

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	26
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
3. ผลการศึกษา	52
4. วิจัยผลการศึกษา	105
5. สรุปผลการศึกษา	117
เอกสารอ้างอิง	119
ภาคผนวก	129
ประวัติผู้เขียน	159

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	45
2.2	สถานะการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	46
2.3	สารที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I	49
2.4	สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ	50
2.5	สถานะที่ใช้ในการทำ PCR วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	50
3.1	ลักษณะของบ่อน้ำร้อน น้ำตกร้อน ที่ อ.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง อ.คลองท่อมเหนือ จ.กระบี่	58
3.2	แอกติวิตีของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาแอกติวิตีแบบ <i>in vivo</i>	62
3.3	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด <i>Chlorella</i> sp. และ <i>Synechococcus</i> sp.	63
3.4	เปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสก่อนและหลังการทำ freeze-dry ระหว่างสารสกัดที่สกัดและละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน	93
3.5	ค่า% identity ของลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอที่มีขนาด 675 และ 748 bp เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	104

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	วัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle)	3
1.2	วิถีการใช้ไนเตรต (Nitrate assimilation pathway)	4
1.3	โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต	6
1.4	โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส แสดงตำแหน่งรับ-ส่งอิเล็กตรอนระหว่างศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารต่างๆ	8
1.5	เส้นทางการเข้า-ออกของไนเตรต ( $\text{NO}_3^-$ ) ภายในเซลล์	9
1.6	การเกิด assimilation ของไนเตรตในแบคทีเรีย	13
1.7	กระบวนการ respiratory nitrate reduction โดยเอนไซม์ Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)	14
1.8	โครงสร้างแบบ 3 มิติของเอนไซม์ NarGHI ใน <i>E.coli</i> K 12	15
1.9	การรีดิวซ์ไนเตรตในส่วนเพอริพลาซึม ใน <i>R.sphaeroides</i> Nap	20
1.10	โครงสร้างแบบ 3 มิติ ของ NapA ใน <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	21
3.1	บ่อน้ำร้อนในพื้นที่หมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง จ.กระบี่	53
3.2	น้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	54
3.3	บ่อน้ำร้อนหน้าศาลาขนาดของกลุ่มสร้างสุขภาพสถานีนอนามัยบ้านบางคราม ในบริเวณน้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	54
3.4	สวนสปาในบริเวณน้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	55
3.5	สระมรกต หมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	55
3.6	บ่อน้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่	56
3.7	บ่อน้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่	56
3.8	บ่อน้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่	57

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.9	บ่อที่ 4 น้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่	57
3.10	โคโลนีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	60
3.11	สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวชนิด <i>Chlorella</i> sp. (A) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดี่ยวชนิด <i>Synechococcus</i> sp. (B)	61
3.12	ผลของการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	65
3.13	เปรียบเทียบปริมาณไนเตรตในอาหารที่ลดลง (A) และไนไตรต์ในอาหารที่เพิ่มขึ้น (B)	66
3.14	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	67
3.15	ผลของโซเดียมไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	68
3.16	ผลของความเค็มต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	70
3.17	ผลของไนเตรตต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	71
3.18	การเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายชนิด <i>Synechococcus</i> sp. ในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง	72
3.19	การเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายชนิด <i>Synechococcus</i> sp. ในช่วงวัน	73
3.20	ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp. ที่ pH ต่าง ๆ	74
3.21	ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด <i>Synechococcus</i> sp. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	75
3.22	ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส	76

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.23	ผลของ Hydroquinone ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส	77
3.24	ผลของ NADH และ NADPH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส	78
3.25	ผลของ Methyl viologen ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส	79
3.26	ผลของ Potassium ferricyanide ( $K_3Fe(CN)_6$ ), Sodium thiocyanate (NaSCN), Arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) และ Sodium azide ( $NaN_3$ ) ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส	80
3.27	แอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสของสาหร่ายเมื่อทำการสกัดด้วย acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆ	82
3.28	ผลการศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 และ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	83
3.29	แอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสเมื่อบ่มสารสกัดที่อุณหภูมิ 40 °C ที่เวลาต่าง ๆ กัน	84
3.30	การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสจากข้าวโพดกับเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสจากสาหร่าย	85
3.31	จลนศาสตร์ของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส แบบ Hyperbola (A) และแบบ Lineweaver-Burk (B)	86
3.32	แอกติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด <i>Synechococcus</i> sp. เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน	87
3.33	ผลของอุณหภูมิและการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสในกลีเซอรอล	89
3.34	ผลของอุณหภูมิและการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสใน L-Proline	91
3.35	เปรียบเทียบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria	97

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.36	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ NR ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria	98
3.37	แบบแผนของ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวสำหรับ ยีน nar ในสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด <i>Synechococcus</i> sp.	100
3.38	ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีน nar ที่มีขนาดเท่ากับ 534 bp (แถบบน) ลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส (แถบล่าง)	101
3.39	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria	102
3.40	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria	103

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

น.	นาฬิกา
$\alpha$	Alpha
bp	Base pair
$\beta$	Beta
BSA	Bovine serum albumin
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
DNA	Deoxyribonucleia acid
DTT	Dithiothretol
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
FAD	Flavin adenine dinucleotide
$\gamma$	Gamma
g	Gram
$K_m$	Michaelis constant
LB	Luria Bertaini
mRNA	Messenger ribonucleic acid
min	Minute
mg	Milligram
ml	Millilitre
mM	Millimolar
$\mu\text{g}$	Microgram
$\mu\text{l}$	Microliter
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mole}$	Micromole
Mo-MPT	Molybdenum-molybdopterin
M	Molar
NADH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	Nitrite reductase

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

nmole	Nanomole
NR	Nitrate reductase
OD	Optical density
pH	-log hydrogen ion concentration
%	Percent
pmole	Picomole
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease A
rpm	Revolutions per minute
TAE	Tris acetate EDTA
TBS	Tris buffer saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
U	Unit
X-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside