



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้าง Extracellular Polymeric Substances (EPS)
ในแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม

Growth conditions effecting production of
Extracellular Polymeric Substances (EPS) in *Rhizobium* spp.

วรัญญู พูลสวัสดิ์
Waranyoo Pulsawat

สิงหาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้าง Extracellular Polymeric Substances (EPS)
ในแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม

Growth conditions effecting production of Extracellular Polymeric Substances
(EPS) in *Rhizobium* spp.

วรัญญู พูลสวัสดิ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำหรับการสนับสนุนดังกล่าว ขอขอบคุณ A/Prof. L.J.R Foster และ Bio/Polymers Research Group (BRG) ประเทศออสเตรเลีย ที่ให้คำปรึกษาและอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์รวมถึงเครื่องมืออุปกรณ์บางชนิดที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา (ตึกไรโซเปียม) กรมวิชาการเกษตร ที่เอื้ออำนวยสายพันธุ์ไรโซเปียมที่คัดแยกจากปมรากพืชเศรษฐกิจตระกูลถั่วจากส่วนการเก็บรักษาและจำหน่ายสายพันธุ์จุลินทรีย์

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมถึงเครื่องมือ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ต่างๆในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรสายสนับสนุน ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับการวิเคราะห์สารโพลีเมอร์ ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการบริการเตรียมน้ำ MilliQ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ : MRG5080300
ชื่อโครงการ : ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้าง Extracellular Polymeric Substances (EPS) ในแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม
ชื่อนักวิจัย : วรัญญ พูลสวัสดิ์
ระยะเวลาดำเนินงาน : 5 ปี 1 เดือน (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 31 สิงหาคม 2555)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา (ตึกไรโซเบียม) กรมวิชาการเกษตร และ 1 สายพันธุ์จากศูนย์ Bio/Polymers Research Group (BRG) ประเทศออสเตรเลีย ปัจจัยแวดล้อมที่ทำการศึกษาดังกล่าวได้แก่ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน รวมถึงอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาอิทธิพลของโลหะวาเลนซ์ 2 ต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วย การจำแนกไรโซเบียมกระทำโดยการทดสอบทางชีวเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal 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 ที่พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณ EPS สูงสุดเพิ่มขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นกรณีที่ปรับเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนแต่คงปริมาณแหล่งไนโตรเจน

สารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมผลิตมีบทบาทสำคัญในการสร้างปมรากในพืชตระกูลถั่วซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายสำหรับการเตรียมและการใช้ปุ๋ยไรโซเบียม

คำสำคัญ: เอ็กตราเซลล์ลาร์โพลิแซคคาไรด์ ไรโซเบียม แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 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 rhizobial 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

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญเนื้อหา (list of contents)	iii
สารบัญตาราง (list of tables)	iv
สารบัญภาพ (list of illustrations)	v
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	ix
สรุปรายงานวิจัย (Executive summary)	x
เนื้อหางานวิจัย	1
บทนำ	1
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัย	4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง	6
1. การศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในโครงการวิจัย	6
2. การศึกษาลักษณะคุณสมบัติระบบเมทาบอลิซึมบางประการโดยการทดสอบทางชีวเคมี	6
3. การศึกษาความไว (sensitivity) ของไรโซเบียมต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ	10
4. การศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารพื้นฐาน YMB	11
5. การศึกษาอิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ในเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ	13
6. การศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ในเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ	37
7. การศึกษาอิทธิพลไอออนโลหะวาเลนซ์ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ใน <i>R. etli</i> M4	37
8. การศึกษาจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัยโดยอาศัย 16S rRNA nucleotide sequencing	41
สรุปผลการวิจัย	55
ผลผลิต (output)	56
สรุปการเงิน	64
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	69
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานต่างๆ	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลทดสอบทางชีวเคมีบางประการของโรโซเปียมที่ใช้ในโครงการวิจัยสายพันธุ์โรโซเปียม	9
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ <i>R. etli</i> M4	9
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวยาปฏิชีวนะของเชื้อโรโซเปียมสายพันธุ์ต่างๆ	10
ตารางที่ 4 การทดสอบการสร้างกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB + BTB สำหรับโรโซเปียม ทุกสายพันธุ์ และ DM3 + BTB สำหรับเชื้อโรโซเปียม <i>R. etli</i> M4	12
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด อัตราการผลิตโปรตีนในเซลล์ ปริมาณเบตากลูแคนสูงสุด และอัตราการผลิตเบตากลูแคน ของโรโซเปียมแต่ละสายพันธุ์	28
ตารางที่ 6 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ Doubling time (T_d) ของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า OD ₆₀₀ เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น	31
ตารางที่ 7 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ doubling time (T_d) ของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า biomass เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น	32
ตารางที่ 8 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ doubling time (T_d) ของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า OD ₆₀₀ เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น	34
ตารางที่ 9 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ doubling time (T_d) ของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า Biomass เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น	35
ตารางที่ 10 ปริมาณ β -glucan และปริมาณเซลล์ของโรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 03001, DASA 17007, DASA 18005 และ TAL 734 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract และ sucrose-yeast extract ที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10	39
ตารางที่ 11 อิทธิพลของอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS และ CPS จากการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี phenol-sulfuric acid method	39
ตารางที่ 12 อิทธิพลของไอออนโลหะวาเลนซ์ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 ต่อการเจริญและการสร้าง สารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของ <i>R. etli</i> M4	40
ตารางที่ 13 การจัดจำแนกสายพันธุ์โรโซเปียมที่ใช้ในการวิจัยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์	41

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างหน่วยซ้ำของโมเลกุลของ EPSs ที่สร้างโดยไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ A)-B) <i>S. meliloti</i> , C) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> , D) <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 4S, E) <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 248	3
ภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะเซลล์แบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ (A) DASA 01023 และ (B) DASA 02001 เมื่อย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X	7
ภาพที่ 3 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ (A) DASA 03001 และ (B) DASA 03001 เจริญบน YMA หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน	8
ภาพที่ 4 ผลการทดสอบการสร้างกรด-เบสของเชื้อไรโซเบียมเมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB + BTB และ DM3 + BTB สำหรับสายพันธุ์ <i>R. etli</i> M4 1) DASA 01023, B) DASA 02001, C) DASA 03001 D) DASA 17007, E) DASA 18005, F) TAL 734, G) <i>R. etli</i> M4 (YMB + BTB) และ H) <i>R. etli</i> M4 (DM3 + BTB)	11
ภาพที่ 5 การเจริญโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB + BTB ที่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ และการเจริญของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 + BTB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	13
ภาพที่ 6 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	14
ภาพที่ 7 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ <u>sucrose</u> - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	14
ภาพที่ 8 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ <u>glucose</u> - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	15
ภาพที่ 9 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - <u>malt extract</u> broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	15
ภาพที่ 10 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - <u>peptone</u> broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	16
ภาพที่ 11 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ (A) – (F) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน จากการคำนวณโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	17
ภาพที่ 12 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	19

ภาพที่ 13	มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ <u>sucrose</u> - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	19
ภาพที่ 14	มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ <u>glucose</u> - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	20
ภาพที่ 15	มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - <u>malt extract</u> broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	20
ภาพที่ 16	มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - <u>peptone</u> broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	21
ภาพที่ 17	อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน จากการคำนวณโดยอาศัยมวลชีวภาพแห้ง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	22
ภาพที่ 18	อัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน จากการคำนวณโดยอาศัยมวลชีวภาพแห้ง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	23
ภาพที่ 19	ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	26
ภาพที่ 20	การผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยอาศัยการวัดปริมาณเบตาไกลูแคนองค์ประกอบของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm	27
ภาพที่ 21	อิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ <i>R. etli</i> M4 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	31
ภาพที่ 22	อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อมวลชีวภาพแห้ง (Dry biomass) ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ <i>R. etli</i> M4 เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	32
ภาพที่ 23	อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>R. etli</i> M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	33
ภาพที่ 24	อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน cells pellet ของอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>R. etli</i> M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	33
ภาพที่ 25	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ <i>R. etli</i> M4 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร DM3 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	34

ภาพที่ 26	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อมวลชีวภาพแห้ง (Dry biomass) ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ <i>R. etli</i> M4 เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	35
ภาพที่ 27	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>R. etli</i> M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	36
ภาพที่ 28	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid methos ใน cells pellet ของอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>R. etli</i> M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm	36 41
ภาพที่ 29	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 01023 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains	42
ภาพที่ 30	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 01023 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains	43
ภาพที่ 31	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 02001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1100R และเทียบกับ Type strains	44
ภาพที่ 32	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 02001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains	45
ภาพที่ 33	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 03001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบกับ Type strains	46
ภาพที่ 34	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 03001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains	47
ภาพที่ 35	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 17007 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains	48
ภาพที่ 36	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 17007 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains	49

	หน้า
ภาพที่ 37	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains
ภาพที่ 38	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains
ภาพที่ 39	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 734 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains
ภาพที่ 40	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 734 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับทั้ง type strains และ non-type strains
ภาพที่ 41	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ <i>R. etli</i> M4 จากลำดับเบสที่ได้จาก full-length sequencing ของ 16S rRNA โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1492R

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

16S rRNA	16S ribosomal ribonucleic acid
μ	specific growth rate (hour ⁻¹ or h ⁻¹)
BTB	Bromthymol blue (bromothymolsulfonephthalein)
C:N	ratio of carbon to nitrogen of medium composition
EPS	Extracellular Polymeric Substances
PCR	Polymerase chain reaction
$Y_{p/x}$	yield of product concentration per dry biomass concentration (or per cells protein concentration in this research)

สรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่ MRG5080300

โครงการ : ปักจี้แวลลุ่มที่มีผลต่อการสร้าง Extracellular Polymeric Substances (EPS) ในแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม

หัวหน้าโครงการ	:	ดร.วรัญญู พูลสวัสดิ์
หน่วยงาน	:	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ระยะเวลาดำเนินงาน	:	5 ปี 1 เดือน (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 31 สิงหาคม 2555)
งบประมาณ	:	240,000.00 บาท

ในการทำเกษตรกรรมเพื่อผลผลิตทางการเกษตรในระดับการค้า เกษตรกรนิยมใส่ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ในแก๊ดินและธาตุอาหารที่จำเป็นแก่พืช แต่ปุ๋ยเคมีมีราคาสูง เป็นสาเหตุให้ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตทางการเกษตรที่สูงขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยเคมียังส่งผลกระทบต่อเนื่องจากการสะสมตกค้างในพื้นที่การเกษตร และทำลายโครงสร้างของชั้นดิน หน่วยราชการที่เกี่ยวข้องจึงส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกพืชตระกูลถั่ว การใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมหรือทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิต รวมถึงการรักษาความสมบูรณ์ของพื้นที่เกษตรกรรม

ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม ซึ่งมีถิ่นอาศัยในดินและมีความสามารถในการเข้าไปสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่วได้ ซึ่งบางสายพันธุ์มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของต้นถั่วที่เหมาะสม บางสายพันธุ์ความสามารถสร้างปมได้ในรากพืชตระกูลถั่วต่างชนิดได้ ภายในปมรากไรโซเบียมสามารถดำเนินกิจกรรมตรึงไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ การอยู่ร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วและไรโซเบียมแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiotic nitrogen fixing) ต้นพืชตระกูลถั่วได้ผลประโยชน์จากการได้รับไนโตรเจนในรูปที่พืชใช้ได้จากแบคทีเรีย ในขณะที่แบคทีเรียไรโซเบียมก็ได้รับแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจากพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมขึ้นอยู่กับความสำเร็จในการเข้าและสร้างปมรากของไรโซเบียม (nodulation) กับรากพืชตระกูลถั่ว มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในขั้นตอนการเข้าและสร้างปมรากพืชตระกูลถั่วโดยไรโซเบียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนแรกในการที่ไรโซเบียมยึดเกาะกับรากพืชตระกูลถั่วที่จำเพาะเจาะจงภายหลังการถูกชักนำโดยสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่รากหรือเมล็ดพืชตระกูลถั่วสร้างและปลดปล่อยในแหล่งดินแวลลุ่ม ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของสารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ (Extracellular Polymeric Substances or EPS) ที่ไรโซเบียมผลิตขึ้น นอกเหนือไปจากการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของไรโซเบียมในสิ่งแวดล้อม (1, 2) แล้วยังมีความสำคัญในการยึดเกาะกับรากต้นถั่ว แล้วต่อมาจึงสร้างและหลั่งสาร Nod factor ที่ไรโซเบียมสร้างขึ้นเป็นผลให้เกิดการโค้งงอของรากขนอ่อนและกระตุ้นให้เซลล์ชั้นคอเท็กซ์เกิดการแบ่งเซลล์ซึ่งเป็นลำดับขั้นต่อมาในกระบวนการสร้างปมราก ด้วยบทบาทสำคัญ EPS ต่อประสิทธิภาพต่อการสร้างปมรากถั่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนต้นๆของกระบวนการสร้างปมราก (3) และความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม ปัจจัยแวดล้อมหลายประการที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสร้าง EPS เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (4) อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน (5) ธาตุโลหะ เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนาสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสนับสนุนการเจริญและการผลิตสารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของไรโซเบียม จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาประสิทธิภาพและส่งเสริมการใช้ปุ๋ยไรโซเบียมในการเกษตรกรรมทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ลดปัญหาสารเคมีตกค้างในดินและการทำลายโครงสร้างดิน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการใช้พื้นดินเกษตรกรรมอย่างมีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และยั่งยืน

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจนในการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจตระกูลถั่วเช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว เป็นต้น นอกจากค่าใช้จ่ายสำหรับต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นแล้ว ยังเป็นการเพิ่มสารเคมีตกค้างในแหล่งดินทำการเกษตร การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีคุณประโยชน์หลายประการทั้งต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม เช่น เป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการซื้อปุ๋ยเคมีในโตรเจนที่มีแนวโน้มของราคาสูงขึ้น ช่วยเพิ่มผลผลิตต่อไร่ถึง 15-20% (6) และยังเป็นการลดปริมาณสารเคมีตกค้างในพื้นที่ทำการเกษตร พบว่าในอดีตมีการใช้ปุ๋ยชีวภาพในโตรเจนน้อยแต่มีแนวโน้มการใช้ที่สูงขึ้นเนื่องจากราคาที่สูงขึ้นของปุ๋ยเคมีในท้องตลาด การพัฒนาประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเป็นการชักจูงและเพิ่มปริมาณการใช้ของปุ๋ยดังกล่าว ซึ่งจะนำไปสู่การลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มอัตราการผลิตต่อไร่ของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรตระกูลถั่ว นอกจากนี้ยังเป็นการรักษาสมดุลสิ่งแวดล้อมและลดมลภาวะสารเคมีตกค้างในดิน ไม่เฉพาะการเกษตรที่จะได้รับประโยชน์จากการพัฒนาปรับปรุงประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงสภาพดินในแหล่งดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์

ปัจจัยแวดล้อมหลายประการส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ในปมรากพืชตระกูลถั่ว นอกเหนือจากชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมเอง ขั้นตอนแรกที่สำคัญในการเกิดปมรากถั่ว (7) ซึ่งเป็นแหล่งที่เกิดการตรึงของไนโตรเจน Extracellular Polymeric Substances (EPS) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมมีบทบาทสำคัญยิ่งต่อประสิทธิภาพในการสร้างปมรากพืชตระกูลถั่วของแบคทีเรีย (nodulation) (8) พบว่าชนิดและปริมาณการผลิต EPS นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแล้ว (9, 10) ปัจจัยแวดล้อมหลายชนิดเช่น อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน (11) อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (5, 12) ชนิดและปริมาณโลหะหนัก เป็นต้น สามารถส่งผลกระทบต่อการผลิต EPS การศึกษาสภาวะแวดล้อมต่างๆที่มีผลต่อการผลิต EPS จึงมีความสำคัญในการพัฒนาประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตแก่เกษตรกร และรักษาสมดุลสิ่งแวดล้อมในดินโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่การเกษตร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

แบคทีเรียในตระกูลไรโซเบียมซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) และเกิดขึ้นในสภาวะพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ระหว่างไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่ว ซึ่งแบคทีเรียมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่าปม (nodules) บริเวณรากหรือลำต้นของพืชตระกูลถั่ว (leguminous plants) แบคทีเรียไรโซเบียมจัดอยู่ในกลุ่ม Proteobacteria ทั้ง subclass α - Proteobacteria (α - Rhizobia) ได้แก่ จินัส Rhizobium, Allorhizobium และ Methylobacterium และใน subclass β -Proteobacteria (β - Rhizobia) ได้แก่ จินัส Burkholderia และ Cupriavidus (12) กระบวนการสร้างปมและตรึงไนโตรเจนดังกล่าวต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วและแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมอย่างจำเพาะ แต่ไรโซเบียมบางสายพันธุ์อาจมีความสามารถในการเข้าสร้างปมรากกับพืชตระกูลถั่วได้มากกว่าหนึ่งชนิด (13, 14, 15) นอกจากนี้การจัดกลุ่มแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมอาจจำแนกได้โดยใช้อัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ย (specific growth rate, μ) นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมที่เจริญได้รวดเร็ว (fast-growing rhizobium) เช่น *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* เป็นต้น ส่วนกลุ่มแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมที่มีการเจริญช้า (slow growing rhizobium) ได้แก่ *Rhizobium japonicum* และ *Rhizobium lupine* เป็นต้น (16, 17, 18) หรืออาจจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโดยคำนึงถึงความจำเพาะเจาะจงในการสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่ว (host specificity) (19, 20, 21, 22, 23)

ขั้นตอนในการเกิดปมรากถั่วมีหลายขั้นตอน (24, 25, 26) เริ่มจากไรโซเบียมถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่เข้าหารากพืชตระกูลถั่ว (chemotaxis) อันเนื่องมาจากสาร flavonoid หรือ isoflavonoid ที่รากพืชปลดปล่อยออกมา แต่ขั้นตอนที่สำคัญคือขั้นตอนในการยึดเกาะของแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมกับรากของพืชตระกูลถั่วที่จำเพาะ ความจำเพาะเบื้องต้นนี้ถูก

สันนิษฐานว่าเกิดจากความจำเพาะของการจับกันระหว่าง lectin (a specific carbohydrate-binding proteins) กับ mono- หรือ oligosaccharide (EPS) ที่แบคทีเรียไรโซเบียมผลิตและปลดปล่อยออกมา ในเวลาต่อมา พบว่า Nod factor เป็นกุญแจสำคัญทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำเพาะเจาะจงระหว่างชนิดและสายพันธุ์ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว แต่อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการยึดเกาะเริ่มแรกระหว่าง lectin ที่สร้างโดยรากพืชและเพื่อให้เกิดกระบวนการสร้างปมรากถั่ว นั้น Extracellular Polymeric Substances (EPS) (27, 28, 29, 30, 31, 32) ที่สร้างโดยแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียมมีบทบาทสำคัญอย่างมาก พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของ EPS ที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียไรโซเบียมประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามัญ เช่น D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, D-glucuronic acid และ D-galactose ซึ่งพบว่า repeating units แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียหรืออาจแตกต่างกันเมื่อมีความจำเพาะต่อพืชตระกูลถั่วต่างชนิดกันแม้แบคทีเรียจะเป็นชนิดหรือสายพันธุ์เดียวกัน (33, 34) นอกจากนี้ repeating units ที่แตกต่างกันแล้ว โมเลกุลที่เชื่อมระหว่าง repeating units อาจแตกต่างกันไปด้วย ตัวอย่างของโมเลกุลที่เชื่อม repeating units ได้แก่ acetyl, pyruvyl, succinyl และ hydroxybutanoyl ตัวอย่างของ EPS ที่ผลิตโดยไรโซเบียมสายพันธุ์ดังในภาพที่ 1

เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลโดยทั่วไปของ EPS ประกอบด้วยประจุจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งประจุลบเป็นองค์ประกอบของโมเลกุล จึงทำให้ถูกสันนิษฐานว่าบทบาทของ EPS คือการยึดเกาะพื้นผิว (รากพืชตระกูลถั่ว) และสร้างพันธะกับ lectin ซึ่งเป็นโมเลกุลโปรตีนที่สร้างพันธะกับน้ำตาลและพบโมเลกุลในเมล็ดถั่ว รวมถึงราก ก้าน ใบและเปลือกของพืชตระกูลถั่ว (35, 36) นอกจากนี้ EPS ยังช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมที่สามารถระบอบการอยู่รอดของแบคทีเรีย (37, 38) ควบคุมแรงดันออสโมติก (39, 40) เป็นต้น อีกบทบาทที่สำคัญของ EPS ต่อการอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียไรโซเบียมและรากพืชตระกูลถั่วคือ การยึดเกาะและของไรโซเบียมกับรากพืชซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ไม่สามารถสร้าง EPS ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสร้างปมรากในพืชตระกูลถั่ว นอกจากนี้ดังที่กล่าวข้างต้น EPS ทำหน้าที่ในการจำเพาะ (recognition) และกีดกันหรือยับยั้งกลไกกระบวนการป้องกันการติดเชื้อทั่วไปของพืชเจ้าบ้าน (41, 42)

ประสิทธิภาพของขั้นตอนการเกาะยึดของไรโซเบียมแตกต่างและขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของ EPS ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งพบว่าโดยทั่วไปปัจจัยแวดล้อมหลายอย่างส่งผลกระทบต่อชนิดและปริมาณของ EPS เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (5, 43, 44) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (13) รวมถึงอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (5, 12) ความเป็นกรด-ด่าง (46) ชนิดและปริมาณของโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนโลหะที่มีวาเลนซ์เท่ากับ 2 (47) เป็นต้น

Staudt และคณะ (5) ได้ทำการทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนต่างกัน 6 ชนิด ต่อการเจริญและการผลิต EPS ของ *Rhizobium tropici* ซึ่งจากการตรวจนับเซลล์โดยวิธี plate count พบว่าผลการสนับสนุนการเจริญของเซลล์ตามลำดับดังนี้ fructose = mannitol > glucose = arabinose > sucrose > glutamate อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ที่แตกต่างอยู่ในช่วง $2.4 \times 10^9 - 7.9 \times 10^9$ ลำดับชนิดของน้ำตาลข้างต้นแตกต่างไปจากลำดับของชนิดของน้ำตาลที่สนับสนุนการสร้าง EPS สูงสุด ซึ่งมีลำดับดังนี้ Sucrose = glucose (4x) > fructose = glutamate (3x) > mannitol = arabinose (x) เมื่อคำนึงถึงอัตราการสร้าง EPS แล้ว พบว่า glucose ให้ค่าสูงสุดโดยประมาณ $1.1 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ในศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้าง EPS พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย sucrose 20 g L^{-1} และ $\text{NH}_4\text{Cl } 2 \text{ g L}^{-1}$ (0.2%, w/w) ซึ่งมีค่า C:N ratio = 10 ให้ปริมาณการผลิต EPS สูงสุดเท่ากับ 4 g L^{-1} และมีอัตราการผลิตเท่ากับ $1.1 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ในขณะที่ C:N = 5, 10 และ 40 ให้ค่าที่น้อยกว่าโดยประมาณ 0.81, 0.83 และ 0.65 ตามลำดับ Breedveld และคณะ (44) ทำการทดสอบผลการผลิต EPS ในระบบ batch เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C โดย *Rhizobium leguminosum* bv *trifolii* TA-1 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม fast-growing rhizobium เมื่อใช้น้ำตาล glucose, sucrose, galactose และ mannitol ปริมาณ 10 g L^{-1} โดยมี glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า แหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิต EPS มีลำดับดังนี้ mannitol > sucrose > glucose = galactose

ดังนั้นการศึกษาถึงปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณและคุณภาพของ EPS ที่ผลิตโดยแบคทีเรียตระกูลไรโซเบียม รวมถึงสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างปมรากพืชเศรษฐกิจตระกูลถั่วที่สำคัญของประเทศไทย และนำไปสู่การพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร และเป็นการรักษาสสมดุลสิ่งแวดล้อมในดินพื้นที่การเกษตรอีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

1. สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ใช้ในโครงการวิจัย

สายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีความสำคัญต่อการเกิดปมรากในพืชตระกูลถั่วได้จัดหาไรโซเบียมสำหรับโครงการวิจัยนี้จำนวนทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก A/Prof L.J.R. Foster หัวหน้าศูนย์ Biopolymer Research Groups (BRG), University of New South Wales, ประเทศออสเตรเลียจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ (1) *Rhizobium etli* strain M4 ซึ่ง genus สายพันธุ์นี้ปกติแล้วสามารถ symbiosis กับถั่วขาว (*Bruguiera cylindrica*) แต่สายพันธุ์นี้พบว่าอาศัยอยู่ร่วมกับ microalgae ที่คัดแยกได้จากกองแร่ เหมือนแร่แมงกานีส และอีก 6 สายพันธุ์ได้จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ประเทศไทย ได้แก่สายพันธุ์;

(2) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 01023 ซึ่ง symbiosis กับถั่วเหลือง (*Glycine max*)

(3) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 02001 ซึ่ง symbiosis กับถั่วเขียว (*Vigna radiata*)

(4) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 03001 ซึ่ง symbiosis กับถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*)

(5) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 17007 ซึ่ง symbiosis กับถั่วฝักยาว (*Vigna sinensis*)

(6) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 18005 ซึ่ง symbiosis กับถั่วลันเตา (*Pisum sativum*)

(7) ไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA TAL 734 ซึ่ง symbiosis กับปอเทือง (*Crotalaria juncea*)

ซึ่งศูนย์วิจัยจุลินทรีย์ดินยังได้ดำเนินการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานถึงระดับจีโนมโดยเทคนิคซีวโมเลกุลเพียง 3 สายพันธุ์คือ DASA 01023, DASA 02001 และ DASA 03001 ซึ่งจัดอยู่ในจีโนม *Bradyrhizobium japonicum* และ *Bradyrhizobium elkanii* (จากการสอบถามข้อมูล)

ทั้งนี้ได้ทำการรักษาเก็บสายพันธุ์แบคทีเรียไรโซเบียมในสต็อกเพื่อทำการวิจัยและป้องกันการกลายพันธุ์โดยการเก็บรักษาเชื้อใน YMA (Yeast mannitol) slant และปิดทับด้วย glycerol ทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ใน Freezer ที่ -20°C เมื่อนำสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมมาใช้ ทำโดยการ subculture ใน YMB และ streak บน YMA เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C และใช้สำหรับเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculums) สำหรับการทดลอง ยกเว้น *Rhizobium etli* สายพันธุ์ M4 ที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MO และ OMA แทน

2. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย

2.1 ศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ โดยการย้อมแกรมส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000X

2.2 ศึกษาลักษณะโคโลนีของไรโซเบียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YMA สำหรับ *R. etli* สายพันธุ์ M4 ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการออกซิไดซ์ Mn^{2+} โดยดูจากสีโคโลนีและรอบๆโคโลนีจะปรากฏสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง OMA

2.3 ศึกษาลักษณะคุณสมบัติระบบเมตาบอลิซึมบางประการโดยการทดสอบทางชีวเคมี

- catalase, oxidase, urease และ citrate utilization tests

2.4 ศึกษาความไว (sensitivity) ของไรโซเบียมต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ

- Chloramphenicol (C) 10 µg/disk, Tetracycline (TE) 30 µg/disk, Streptomycin (S) 10 µg/disk, Polymyxin B (PB) 30 µg/disk, Kanamycin (K) 30 µg/disk, Ciprofloxacin (CIP) 5 µg/disk, Gentamicin (GN) 30 µg/disk, Vancomycin (VA) 30 µg/disk และ Cephalothin (KF) 30 µg/disk

2.5 ศึกษาการเจริญและจัดกลุ่มตามอัตราการเจริญโดยจากการสร้างกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ที่มี Bromthymol blue (bromnmothylmolsulfobephthalein) หรือ BTB เป็น pH indicator

3. การศึกษาอิทธิพลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน รวมถึงอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย

