

แบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงสารอนินทรีย์ ในดินกรดกำมะถันชุดดินรังสิต

Involving bacteria to Inorganic Substance Changes in an Acid Sulfate Soil (Rangsit Soil Series)

ทรายขาว วันนา¹, สวพร สุภผล², สุภกาญจน์ ล้วนมณี³ และ สมชัย อานุสนธิ์พรเพิ่ม^{1*}

Saikhaow Wanna¹, Savaporn Supaphol², Suphakarn Luanmanee³
and Somchai Anusontpornperm^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารอนินทรีย์ในดินกรดกำมะถันชุดดินรังสิตในสภาพรีดักชัน ด้วยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียกับสารอนินทรีย์ถูกเปลี่ยน ด้วยวิธี canonical correspondence analysis (CCA) ดำเนินการโดยวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของดิน และนำดินมาบ่มจำลองสภาพขังน้ำในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษา พบว่า ดินรังสิตมีเนื้อเป็นดินเหนียวและมีพีเอชเป็นกรดรุนแรงมาก (pH 4.3) ผลการศึกษา พบว่า ปริมาณไนเตรตในสารละลายดินลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +200 มิลลิโวลต์ลงไป และหมดไปเมื่อศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์เท่ากับ 0 มิลลิโวลต์ ปริมาณแมงกานีสที่ละลายน้ำได้ในดินเริ่มสูงขึ้นตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +200 มิลลิโวลต์ จนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 14 มก./กก. ที่ -150 มิลลิโวลต์ เหล็กในสารละลายดินเพิ่มขึ้นชัดเจนตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +150 มิลลิโวลต์ สำหรับปริมาณซัลเฟตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตั้งแต่ช่วงต้น สามารถแบ่งตามความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอนินทรีย์ในดินได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ 1) กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความเด่นในช่วงที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์อื่นๆ 2) กลุ่มที่สามารถอยู่ได้ทั้งที่มีออกซิเจน และเมื่อออกซิเจนหมดไป โดยสามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรต เหล็ก และแมงกานีส 3) กลุ่มที่มีความเด่นในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ตั้งแต่ +150 ถึง -250 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการรีดักชันของไนเตรต เหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีการรีดักชันของเหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต และ 4) กลุ่มที่มีพบในช่วงที่มีการรีดักชันเฉพาะของเหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต

คำสำคัญ: ดินกรดกำมะถัน, ชุดดินรังสิต, denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

ABSTRACT A study of the group of bacteria that played a role in changing inorganic substances in an acid sulfate soil (Rangsit soil serie) was carried out using the denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) technique and the relationship between bacterial community and changed inorganic substances was examined using canonical correspondence analysis (CCA). Soil basic properties were analyzed and the soil was incubated under submerged condition in laboratory. This Rangsit soil had clayey texture and was extremely acid soil (pH 4.3). Result revealed that nitrate content decreased rapidly from the redox potential of +200 mV and entirely disappeared at 0 mV. Soluble manganese content in the soil increased from the redox potential of +200 mV and reached the maximum (14 mg/kg)

¹ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

² Greenworks - Al Barari, Dubailand, United Arab Emirates.

³ ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร นครสวรรค์ 60190

Nakhon Sawan Field Crops Research Center, Department of Agriculture, Nakhon Sawan 60190

* Corresponding author: somchai.a@ku.ac.th

at -150 mV. The amount of iron in soil solution clearly increased from the redox potential of +150 mV while sulfate tended to slowly increase from the beginning. It can be divided into, in accordance with the relationship between the group of bacteria and changed inorganic substances in the soil, four groups as follow; 1) the group dominant in the unchanged state of organic substances, 2) the group thriving in the condition both with or without oxygen that can reduce nitrate, iron and manganese, 3) the group dominating in the redox potential ranging between +150 - -250 mV of which the reduction of nitrate, iron, manganese and sulfate took place, especially in the cases of iron, manganese and sulfate, and 4) the group found only during the reduction of iron, manganese and sulfate.

Keywords: acid sulfate soil, denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

บทนำ

ดินกรดกำมะถัน หรือดินเปรี้ยวจัด คือ ดินที่มีสารไพไรต์ (pyrite) เมื่อผ่านกระบวนการออกซิเดชันจะทำให้เกิดกรดกำมะถัน และฤทธิ์ของความเป็นกรดมักจะรุนแรงพอที่จะเกิดอันตรายต่อพืชที่ปลูกได้ ดินชนิดนี้มักพบจาโรไซต์ (jarosite) ลักษณะสีเหลืองฟางข้าวที่ชั้นใดชั้นหนึ่งในหน้าตัดดิน (คณะกรรมการจัดทำพจนานุกรมปฐพีวิทยา, 2551) พบเป็นบริเวณกว้างในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ซึ่งส่วนใหญ่มีการใช้ประโยชน์เพื่อการทำนา

การทำนาเป็นการทำการเกษตรที่มีการขังน้ำตลอดฤดูปลูก เมื่อมีการขังน้ำออกซิเจนในดินจะหมดไป เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน จากนั้นจุลินทรีย์จะเลือกใช้สารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในดินเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจแทนออกซิเจน จึงทำให้เกิดการรีดักชันของสารอนินทรีย์ต่างๆ ตามลำดับดังนี้ รีดักชันของไนเตรต (NO_3^-) สารประกอบแมงกานีส (Mn^{4+}) เฟอร์ริก (Fe^{3+}) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) (Gao et al., 2002) มีผลทำให้เกิดการสูญเสียไนเตรต (NO_3^-) ซึ่งเป็นรูปของไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เกิดความเป็นพิษของเฟอร์รัส (Fe^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่มากจนเกินไป นอกจากนั้นยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอันเกิดขึ้นจากการปลดปล่อยแก๊สไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และแก๊สมีเทน (CH_4) ซึ่งเป็นแก๊สเรือนกระจกที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน (ทัศนีย์, 2550; Yu and Patrick, 2004)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินเป็นหลัก การศึกษา

ถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในดินกรดกำมะถัน โดยเฉพาะดินรังสิตที่ขังน้ำโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล จะทำให้ทราบชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการปัญหาที่เป็นผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของข้าวและสิ่งแวดล้อมในอนาคตได้

วิธีการศึกษา

การบ่มตัวอย่างดินและการเก็บสารแขวนลอยดิน

เก็บตัวอย่างดินชุดดินรังสิตซึ่งเป็นดินกรดกำมะถัน จากพื้นที่แปลงนา อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ที่ความลึก 0-30 ซม. เมื่อช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2551 มาวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของดิน และนำมาบ่มดินเพื่อจำลองสภาพขังน้ำ โดยผสมดินที่กับฟางข้าวบดละเอียด 1% ของน้ำหนักดินกับน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:8 (220 ก.: 1,760 มล.) แล้วบ่มดินไว้ในภาชนะ pH-Eh controlled unit (Attanandana, 2000) โดยภาชนะที่บรรจุดินเป็นทรงกระบอกความจุ 2 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เดิมแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ตลอดเวลาเพื่อไล่ที่แก๊สออกซิเจน ออกจากระบบ pH-Eh controlled unit ช่วยในการเร่งสภาพรีดักชัน บ่มดินไว้จนมีศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ลดลงเท่ากับ -250 มิลลิโวลต์ ในขณะที่ยังมีการเก็บสารแขวนลอยดิน โดยใช้หลอดฉีดยา ขนาดปริมาตร 25 มล. (Figure 1) โดยเก็บครั้งแรกเมื่อเริ่มบ่มและที่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ลดลงทุก 50 มิลลิโวลต์ จนถึง -250 มิลลิโวลต์ ครั้งละ 20 มล. จำนวน 3 ซ้ำ เก็บและกรองตัวอย่างดินในสภาพไร้ออกซิเจน

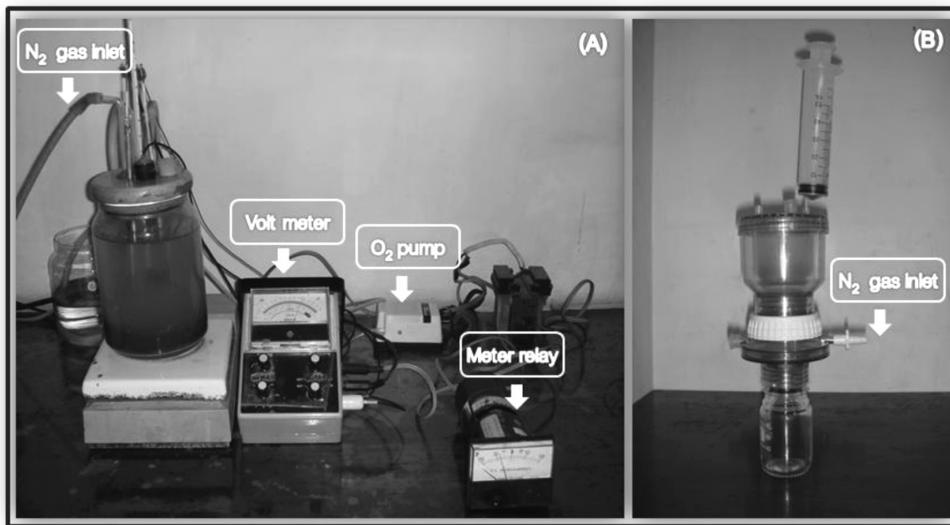


Figure 1 Incubation of soil in pH-Eh controlled unit (A) and sample filter for air oxidation protection (B)

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์

นำสารละลายดิน (ส่วนที่กรองได้) ที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ต่างๆ วิเคราะห์ค่าทางเคมี โดยวิเคราะห์ปริมาณ NO_3^- วิธี colorimetric method (ทัศนีย์ และจงรักษ์, 2551) ปริมาณ Fe^{2+} และ Mn^{2+} ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometry และปริมาณ SO_4^{2-} วิธี turbidimetric method (ทัศนีย์ และจงรักษ์, 2551)

การสกัดดีเอ็นเอและการทำ denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

สกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากดินส่วนที่เหลือจากการกรอง ที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ต่างๆ ตามวิธีการของ Zhou et al. (1996) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง V3 region โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย universal primer ที่มีความจำเพาะกับช่วง V3 region ของ 16S rDNA ประกอบไปด้วย VFC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') เป็นฟอว์เวอร์สไพรมเมอร์ ที่มี GC-clamp และไพรมเมอร์ VR (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') เป็นรีเวอร์สไพรมเมอร์ ที่เสนอโดย

Muyzer et al. (1993) และตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำ denature gradient gel electrophoresis (DGGE) โดยใช้ polyacrylamide gel ตามวิธีการของ Supaphol (2005) มีความแตกต่างของ denaturant คือ urea-formamide gradient ตั้งแต่ 35 เปอร์เซ็นต์ ถึง 60 เปอร์เซ็นต์

