is at 1.0×10^7, 2.5×10^5 and 1.62×10^6 cell/m^2 in treatments supplied N-fertilizer, vegetative cells and akinete inoculum, respectively.

School of Biotechnology | Student's Signature __________

Academic Year 2005 | Advisor's Signature __________

Co-advisor's Signature __________