2.1 ทดสอบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนโดยการปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารมาตรฐานคือ YMB สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ โดยการปรับเปลี่ยนแหล่งจาก mannitol เป็น glucose และ sucrose ใน YMB ยกเว้น *R. etli* M4 ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 โดยปรับจากแหล่งคาร์บอนหลักเดิมคือ กลูโคส เป็น

sucrose, lactose, mannitol, rhamnose และ dextran โดยคำนวณให้มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนรวมคงที่ และทำเช่นเดียวกับกับ DM3

2.2 ทดสอบอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนโดยการเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารมาตรฐานคือ YMB สำหรับไรโซเปียมสายพันธุ์ต่างๆ โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเดิม คือ yeast extract เป็น peptone และ malt extract สำหรับ *R. etli* M4 ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 โดยการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนหลักจาก urea เป็น peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + peptone และ glutamic + yeast extract ใน YMB โดยคำนวณให้มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนรวมคงที่

2.3 ทดสอบอิทธิพลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยคัดเลือกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 2.1 และ 2.2 โดยปรับอัตราส่วนให้ C:N ratio = 10 ตามลำดับ โดยที่หากปรับเปลี่ยนปริมาณแหล่งคาร์บอนให้คงปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (ซึ่งได้ทำการทดสอบเฉพาะไรโซเปียมบางสายพันธุ์)

การทดสอบในข้อ 2.1-2.3 นั้น พารามิเตอร์ที่ใช้ตรวจวัดการเจริญของไรโซเปียมและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีดังนี้

- การตรวจวัดการเจริญ โดยอาศัย
 - การวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
 - การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ โดยการทดสอบ Bradford protein assay
 - การวัดมวลชีวภาพแห้ง (dry weight of biomass)
 - การตรวจสอบการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยอาศัย
 - การวัดปริมาณ β -glucan โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสาร calcofluor (48)
 - การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method (49)
- 2.4 ทดสอบอิทธิพลของไอออนโลหะ เช่น แมงกานีส (Mn^{2+}) เหล็ก (Fe^{2+}) สังกะสี (Zn^{2+}) ทองแดง (Cu^{2+}) และแคดเมียม (Cd^{2+}) ต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ (ซึ่งได้ทำการทดสอบเฉพาะ *R. etli* M4)

4. การศึกษาจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อไรโซเปียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย ยกเว้น *R. etli* M4 โดยอาศัย 16S rRNA nucleotide sequencing

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยวิธี colony PCR และใช้ไพรเมอร์ดังตารางในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ลำดับที่	ชื่อ	ประเภท	ชนิด	ขนาด (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์
1	27F	universal primer	forward	41	TAG TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
2	1492Rc	universal primer	reverse	41	TAG CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAC GGC TAC CTT GTT ACG AC
3	357F	universal primer	forward	19	CTC CTA CGG GAG GCA GCA G
4	533F	universal primer	forward	19	GTG CCA GCA GCC GCG GTA A
5	CDR	universal primer	reverse	23	CTT GTG CGG GCC CCC GTC AAT TC
6	1100R	universal primer	reverse	16	AGG GTT GCG CTC GTT G

และนำ PCR product หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับที่ได้เปรียบเทียบกับ type strain และ non type strain ในฐานข้อมูล Ribosomal Database project-release 10 (<http://rdp.cme.msu.edu>) นำ nucleotide sequences ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 20 ลำดับ มาทำ alignment และสร้างเดนโดรแกรมโดยอาศัยโปรแกรม Geneious 5.6.5 (evaluation version)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results & Discussion)

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในโครงการวิจัย

1.1 รูปร่างลักษณะเซลล์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ

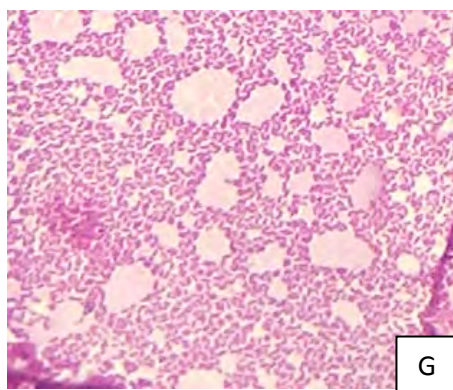
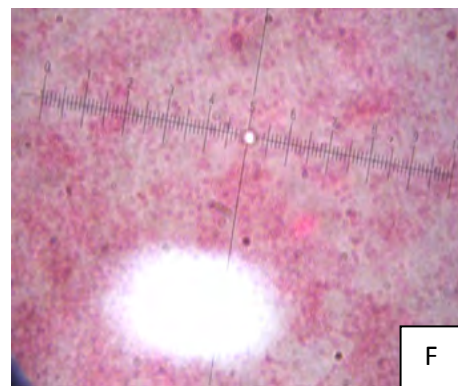
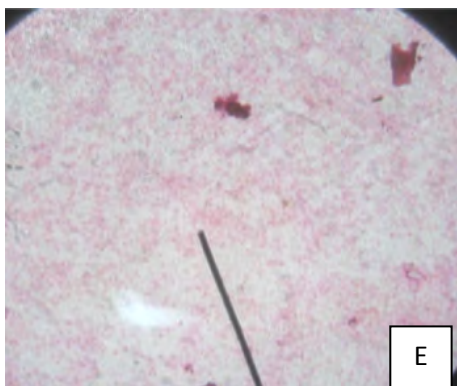
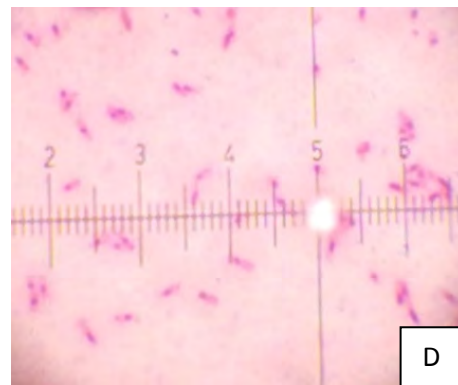
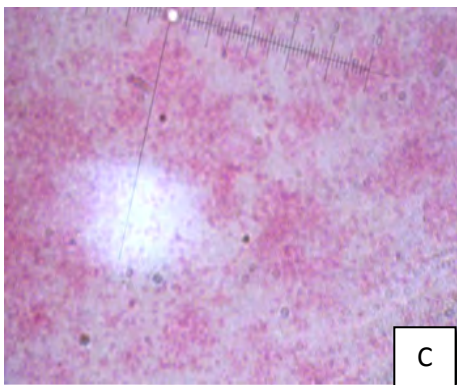
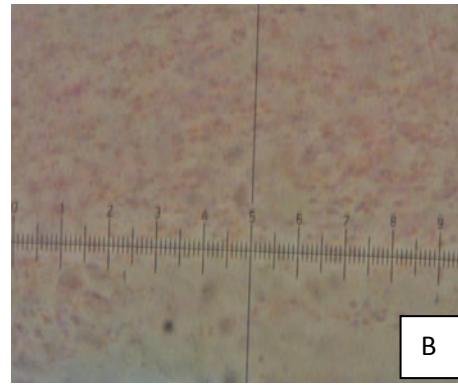
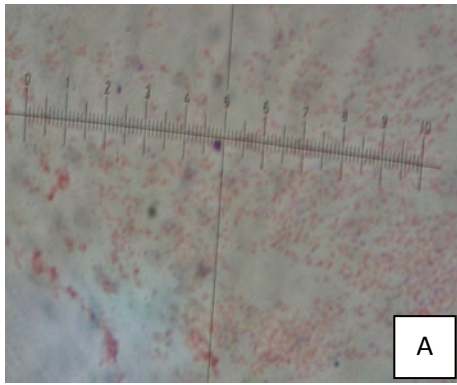
ได้ศึกษาทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ โดยการย้อม Gram ส่องตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างสั้น มีขนาดประมาณ $0.5-1.0 \mu \times 1-3 \mu$ (ภาพที่ 1 A และ B) ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ พบ inclusion body เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน หรืออยู่ในช่วง stationary ซึ่งมีรายงานว่าไรโซเบียมสร้าง PHB granule เมื่ออยู่ในสภาวะที่เมแทบอลิซึมไม่สมดุล เช่น ปริมาณของแหล่งคาร์บอนสูง หรือมีแคตไอออนสูงในสิ่งแวดล้อม (49) ซึ่งมักพบว่าเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase

1.2 ศึกษาลักษณะโคโลนีของไรโซเบียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YMA สำหรับไรโซเบียมทุกสายพันธุ์และ OMA สำหรับ *R. etli* M4

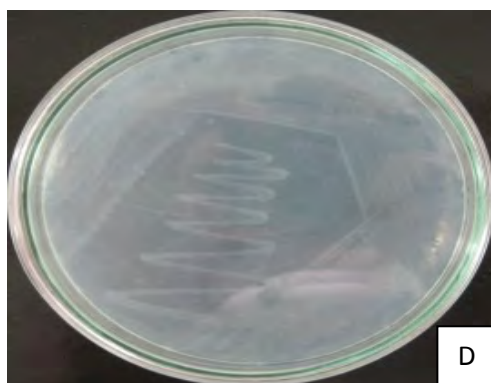
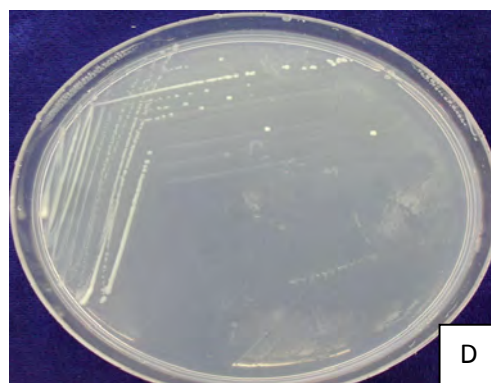
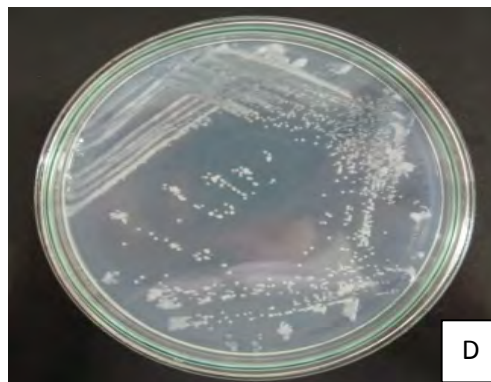
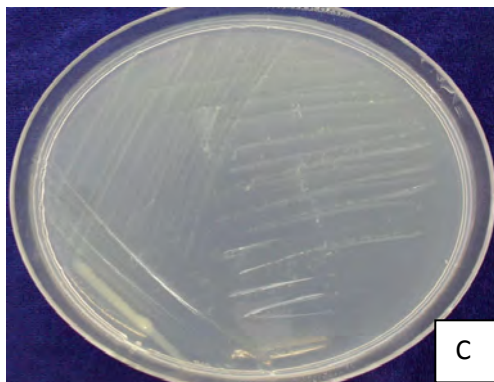
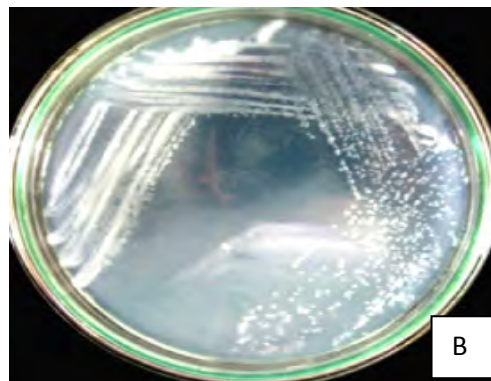
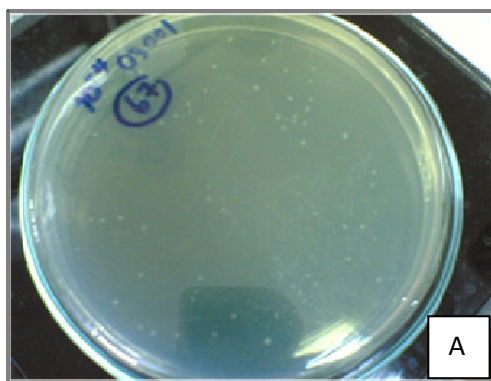
โคโลนีของไรโซเบียมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 1-3 มิลลิเมตร โคโลนีมีลักษณะสีขาวครีม ขุ่น นูน (convex) ขอบเรียบ (entire) (ภาพที่ 2) และพบว่าโคโลนีของ DASA 18005 มีลักษณะเมือกเยิ้ม ซึ่งแตกต่างไปจากโคโลนีของไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการวิจัยนี้ (รูปที่ 3(E)) สำหรับโคโลนีของ *R. etli* M4 ที่เจริญบนอาหาร OMA ซึ่งมี Mn^{2+} เป็นองค์ประกอบอยู่ พบว่า ในระยะเวลาการเจริญ 3-7 วัน โคโลนีมีสีขาวขุ่น (opaque) ขนาดเล็ก โค้งนูน (convex) ขอบเรียบ (entire/regular) รอบๆโคโลนีเกิดฝ้าขาวขุ่นโดยรอบ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น 7-17 วัน พบว่า โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและสีเข้มขึ้นตามระยะเวลาที่เชื้อเจริญ ซึ่งรอบๆโคโลนีที่เกิดฝ้าขาวขุ่น ฝ้าขาวดังกล่าวก็ค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจาก *R. etli* M4 เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถออกซิไดซ์ Mn^{2+} เป็น Mn^{3+} และ Mn^{4+} ซึ่งออกไซด์ของแมงกานีสไม่ละลายในน้ำหรือละลายได้น้อย และออกไซด์ของ Mn^{3+} มีสีขาวขุ่น ในขณะที่ออกไซด์ของ Mn^{4+} มีสีน้ำตาล มีรายงานว่าสันนิษฐานว่าเชื้อแบคทีเรียที่ออกซิไดซ์โลหะได้นั้นได้รับพลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงเป็นการลดความเป็นพิษของไอออนโลหะที่ความเข้มข้นสูงๆต่อเซลล์ได้ (50)

2. การศึกษาลักษณะคุณสมบัติระบบเมแทบอลิซึมบางประการโดยการทดสอบทางชีวเคมี

จากผลการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase ในการย่อยสลายสาร H_2O_2 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหายใจแบบใช้ออกซิเจนที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม strict aerobe และ facultative anaerobe พบว่าไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบให้ผลบวก นอกจากนี้นั้ยังทดสอบการสร้างเอนไซม์ cytochrome oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ reduced cytochrome เป็น oxidized cytochrome ที่พบในแบคทีเรียกลุ่ม strict aerobe และ facultative anaerobe ตระกูล Vibrionaceae แต่ไม่พบเอนไซม์ดังกล่าวแบคทีเรียกลุ่ม anaerobe และ facultative anaerobe ตระกูล Enterobacteriaceae ไรโซเบียมส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม aerobic bacteria ซึ่งสอดคล้องกับผลทดสอบ catalase และ oxidase tests ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease ซึ่งจัดเป็น inducible enzyme และเอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายยูเรีย ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย ซึ่งในอาหารที่ใช้ทดสอบมี phenol red เป็น pH indicator ดังนั้นในกรณีที่จุลินทรีย์ย่อยยูเรียได้จะเกิดแอมโมเนียซึ่งเป็นเบสและเปลี่ยนสี pH indicator เป็นสีชมพู และพบว่าไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบให้ผลบวก และจากการทดสอบความสามารถในการ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และมีกลีโค แอมโมเนียม เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือการทดสอบความสามารถในการสร้าง citrate denolase หรือ citrate oxaloacetate lyase พบว่า ไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ให้ผลลบ ซึ่งไรโซเบียมส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบเป็นลบสอดคล้องกับผลการทดสอบที่ได้ (ตารางที่ 1) สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีของ *R. etli* M4 นั้นได้ทำการทดสอบเพิ่มเติม ดังในตารางที่ 2 เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวไม่ได้คัดแยกมาจากปมของรากพืชตระกูลถั่ว



ภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะเซลล์แบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ (A) DASA 01023, (B) DASA 02001, (C) DASA 03001, (D) DASA 17007, (E) DASA 18005, (F) TAL 734 และ (G) *R. etli* M4 เมื่อย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X



ภาพที่ 3 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ (A) DASA 01023, (B) DASA 02001, (C) DASA 03001, (D) DASA 17007, (E) DASA 18005, (F) TAL 734 และ (G) *R. etli* M4 เจริญบน YMA หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน

ตารางที่ 1 ผลทดสอบทางชีวเคมีบางประการของไรโซเบียมที่ใช้ในโครงการวิจัยสายพันธุ์ไรโซเบียม

สายพันธุ์ไรโซเบียม	ผลทดสอบทางชีวเคมี			
	Catalase test	Oxidase test	Urease test	Citrate utilization test
DASA 01023	+ve	+ve	+ve	-ve
DASA 02001	+ve	+ve	+ve	-ve
DASA 03001	+ve	+ve	+ve	-ve
DASA 17007	+ve	+ve	+ve	-ve
DASA 18005	+ve	+ve	+ve	-ve
TAL 734	+ve	+ve	+ve	-ve
<i>R. etli</i> M4	+ve	+ve	+ve	-ve

หมายเหตุ +ve ผลทดสอบเป็นบวก
-ve ผลทดสอบเป็นลบ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *R. etli* M4

การทดสอบทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ	ลักษณะ/คุณสมบัติจากผลการทดสอบ
Catalase test	+ve	สังเคราะห์เอนไซม์ catalase (พบใน aerobic และ facultative anaerobic bacteria)
Oxidase test	+ve	สังเคราะห์เอนไซม์ oxidase เร่งปฏิกิริยาใน cytochrome oxidase system (พบใน aerobic และ facultative anaerobic bacteria)
Triple sugar iron (TSI) agar	Alk / no change	สลายกลูโคสในสภาวะ aerobic
Oxidation-Fermentation (OF) test	เปิด / ปิด : Inert / -	Aerobic bacteria สลายโปรตีนได้เบส (oxidation)
Urease test	-ve	ไม่สังเคราะห์เอนไซม์ urease
Decarboxylase test	-ve	ไม่สังเคราะห์เอนไซม์ lysine, ornithine และ arginine decarboxylases
Indole production test	-ve	ไม่สังเคราะห์เอนไซม์ tryptophanase
Methyl red test and Voges-Proskauer test (MR-VP)	-ve / -ve	ไม่หมักน้ำตาล
Citrate utilization test	-ve	ไม่สังเคราะห์เอนไซม์ citrate demolase หรือ citrate oxaloacetate lyase ในการย่อยสลายซิเตรท

หมายเหตุ +ve ผลทดสอบเป็นบวก
-ve ผลทดสอบเป็นลบ

3. การศึกษาความไว (sensitivity) ของไรโซเบียมต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ

จากการทดสอบความไว (sensitivity) ต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ ของไรโซเบียม พบว่า ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 เกิด clear zone หรือไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ โดยมีความไวต่อ Tetracyclin และ Ciprofloxacin มากกว่ายาปฏิชีวนะอื่น ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023 มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ทุกชนิดที่ทำการทดสอบยกเว้น Kanamycin โดยรวมแล้วพบว่าไรโซเบียมไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก พบเพียง DASA 03001 และ DASA18005 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone ที่น้อย ดังตารางที่ 3 ทั้งนี้สอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ในไรโซเบียมซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบจึงมีชั้น peptidoglycan ที่บางกว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จึงเป็นเหตุให้ความไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวน้อยกว่า

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ

ยาปฏิชีวนะ	Mode of action	DASA 01023	DASA 02001	DASA 03001	DASA 17007	DASA 18005	TAL 734	<i>R. etli</i> M4
		Yeast-Mannitol agar						DM3 agar
Streptomycin (S)	PS(30S)r	-	+ (3.1)	+ (1.9)	+ (2.9)	+ (1.9)	+ (1.2)	-
Kanamycin (K)	PS(30S)r	+ (2.6)	-	-	-	+ (3.1)	+ (1.2)	-
Gentamicin (GN)	PS(30S)r	-	+ (1.3)	+ (1.5)	+ (1.2)	+ (2.2)	+ (2.8)	+ (1.2)
Tetracycline (TE)	PS(30S)i	-	+ (1.0)	+ (2.5)	+ (1.2)	+ (4.0)	-	+ (1.2)
Chloramphenicol (C)	PS(50)	-	-	-	-	+ (1.5)	-	+ (1.9)
Vancomycin (VA)	CW	-	-	+ (1.0)	-	+ (2.5)	-	+ (1.6)
Cephalothin (KF)	CW	-	-	-	-	+ (2.6)	-	-
Polymyxin B (PB)	CM	-	-	+ (1.2)	-	+ (1.1)	-	-
Ciprofloxacin (CIP)	NA	-	-	+ (2.6)	+ (1.8)	+ (4.4)	-	-

หมายเหตุ - ความเข้มข้นของ CIP = 5 µg/disk

- ความเข้มข้นของ S และ C = 10 µg/disk

- ความเข้มข้นของ TE, PB, K, GN, VA และ KF = 30 µg/disk

- (number) หมายถึง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ในหน่วย centimeter ซึ่ง antibiotic disk มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 millimeters

- PS(30S)i หมายถึง ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับกับ 30S ribosomal subunit แบบถาวร

- PS(30S)r หมายถึง ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับกับ 30S ribosomal subunit แบบไม่ถาวร

- PS(50S) หมายถึง ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับกับ 50S ribosomal subunit

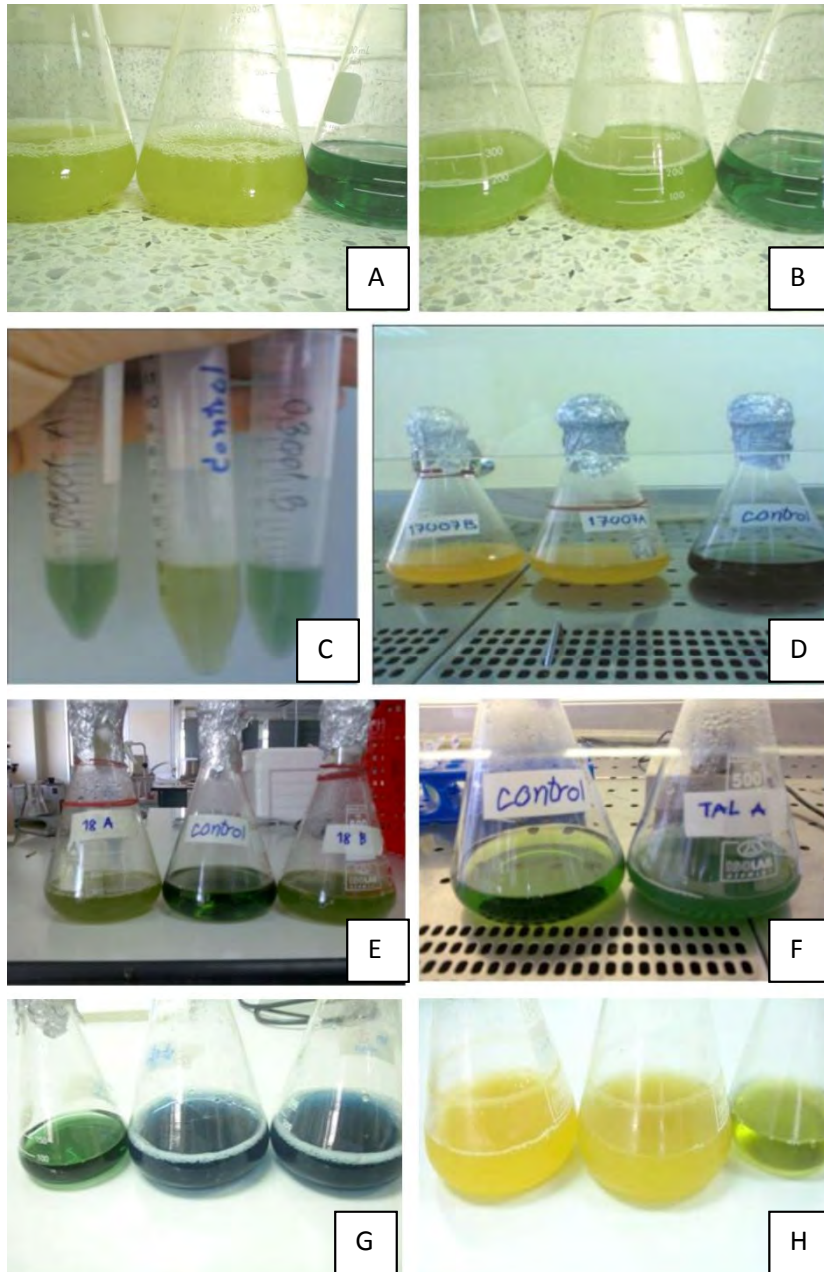
- CW หมายถึง ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดยยับยั้งการเกิด cross-linking ของหน่วยย่อยในการสังเคราะห์ peptidoglycan

- CM หมายถึง ออกฤทธิ์รบกวนสมดุลการแพร่ผ่านเข้าออกของสารภายในเซลล์จากการจับกับประจุลบของ LPS ซึ่งส่งผลต่อสมดุลพันธะ electrostatic ระหว่าง amino cyclic peptide กับ ไอออน Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็นผลให้เซลล์แตกจากแรงดันออสโมติกได้ง่ายขึ้น

- NA หมายถึง ออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกจากการจับกับหน่วยย่อยของเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งทำหน้าที่ในการเกิด supercoiling ของ DNA

4. การศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารพื้นฐาน Yeast-Mannitol Broth (YMB)

จากการทดสอบอัตราการเจริญและการสร้างกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ที่มี pH indicator Bromthymol Blue (bromothymolsulfonephthalein) หรือ BTB ซึ่งในสภาวะที่เป็นกรด ($\text{pH} < 6.0$) จะมีสีเหลือง ในสภาวะเป็นกลาง ($6.0 < \text{pH} < 7.6$) จะมีสีเขียว และในสภาวะที่เป็นเบส ($\text{pH} > 7.6$) จะมีสีน้ำเงิน การเปลี่ยนสีของ BTB ใช้บ่งลักษณะการสร้างกรดและการสร้างเบสของเชื้อไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB + BTB และใช้ในการจัดกลุ่มไรโซเบียมโดยอาศัยการสร้างกรด-เบสดังกล่าว โดยที่ไรโซเบียมกลุ่ม fast-growing จะสร้างกรด และกลุ่มไรโซเบียม slow-growing จะสร้างเบส ผลการสอบลักษณะดังกล่าว พบว่า ไรโซเบียมส่วนใหญ่เปลี่ยนสีเขียวของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเขียวอมเหลือง ยกเว้น DASA 17007 ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และ *R. etli* M4 ที่เปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงิน อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)



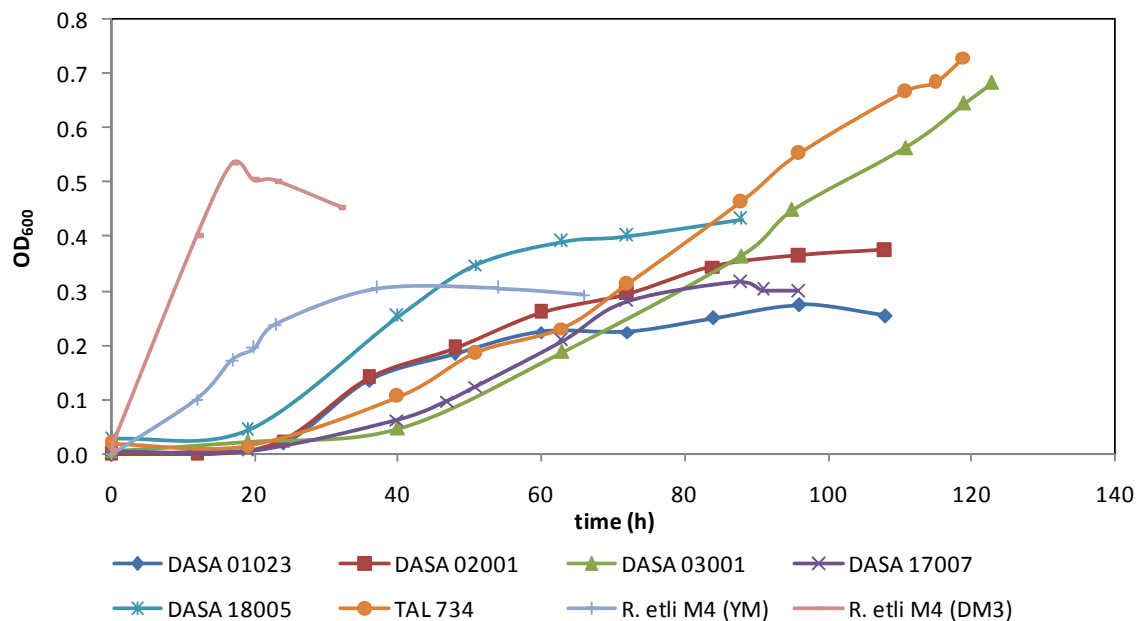
ภาพที่ 4 ผลการทดสอบการสร้างกรด-เบสของเชื้อไรโซเบียมเมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB + BTB และ DM3 + BTB สำหรับสายพันธุ์ *R. etli* M4 1) DASA 01023, B) DASA 02001, C) DASA 03001 D) DASA 17007, E) DASA 18005, F) TAL 734, G) *R. etli* M4 (YMB + BTB) และ H) *R. etli* M4 (DM3 + BTB)

จากการวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม ณ เวลาต่างๆกัน โดยวัดความขุ่นจนเป็นเวลา 5 วัน และหยุดวัดเมื่อค่าการดูดกลืนแสงมีค่าค่อนข้างคงที่หรืออาจกล่าวได้ว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary แล้วจึงพล็อตกราฟเพื่อคำนวณค่า doubling time (T_d) และ specific growth rate (μ) รวมถึงวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและหลังเชื้อเจริญ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของ pH ดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ ไรโซเบียมส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยและส่วนใหญ่จะมีค่า pH ที่ลดลง แต่ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงมาจาก pH เริ่มต้น 6.87 เป็น 4.71 และเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี bromthymol blue เป็นสีเหลืองได้อย่างชัดเจน สำหรับ *R. etli* M4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น จากเริ่มต้น 6.79 เป็น 7.62 ซึ่งเปลี่ยนสี bromthymol blue เป็นสีน้ำเงิน สำหรับ *R. etli* M4 ที่เลี้ยงในอาหาร DM3 ที่มี BTB นั้น มีค่า pH เริ่มต้นต่ำทำให้สีอาหารเริ่มต้นมีสีเหลืองอมเขียว แต่จากการวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงพบว่า มีค่า pH ที่ลดลง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากการสร้างกรดหรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอมโมเนียที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอัตราการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ จากภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่า *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB เข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีค่า T_d เท่ากับ 9 ชั่วโมง และมีค่า μ เท่ากับ 0.08 h^{-1} สำหรับ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 พบว่ามีอัตราการเจริญที่สูงและเข้าสู่ stationary phase ในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) และมีค่า OD_{600} ลดลงเรื่อยๆ ทั้งนี้อาจเกิดจากสถานะความเป็นกรดที่สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย จากการคำนวณ μ และ T_d ของไรโซเบียมที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB พบว่าอยู่ในช่วง $0.04 - 0.14 \text{ h}^{-1}$ และ 5.1 - 17.3 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 4 การทดสอบการสร้างกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB + BTB สำหรับไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ และ DM3 + BTB สำหรับเชื้อไรโซเบียม *R. etli* M4

สายพันธุ์ไรโซเบียม	parameters					
	Acid-base production	Initial pH	Final pH	T_d (h)	μ (h^{-1})	R^2
DASA 01023	slightly acid production	6.82	6.78	5.1	0.14	0.991
DASA 02001	slightly acid production	6.75	6.73	6.3	0.11	0.969
DASA 03001	slightly acid production	6.92	6.84	17.3	0.04	0.980
DASA 17007	acid production	6.87	4.71	7.4	0.09	0.987
DASA 18005	slightly acid production	6.87	6.36	10.5	0.07	0.960
TAL 734	slightly acid production	6.88	6.84	12.6	0.06	0.909
<i>R. etli</i> M4 (ใน YMB + BTB)	alkaline production	6.79	7.62	9.0	0.08	0.963
<i>R. etli</i> M4 (ใน DM3 + BTB)	acid production	5.72	5.37	2.6	0.27	0.947



ภาพที่ 5 การเจริญโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB + BTB ที่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ และการเจริญของเชื้อ *R. etli* M4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 + BTB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

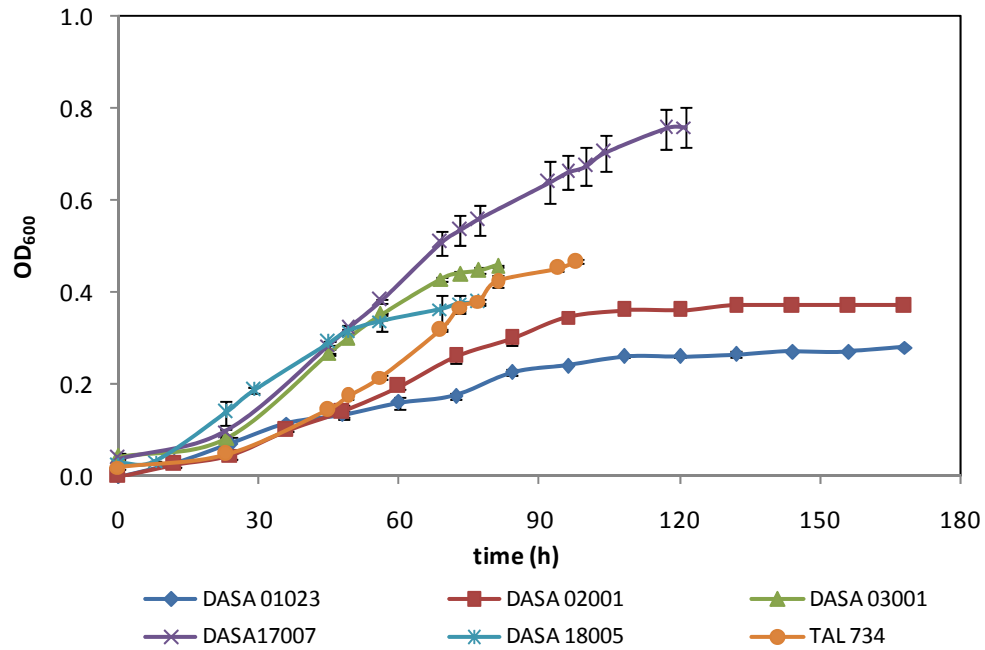
5. การศึกษาอิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ในเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ

5.1 ไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วจำนวน 6 สายพันธุ์ (DASA 01023, DASA 02001, DASA 03001, DASA 17007, DASA 18005 และ TAL 734)

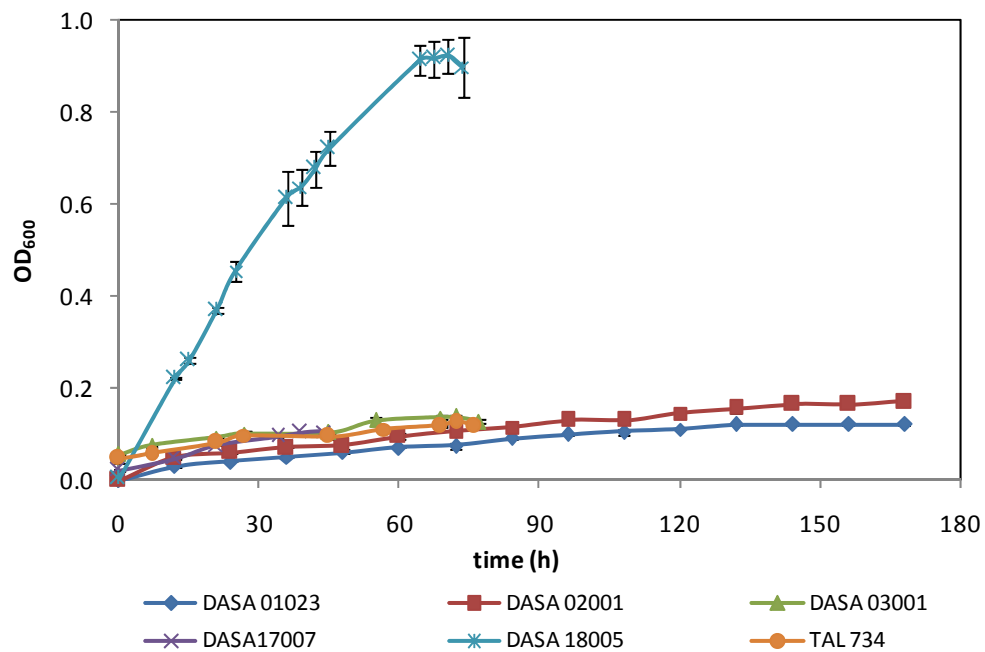
ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Yeast extract-mannitol broth หรือ YMB (ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม) และ DM3 (ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *R. etli* M4) ต่อการเจริญและการสร้าง EPS ของเชื้อไรโซเบียม ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงดังในภาคผนวก ก

ในภาพที่ 6 ซึ่งแสดงการเจริญของไรโซเบียมจำนวน 6 สายพันธุ์ ในอาหารมาตรฐาน YMB โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm จนเข้าสู่ช่วงแรกของระยะ stationary (ภาพที่ 6) พบว่า ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 มีค่า maximum OD_{600} สูงกว่าไรโซเบียมสายพันธุ์อื่น ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทดสอบมีค่า maximum OD_{600} ในช่วงประมาณ 0.3-0.8 และมีสายพันธุ์ไรโซเบียมเรียงลำดับค่า OD_{600} จากน้อยไปมาก คือ DASA 01023 < DASA 02001, DASA 18005 < DASA 03001, TAL 734 < DASA 17007 เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล sucrose แทน พบว่ามีไรโซเบียมมีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ DASA 18005 ที่พบว่า sucrose สนับสนุนการเจริญได้ดี (ภาพที่ 7) และเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาล glucose แทน (ภาพที่ 8) พบว่าแนวโน้มค่า maximum OD_{600} ที่วัดได้ส่วนใหญ่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำตาล mannitol ยกเว้นในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023, DASA 02001 และ DASA 18005 ที่ให้ค่าดังกล่าวสูงกว่าค่าที่ได้จากการใช้น้ำตาล mannitol โดยประมาณ 1.7, 1.25 และ 1.5 ตามลำดับ

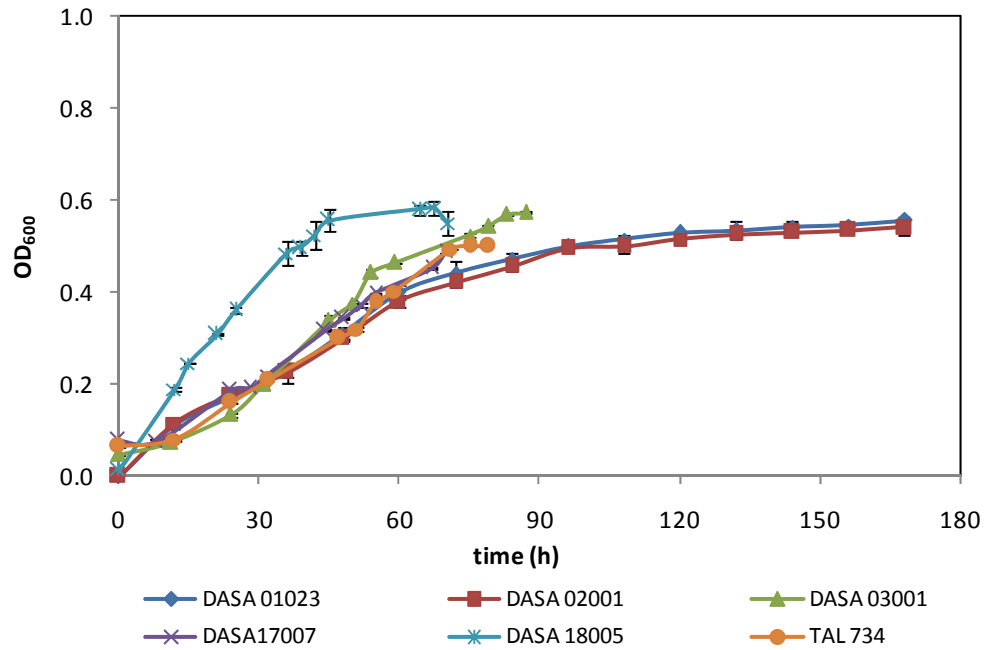
เช่นเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยการแทน yeast extract ในอาหาร YMB มาตรฐานด้วย malt extract พบว่ามีไรโซเบียมทุกสายพันธุ์มีการเจริญได้น้อยกว่าเมื่อให้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 9) ในขณะที่ให้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่า peptone สนับสนุนการเจริญไรโซเบียมโดยรวมได้ดีกว่า malt extract แต่สนับสนุนการเจริญน้อยกว่าการให้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ยกเว้น DASA 17007 ที่ให้ค่าไม่แตกต่าง (ภาพที่ 10) โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า maximum OD_{600} ที่ได้จาก yeast extract เปรียบเทียบกับ peptone พบว่า การใช้ yeast extract สนับสนุนการเจริญได้ดีกว่าเป็น 1.4 – 3 เท่า



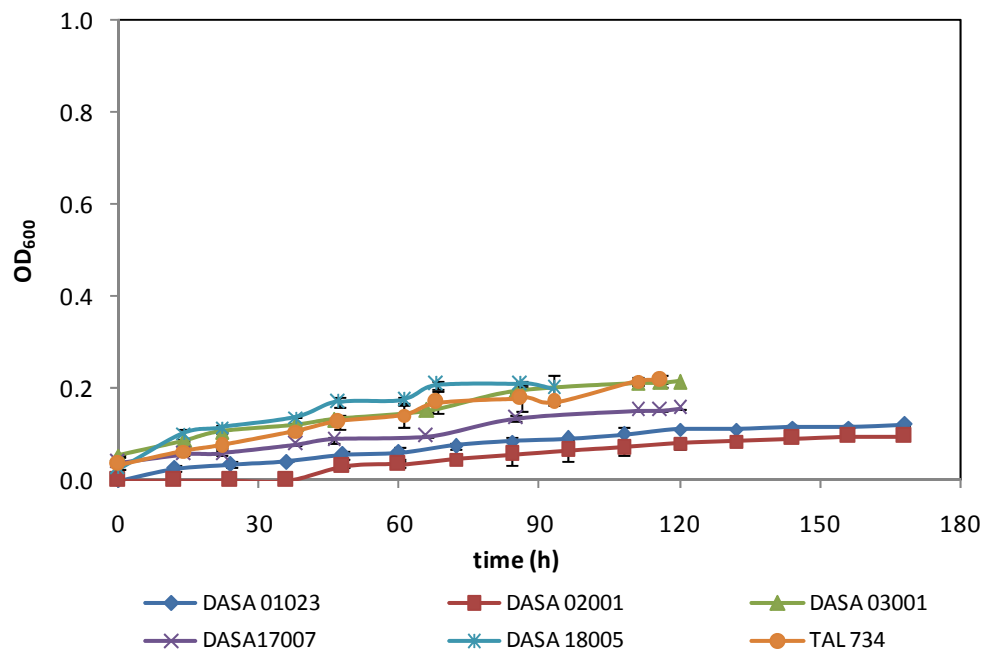
ภาพที่ 6 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเปียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



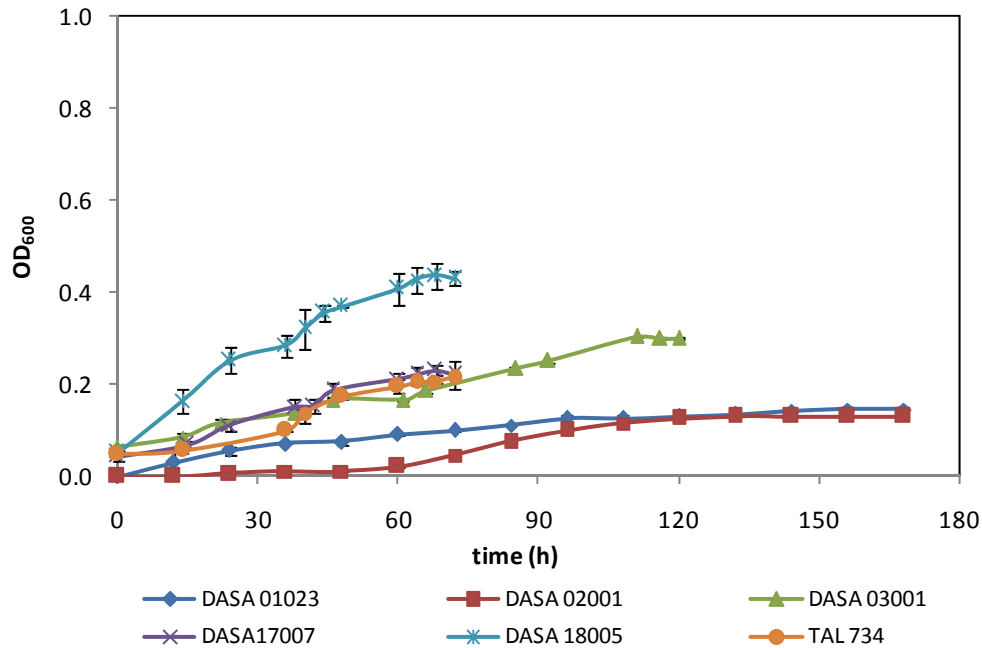
ภาพที่ 7 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเปียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



ภาพที่ 8 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

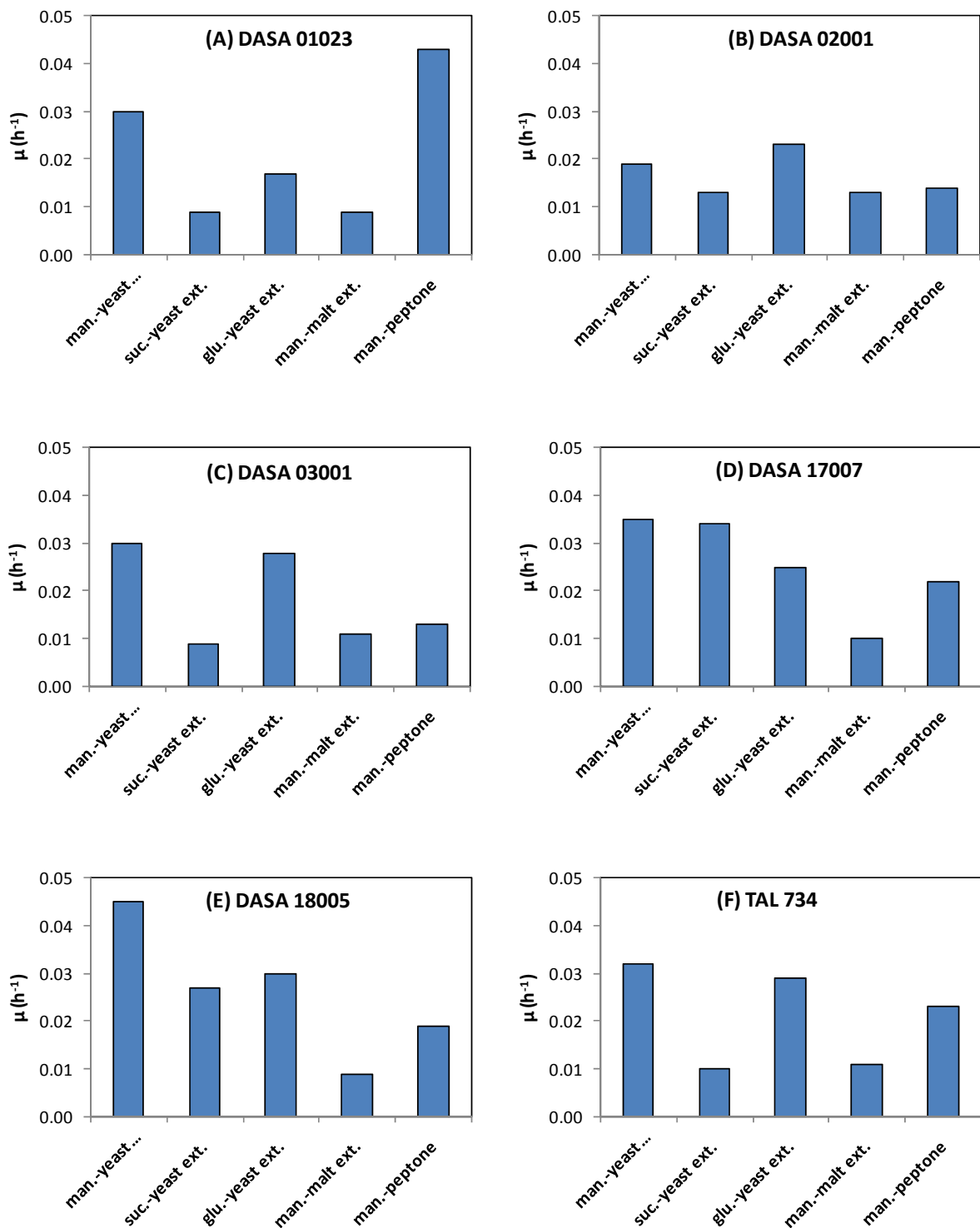


ภาพที่ 9 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - malt extract- broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



ภาพที่ 10 การเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - peptone broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

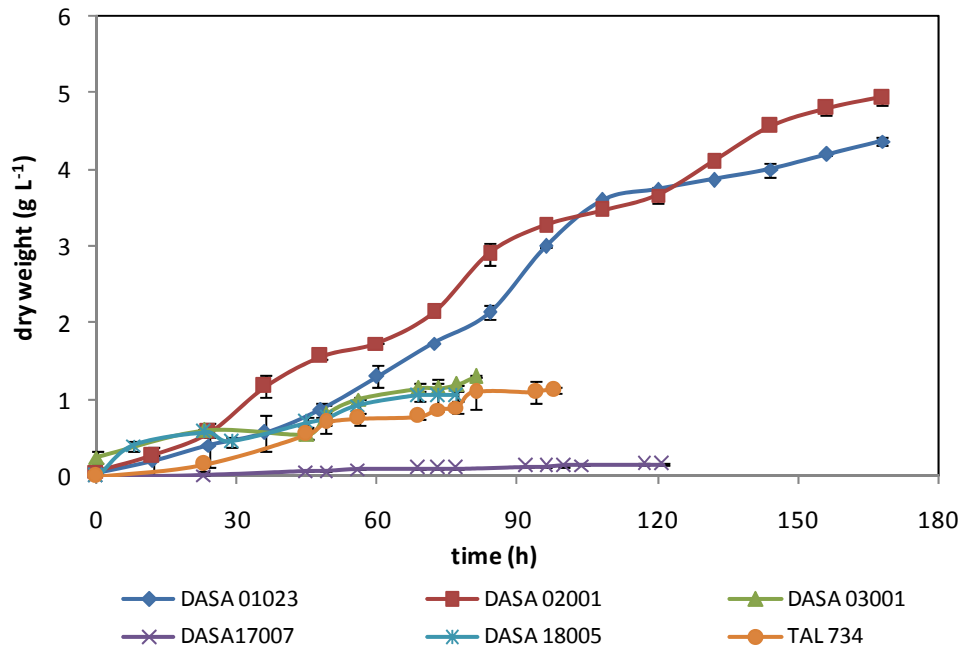
จากข้อมูลค่า OD₆₀₀ ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ให้ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน เมื่อนำมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เปรียบเทียบกัน ดังในภาพที่ 11 พบว่า โดยทั่วไปแล้ว อาหาร YMB สนับสนุนการเจริญของไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ได้ดี สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ mannitol-peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนหลัก นั้นมีค่า μ ที่สูงกว่าค่าที่ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ประมาณ 1.4 เท่า และมากกว่าอาหารอื่นๆปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำการทดสอบ โดยเฉลี่ย 4 เท่า สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 02001 มีความแตกต่างกันน้อยของค่า μ ที่ได้จากอาหารที่ปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001 พบว่า glucose สนับสนุนอัตราการเจริญได้ใกล้เคียงกับการให้ mannitol เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้อัตราการเจริญที่ดีกว่าแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอื่นๆที่ทดสอบโดยประมาณ 3 เท่า DASA 17007 และ DASA 18005 พบว่ามีอัตราการเจริญที่สูงกว่าหรือเท่ากับ 0.02 h^{-1} ยกเว้นในอาหาร malt extract-mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวคล้ายคลึงกับอัตราการเจริญของ TAL 734 ยกเว้น อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract-sucrose ที่ให้ค่า μ ที่ต่ำกว่า 0.01



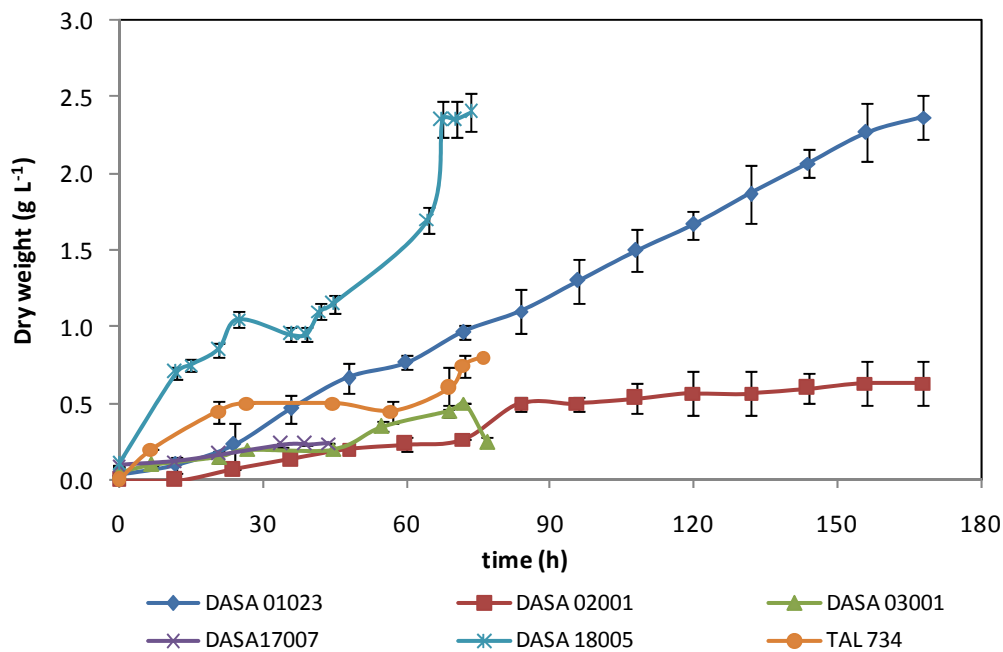
รูปที่ 11 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ (A) – (F) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน จากการคำนวณโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