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ตัดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเจลที่ทำ DGGE ที่มีลักษณะเด่น คาดว่าน่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ในดิน และทำการ re-amplified โดยวิธี PCR ด้วยไพรมเมอร์ VFC และ VR แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ MacroGen Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (basic local alignment search tools) ในอินเทอร์เน็ตที่ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เพื่อใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์และกลุ่มแบคทีเรีย

เปลี่ยนความเข้มข้นของสายพิมพ์แต่ละแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเด่น จากเทคนิค DGGE เป็นค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Quality One แทนการเปลี่ยนแปลงของชนิดแบคทีเรีย และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Canoco for window 4.5 (Ter Braak and Smilauer, 2002). วิธี principle component analysis (PCA) และวิธี canonical correspondence analysis (CCA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

สมบัติของดินชุดดินรังสิตที่ใช้ในการศึกษา

ดินชุดดินรังสิตที่ใช้ในการศึกษา เป็นดินกรดกำมะถัน (acid sulfate soil) มีเนื้อดินเป็นดินเหนียว ค่าพีเอชของดิน (อัตราส่วนระหว่างดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:1) เท่ากับ 4.3 จัดเป็นดินกรดรุนแรงมาก (extremely acid) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (CEC) อยู่ในระดับสูง เท่ากับ 6.0 ก./กก. และ 22.5 เซนติโมล/กก. ตามลำดับ สภาพการนำไฟฟ้า (EC) อยู่ในระดับต่ำ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับปานกลางมีค่าเท่ากับ 0.4 ก./กก. และ 14 มก./กก. ตามลำดับปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูง (102 ก./กก.) ส่วนปริมาณเหล็กและแมงกานีสทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 14,438 และ 115 มก./กก. ตามลำดับ สำหรับซัลเฟตและไนเตรตที่สกัดได้มีปริมาณเท่ากับ 806 และ 45 มก./กก. ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของพีเอช ไนเตรต แมงกานีสเหล็ก และซัลเฟตในดิน

ผลการศึกษา พบว่า ค่าพีเอชในดินครั้งที่ 4.8 ในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เริ่มต้นคือ +280 มิลลิโวลต์ จนถึง +200 มิลลิโวลต์ สอดคล้องกับสารอนินทรีย์อื่นๆ ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก (Figure 2) สามารถบ่งชี้ได้ว่า ช่วงดังกล่าวยังไม่เกิดการรีดักชันของสาร

อนินทรีย์อื่นๆ นอกจากการใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน จึงไม่มีการใช้ H^+ จากสารละลาย ค่าพีเอชจึงไม่เปลี่ยนแปลง แต่หลังจากนั้นจนถึง -150 มิลลิโวลต์ ค่าพีเอชดินเพิ่มขึ้นเป็น 5.4 เป็นผลเนื่องจากภายใต้สภาพออกซิเดชัน เหล็กที่มีปริมาณมากในดินเปรี้ยวจะอยู่ในรูปเฟอร์ริกออกไซด์รูปอสัณฐาน $[Fe(OH)_3]$ และเมื่อมีการขังน้ำเกิดสภาพรีดักชัน เฟอร์ริกถูกรีดิวซ์เป็นเฟอร์รัส ซึ่งการรีดักชันดังกล่าวส่งผลให้ H^+ เปลี่ยนเป็นน้ำ (H_2O) ทำให้ค่าพีเอชของดินเพิ่มขึ้น จนกระทั่งศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เท่ากับ -250 มิลลิโวลต์ ค่าพีเอชจะคงที่ ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดย CO_2 รวมกับน้ำและปลดปล่อย H^+ ออกมา

ตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +200 มิลลิโวลต์ลงไปปริมาณไนเตรตในสารละลายดินลดลงอย่างรวดเร็วและหมดไปเมื่อศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เท่ากับ 0 มิลลิโวลต์ สอดคล้องกับผลศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าไนเตรตเริ่มเกิดการรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +200 มิลลิโวลต์ (Patrick and Jugsujinda, 1992)

ปริมาณแมงกานีสที่ละลายน้ำได้ในดิน เริ่มสูงขึ้นตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +200 มิลลิโวลต์ จนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 14 มก./กก. ที่ -150 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่าสภาพรีดักชันทำให้แมงกานีสเปลี่ยนเป็นแมงกานีสที่ละลายน้ำได้มากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Patrick and Jugsujinda (1992) ที่พบว่า รีดักชันของแมงกานีสเริ่มเกิดที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ประมาณ +200 มิลลิโวลต์

เหล็กในสารละลายดินเพิ่มขึ้นชัดเจนตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +150 มิลลิโวลต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Patrick and Reddy (1978) ที่พบว่าเหล็กเริ่มถูกรีดิวซ์ที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +180 ถึง +150 มิลลิโวลต์ และมีปริมาณเหล็กในสารละลายดินสูงสุดเท่ากับ 406 มก./กก. ที่ ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ -150 มิลลิโวลต์ การเพิ่มขึ้นของปริมาณเหล็กในสารละลายเกิดเนื่องจากกระบวนการรีดักชันของเหล็ก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปเหล็กจากรูปที่ละลายได้ยากคือรูปเฟอร์ริกเปลี่ยนเป็นเฟอร์รัส ซึ่งละลายได้ง่ายขึ้น และที่ ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เท่ากับ -200 มิลลิโวลต์ พบว่าเหล็กในสารละลายเริ่มลดลง

