บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ : MRG5080300

ชื่อโครงการ : ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้าง Extracellular Polymeric Substances (EPS) ในแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม

ชื่อนักวิจัย : วรัญญู พูลสวัสดิ์

ระยะเวลาดำเนินงาน : 5 ปี 1 เดือน (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 31 สิงหาคม 2555)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา (ตึกไรโซเบียม) กรมวิชาการเกษตร และ 1 สายพันธุ์จากศูนย์ Bio/Polymers Research Group (BRG) ประเทศออสเตรเลีย ปัจจัยแวดล้อมที่ทำการศึกษาดังกล่าวได้แก่ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน รวมถึงอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาอิทธิพลของโลหะวาเลนซ์ 2 ต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย การจำแนกไรโซเบียมกระทำโดยการทดสอบทางชีวเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 16S riboromal RNA (16S rRNA sequencing) พบว่า ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023, DASA 02001, DASA 03001, DASA 17007 และ TAL 734 จัดอยู่ในจีนัส Bradyrhizobium ในขณะที่สายพันธุ์ DASA 18005 จัดอยู่ในจีนัส Rhizobium โดยทุกสายพันธุ์ให้ผลทดสอบบวกต่อการทดสอบเอนไซม์ catalase, oxidase, urease และให้ผลลบต่อ citrate utilization test ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 จัดอยู่ในกลุ่ม fast-growing และ *Rhizobium etli* M4 ถูกจัดในกลุ่ม slow-growing จากการทดสอบการสร้างกรด-เบสในอาหาร YM ที่มี bromthymol blue เป็น indicator ไรโซเบียมส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสหรือแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ยกเว้นไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 และ DASA 18005 ที่พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณ EPS สูงสุดเพิ่มขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนเจนที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นกรณีที่ปรับเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่คงปริมาณแหล่งไนโตรเจน

สารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมผลิตมีบทบาทสำคัญในการสร้างปมรากในพืชตระกูลถั่วซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายสำหรับการเตรียมและการใช้ปุ๋ยไรโซเบียม

คำสำคัญ: เอ็กตราเซลลูลาร์โพลีแซคคาไรด์ ไรโซเบียม แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 16S rRNA

ABSTRACT

Contract No.	:	MRG5080300
Project Title	:	Growth conditions effecting production of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in *Rhizobium* spp.
Researcher	:	Waranyoo Pulsawat
Research duration	:	5 years and 1 months (1 July 2007 – 31 August 2012)

This research was aimed to determine the environmental conditions effecting growth and production of extracellular polymeric substances (EPSs) of *Rhizobium* spp. isolated from nodules of economic leguminous plants in Thailand by Soil Microbiology Group, Division of Soil Science, Department of Agriculture in Thailand and one Rhizobial isolate from Bio/Polymers Research Group (BRG) in Australia. The studied environmental conditions were type and concentration of carbon and nitrogen sources including ratio of carbon and nitrogen sources composed in cultivation media. Furthermore, influence of heavy metal ions on growth and EPSs production of Rhizobia was also performed. Biochemical tests and 16S ribosomal RNA sequencing were used in order to identification of the isolated rhizobia. The isolated rizobial strains; DASA 01023, DASA 02001, DASA 03001, DASA 17007 และ TAL 734 were categorized in genus Bradyrhizobium whereas DASA 18005 was grouped in genus Rhizobium. Every studied isolates gave positive results for catalase, oxidase, urease tests and negative result for citrate utilization tests. According to acid production in YM media containing bromthymol blue as pH indicator, DASA 17007 was classified as fast-growing and *Rhizobium etli* M4 was grouped in slow growing. Most rhizobial isolates grew with high specific growth rate when they were cultured in the medium containing glucose or mannitol as carbon source except DASA 17007 and DASA 18005 which were favor for sucrose as carbon source instead. The maximum EPS production increased with an increase of C:N ratio that adjusted by increasing amount of carbon source and remaining amount of nitrogen source.

Rhizobial EPS play important roles in successive nodulation in leguminous plants and subsequently raises nitrogen fixation efficiency henceforth promotes utilized nitrogen form fertilizer for plants. Development of optimal culture medium can lead to improvement of efficiency and low cost for preparation and utilization of Rhizobium fertilizer.

Keyword: Extracellular polymeric substances (EPSs), Rhizobium, Carbon and nitrogen sources, 16S rRNA sequencing