อย่างไรก็ตามการวัดการเจริญด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เป็นการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียโดยคร่าว ทั้งนี้ความขุ่นที่สูงขึ้นอาจไม่ได้เกิดจากปริมาณจุลินทรีย์เท่านั้น แต่อาจเกิดจากปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นและปลดปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น โปรตีน สารโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการคำนวณอัตราการเจริญของไรโซเปียมแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยอาศัยค่ามวลชีวภาพแห้งที่วัดได้ สำหรับมวลชีวภาพนั้นหมายถึงเซลล์แบคทีเรีย สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สามารถถูกแรงปั่นเหวี่ยงทำให้ตกตะกอนลงมา ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB นั้นพบว่า ปริมาณมวลชีวภาพแห้งมีความสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ยกเว้นในกรณีของ DASA 17007 ที่พบปริมาณมวลชีวภาพแห้งที่น้อยทั้งๆที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง (ภาพที่ 12) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sucrose-yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน (ภาพที่ 13) พบว่าแนวโน้มปริมาณของมวลชีวภาพแห้งที่ได้สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสง ยกเว้นในกรณีของ DASA 01023 ที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อแม่เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาจนถึง 180 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) ซึ่งแตกต่างไปจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย และพบลักษณะปรากฏการณ์เช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี malt extract-mannitol และ peptone-mannitol เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน (ภาพที่ 15 และ ภาพที่ 16) ปริมาณมวลชีวภาพแห้งที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract-glucose มีค่าสูงสุดประมาณ 13 g L^{-1} สำหรับไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 01023 และไรโซเปียมสายพันธุ์ดังกล่าวให้ค่ามวลชีวภาพแห้งสูงสุดมากกว่ามวลชีวภาพแห้งของไรโซเปียมสายพันธุ์อื่นๆ ในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ เมื่อนำข้อมูลค่ามวลชีวภาพแห้งที่วัดได้ไปคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะแล้วนำไปพล็อตกราฟดังแสดงในภาพที่ 17 สำหรับไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 01023 ค่า μ จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งต่างไปจากค่า μ ที่คำนวณโดยใช้ข้อมูลค่าการดูดกลืนแสง ในทางกลับกันสำหรับค่า μ ของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 02001 จากการคำนวณโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบ พบว่าค่า μ ที่ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี mannitol-malt extract ซึ่งคำนวณจากมวลชีวภาพแห้งมีค่าน้อยกว่าที่ได้ในอาหารอื่นๆ และในไรโซเปียมสายพันธุ์อื่นๆ พบแนวโน้มค่า μ ที่คำนวณจากมวลชีวภาพแห้งไม่สอดคล้องกับค่า μ ที่ได้จากการคำนวณโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสง ดังนี้ สำหรับไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 03001 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose-yeast extract broth, ไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 17007 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol-yeast extract broth และอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract broth, ไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 18005 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB และสุดท้าย ไรโซเปียมสายพันธุ์ TAL 734 ที่พบว่าค่า μ ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงมีความแตกต่างกันเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน แต่พบว่าค่า μ ที่ได้จากการมวลชีวภาพแห้งนั้นไม่แตกต่างกันในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ

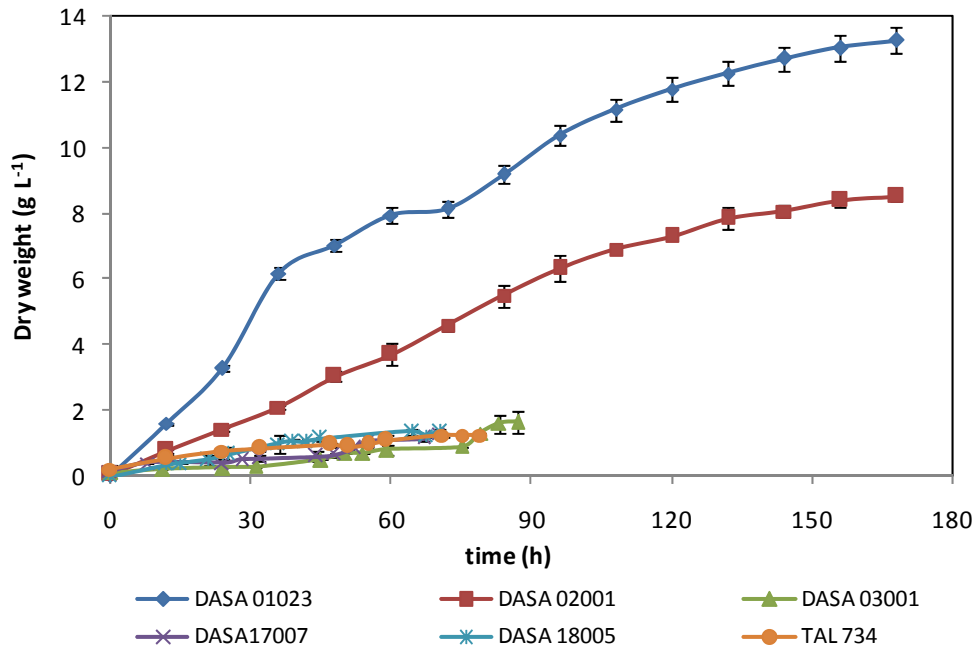
เมื่อนำค่ามวลชีวภาพแห้งที่ได้มาคำนวณต่อหน่วยเวลา หรือค่าอัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้ง แล้วพล็อตกราฟดังในภาพที่ 18 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract broth มีอัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ในไรโซเปียมทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ยกเว้นในกรณีของไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 18005 ที่อาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose-yeast extract broth ให้อัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งที่สูงกว่า สำหรับอัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งสูงสุดที่ได้รับเท่ากับ $1.8 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ โดยไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 01023 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract broth และพบว่าไรโซเปียมสายพันธุ์ DASA 17007 และ TAL 734 มีอัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งต่ำกว่า $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$



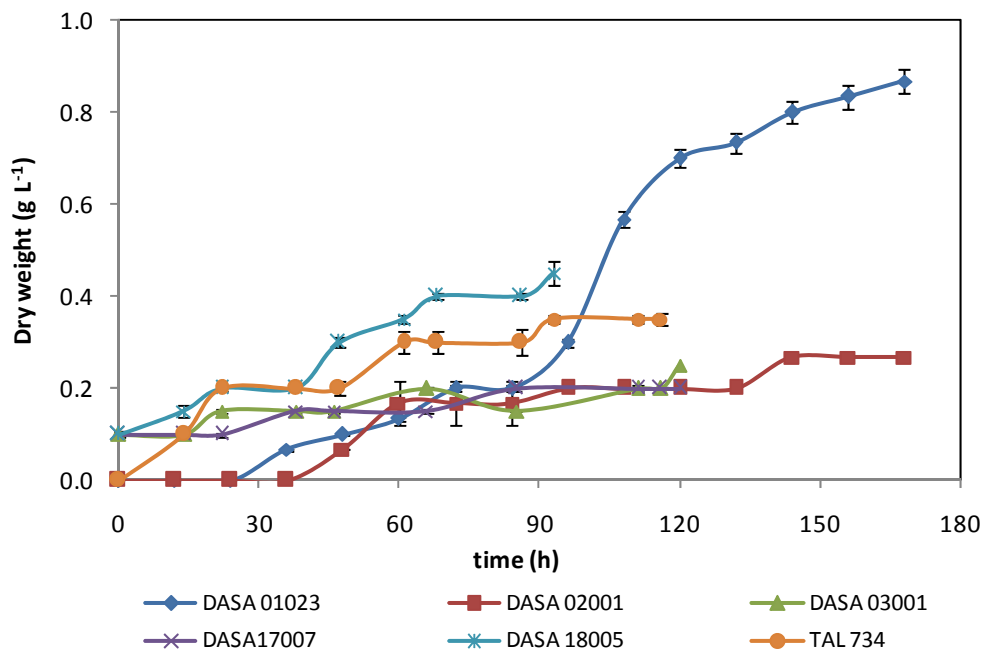
ภาพที่ 12 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



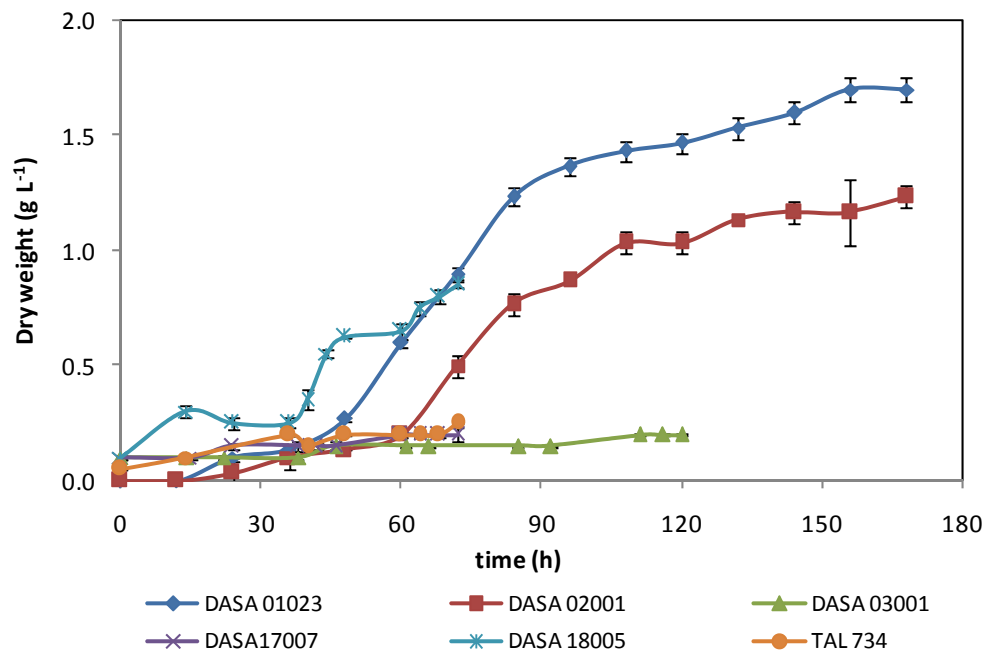
ภาพที่ 13 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



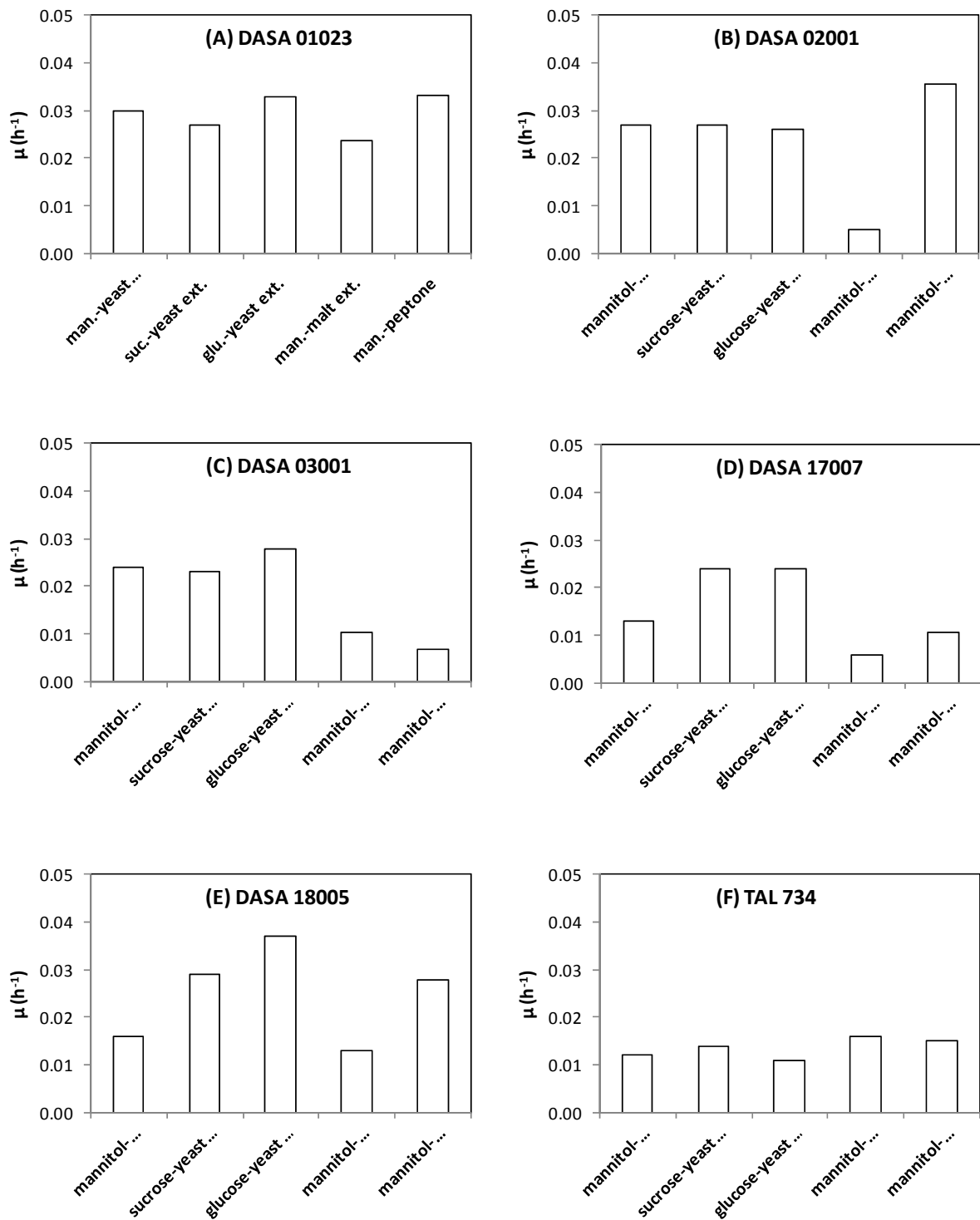
ภาพที่ 14 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose - yeast extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



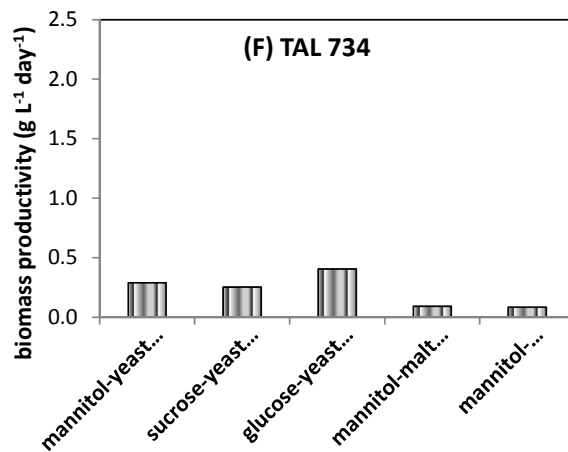
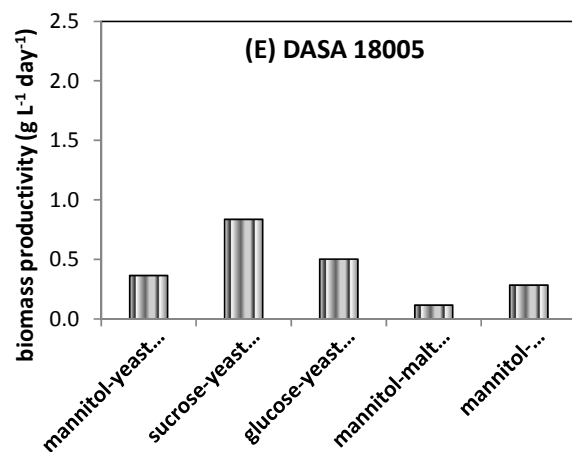
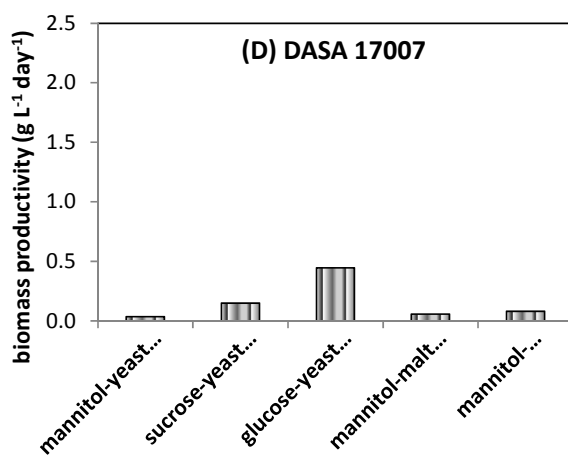
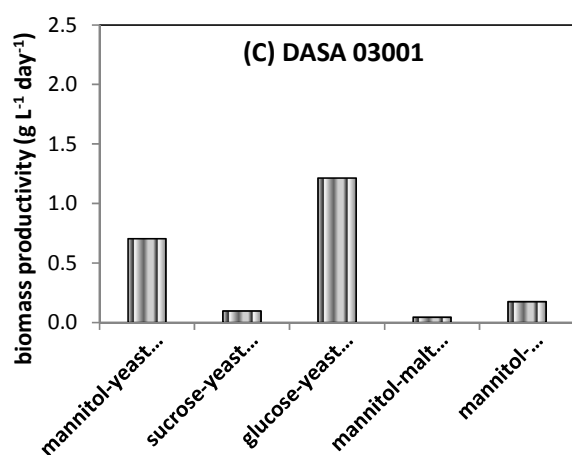
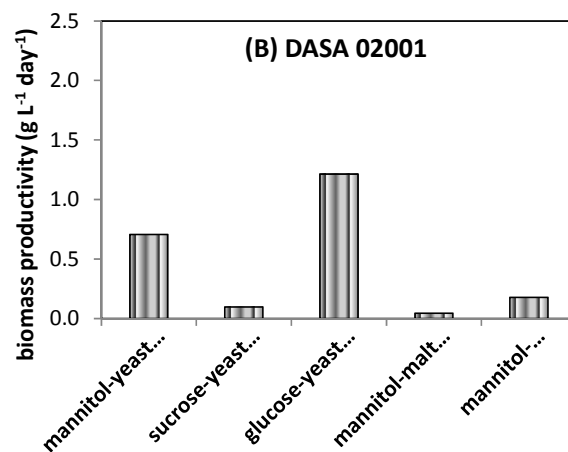
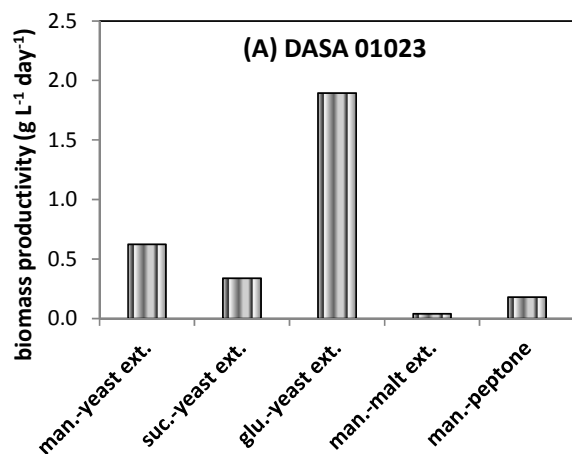
ภาพที่ 15 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



ภาพที่ 16 มวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol - peptone broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm



ภาพที่ 17 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ต่างๆกัน จากการคำนวณโดยอาศัยมวลชีวภาพแห้ง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

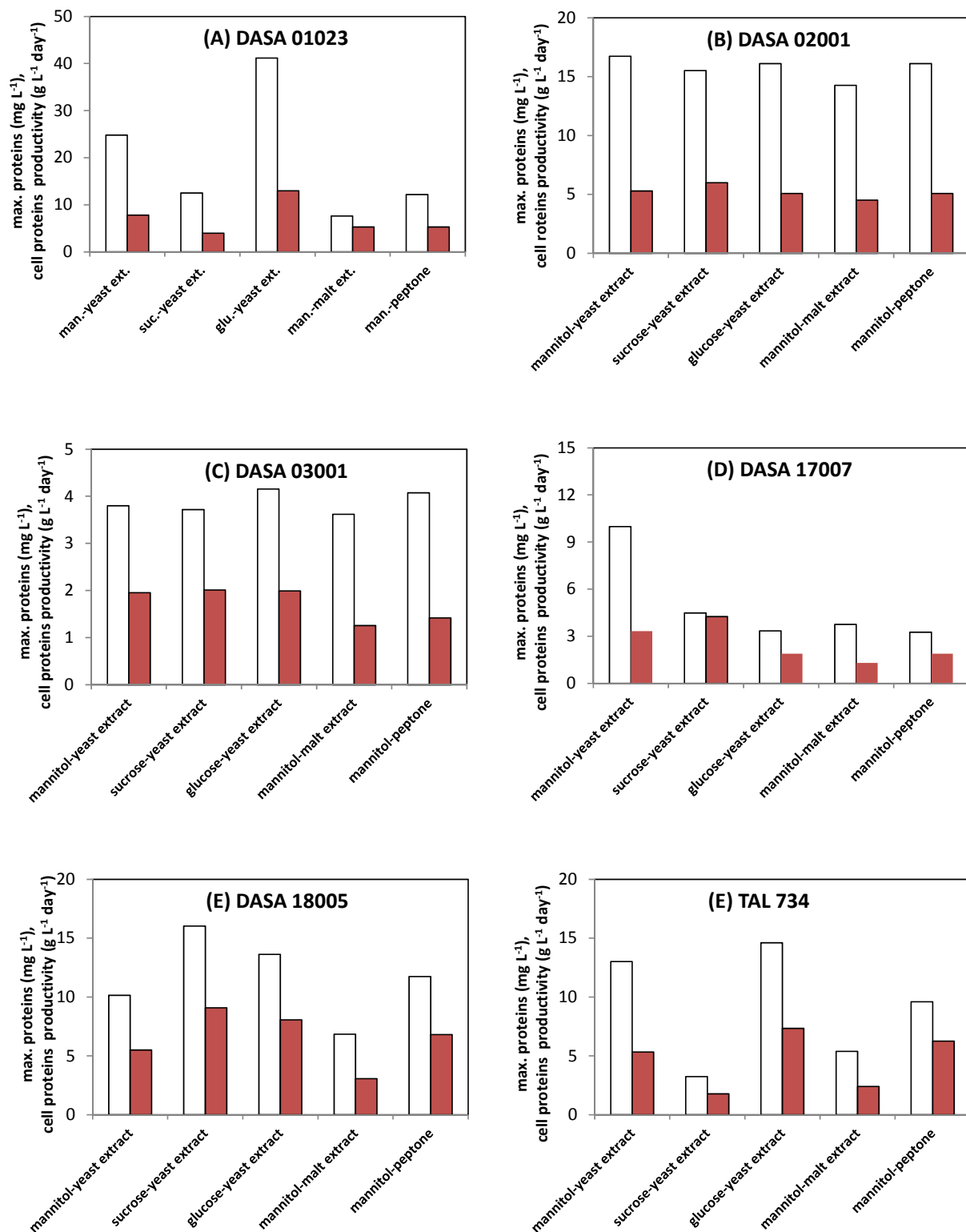


ภาพที่ 18 อัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน จากการคำนวณโดยอาศัยมวลชีวภาพแห้ง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

ทั้งนี้ค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักมวลชีวภาพแห้งนั้นเป็นดัชนีบ่งชี้การเจริญของจุลินทรีย์โดยอ้อม ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนจากสารชีวโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 nm หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและถูกตะกอนได้ในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ (cellular proteins content) ซึ่งโดยปกติแล้วจะเป็นค่าที่มีปริมาณค่อนข้างคงที่และเป็นสัดส่วนต่อปริมาณเซลล์ ผู้วิจัยจึงได้ใช้ค่าดังกล่าวเป็นอีกดัชนีหนึ่งเพื่อยืนยันการเจริญของไรโซเบียมที่ทำการทดสอบ โดยใช้สารละลายที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีsonication ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay. ซึ่งข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบและคำนวณค่า maximum cellular proteins content (mg L^{-1}) และ cellular proteins productivity ($\text{g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) ดังภาพที่ 19 โดยผลการวัดส่วนใหญ่มีแนวโน้มของดัชนีที่ใช้วัดการเจริญสอดคล้องกับค่า maximum cellular proteins contents และ cellular proteins productivity ที่วัดได้ยกเว้นในกรณีของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol-malt broth และ mannitol-peptone ซึ่งเมื่อวัดการเจริญโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักมวลชีวภาพแห้งมีค่าที่ต่ำกว่าค่าที่ได้รับจากอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่ทำการทดสอบ แต่พบว่าค่าปริมาณโปรตีนภายในเซลล์และอัตราการผลิตโปรตีนภายในเซลล์ไม่แตกต่างกันในแต่ละชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบ และในกรณีของ SADA 18005 ซึ่งพบว่าเปรียบเทียบการเจริญจากค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) แล้วพบค่าสูงสุดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB มีแนวโน้มที่ต่างออกไปเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตมวลชีวภาพแห้งซึ่งพบว่าค่าทั้งสองต่ำกว่าค่าที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose-mannitol broth และ glucose-mannitol broth ทั้งนี้อาจเกิดจากในอาหาร YMB ที่สามารถสนับสนุนให้สร้างหรือผลิตสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 nm แต่ไม่ถูกตกตะกอนการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ค่า maximum cellular proteins content และ cellular proteins productivity สูงสุด ได้จากไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract broth มีค่าเท่ากับ 41 mg L^{-1} และ $13 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$

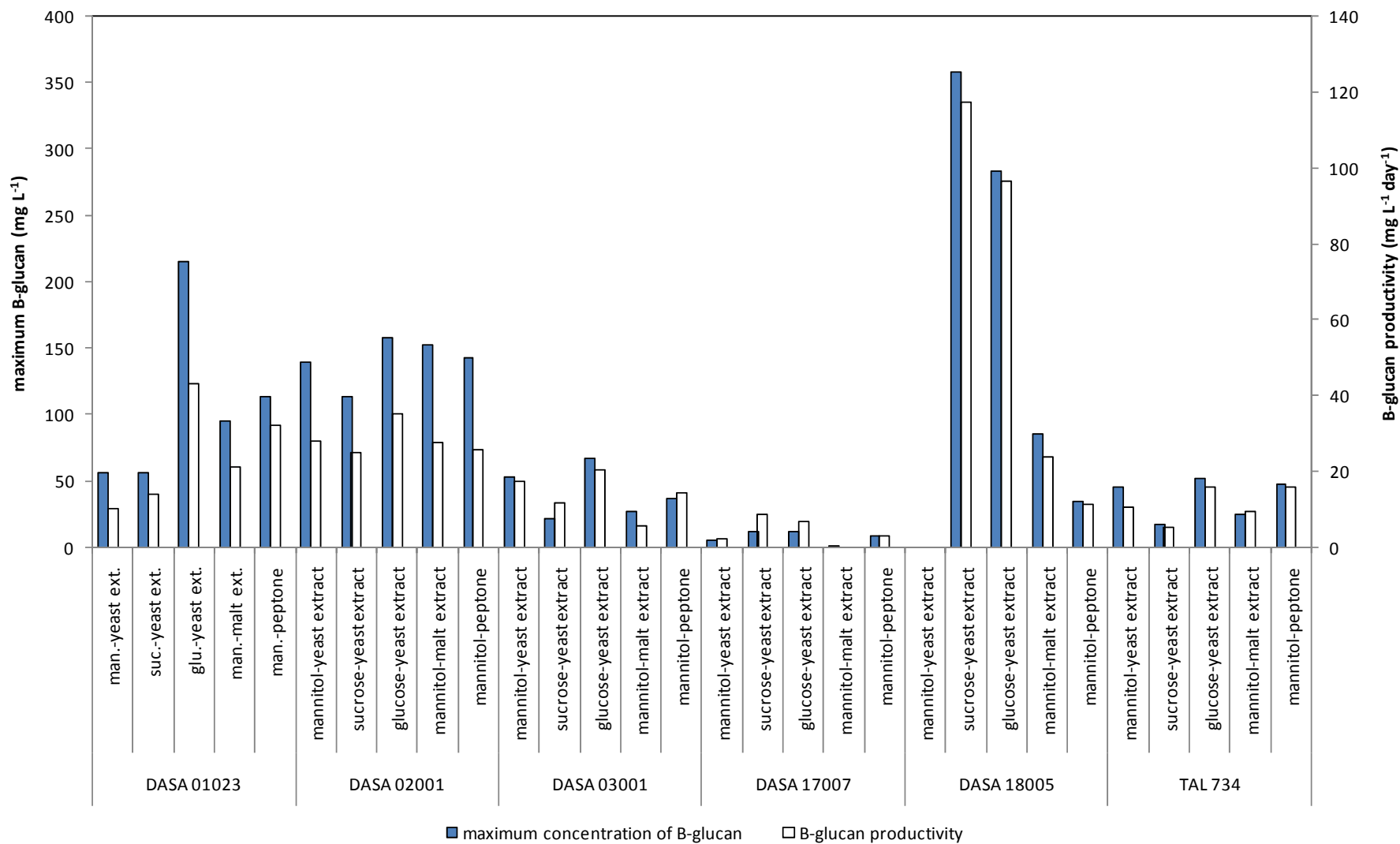
การศึกษาอิทธิพลของชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆที่ทดสอบนั้นใช้การวัดปริมาณเบตาไกลูแคนที่ไรโซเบียมสร้างและปลดปล่อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ calcofluor โดยนำข้อมูลที่ได้มาพล็อตกราฟเปรียบเทียบกับระหว่างปริมาณเบตาไกลูแคนสูงสุดกับอัตราการผลิตเบตาไกลูแคนของไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบ ดังในภาพที่ 20 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract broth สนับสนุนการสร้างสารเบตาไกลูแคนหรือสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีในไรโซเบียมทุกสายพันธุ์โดยให้ค่าปริมาณการผลิตและอัตราการผลิตเบตาไกลูแคนสูงกว่าในอาหารทดสอบชนิดอื่นๆ ยกเว้นในกรณีของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 ซึ่งเบตาไกลูแคนผลิตได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose-yeast extract จากข้อมูลข้างต้นเมื่อพิจารณาอาหารเลี้ยงเชื้อที่สนับสนุนการเจริญของไรโซเบียมและการผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์นั้น สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5 จากตารางดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทั้งในแง่สนับสนุนการเจริญของเซลล์และในแง่ของการผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์คือสารสกัดยีสต์ (yeast extract) สำหรับชนิดแหล่งคาร์บอนนั้นส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไรโซเบียมแตกต่างกันไป โดยรวมแล้วน้ำตาล glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนการผลิตเบตาไกลูแคนในไรโซเบียมในทุกสายพันธุ์ พบปริมาณการผลิตเบตาไกลูแคนสูงสุดในไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ DASA 18005, DASA 01023 และ DASA 02001 ที่มีความเข้มข้นของเบตาไกลูแคนเท่ากับ 357.35, 214.97 และ 158.36 mg L^{-1} ตามลำดับ ซึ่งได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ยกเว้นการผลิตเบตาไกลูแคนของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 ที่ใช้น้ำตาล sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเซลล์ไรโซเบียมโดยวัดจากปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนภายในเซลล์ นั้นพบว่าแหล่งคาร์บอนทดสอบที่ต่างกันไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ที่แตกต่างกันในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 02001 และ DASA 03001 ส่วนไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นๆ พบว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ได้ดี ยกเว้นในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 ที่น้ำตาล mannitol ส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำตาล glucose หากคำนึงถึงการผลิตเบตาไกลูแคนต่อปริมาณโปรตีนในเซลล์ (ซึ่งใช้เป็นดัชนีบ่งบอกการเจริญของเซลล์) หรือค่า $Y_{p/x}$ พบว่า ไร