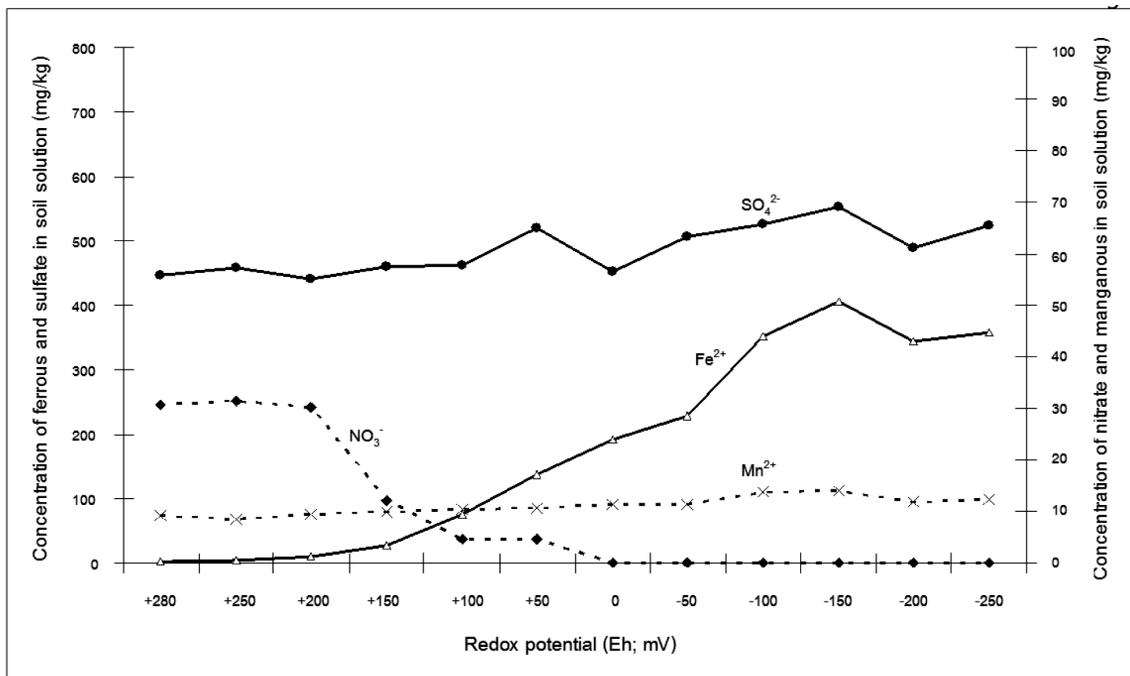


Figure 2 Relation between redox potentials and change of inorganic substances in a submerged acid sulfate soil (Rangsit soil series).

ดินมีปริมาณซัลเฟตเพิ่มขึ้นในช่วงต้นสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Peters and Corad (1996) และ Lueders and Friedrich (2000) ซึ่งพบว่า ในช่วงแรกของการบ่มดินซัลเฟตจะเพิ่มขึ้นและจากนั้นก็ลดลงจนหมดไปในที่สุด การเพิ่มขึ้นของซัลเฟตในช่วงต้นสามารถอธิบายผลได้ว่า ซัลเฟตที่ถูกดูดซับหรืออยู่ในรูป basic aluminum sulfate (AlOHSO₄) จะอยู่ในรูปที่ละลายได้ง่ายเมื่อดินมีการขังน้ำ (ทัศนีย์, 2550) นอกจากนี้เป็นผลร่วมกับการออกซิเดชันของซัลเฟอร์ในรูปสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์กลายเป็นซัลเฟตโดยจุลินทรีย์ที่ใช้สารประกอบจากการรีดักชันของไนเตรต เช่น ไนไตรต์ (NO₂⁻) ไนตริกออกไซด์ (NO) และไนตรัสออกไซด์ (N₂O) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Peters and Corad, 1996) และในช่วงปลาย พบการลดลงของซัลเฟตแต่ไม่ชัดเจนมาก Shelobolina et al. (2003) พบว่าแบคทีเรียที่รีดักชันซัลเฟตไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 แต่เจริญได้ที่พีเอช 6.8 แต่ในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ -150 ถึง -250

มิลลิโวลต์ ดินมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.4 ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดการรีดักชันของซัลเฟตแต่ไม่ชัดเจน

ลำดับการเกิดรีดักชันของสารอนินทรีย์ในชุดดินรังสิต พบว่า รีดักชันของไนเตรตและแมงกานีสเกิดในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยเริ่มที่ค่าศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ ประมาณ +200 มิลลิโวลต์ แต่การเกิดรีดักชันของไนเตรตจะรุนแรงกว่า บ่งชี้ได้จากการลดลงอย่างรวดเร็วของไนเตรตและหมดไปในที่สุด ลำดับต่อมาจึงเกิดรีดักชันของเหล็กที่ ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +150 มิลลิโวลต์ ส่วนการรีดักชันของซัลเฟตเริ่มเกิดที่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ เท่ากับ -150 มิลลิโวลต์

การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารอนินทรีย์ในดินนาด้วยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

รูปแบบโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียที่ได้จากนำสารพันธุกรรมของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE

พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งที่มีการตัดเจลที่เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์หรือมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ในดิน (Figure 3) และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งหมด 15 ตำแหน่ง ผลของการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า มีความเหมือนของลำดับเบส (identity) กับฐานข้อมูล NCBI สูงกว่า ร้อยละ 75 ดังแสดงใน Table 1

ผลวิเคราะห์ความเข้มของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แทนชนิดของแบคทีเรียในดินรังสิตที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ ผลวิเคราะห์ความเข้มของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แทนชนิดของแบคทีเรียในชุดดินรังสิตที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ระดับ

ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี PCA พบว่า ลักษณะโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในชุดดินรังสิต สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ประชากรแบคทีเรียที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +280 ถึง +200 มิลลิโวลต์ ประชากรแบคทีเรียที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +150 ถึง -50 มิลลิโวลต์ และประชากรแบคทีเรียในดินที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ ตั้งแต่ -100 ถึง -250 มิลลิโวลต์ (Figure 4) บ่งชี้ว่าประชากรแบคทีเรียในดินที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ระดับต่างๆ ซึ่งจัดอยู่ในลักษณะของกลุ่มประชากรแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันนั้นจะมีประชากรแบคทีเรียหรือชนิดของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นชนิดเดียวกัน

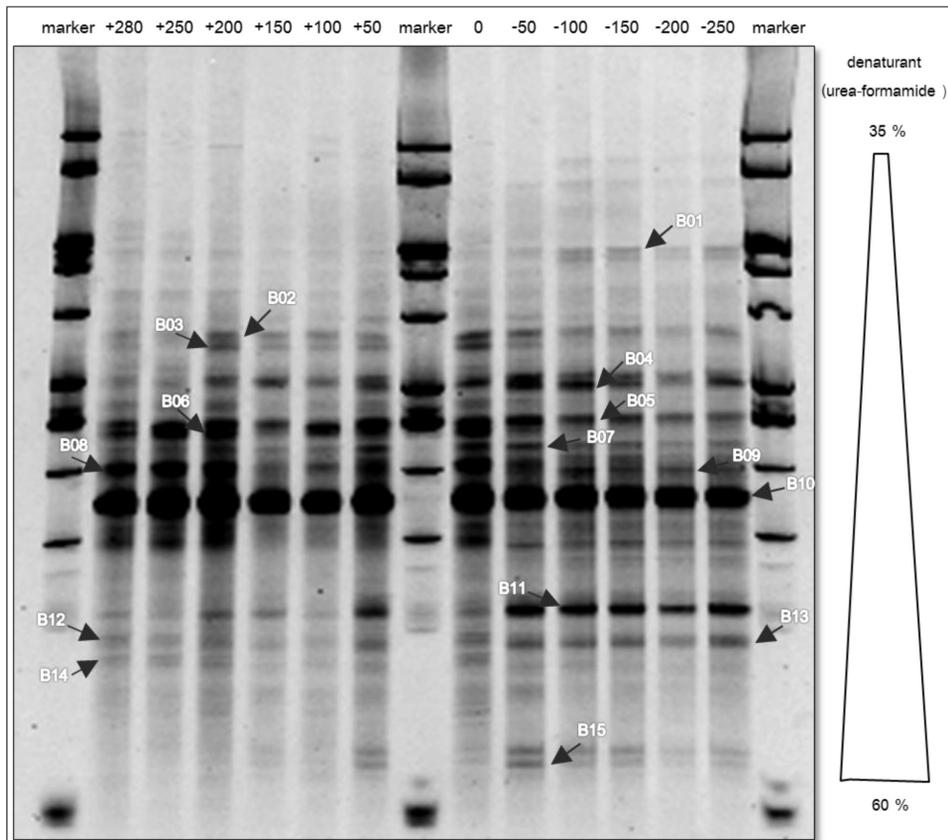


Figure 3 DGGE banding patterns of bacterial community from a submerged acid sulfate soil (Rangsit soil series) at varied redox potentials (Eh). Each band in the DGGE gel represents at least one bacterial species. Bands in the same height are considered belonging to the same species. Marker (Tridye 100 bp marker; NEB Biolab) indicates the marker for DGGE pattern from each redox potential. Fifteen bands (B1-15) were excised for sequencing and compared to BLASTN at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> to ascertain their closest relatives.

Table 1 Dominant species of bacteria in a submerged Rangsit acid sulfate soil from DGGE band were compared to BLASTN at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> to ascertain their closest relatives.

phylotype group	Code	Accession number	Closest match from BLASTN	Identity
Acidobacteria	B10	AM922432.1	Uncultured Acidobacteria bacterium clone B06_Bare_Soil	88%
Acidobacteria	B13	FJ870629.1	Uncultured Acidobacteria bacterium clone BN2-10	91%
Alphaproteobacteria	B05	FM202724.1	Sphingomonas sp. strain CS6	77%
Alphaproteobacteria	B04	EF188320.1	Uncultured Alphaproteobacterium clone 651	98%
Alphaproteobacteria	B07	EU665135.1	Uncultured Kaistobacter sp. clone Plot22-2A06	80%
Alphaproteobacteria	B09	EU449617.1	Uncultured Sphingomonadaceae bacterium clone Plot4-2H12	100%
Deltaproteobacteria	B02	FJ190058.1	Anaeromyxobacter dehalogenans strain FRC-R6	84%
Deltaproteobacteria	B15	EU449596.1	Uncultured Myxococcales bacterium clone Plot4-E03	91%
Firmicutes	B08	AB110415.1	Bacillus senegalensis	98%
Firmicutes	B12	DQ079003.1	Bacillus sp. GB02-39A	89%
Firmicutes	B06	EU043767.1	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-5KA-95-G12	94%
Firmicutes	B14	EU834945.1	Uncultured Bacillus sp. clone IST DGGE 1	95%
Firmicutes	B03	EU919224.1	Uncultured Trichococcus sp. clone QRSYY9	90%
Gammaproteobacteria	B01	AM935063.1	Uncultured Gamma proteobacterium clone AMKG9	88%
Gammaproteobacteria	B11	FJ538164.1	Uncultured Rhodanobacter sp. clone MBMV17	100%

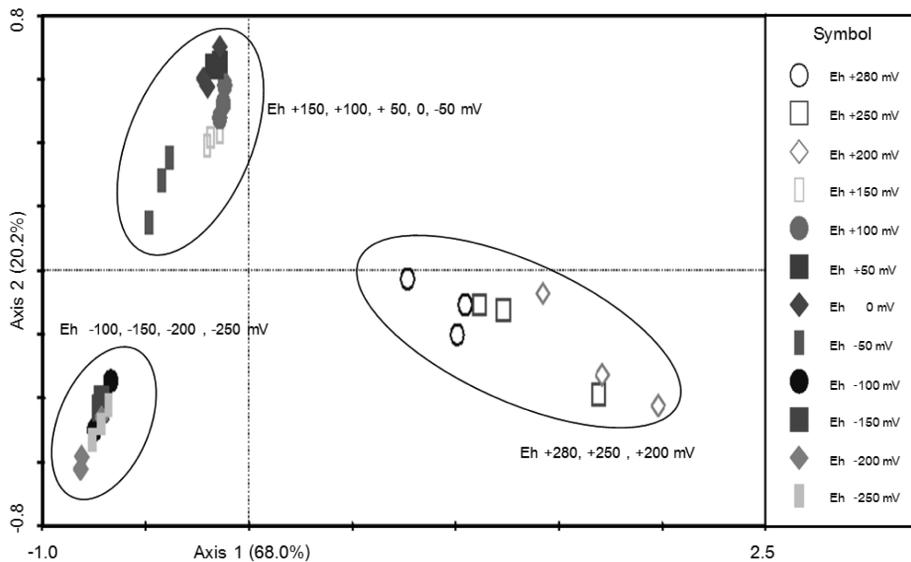


Figure 4 PCA showing structure of bacterial communities at varied redox potentials in a submerged acid sulfate soil (Rangsit soil series).

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างประชากรแบบที่เรียกร่วมกับข้อมูลค่าวิเคราะห์สารอนินทรีย์ในดินที่ศักยภาพรีดอกซ์ระดับต่างๆ ด้วยโปรแกรม Canoco

for Windows วิธี CCA พบการจัดกลุ่มของโครงสร้างประชากรแบบที่เรียกดัดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบบที่เรียด้วยวิธี PCA พบมีการจัด

กลุ่มเป็น 3 กลุ่ม แบ่งตามการเปลี่ยนแปลงของค่าศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เป็นหลัก โดยประชากรแบคทีเรียกลุ่มแรกที่อยู่ในดินช่วงศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +280 ถึง +200 มิลลิโวลต์ ลักษณะกระจายอยู่บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของไนเตรต กลุ่มที่ 2 ประชากรแบคทีเรียจากดินที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ +150 ถึง -50 มิลลิโวลต์ พบกระจายอยู่

บริเวณที่มีการลดลงของไนเตรต และการเพิ่มขึ้นของแมงกานีสและเฟอร์รัส และกลุ่มสุดท้ายคือประชากรแบคทีเรียในดินที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ -100 ถึง -250 มิลลิโวลต์ พบการแจกกระจายบริเวณการเปลี่ยนแปลงของเฟอร์รัส แมงกานีส และซัลเฟตในช่วงปลาย (Figure 5)

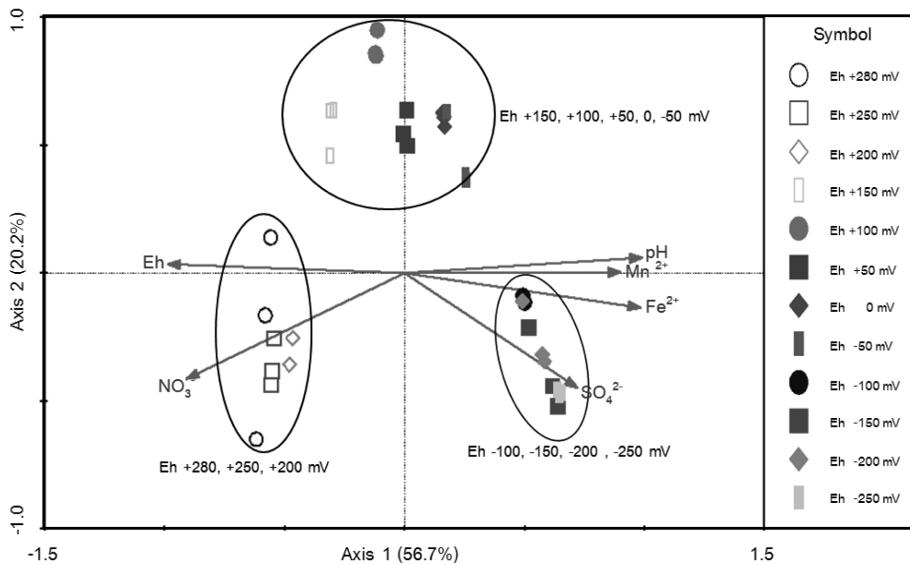


Figure 5 CCA showing the correlation between structure of bacterial communities and change of inorganic substances in a submerged acid sulfate soil (Rangsit soil series).