โซเปียมสายพันธุ์ DASA 18005 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 22.29 g β -glucan / g cellular proteins



ภาพที่ 19 ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

หมายเหตุ: กราฟแท่งโปร่ง แสดงค่า maximum cellular proteins (mg L⁻¹)
 กราฟแท่งทึบ แสดงค่า cellular proteins productivity (g L⁻¹ day⁻¹)



รูปที่ 20 การผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยอาศัยการวัดปริมาณเบตากลูแคนองค์ประกอบของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 rpm

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด อัตราการผลิตโปรตีนในเซลล์ ปริมาณเบตากลูแคนสูงสุด และอัตราการผลิตเบตากลูแคนของไรโซเปียมแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ไรโซเปียม	อาหารเลี้ยงเชื้อที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ไรโซเปียม	Maximum cellular proteins (mg L ⁻¹)	Cellular proteins productivity (g L ⁻¹ day ⁻¹)	อาหารเลี้ยงเชื้อที่สนับสนุนการสร้างเบตากลูแคนของเซลล์ไรโซเปียม	Maximum produced β -glucan concentration (mg L ⁻¹)	β -glucan production (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	Y _{P/X} (yield of β -glucan / cellular proteins)
DASA 01023	glucose - yeast extract	41.16	12.99	glucose - yeast extract	214.97	42.99	5.22
DASA 02001	all media types	15.47*	5.19*	glucose - yeast extract	158.36	35.19	9.84
DASA 03001	all media types	3.87*	1.72*	glucose - yeast extract	67.34	20.46	16.19
DASA 17007	mannitol - yeast extract	9.99	3.33	glucose - yeast extract	12.24	8.64	1.23
DASA 18005	glucose - yeast extract	16.03	9.09	sucrose - yeast extract	357.35	117.48	22.29
TAL 734	glucose - yeast extract	14.06	7.33	glucose - yeast extract	52.03	15.81	3.70

หมายเหตุ ; * หมายถึง ค่าที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกันมีค่าใกล้เคียงกัน จึงใช้เป็นค่าเฉลี่ยของทุกอาหารเลี้ยงเชื้อแทน

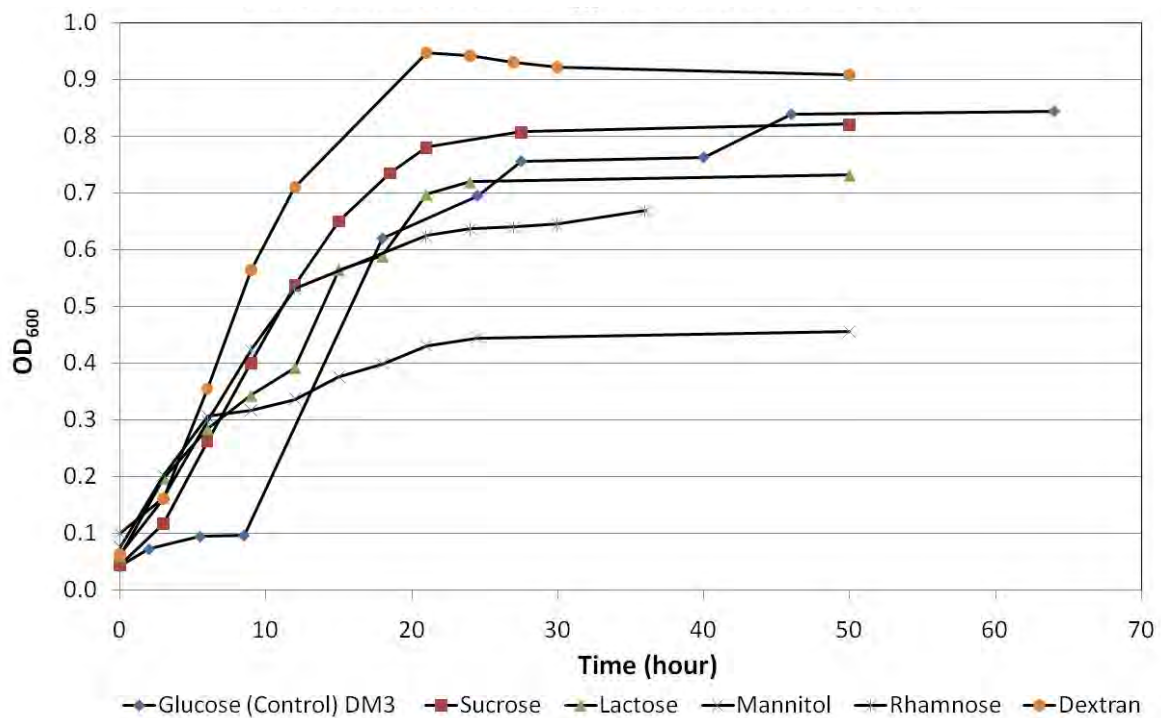
5.2 ไรโซเบียมที่คัดแยกได้น้ำชะกองเหมืองแร่ ประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ *Rhizobium etli* M4

การทดสอบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ใน *R. etli* strain M4 ต่อการเจริญและการสร้าง EPS โดยทำการเลี้ยงเชื้อและใช้เชื้อตั้งต้นปริมาตร 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ใน rotary incubator shaker โดยใช้ความเร็วรอบที่ 180 rpm ทั้งนี้ได้แบ่งการศึกษาอิทธิพลของแหล่งชนิดของคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ glucose, sucrose, lactose, mannitol, rhamnose, dextran ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต EPS ของเชื้อ *R. etli* สายพันธุ์ M4 ในอาหาร DM3 ทั้งนี้ได้ควบคุมปริมาณของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าคงที่ พบว่า *R. etli* M4 เจริญเข้าสู่ระยะ stationary ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 24 ชั่วโมง สำหรับทุกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ทำการทดสอบ โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ภาพที่ 21) และค่าน้ำหนักมวลชีวภาพแห้ง (ภาพที่ 22) ซึ่งค่าทั้งสองดังกล่าวมีความสอดคล้องกันในแง่ของระยะการเจริญ แต่แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันให้ค่า maximum OD₆₀₀ ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.46-0.95 (ตารางที่ 6) พบว่าการใช้ dextran เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ซึ่งคำนวณจากค่า OD₆₀₀ นั้นได้ค่าสูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 0.06 และเมื่าค่า T_d เท่ากับ 11 ชั่วโมง และเมื่อคำนวณค่า μ และ T_d โดยอาศัยค่าน้ำหนักมวลชีวภาพแห้ง (biomass) พบอัตราการเจริญสูงสุด (μ) ของ *R. etli* M4 เท่ากับ 0.095 h⁻¹ เมื่อให้ rhamnose และ mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 การให้ lactose, dextran และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ค่า μ เท่ากับ 0.08 โดยประมาณ ซึ่งค่าดังกล่าวคิดเป็น 2 เท่าโดยประมาณของค่า μ ที่ได้รับการให้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ดังในตารางที่ 7

จากการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ เวลาต่างๆที่เชื้อเจริญ พบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วและในอัตราที่ใกล้เคียงกันคือในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose, sucrose, lactose และ dextran เป็นแหล่งคาร์บอน ดังภาพที่ 23 ส่วนในอาหารที่มี mannitol และ rhamnose นั้น พบปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงด้วยอัตราที่ช้ากว่าจนกระทั่งเวลา 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน supernatant เริ่มคงไม่ ซึ่งแตกต่างไปจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ชนิดข้างต้นที่มีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในอัตราที่สูงหลัง 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้จะเกิดจากสาเหตุที่ *R. etli* M4 มีการเริ่มสร้างและผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต จึงเป็นเหตุให้วัดค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้สูงขึ้น (ปริมาณคาร์โบไฮเดรต = ปริมาณสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสร้าง - ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้) และนอกจากนี้ยังพบว่า ที่เวลา 40 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อนั้นพบว่าลำดับปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน supernatant ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่โนปริมาณจากสูงไปต่ำมีลำดับดังนี้ sucrose > glucose > lactose > dextran ซึ่งลำดับดังกล่าวจะเป็นการบอกแนวโน้มความสามารถในการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ นอกเหนือจากการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน supernatant เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้การผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (EPS) โดยอ้อมแล้ว ได้ทำการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตของตะกอนเซลล์ (cell pellets) เพื่อใช้เป็นดัชนีบ่งบอกการเจริญและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้าง capsular polymeric substances (CPS) ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์สร้างอยู่ภายนอกเซลล์ถัดไปจากชั้นผนังเซลล์ซึ่งสารดังกล่าวไม่หลุดออกจากเซลล์ด้วยแรงปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการตกตะกอนเซลล์ ซึ่งพบว่าลำดับแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของตะกอนเซลล์ของ *R. etli* M4 ที่เวลา 40 ชั่วโมง มีปริมาณจากมากไปน้อย ตามลำดับ ดังนี้ dextran > sucrose > glucose > lactose > rhamnose > mannitol (ภาพที่ 24)

ในการศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ดังในภาพที่ 25 และ ภาพที่ 26 พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ได้ดี ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วสารอินทรีย์ไนโตรเจนสนับสนุนการเจริญของเซลล์ *R. etli* M4 ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก ซึ่งสังเกตได้จากค่า μ และ T_d ในตารางที่ 8 และ 9 และจากการศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ทั้งแนวโน้มการผลิตสาร EPS และ CPS ดังผลจากภาพที่ 27 และ 28 โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่สูงสุดหลังระยะเวลาที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุด(หลังจาก 20 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) เนื่องจากค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงขึ้นนั้นน่าจะเกิดจากปริมาณและอัตราการผลิตของ EPS ที่สูงนั่นเอง ซึ่งพบว่าแหล่งไนโตรเจนหลักที่ให้ในรูปยูเรีย (DM3) และ (NH₄)₂SO₄+ yeast extract นั้นสนับสนุนการสร้าง EPS ได้ดี สำหรับการวัดปริมาณของคาร์โบไฮเดรตของ cells pellet นั้น ค่าดังกล่าวเป็นค่าปริมาณรวมระหว่างคาร์โบไฮเดรตองค์ประกอบ

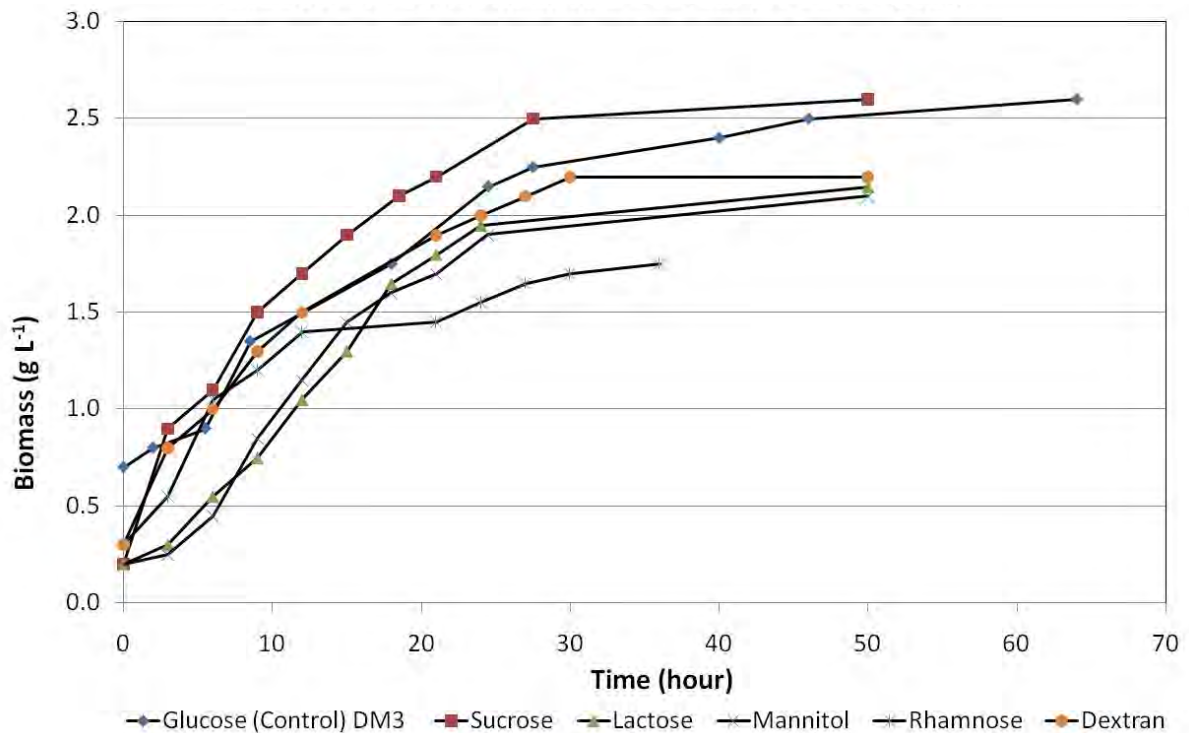
เซลล์และ CPS ซึ่งพบว่า การให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก (DM3) พบว่าให้ค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตของเซลล์เพิ่มขึ้น โดยประมาณ 50 mg L^{-1} และมากกว่าค่าที่ได้รับจากการให้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักถึง 3 เท่า



ภาพที่ 21 อิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *R. etli* M4 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm

ตารางที่ 6 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ Doubling time (T_d) ของเชื้อ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า OD_{600} เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น

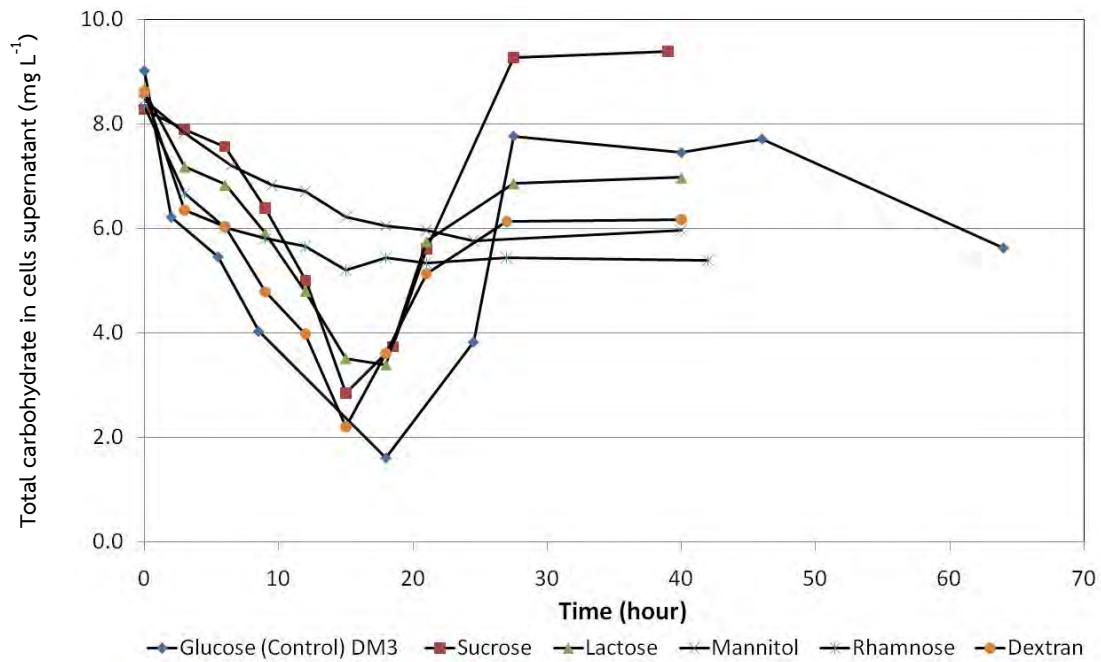
Table of specific growth rate (μ), T_d of <i>R. etli</i> M4 in DM3 calculated using OD_{600}					
<i>Rhizobium etli</i> M4	log phase duration (h)	Max OD_{600}	slope (μ), h^{-1}	R^2	T_d (h)
Glucose (Control DM3)	8.5 - 27.5	0.845	0.034	0.907	20
Sucrose	0 - 15	0.822	0.044	0.998	16
Lactose	0 - 21	0.732	0.029	0.981	24
Mannitol	0 - 6	0.456	0.027	0.903	26
Rhamnose	0 - 12	0.670	0.037	0.989	19
Dextran	0 -12	0.948	0.061	0.994	11



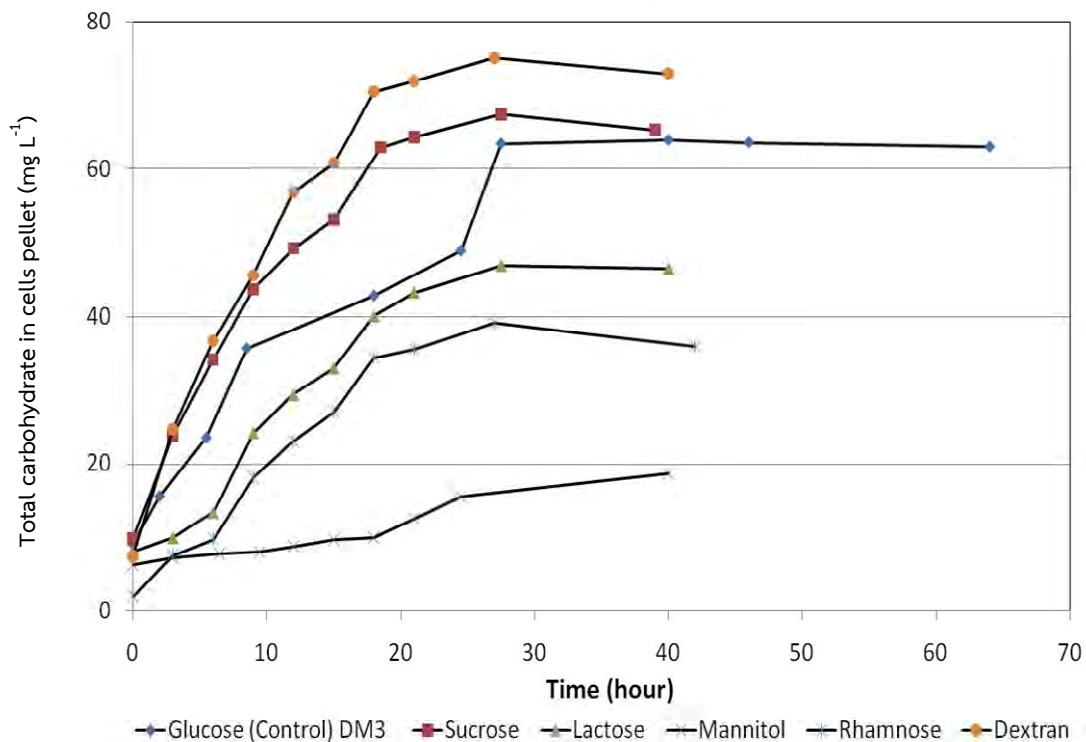
ภาพที่ 22 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อมวลชีวภาพแห้ง (Dry biomass) ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ *R. etli* M4 เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm

ตารางที่ 7 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ Doubling time (T_d) ของเชื้อ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า biomass เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น

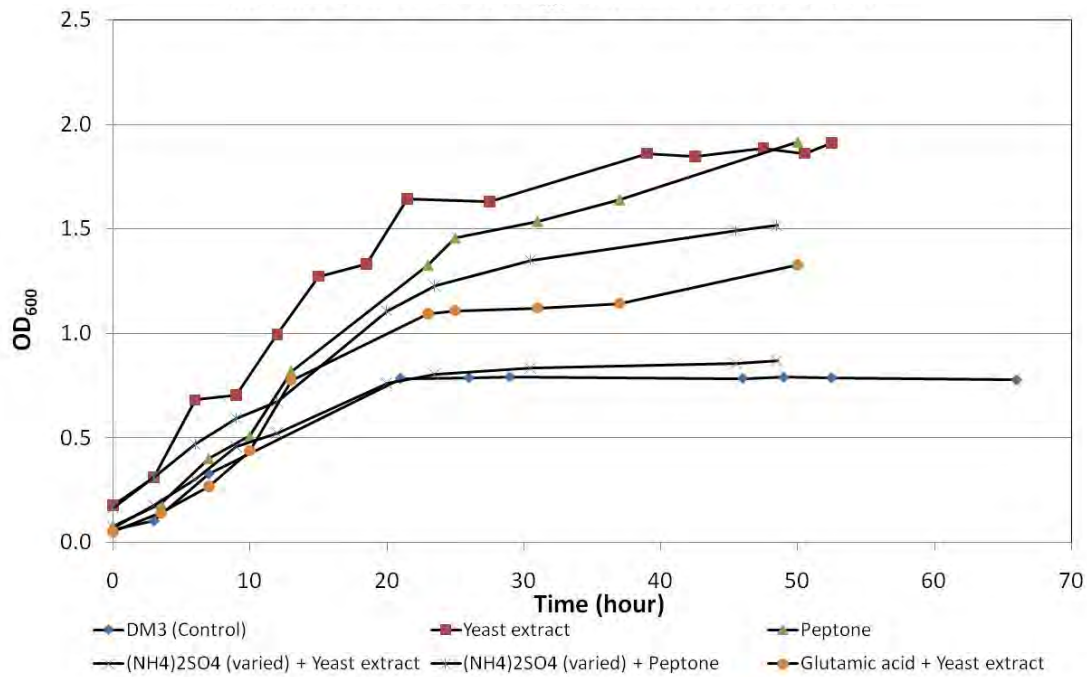
Table of specific growth rate (μ), T_d of <i>R. etli</i> M4 in DM3 calculated using biomass				
<i>Rhizobium etli</i> M4	Max biomass	slope (μ), h^{-1}	R^2	T_d (h)
Glucose (Control DM3)	2.60	0.048	0.992	14
Sucrose	2.60	0.079	0.980	9
Lactose	2.15	0.082	0.991	8
Mannitol	2.10	0.095	0.986	7
Rhamnose	1.75	0.095	0.961	7
Dextran	2.20	0.080	0.993	9



ภาพที่ 23 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. etli* M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น และทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm



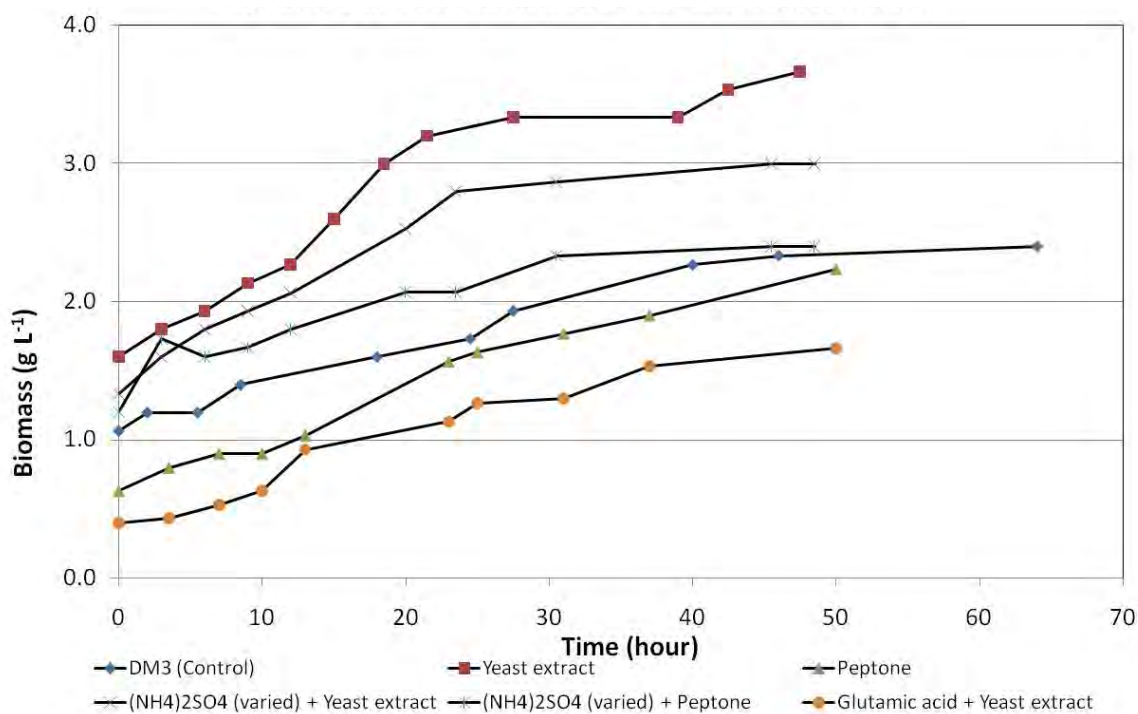
ภาพที่ 24 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน cells pellet ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. etli* M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm



ภาพที่ 25 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *R. etli* M4 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร DM3 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm

ตารางที่ 8 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ Doubling time (T_d) ของเชื้อ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า OD_{600} เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น

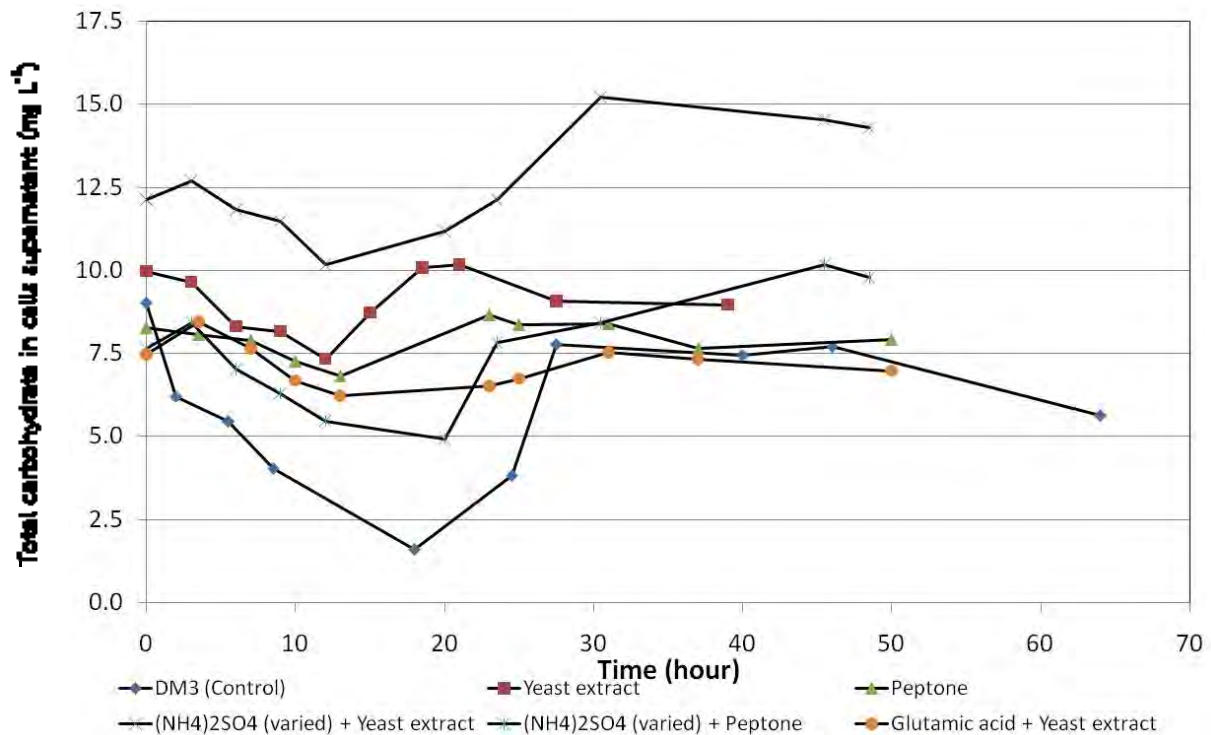
Table of specific growth rate (μ), T_d of <i>R. etli</i> M4 in DM3 calculated using OD_{600}					
<i>Rhizobium etli</i> M4	log phase duration (h)	Max OD_{600}	slope (μ), h^{-1}	R^2	T_d (h)
Control DM3	3 - 21	0.793	0.036	0.986	19
yeast extract	0 - 21.5	1.915	0.067	0.970	10
peptone	0 - 25	1.918	0.059	0.993	12
(NH ₄) ₂ SO ₄ + yeast extract	0 - 20	0.873	0.033	0.980	21
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptone	0 - 23.5	1.520	0.045	0.994	15
Glutamic + yeast extract	3 - 23	1.331	0.051	0.953	14



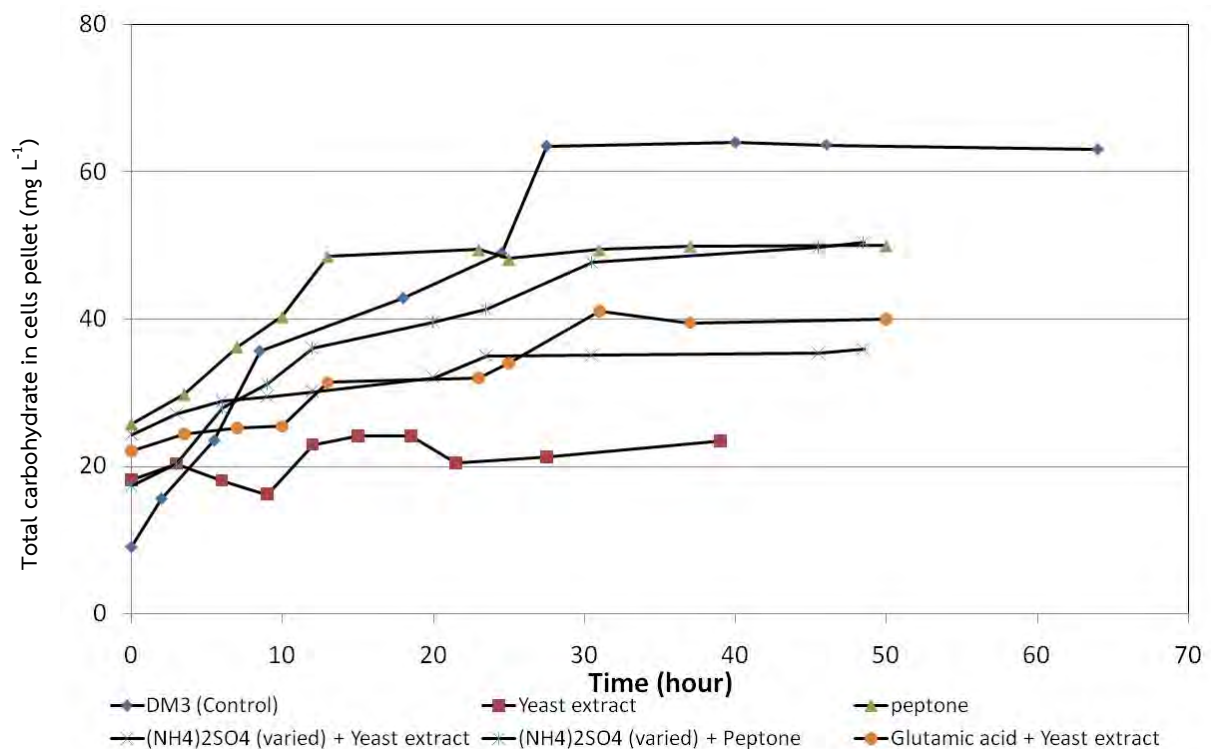
ภาพที่ 26 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อมวลชีวภาพแห้ง (Dry biomass) ในอาหาร DM3 ที่เชื้อ *R. etli* M4 เจริญ โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm

ตารางที่ 9 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และ Doubling time (T_d) ของเชื้อ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 (โดยให้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ) ซึ่งคำนวณได้จากค่า Biomass เมื่อใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น

Table of specific growth rate (μ), T_d of <i>R. etli</i> M4 in DM3 calculated using biomass				
<i>Rhizobium etli</i> M4	Max biomass	slope (μ), h^{-1}	R^2	T_d (h)
Control DM3	2.40	0.024	0.986	29
yeast extract	3.67	0.075	0.976	9
peptone	2.23	0.033	0.975	21
(NH ₄) ₂ SO ₄ + yeast extract	3.00	0.059	0.993	12
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptone	2.40	0.034	0.959	20
Glutamic + yeast extract	1.67	0.032	0.960	22



ภาพที่ 27 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid method ใน supernatant ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. etli* M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้น และทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm



ภาพที่ 28 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี phenol sulfuric acid methos ใน cells pellet ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. etli* M4 โดยใช้ 10% (v/v) subculture เป็นเชื้อตั้งต้นและทำการบ่มเชื้อที่ 30°C ใน rotary incubator shaker ที่ 180 rpm

6. การศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ในเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ

6.1 ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่คัดแยกจากปมรากพืชตระกูลถั่ว (ทำการทดสอบในสายพันธุ์ DASA 03001, DASA 17007, DASA 18005 และ TAL 734)

ได้ทำการทดสอบอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เท่ากับ 10 (C:N = 10) โดยทำการทดสอบในไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ DASA 03001, DASA 17007, DASA 18005 และ TAL 734 โดยมี glucose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ยกเว้นในสายพันธุ์ DASA 18005 และมี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักสำหรับไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น การเพิ่มอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนนั้นกระทำโดยการปรับปริมาณของแหล่งคาร์บอนให้สูงขึ้นและคงปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งพบว่า สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001 นั้น C:N ratio ที่สูงขึ้นให้ค่าปริมาณเบตาไกลูแคนสูงสุดไม่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N ต่ำ (C:N = 5 ของอาหารมาตรฐาน YMB) และส่งผลต่ออัตราการผลิตโดยมีอัตราการผลิตลดลง 10 เท่า ซึ่งต่างไปจากสายไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 ที่ปรากฏว่าการเพิ่ม C:N = 10 หรือเป็นสองเท่าของค่า C:N ในอาหาร YMB เป็นผลให้เพิ่มปริมาณเบตาไกลูแคนสูงสุดและอัตราการผลิตเท่ากับ 355.8 mg L^{-1} และ $62.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ซึ่งเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 30 เท่า และ 7 เท่า ตามลำดับ ส่วนในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 พบว่าการเพิ่ม C:N ที่ให้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นผลให้ลดปริมาณการสร้างเบตาไกลูแคนสูงสุดลดลง 1.7 เท่า และมีอัตราการผลิตที่ลดลง 2.57 เท่า สำหรับในไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 734 พบว่า C:N ที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณเบตาไกลูแคนสูงสุดมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่กลับใช้ระยะเวลาในการผลิตเพิ่มขึ้นหรือมีค่าอัตราการผลิตที่ลดลงจากเดิมสองเท่า (ตารางที่ 10 เปรียบเทียบกับตารางที่ 5)

6.2 ไรโซเบียมสายพันธุ์ *R. etli* M4 ที่คัดแยกจากน้ำชะกองเหมืองแร่

ในการศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ใน *R. etli* M4 นั้น ได้ทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนหลักจำนวน 3 ชนิดในการปรับอัตราส่วน C:N โดยที่ในการปรับแหล่งคาร์บอนนั้นจะคงปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และในการปรับแหล่งไนโตรเจนนั้นจะคงปริมาณของแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดลองพบว่าในการปรับแหล่งไนโตรเจนนั้น ซึ่งอาหาร DM3 ปกติมีค่า C:N เท่ากับ 3.2 นั้นพบว่า C:N ที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ urea หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + yeast extract นั้น ไม่ส่งผลต่อการเจริญและการสร้าง EPS และ CPS แต่พบว่า C:N ที่สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักนั้นมีค่าปริมาณ EPS สูงสุดแปรผันตรงกับ C:N ratio สำหรับการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่า น้ำหนักแห้งมวลชีวภาพ ปริมาณ EPS และ CPS สูงสุดที่ *R. etli* M4 ผลิตแปรผันตรงกับค่า C:N ที่เพิ่มขึ้นในทุกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายรายงานที่พบว่า สภาวะที่ไม่สมดุลของเมทาบอลิซึม โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน รวมถึงสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จะส่งเสริมการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยพบว่า ปริมาณ EPS สูงสุด จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + yeast extract โดยมีปริมาณ EPS ในช่วง $13.67 - 16.69 \text{ g L}^{-1}$ (ตารางที่ 11)

7. การศึกษาอิทธิพลไอออนโลหะวาเลนซ์ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้าง EPS ใน *R. etli* M4

ในการศึกษาผลกระทบของชนิดและปริมาณของไอออนโลหะวาเลนซ์ 2 ต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *R. etli* M4 ซึ่งได้ทำการทดสอบไอออนโลหะ 4 ชนิด คือ Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} และ Cu^{2+} ในรูปซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.08, 0.16, 1.6 และ 3.2 g L^{-1} พบว่า *R. etli* M4 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี FeSO_4 และ CdSO_4 ที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือสูงกว่า 0.08 g L^{-1} ได้ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของโลหะซัลเฟตเท่ากับ 0.08 g L^{-1} นั้น *R. etli* M4 จะเจริญได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอออนโลหะอื่นๆ จากค่ามวลชีวภาพแห้งที่มากกว่าประมาณ 7 เท่า แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณ EPS สูงสุดที่แบคทีเรียสร้างมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีลำดับของไอออนโลหะที่มีอัตราปริมาณ EPS / ปริมาณมวลชีวภาพแห้ง ($Y_{p/x}$) จากมากไปน้อย คือ $\text{MnSO}_4 > \text{CdSO}_4 = \text{FeSO}_4 > \text{ZnSO}_4$ ทั้งนี้อาจเกิดจากการสร้าง EPS ที่สูงขึ้นช่วยลดความเป็นพิษของไอออนโลหะต่อเซลล์จากการดูดซับด้วยองค์ประกอบของ EPS ที่สามารถดูดซับไอออนโลหะได้ และโดยปกติแล้วความเป็นพิษของโลหะในปริมาณที่เท่ากันมีลำดับคือ $\text{Cd} > \text{Fe} = \text{Zn} = \text{Mn}$ นอกจากนี้ยังพบว่า *R. etli* M4 สามารถเจริญได้

ในอาหารที่มี MnSO_4 3.2 g L^{-1} และ ZnSO_4 0.16 g L^{-1} พบปริมาณ EPS สูงสุด 14.61 และ 14.59 g L^{-1} ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มี ว่าสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี MnSO_4 0.16 g L^{-1} และ ZnSO_4 0.08 g L^{-1} ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณ β -glucan และปริมาณเซลล์ของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001, DASA 17007, DASA 18005 และ TAL 734 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-yeast extract และ sucrose-yeast extract ที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10

สายพันธุ์ไรโซเบียม	แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	Max. β -glucan (mg L ⁻¹)	β -glucan productivity (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (CFU/ml)
DASA 03001	Glucose –yeast extract	52.8	2.4	2.63E+08
DASA 17007	Glucose-yeast extract	355.8	62.8	9.65E+07
DASA 18005	Sucrose-yeast extract	208.9	45.7	1.44E+08
TAL 734	Glucose-yeast extract	65.1	8.8	2.15E+08

ตารางที่ 11 อิทธิพลของอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้าง EPS และ CPS จากการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี phenol-sulfuric acid method

Modified C- or N-source	Type of carbon & nitrogen source	C:N ratio	Dry weight biomass, g L ⁻¹	Max. EPS, g L ⁻¹	Yp/x (g EPS / g dry wt. cells)	Max. CPS, g L ⁻¹	Yp/x (g CPS / g dry wt. cells)
Modified major nitrogen source of DM3	Urea (DM3)	1.6	2.5	9.42	4.04	0.28	0.020
		3.2	3.5	7.01	2.7	0.07	0.018
		6.0	3.0	9.16	3.05	0.25	0.023
	Yeast extract	1.6	5.0	8.17	2.23	0.05	0.010
		3.2	3.5	9.17	4.90	0.08	0.008
		6.0	5.3	11.27	2.64	0.06	0.013
	(NH ₄) ₂ SO ₄ + yeast extract	1.6	2.1	16.16	5.63	0.04	0.018
		3.2	2.8	13.67	4.80	0.09	0.011
		6.0	2.3	16.69	4.38	0.05	0.021
Modified major carbon source of DM3	Glucose	1.6	1.8	2.52	1.44	0.87	0.025
		3.2	2.3	7.01	3.03	1.91	0.015
		6.0	6.7	10.86	1.43	3.17	0.014
	Sucrose	1.6	1.8	2.38	1.36	1.00	0.024
		3.2	2.5	7.65	3.34	2.03	0.017
		6.0	9.5	11.60	1.22	3.16	0.012
	Lactose	1.6	1.5	2.72	1.39	0.73	0.022
		3.2	2.1	6.21	3.18	1.41	0.015
		6.0	5.9	7.75	1.31	2.76	0.007

ตารางที่ 12 อิทธิพลของไอออนโลหะวาเลนซ์ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ DM3 ต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของ *R. etli* M4

Tested divalent metal ion at varied concentration	Dry weight biomass (g L ⁻¹)	Max. EPS, g L ⁻¹	Yp/x (g EPS / g dry wt. cells)	Max. CPS, g L ⁻¹	Yp/x (g CPS / g dry wt. cells)
MnSO ₄ 0.08 g L ⁻¹	0.63	12.37	19.63	0.08	0.126
MnSO ₄ 0.16 g L ⁻¹	1.5	14.61	9.74	0.09	0.060
MnSO ₄ 1.6 g L ⁻¹	3.43	10.88	3.17	0.21	0.061
MnSO ₄ 3.2 g L ⁻¹	1.13	-	-	0.07	0.062
FeSO ₄ 0.08 g L ⁻¹	0.87	12.3	14.14	0.13	0.149
ZnSO ₄ 0.08 g L ⁻¹	5.33	14.59	2.73	0.08	0.015
ZnSO ₄ 0.16 g L ⁻¹	2.8	12.74	4.55	0.08	0.029
CdSO ₄ 0.08 g L ⁻¹	0.8	11.63	14.54	0.08	1.000

หมายเหตุ ในอาหาร DM3 ปกติจะมี MnSO₄ 1.6g L⁻¹ เป็นองค์ประกอบ

8. การศึกษาจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย โดยอาศัย 16S rRNA nucleotide sequencing

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ต่างๆ กันแล้วนำไปเทียบเคียงกับแบคทีเรียทั้ง type strain และ both type & non-type strain จากฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (release 10) โดยดูลำดับที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด (ตารางที่ 13) และนำ 20 ลำดับแรก ไปทำเดนโดรแกรมโดยอาศัยโปรแกรม Genious 5.6.0 (ภาพที่ 29-40)

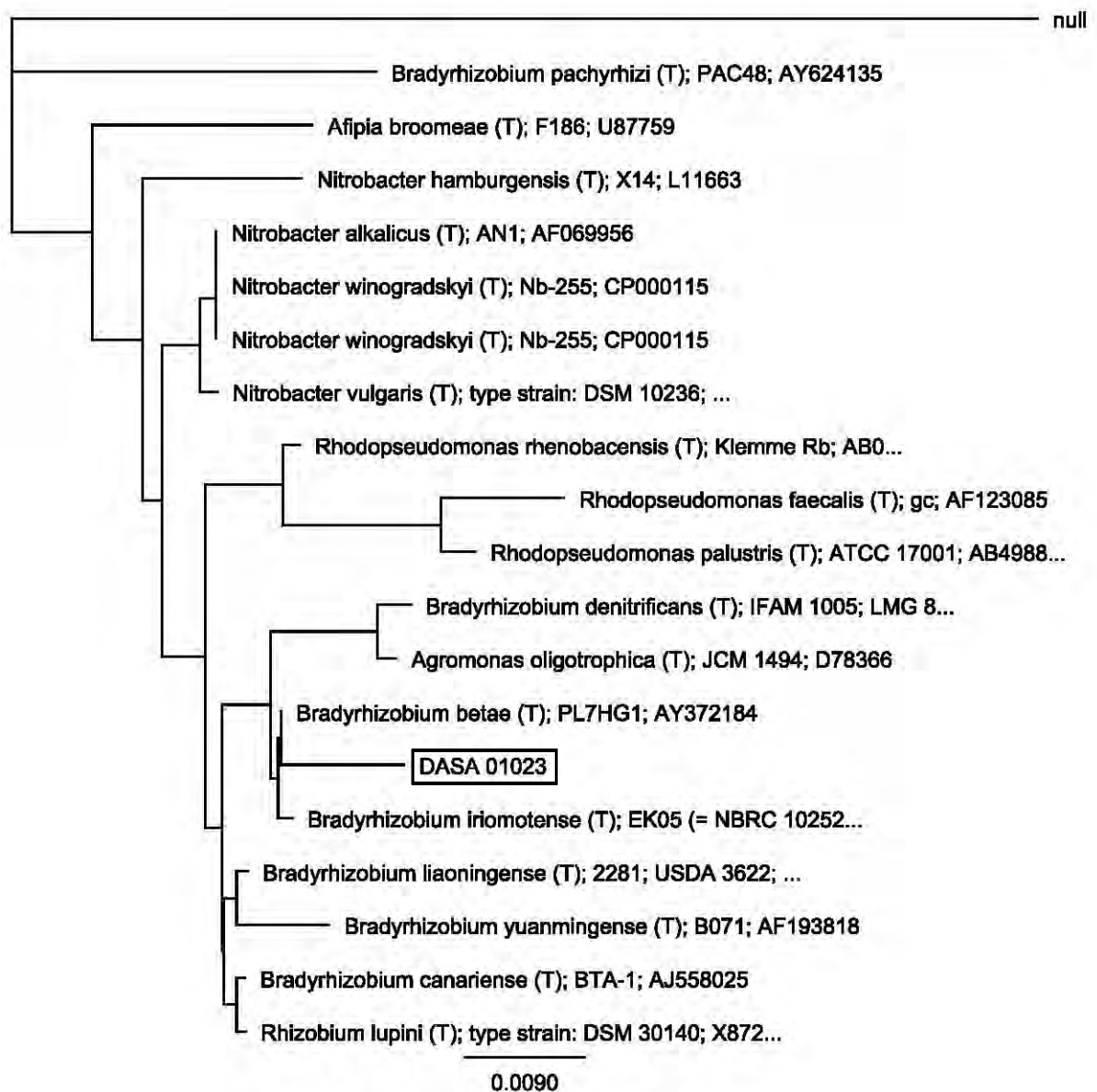
ตารางที่ 13 การจัดจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ใช้ในการวิจัยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

สายพันธุ์ ไรโซเบียม	Pair of primer	Length of nucleotide sequence	type / non- type strains	% similarity	Closet specie	Accession number
DASA 01023	533F-1100R	794	type	97.3	<i>Bradyrhizobium betae</i>	S000368588
			both	100	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	S002910649
DASA 02001	27F-1100R	728	type	93.9	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	S000389094
			both	95.2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	S002409642
DASA 03001	357F-1100R	697	type	96.5	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	S000389094
			both	100	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	S000541559
DASA 17007	533F-1100R	773	type	100	<i>Bradyrhizobium betae</i>	S000368558
			both	100	<i>Bradyrhizobium *</i>	**
DASA 18005	533F-1100R	511	type	99.4	<i>Rhizobium pisi Rhizobium phaseoli</i>	S000265215 S000769770
			both	100	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	S001170826
TAL 734	533F-1100R	510	Type	93.9	<i>Bradyrhizobium canariense Bradyrhizobium liaoningense</i>	S000270387 S000389094
			both	95.7	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	S001292900

ซึ่งโดยสรุปแล้วไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยจัดอยู่ในจีนัส *Bradyrhizobium* ยกเว้นสายพันธุ์ DASA 18005 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Rhizobium* สำหรับ *R. etli* สายพันธุ์ M4 ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์มาก่อนแล้ว (51) จึงไม่ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ในงานวิจัยนี้

DASA 01023

Primers; 533F และ 1100R
Base length; 794
Identical site; 89.2% (1,336/1501)
Pair wise % identity; 97.5%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 29 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

DASA 01023

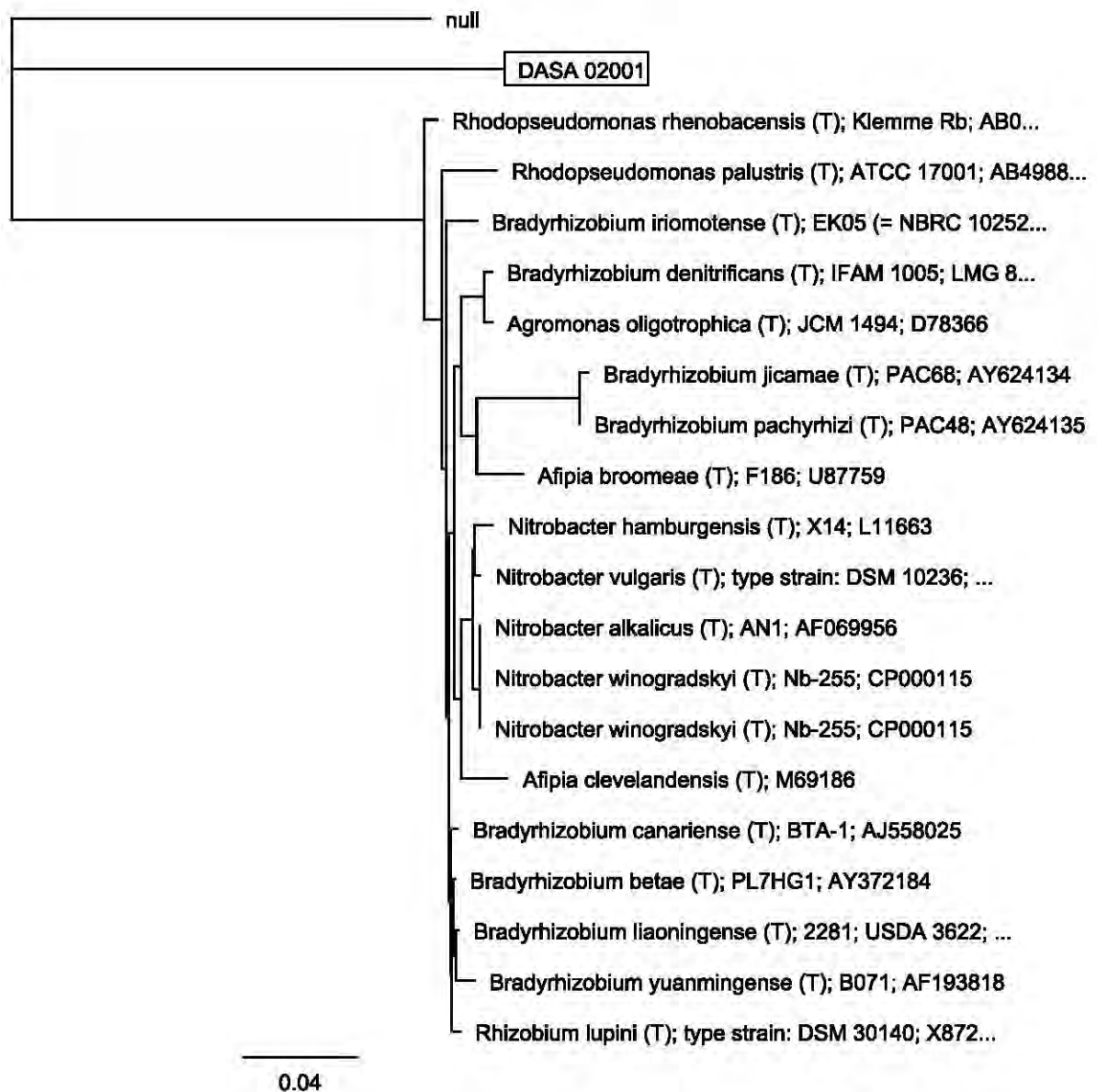
Primers: 533F และ 1100R
 Base length; 794
 Identical site; 94.9% (1,409/1497)
 Pair wise % identity; 99.4%
 Alignment both type and non-type strains



ภาพที่ 30 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01023 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

DASA 02001

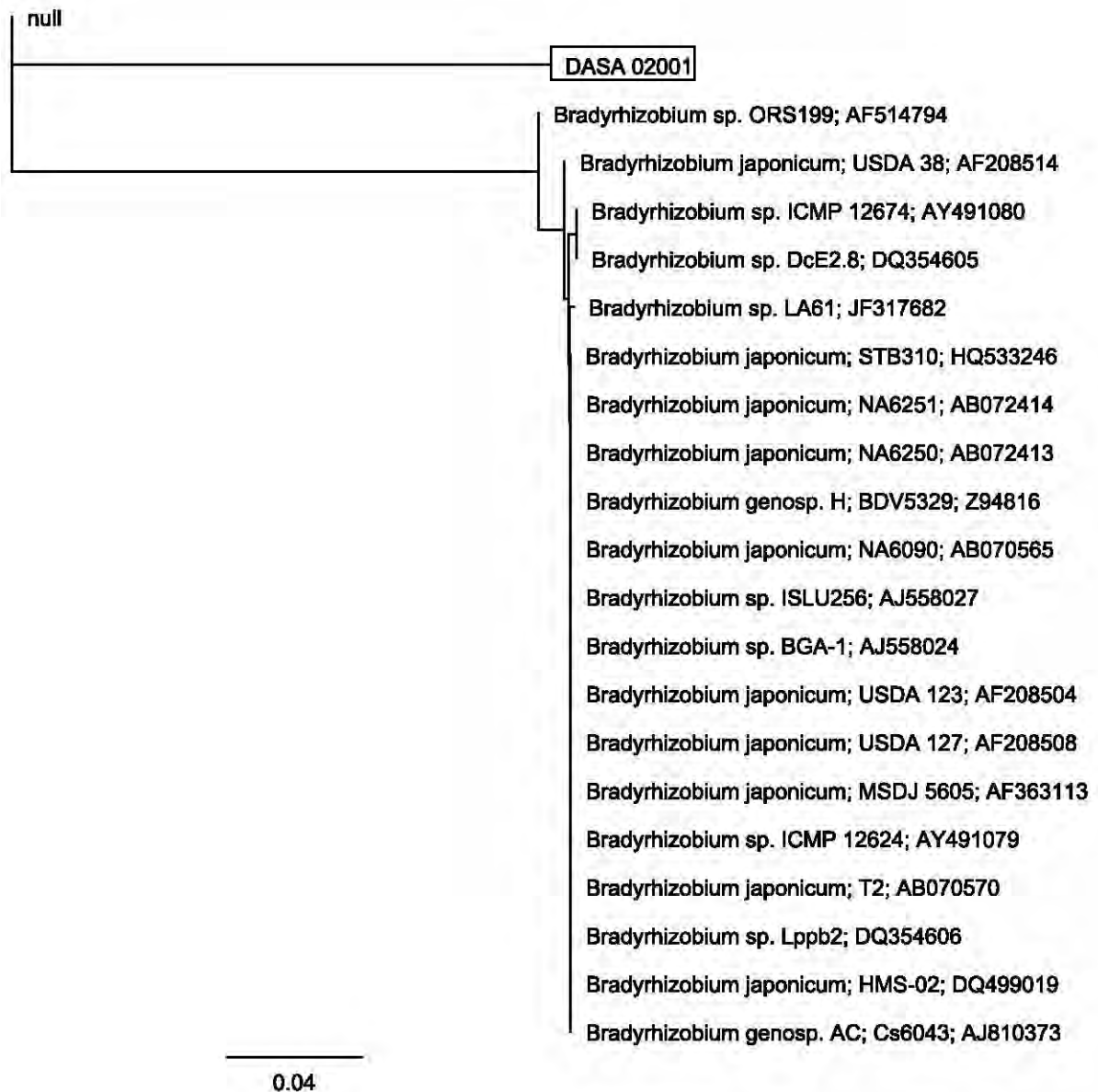
Primers; 27F และ 1100R
Base length; 728
Identical site; 77.7% (1,166/1502)
Pair wise % identity; 96.1%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 31 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 02001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