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอนินทรีย์ในดินที่ได้จากวิธี CCA ในชุดดินรังสิตที่ศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ระดับต่างๆ (Figure 6) สามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่หนึ่ง (I) คือกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความเด่นในช่วงที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารอนินทรีย์อื่นๆ แสดงว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ ได้แก่ *Bacillus sp.* (B12) และ Uncultured *Bacillus sp.* (B14)

กลุ่มที่สอง (II) คือกลุ่มที่พบในช่วงศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นจนถึง -50 มิลลิโวลต์ แสดงว่าเป็นกลุ่มที่สามารถอยู่ได้ทั้งที่มีออกซิเจน และเมื่อออกซิเจนหมดไป โดยสามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรต เหล็ก และแมงกานีส ได้แก่ *Bacillus senegalensis* (B08), *Sphingomonas sp.*

(B05), Uncultured *Kaistobacter sp.* (B07), Uncultured *Acidobacteria bacterium* (B10), *Anaeromyxobacter dehalogenans* (B02), Uncultured *Bacillus sp.* (B06) และ Uncultured *Trichococcus sp.* (B03)

กลุ่มที่สาม (III) คือกลุ่มที่มีความเด่นในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ตั้งแต่ +150 ถึง -250 มิลลิโวลต์ที่มีการรีดักชันของไนเตรต เหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต โดยเฉพาะการรีดักชันของเหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต ได้แก่ Uncultured *Rhodanobacter sp.* (B11), Uncultured *Acidobacteria bacterium* (B13), Uncultured *Myxococcales bacterium* (B15), Uncultured *Sphingomonadaceae bacterium* (B09) และ Uncultured *Gamma proteobacterium* (B01)

กลุ่มที่สี่ (IV) คือกลุ่มที่มีพบในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ -50 ถึง -250 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการรีดักชันของ เหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต ได้แก่ Uncultured Alphaproteo bacterium (B04)

การศึกษานี้ถึงแม้ว่าจะพบแบคทีเรียหลายชนิดที่มีบทบาทในการรีดิวซ์สารอนินทรีย์ต่างๆ ในดิน แต่ไม่มีรายงานยืนยันทุกชนิด มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีรายงานยืนยันว่ามีกรรีดิวซ์สารอนินทรีย์ได้จริง เช่น รายงานที่พบว่า *Bacillus senegalensis*, Uncultured *Bacillus sp.*, และ *Sphingomonas sp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Bacillus* และสกุล *Sphin-*

gomonas มีความสามารถในการรีดิวซ์ในเทรต (Michiko and Peter, 1998, Heyrman et al., 2004) และ *Anaeromyxobacter dehalogenans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเกี่ยวกับรีดักชันของเหล็กและสามารถรีดิวซ์ในเทรตได้ (Akob et al., 2008) ในขณะที่แบคทีเรียในไฟลัม Acidobacteria สามารถรีดิวซ์ในเทรต และเหล็กได้ (Ward et al., 2009) และแบคทีเรียในสปีชีส์ Myxococcale เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในคลาส Deltaproteobacteria ที่สามารถกรรีดิวซ์ซัลเฟตได้ (Schluter et al., 2011)

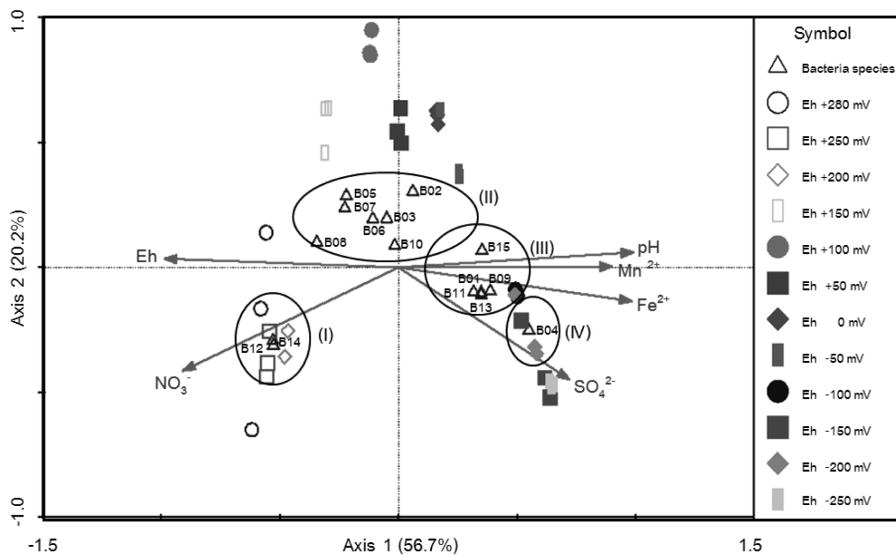


Figure 6 CCA showing the correlation between dominant species of bacteria and change of inorganic substances in a submerged acid sulfate soil (Rangsit soil series).