DASA 02001

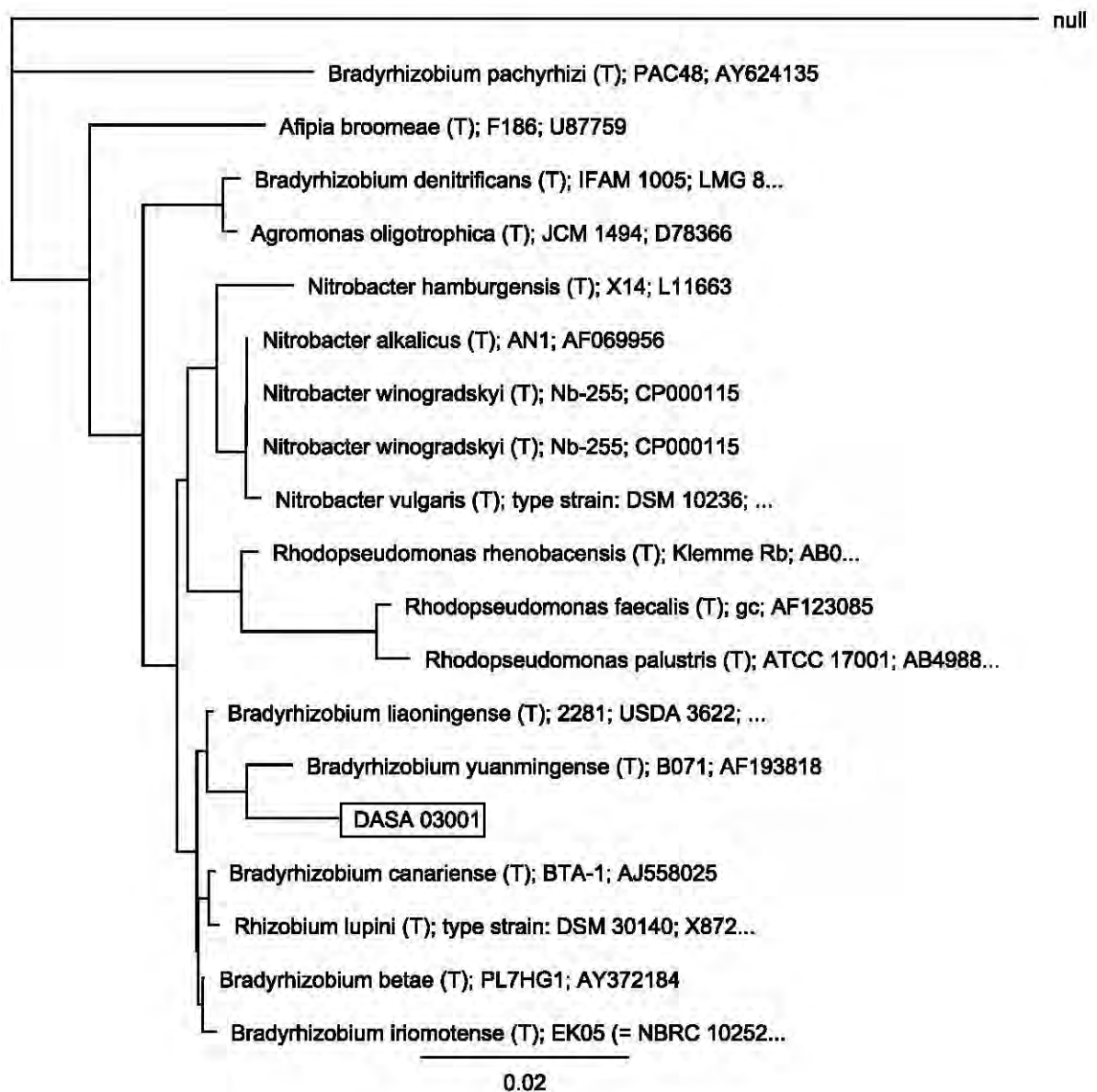
Primers; 27F และ 1100R
Base length; 728
Identical site; 82.5% (1,166 /1525)
Pair wise % identity; 98.1%
Alignment both type and non-type strains



ภาพที่ 32 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 02001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

DASA 03001

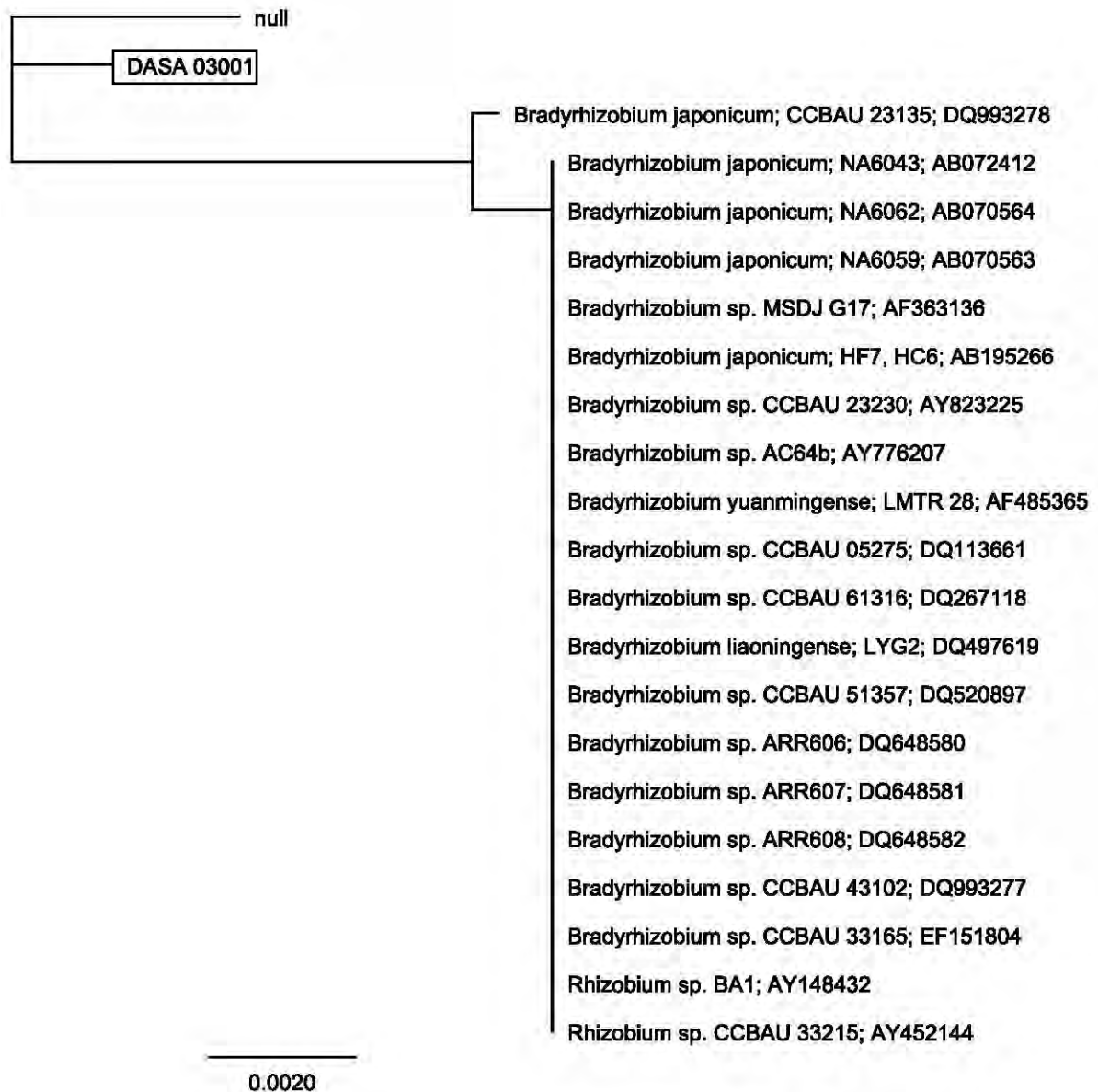
Primers; 357F และ 1100R
Base length; 697
Identical site; 89.3% (1,335/1498)
Pair wise % identity; 97.5%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 33 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

DASA 03001

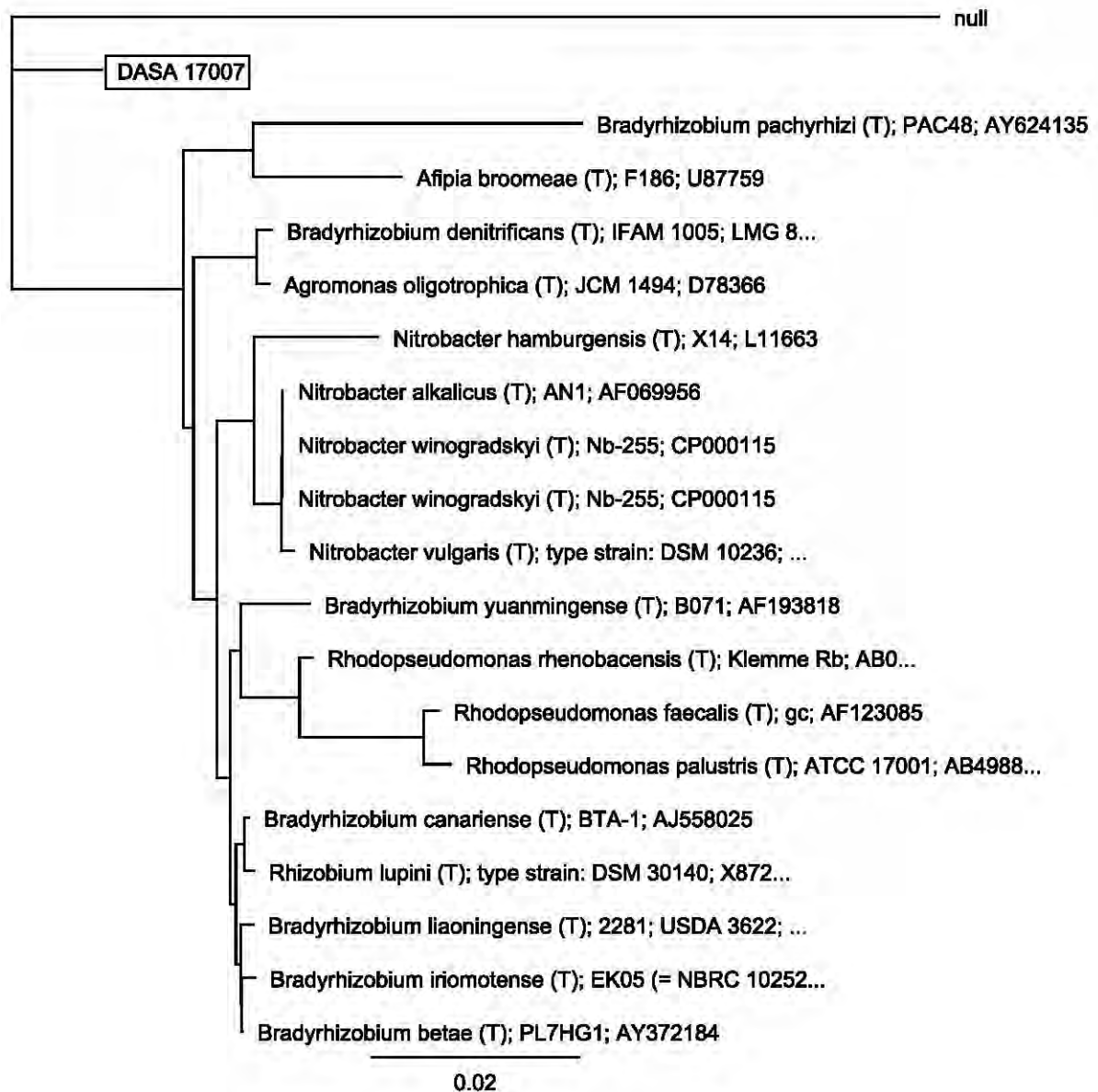
Primers; 357F และ 1100R
Base length; 697
Identical site; 92.0% (1,377/1535)
Pair wise % identity; 98.6%
Alignment both type and non-type strains



ภาพที่ 34 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 03001 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

DASA 17007

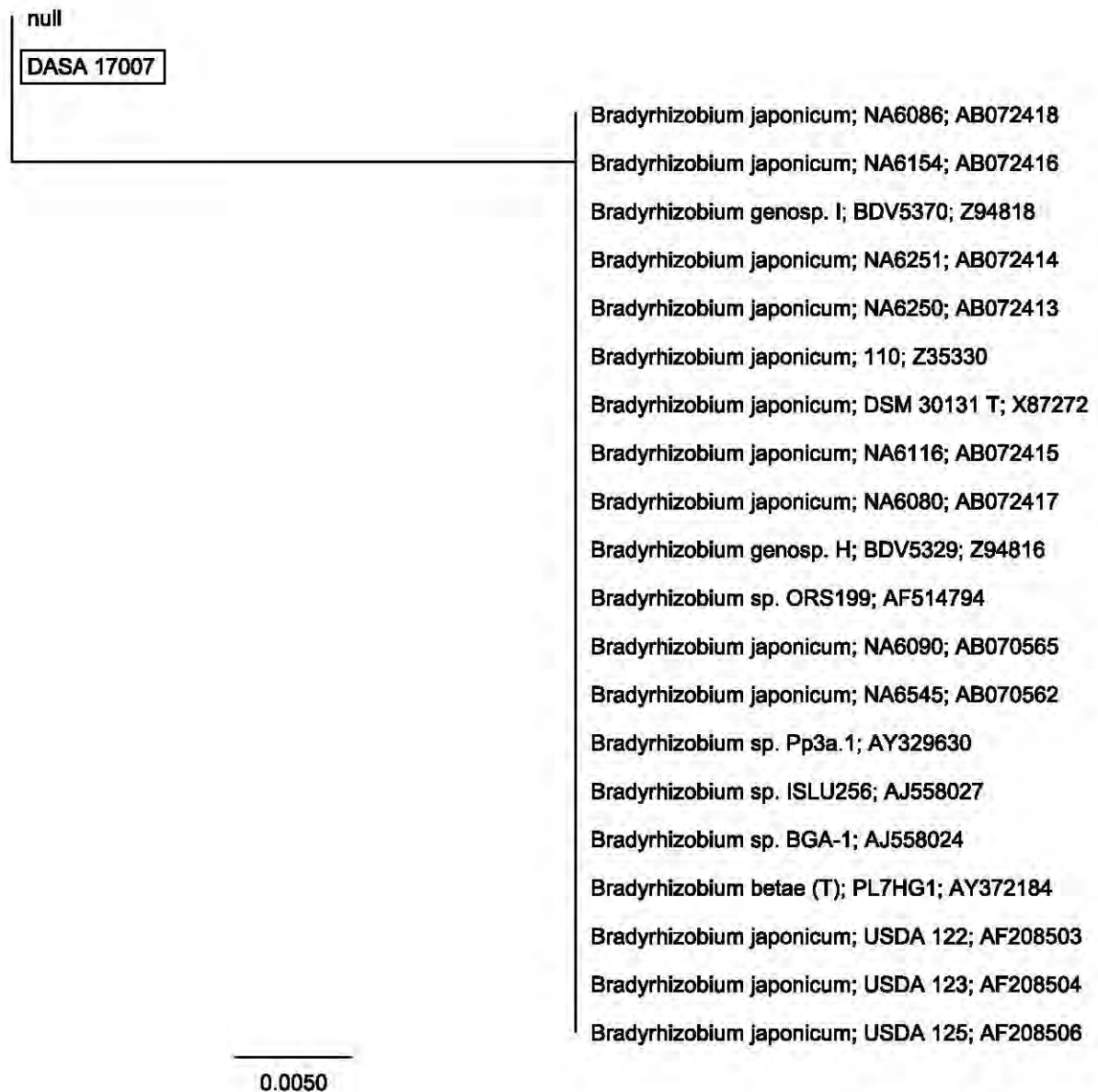
Primers; 533F และ 1100R
Base length; 773
Identical site; 89.8% (1,342/1498)
Pair wise % identity; 97.6%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 35 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

DASA 17007

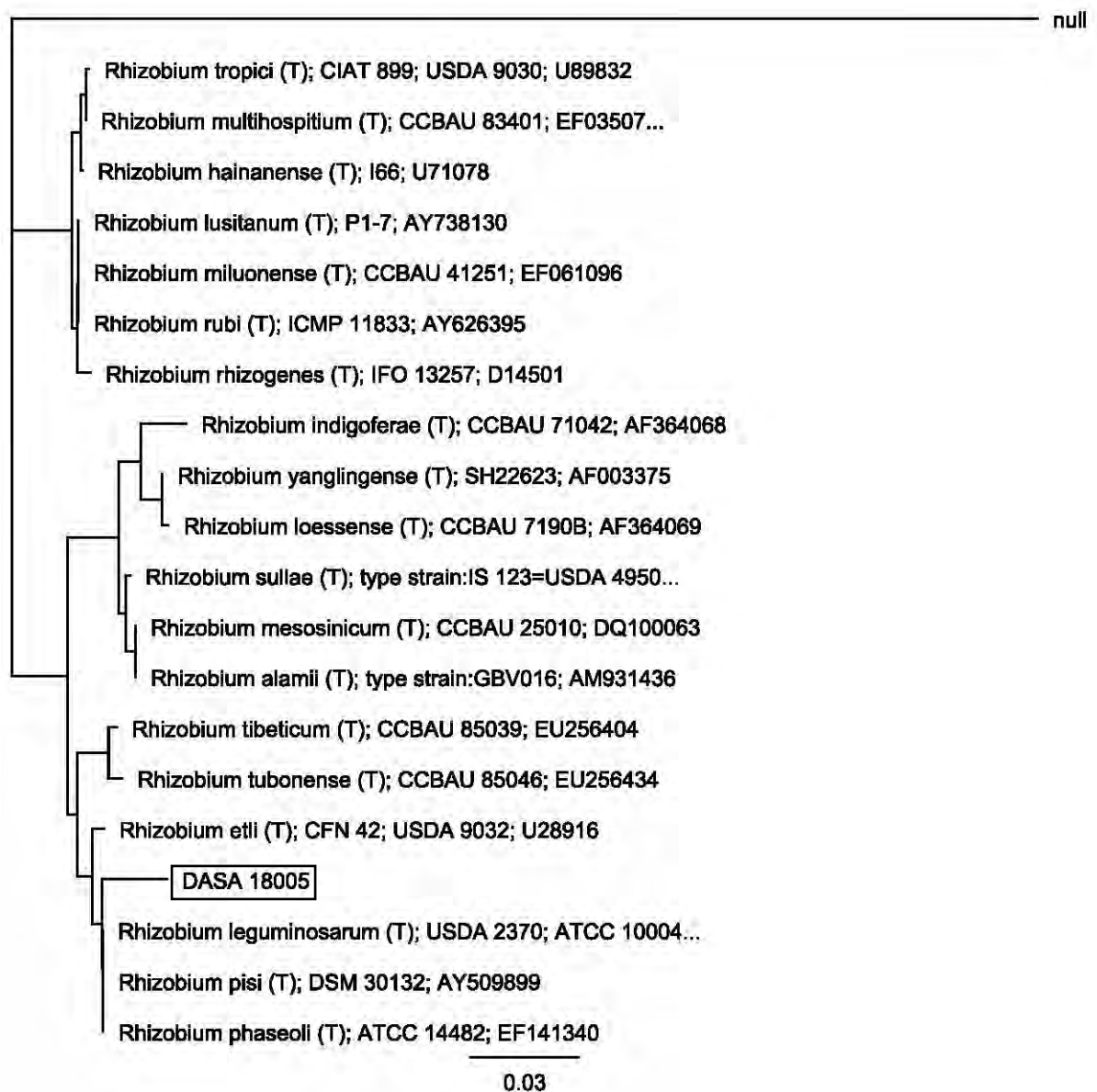
Primers; 533F และ 1100R
 Base length; 773
 Identical site; 97.1% (1,142/1494)
 Pair wise % identity; 99.5%
 Alignment both type and non-type strains



ภาพที่ 36 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 17007 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 357F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

DASA 18005

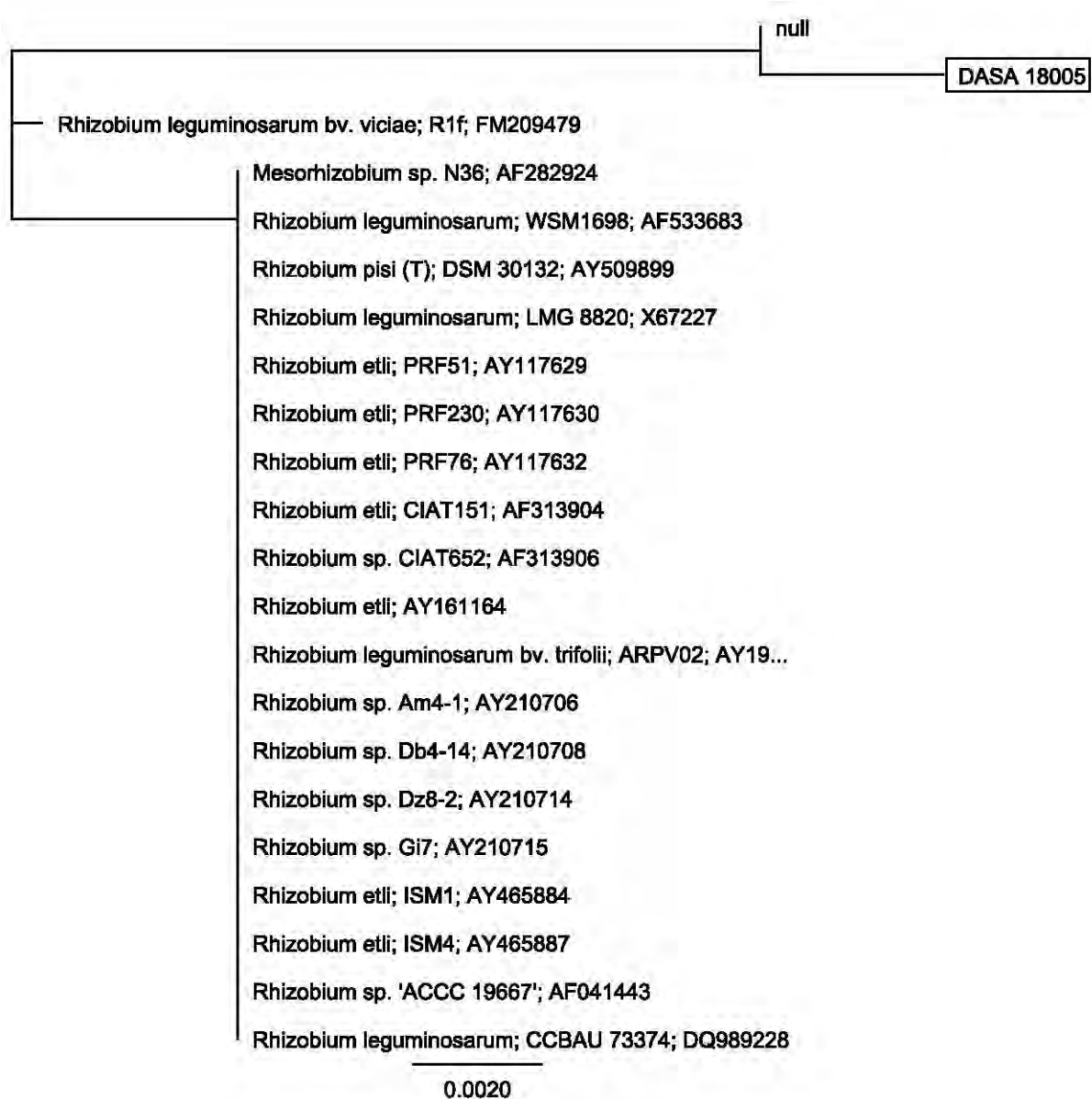
Primers; 533F และ 1100R
Base length; 511
Identical site; 89.8% (1,342/1498)
Pair wise % identity; 97.3%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 37 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

DASA 18005

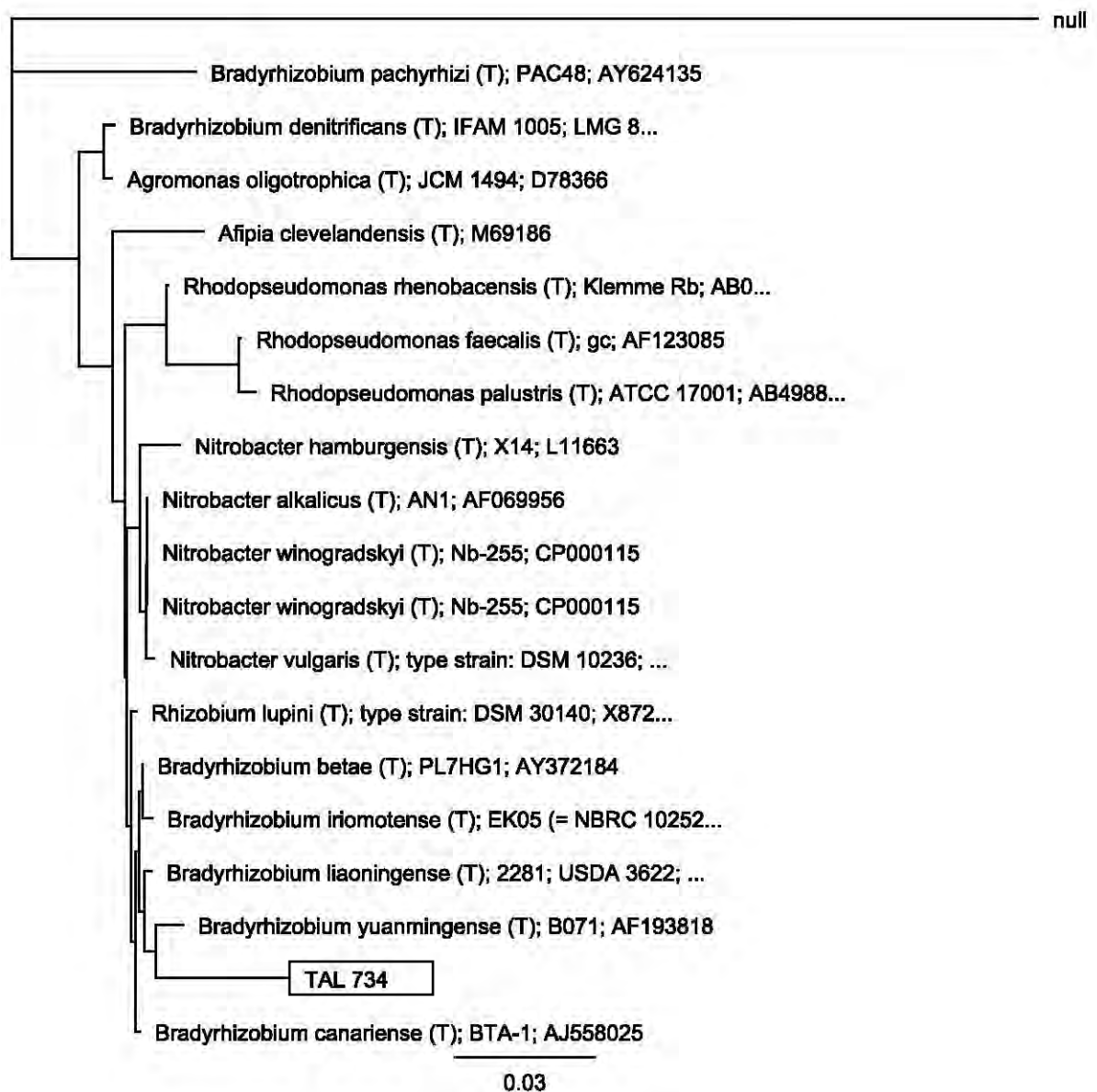
Primers; 533F และ 1100R
Base length; 511
Identical site; 91.5% (1,402/1553)
Pair wise % identity; 98.9%
Alignment both type and non-type strains