สรุป

ดินรังสิตที่ทำการศึกษาคือเป็นดินเหนียวมีพีเอชเป็นกรดรุนแรงมาก (pH 4.3) การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในเทรต แมงกานีส เหล็ก และซัลเฟตในดิน พบว่าปริมาณในเทรตในสารละลายดินลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +200 มิลลิโวลต์ลงไป และหมดไปเมื่อศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์เท่ากับ 0 มิลลิโวลต์ ปริมาณแมงกานีสที่ละลายน้ำได้ในดิน เริ่มสูงขึ้นตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +200 มิลลิโวลต์ จนมีค่าสูงสุด

เท่ากับ 14 มก./กก. ที่ -150 มิลลิโวลต์ เหล็กในสารละลายดินเพิ่มขึ้นชัดเจนตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +150 มิลลิโวลต์ สำหรับปริมาณซัลเฟตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตั้งแต่ช่วงต้น แต่มีการลดลงเล็กน้อยในช่วงศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ ผลวิเคราะห์ความเข้มข้นของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แทนชนิดของแบคทีเรียในชุดดินรังสิตที่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ระดับต่างๆ พบว่า ลักษณะโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในชุดดินรังสิต สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ประชากรแบคทีเรียที่ศักย์ไฟฟ้ารีด็อกซ์ +280 ถึง +200 มิลลิโวลต์ ประชากร

แบคทีเรียที่ดักยี่ห้อไฟฟ้ารีด็อกซ์ +150 ถึง -50 มิลลิโวลต์ และประชากรแบคทีเรียในดินที่ดักยี่ห้อไฟฟ้ารีด็อกซ์ ตั้งแต่ -100 ถึง -250 มิลลิโวลต์ โดยสามารถแบ่งตาม ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียและการ เปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์ในดินได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ 1) กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความเด่นในช่วงที่ยังไม่มี การเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์อื่นๆ 2) กลุ่มที่สามารถอยู่ได้ทั้งที่มีออกซิเจน และเมื่อออกซิเจนหมด ไป โดยสามารถรีดิวซ์ได้ทั้งไนเตรต เหล็ก และ แมงกานีส 3) กลุ่มที่มีความเด่นในช่วงดักยี่ห้อไฟฟ้า รีด็อกซ์ตั้งแต่ +150 ถึง -250 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มี การรีดักชันของไนเตรต เหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีการรีดักชันของเหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต และ 4) กลุ่มที่มีพบในช่วงที่มี การรีดักชันเฉพาะของเหล็ก แมงกานีส และซัลเฟต

เอกสารอ้างอิง

- คณะกรรมการจัดทำพจนานุกรมปฐพีวิทยา. 2551. พจนานุกรม ปฐพีวิทยา. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์. 2550. ดินที่ใช้ปลูกข้าว. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงวัชร จันทร์เจริญสุข. 2551. การ วิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Akob, D.M., H.J. Mills, T.M. Gihring, L. Kerkhof, and J.W. Stucki. 2008. Functional diversity and electron donor dependence of microbial populations capable of U (VI) reduction in radionuclide-contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3159-3170.
- Attanandana, T. 2000. Paddy Soil Science. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok. Cited W.H. Patrick, B.G. Williams and J.T. Moraghan. 1973. A simple system for controlling redox potential and pH in soil suspension. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37: 33-332.
- Gao, S., K.K. Tanji, S.C. Scardaci, and A.T. Chow. 2002. Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice - growing season. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 805-817.
- Heyrman, J., B. Vanparys, N.A. Logan, A. Balcaen, M. Rodriguez-Díaz, A. Felske, and P.D. Vos. 2004. *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse a grasslands. *Inter. J. Sys. Evol. Microbiol.* 54: 47-57.
- Lueders, T. and M. Freidrich. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2732-2742.
- Michiko, M. N., and Z. Peter. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 165-90.
- Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactions-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Patrick, W.H., and A. Jugsujinda. 1992. Sequential reduction and oxidation of inorganic nitrogen, manganese and iron in flooded soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 1071-1073.
- Patrick, W.H., and C.N. Reddy. 1978. Chemical changes in rice soils. pp. 361-379. In *Soils and Rice*. International Rice Research Institute, Manila.
- Peters, V., and R. Conrad. 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of toxic upland soils. *Soil Biol. Biochem.* 28: 371-382.
- Shelobolina, E.S., K. O'Neill, K.T. Finneran, L.A. Hayes, and D.R. Lovley. 2003. Potential for in situ bioremediation of a low-pH, high-nitrate uranium-contaminated groundwater. *Soil Sediment Contam.* 12: 865-884.
- Schluter, A., I. Ruiz-Trillo, and A. Pujol. 2011. Phylogenomic evidence for a Myxococcal contribution to the mitochondrial fatty beta-oxidation. *PLoS ONE* 6(7); e21989.
- Supaphol, S. 2005. Intrinsic Bioremediation and the Molecular Analysis of Microorganisms in Hydrocarbon Contaminated Thai Soil. Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Bangkok.
- Ter Braak, C.J.F., and P. Smilauer. 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, NY.
- Yu, K. and W.H. Patrick. 2004. Redox window with minimum global warming potential contribution from rice soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 2086-2091.
- Ward, N.L., J.F. Challacombe, P.H. Janssen, B. Henriessat, P.M. Coutinho, M. Wu, G. Xie, D.H. Haft, and et al. 2009. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(7): 2046-2056.
- Zhou, J., M.A. Bruns, and M.T. James. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Am. Soc. Microbiol.* 62: 316-322.