ภาพที่ 38 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

TAL 734

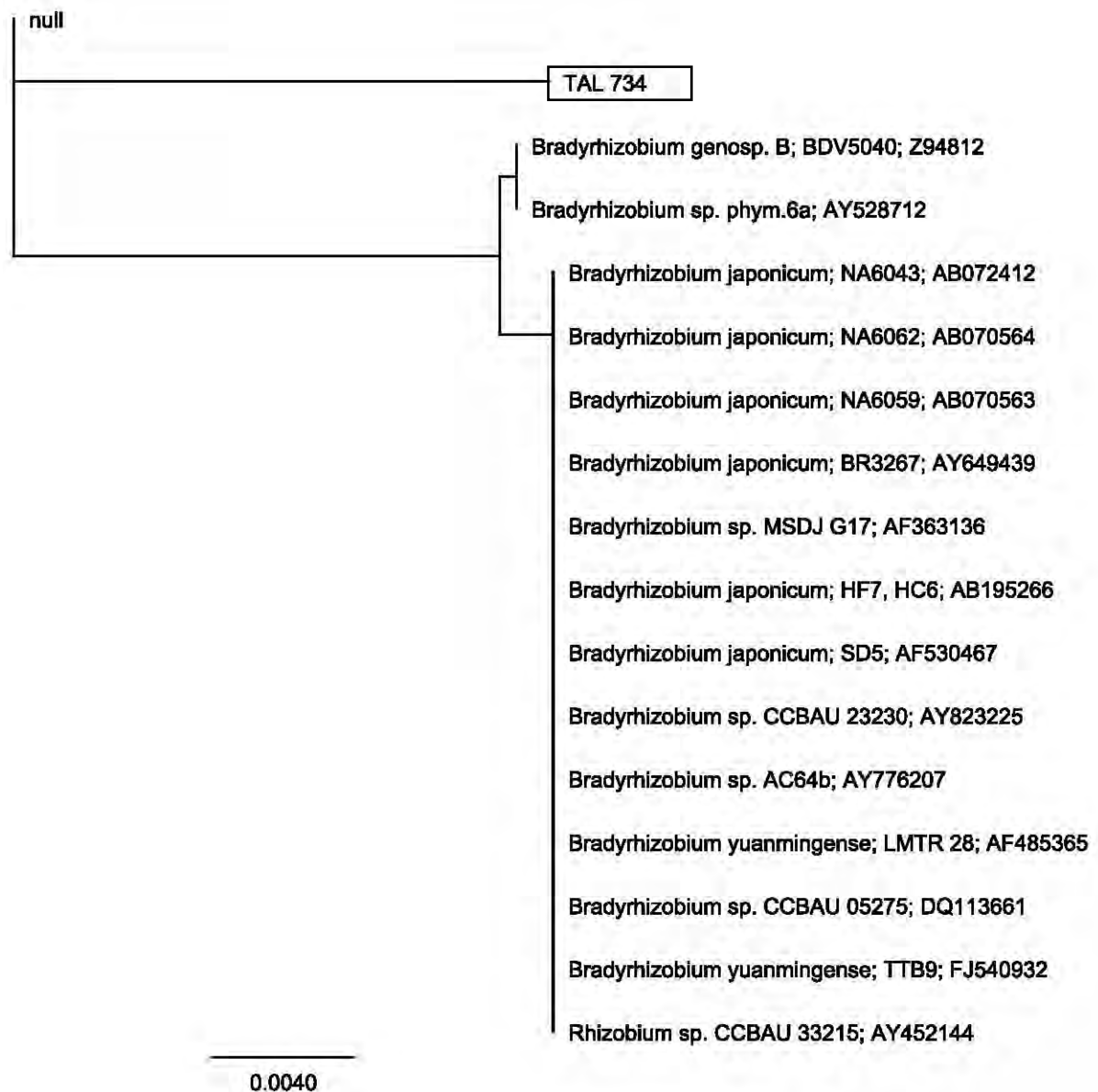
Primers; 533F และ 1100R
Base length; 510
Identical site; 85.5% (1,326/1501)
Pair wise % identity; 97.5%
Alignment limited to type strain



ภาพที่ 39 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 734 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบกับ Type strains

TAL 734

Primers; 533F และ 1100R
Base length; 510
Identical site; 92.6% (1,355/1518)
Pair wise % identity; 98.8%
Alignment both type and non-type strains

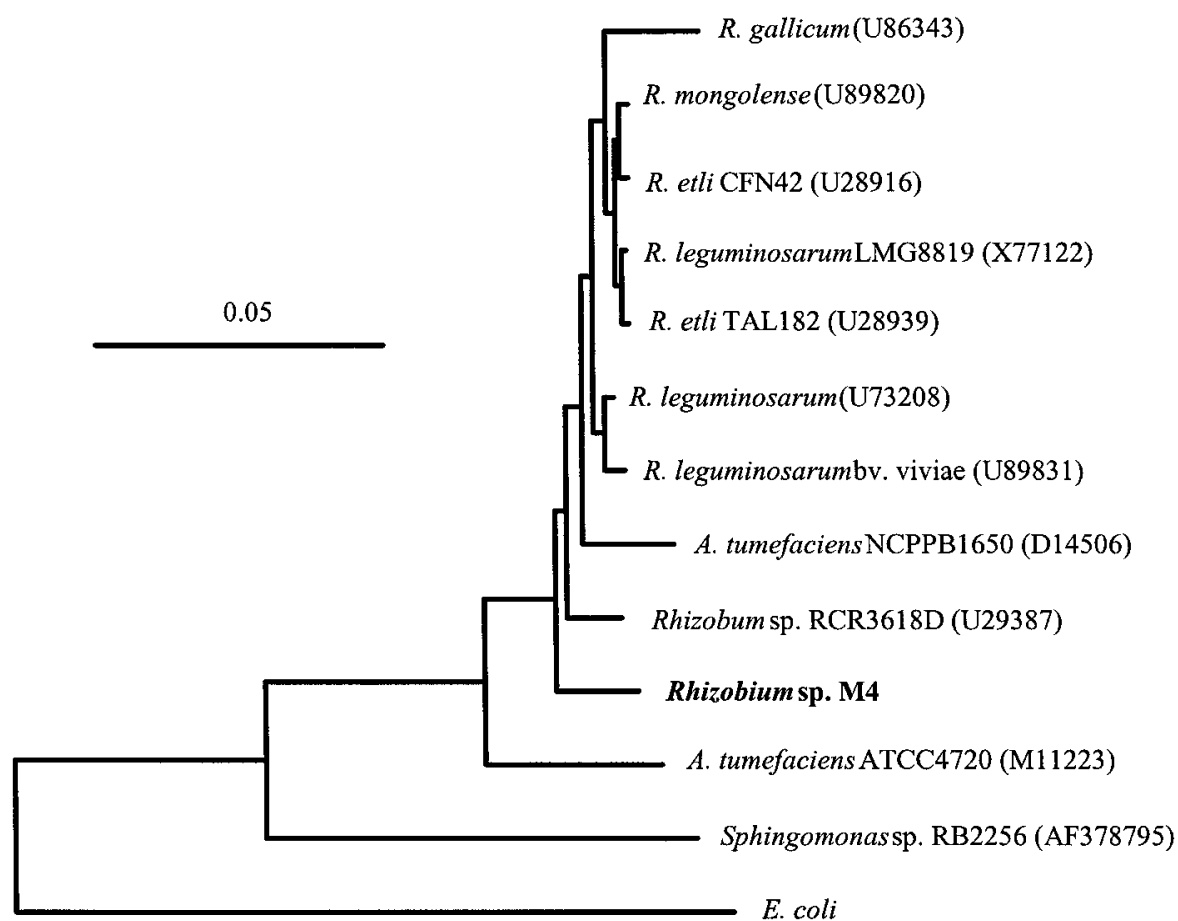


ภาพที่ 40 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 734 จากลำดับเบสที่ได้จาก partial sequencing โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 533F และ 1100R และเทียบเคียงทั้ง type strains และ non-type strains

R. etli M4 (สำเนาจากเอกสารอ้างอิง 50)

Primers; 27F และ 1492R

Base length;



ภาพที่ 41 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *R. etli* M4 จากลำดับเบสที่ได้จาก full-length sequencing ของ 16S rRNA โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1492R โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1492R (51)

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะเซลล์ของไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ขนาดเล็ก แกรมลบ ไม่พบเอนโดสปอร์ แต่พบการสร้าง inclusion body ในบางระยะของการเจริญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ stationary phase โคโลนีของมีสีขาวขุ่น (opaque) โค้งนูน (convex) ขอบเรียบสม่ำเสมอ (entire / regular) แต่ในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 มีลักษณะเมือกเยิ้ม ต่างไปจากไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบ สำหรับ *R. etli* M4 ที่เจริญในอาหาร OMA นั้นพบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่นรอบโคโลนีและโคโลนีเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 7-17 วัน ซึ่งสีน้ำตาลบ่งบอกความสามารถของ *R. etli* M4 ในการออกซิไดซ์ Mn^{2+} ในอาหารไปเป็น Mn^{4+} ได้ ไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบให้ผลการทดสอบ catalase, oxidase และ urease เป็นบวก และผลการทดสอบ citrate utilization test เป็นลบ ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของไรโซเบียมส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ทดสอบส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น Streptomycin, Gentamycin และ tetracycline ในการทดสอบการสร้างกรด-เบสในอาหาร YMB ที่มี BTB เป็น pH indicator นั้นพบว่าสายพันธุ์ DASA 17007 สร้างกรดและเห็นการเปลี่ยนสีของ BTB จากสีเขียวเป็นสีเหลืองได้อย่างชัดเจน และ *R. etli* M4 สามารถสร้างเบสและเห็นการเปลี่ยนสีของ BTB เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งจากการทดสอบนี้ อาจสันนิษฐานว่า DASA 17007 จัดอยู่ในกลุ่ม fast growing rhizobium สำหรับ *R. etli* M4 จัดอยู่ในกลุ่ม slow-growing rhizobium ซึ่งขัดแย้งกับข้อมูลการจัดกลุ่มทั่วไป เพราะมีเพียงจีโนม Bradyrhizobium ที่ถูกจัดว่าเป็น slow-growing rhizobium สำหรับไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบนั้นเปลี่ยนสีอาหาร YMB + BTB เป็นสีเหลืองอ่อนอมเขียว จึงไม่สามารถระบุกลุ่มที่แบ่งตามการสร้างกรด-เบสได้

ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ทดสอบส่วนใหญ่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สนับสนุนทั้งการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดี แต่สำหรับแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่า glucose สนับสนุนการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีในสายพันธุ์ไรโซเบียมส่วนใหญ่ที่ทดสอบ ยกเว้นในสายพันธุ์ DASA 17007 ที่ mannitol สนับสนุนการเจริญของเซลล์ได้ดีกว่า glucose และในไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 พบว่า sucrose สนับสนุนการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีกว่า glucose และ mannitol ปริมาณเบตาไกลูแคนสูงสุดผลิตโดย DASA 18005 ที่ 357.5 mg L^{-1} และมีอัตราการสร้างเท่ากับ $117.48 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ สำหรับ *R. etli* M4 เจริญได้ในอาหาร DM3 ได้ดีกว่า YMB และเมื่อปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร DM3 พบว่าน้ำตาล glucose และ sucrose ส่งเสริมการเจริญและการสร้าง EPS ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือการให้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักร่วมกับ yeast extract ซึ่งพบปริมาณการสร้าง EPS สูงสุดถึง 1616 และ 16.69 g L^{-1} ที่ C:N ratio เท่ากับ 1.6 และ 6 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการปรับ C:N ที่ลดปริมาณไนโตรเจนและคงปริมาณคาร์บอนนั้น พบว่าค่า C:N ที่สูงขึ้นไม่ได้ช่วยส่งเสริมการสร้าง EPS ซึ่งแตกต่างไปจากการปรับ C:N โดยการเพิ่มปริมาณคาร์บอนแต่คงปริมาณของไนโตรเจนนั้น พบว่าค่า C:N ที่สูงขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณการสร้าง EPS ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่า สภาวะเมตาบอลิซึมที่ไม่สมดุลระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน หากมีปริมาณคาร์บอนที่สูงมากเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดการสร้าง EPS ได้ดีขึ้น ซึ่งหน้าที่บางประการของ EPS จัดเป็นพลังงานสำรอง (carbon sink) ในเวลาที่ธาตุอาหารลดน้อยหรือหมดลง เพื่อจุลินทรีย์จะได้อยู่รอดและใช้เพื่อความอยู่รอดและการเจริญ

สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ทดสอบนั้น ซึ่งจัดเป็น partial nucleotide sequencing พบว่า ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยจัดอยู่ในจีโนม Bradyrhizobium มีเพียงไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 18005 ที่จัดอยู่ในจีโนม Rhizobium

จากการศึกษาอิทธิพลชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์นั้นพบว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนทั้งการเจริญและการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีในเกือบทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ และสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีบทบาทสำคัญยิ่งในกระบวนการขั้นตอนในการส่งเสริมการยึดติดกับรากพืชตระกูลถั่วและการสร้างปมราก ซึ่งการเตรียมปุ๋ยไรโซเบียมส่วนใหญ่จะเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหาร yeast-mannitol broth ดังนั้นข้อมูลจากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไรโซเบียมที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในใช้เป็นปุ๋ยไรโซเบียม อนึ่ง คุณสมบัติของสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อีกประการหนึ่งคือป้องกันความแห้งและป้องกันไรโซเบียม

จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในดินที่มีโลหะ หรือ เกลือ สูง เป็นต้น ซึ่งจะช่วยส่งเสริมอัตราการรอดของไรโซเบียมได้

ผลผลิต (output)

Publication

-

National conference;

1. Pulsawat W. and Foster LJR. Influences of Carbon and Nitrogen sources on Growth and Exopolysaccharides production of *Rhizobium* spp. “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 8, โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี. 16 – 18 ตุลาคม 2551. (poster presentation)

International conferences;

1. Pulsawat W. and Foster LJR. Encapsulation of EPS-alginate for Metal bioremediation. 4th European Bioremediation Conference, Mino Palace Hotel, Chania, Crete, Greece. 3rd – 6st September 2008. (poster presentation)
2. Pulsawat W. and Foster LJR. EPS-alginate beads: Characterization and Metal Biosorption Application. Macro- and Supramolecular Architectures and Materials: Synthesis, Properties and Applications, 4th International Symposium MAM-08, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany. 7th – 11st September 2008. (Oral presentation)

Influences of Carbon and Nitrogen sources on Growth and Exopolysaccharides production of *Rhizobium* spp.Pulsawat, W.^{1*}, Foster, L. J. R.²¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University,
Maing, Nakorn Pathom 73000, Thailand²Biopolymers Research Group (BRG), School of Biotechnology and Biomolecular Sciences,
University of New South Wales, Sydney, Australia**Abstract**

Rhizobial exopolysaccharides demonstrates its significant roles in establishment nodulation and nitrogen fixation in leguminous plant. Synthesis of several exopolysaccharides strongly depends on the culture condition. Imbalance growth conditions show enhancement of exopolysaccharides production. Among those culture condition factors, limited nitrogen and excessive carbon source constituted in culture medium often improves exopolysaccharides yield. A number of rhizobial strains; *R. etli* M4 which isolated from mining ore in Northern Territory in Australia and *Rhizobium* spp. Strains (DASA 01023, DASA 02001, DASA 03001, DASA 06004, DASA 17007, DASA 18005 and TAL 734) isolated from nodules of local leguminous plants in Thailand were examined. Type of carbon source (mannitol, glucose and sucrose) and nitrogen source (yeast extract, peptone and ammonium sulfate) were monitored. Sucrose and yeast extract was found to promote polysaccharide production.

Furthermore, an increase of carbon nitrogen ratio resulted in a significant increase in exopolysaccharides production. The optimisation of rhizobial exopolysaccharide production promoted by culture media compositions can lead to an effective rhizobial fertilizer.

Keywords: carbon, nitrogen, C:N, rhizobium, exopolysaccharides, EPS

บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ แมธีวิจัยอาวุโส สกว.
ครั้งที่ 8

วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551

โรงแรมฮอติเตย์อินน์ รีสอร์ท ริเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



ENCAPSULATION OF EPS-ALGinate FOR METAL BIOSORPTION

W. Pulsawat^{1,2} and L.J.R. Foster²

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Maung, Nakorn Prathom, Thailand 73000

²Bio/polymers Research Group (BRG), BABS, University of New South Wales, NSW 2054 Australia

ABSTRACT

Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Rhizobium etli* M4 demonstrated its capacity in divalent metal ion binding [1,2]. To enhance metal removal and facilitate biosorbent separation, binary biopolymeric beads of alginate and extracted EPS from *R. etli* M4 were prepared for evaluation of metal sorption capability. Different weight percentages of EPS; 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1% (w/v) were added to 2% (w/v) alginate and different bead sizes were also generated to determine their influences on metal sorption efficiency. Preliminary characterization of the beads was performed such as bead size estimation, water uptake, swelling, SEM and FTIR. EPS-Alginate beads were used as biosorbent for investigation of their divalent metal ions sorption capacity: Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} , in batch condition. Metal ions sorption performance of alginate-EPS beads was compared with EPS solution employed as biosorbent [2,3] and also compared to other alginate-biopolymer blend; dextran, cellulose, curdlan, chitin and starch. In addition, the biosorption equilibrium and kinetics properties of the metal ions on alginate-EPS beads were also investigated.

References:

1. Foster, L.J.R., Y.P. Moy and P.L. Rogers (2000) "Metal binding of *Rhizobium etli* M4 and its extracellular polymeric substances", *Biotechnology letters*, **22**, 1757-1760.
2. Pulsawat, W., N. Leksawasdi, P.L. Rogers and L.J.R. Foster (2003) "Anion effect on biosorption of Mn(II) by extracellular polymeric substances (EPS) from *Rhizobium etli*", *Biotechnology letters*, **25**, 1267-1270.
3. Pulsawat W. (2006) "Extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Rhizobium etli* Strain M4 and its metal biosorption", *Thesis (Ph.D.)*, University of New South Wales

2008 4th European

BioRemediation

Conference



Book of Abstracts

September 3 to 6, Chania, Crete, Greece

Editors:

Nicolas Kalogerakis
Fabio Fava
Steven A. Banwart

Organized by:



Department of Environmental
Engineering
Technical University of Crete



Faculty of Engineering
Adam Mickiewicz
University of Bologna



The Geomicrobiology Protection
and Remediation Group
Earth Research Institute
The University of Sheffield

ISBN 978-960-8475-12-0



Encapsulation of EPS-Alginate for Metal Biosorption



W. Pulsawat^{1*} and L.J.R. Foster²

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Maung, Nakorn Pathom, Thailand 73000

²Biopolymers Research Group (BRG), BABS, University of New South Wales, NSW, 2054 Australia

Abstract

Extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Rhizobium etli* M4 was encapsulated as metal ligands by alginate and obtained EPS-alginate beads were subsequently preliminarily examined physical-morphological properties such as size, size distribution, % water content, degree of swelling and surface topology.

The dry EPS-alginate beads had average diameter ranged from 1.6 to 1.9 millimetres. The diameter increased with an increase of %EPS (w/v) content composed in the beads. Wet bead had water content approximately at 95% (w/v). Surface of beads are generally rough and heterogeneous observed by scanning electron microscope (SEM). Lastly, the EPS-alginate beads were determined their metal removal capabilities for divalent metals; manganese and copper. The biosorption experiment revealed that 0.05% (w/v) EPS-alginate beads removed manganese ions at 433 and 1,261 mg g⁻¹ when provided 3 and 24 hours contacting time, respectively. For copper removal, 0.1% (w/v) EPS-alginate and 0.01% (w/v) EPS-alginate beads could remove copper at 576 and 1,161 mg g⁻¹ at 3 and 24 hours of contacting time, respectively.

Introduction

Metal contamination in wastewater has been concerned for posing damage of for agriculture and human health including biodiversity in the polluted environment. Standard and regulation have been applied to wastewater in order to prevent metal pollution. Physical, chemical and biological metal remediation methods as alternatives to be selected corresponding to characters and property of metal type and wastewater and following standard of wastewater effluent. Furthermore, cost and efficiency of treatments are also taken in to concern. Bioremediation method recently gains acceptance and attention due to low cost in treatment. Nevertheless, secondary problem such as biological sludge contributing land additional cost of sludge managing and posing recycling hindrance.

Rhizobium etli M4 was isolated from mining ore in Groote Eylandt which locates in Northern Territory of Australia[1]. The bacteria is capable in manganese oxidizing forming manganese oxide and also produce extracellular polymers (EPS) that demonstrated role in binding manganese ions including other bivalent ions[2-3].

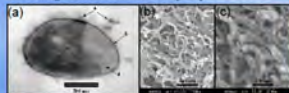


Fig.1 (a)TEM micrograph of *R. etli* M4, (b) and (c) SEM micrograph of the crude EPS

References

- [1] Moy, Y. P., B. A. Neilan, Foster, L. J., Madgwick, J. C., Rogers, P. L. (2003). *Biotechnol Lett* 25(17): 1407-13.
- [2] Foster, L.J.R., Moy, Y.P., Rogers, P.L. (2000). *Biotechnol Lett* 22: 1757-1760.
- [3] Pulsawat, W., N. Leksawasdi, Rogers, P. L. Foster, L. J. (2003). *Biotechnol Lett* 25(15): 1267-70.

Acknowledgements

This research project was financially supported by grants from The faculty of Sciences, Silpakorn University and Thailand Research Fund (TRF). The author is grateful to the department of Microbiology and scientific instruments centre at Silpakorn University including the Biopolymer Research Group (BRG) for instruments and facilities. In addition, the author's appreciation goes to Mr. Riley T. Perry for partial financial support of the conference travel.

Materials & Methods

EPS production

- EPS was extracted from supernatant of the cultivation of *R. etli* M4 using DM3 (C:N=10) as culture medium 5L fermenter. Precipitated EPS by cold absolute ethanol was subsequently dried by lyophilizer. The dried EPS (crude EPS) was then ground into powder form for further used.

EPS-alginate beads preparation

- To prepare control alginate beads; 2% (w/v) alginate beads, solution of 2% (w/v) of sodium alginate was prepared by dissolving sodium alginate powder in deionized water. The solution was added dropwise into 2% (w/v) CaCl₂ solution. The beads were hardened in this solution for 2-6 hours at 4 °C. Then, the beads were removed excess CaCl₂ twice with deionized water. Drying those beads at ambient temperature and store in the desiccator for further experiments.

- To prepare different %EPS (w/v), the beads were prepared in the similar manner as control alginate beads excepted adding 0.01% (w/v), 0.05% (w/v), 0.1% (w/v) and 0.5% (w/v) EPS solution (This was prepared by dissolved EPS in deionised water) into 2% (w/v) alginate solution prior dropping the mixture into 2% (w/v) CaCl₂ solution.

Preliminary morphological characteristic of alginate beads

%water content :

$\frac{\text{wet wt. of beads} - \text{dry wt. of beads}}{\text{dry wt. of beads}} \times 100$

Size distribution:

The diameter of beads were measured under optical microscope and then used to calculate volume ($\frac{4}{3}\pi r^3$) and surface area ($4\pi r^2$) of beads

Water swelling

Beads were submerged in deionised water for 24 hours. Diameter and weight of beads were monitored at 3 and 24 hours of soaking.

Surface topology

Surface area characteristic of the beads were observed by Scanning Electron Microscope (SEM)

Metal biosorption experiment

- 50 mg of beads was added into manganese and copper solution (in sulfate counterions) concentration ranged; 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm. 3 and 24 hours were provided as contacting time. Beads were removed from metal solution and residual metal concentrations were determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

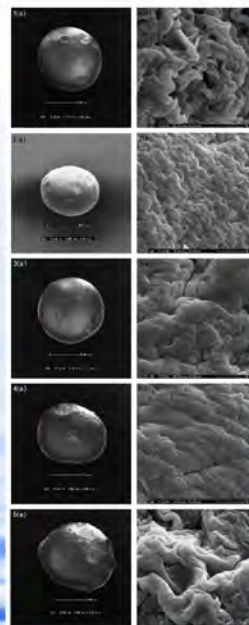


Fig.2 No.1-5 are SEM micrograph of alginate and 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5% (w/v) EPS-alginate beads, respectively (a) 30X and (b) 2000X

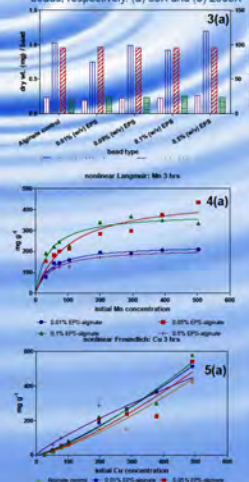


Fig.3-5 3(a) dry wt., wet wt. and %water content of EPS-alginate beads. 3(b) surface/volume of EPS-alginate beads. 4(a) and 4(b): Mn²⁺ removal results fitted Langmuir model at 3 and 24 hours. 5(a) and 5(b): Cu²⁺ removal results fitted Freundlich model at 3 and 24 hours.

Conclusion

The EPS-alginate beads were monitored and demonstrated significant higher Mn²⁺ and Cu²⁺ removal capacities compared to EPS solution used as metal biosorbents. This can lead to practicability and feasibility in separation and handling wastewater contaminated metal

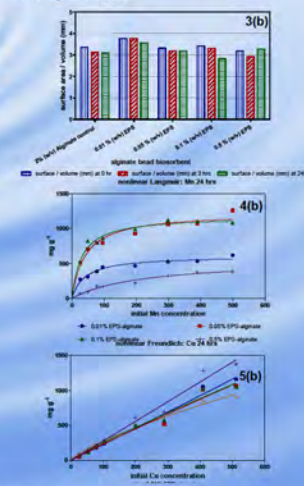
Results & Discussion

Average of single wet and dry bead weight were approximately 25 mg and 1 mg, respectively. These contributed average water content at 95% (w/v) (Fig.3a). After drying, beads has diameter ranged from 1.6-1.9 mm and the diameter increased with an increase of %EPS content. There was slight increase of surface area / volume of beads with an increased %EPS content (Fig.3b) although a decrease of the ratio was observed with an increase of water soaking duration.

For characteristic of bead surface area observed by SEM, higher content of %EPS contributed more rough and ripple surface. This should increase more surface for metal contacting although this contradicted to the calculated average surface area (Fig.2;1-5)

0.01%, 0.05% and 0.1% EPS (w/v) had Mn²⁺ removal capacities at 159, 211 and 224 mg g⁻¹ (initial Mn²⁺ 100 ppm) and 209, 434 and 333 mg g⁻¹ (initial Mn²⁺ 500 ppm), respectively, for 3 hours contacting time. The increase of EPS content enhance metal removal capacities which was opposite, by comparison, to removal obtained from using EPS solution as biosorbent. An increase in contacting time to 24 hours increased Mn²⁺ and Cu²⁺ approximately 3 folds (Fig.4-5;a and b). EPS-alginate beads gave slightly higher metal removal for Cu²⁺ than Mn²⁺.

By fitting the results with biosorption isotherms, Langmuir and Freundlich models gave best fit for Mn²⁺ and Cu²⁺ sorption by the EPS-alginate beads.



CL32
**EPS-ALGINATE BEADS:
CHARACTERISATION AND METAL BIOSORPTION
APPLICATION**

W. Pulsawat,^{1*} and L.J.R. Foster²

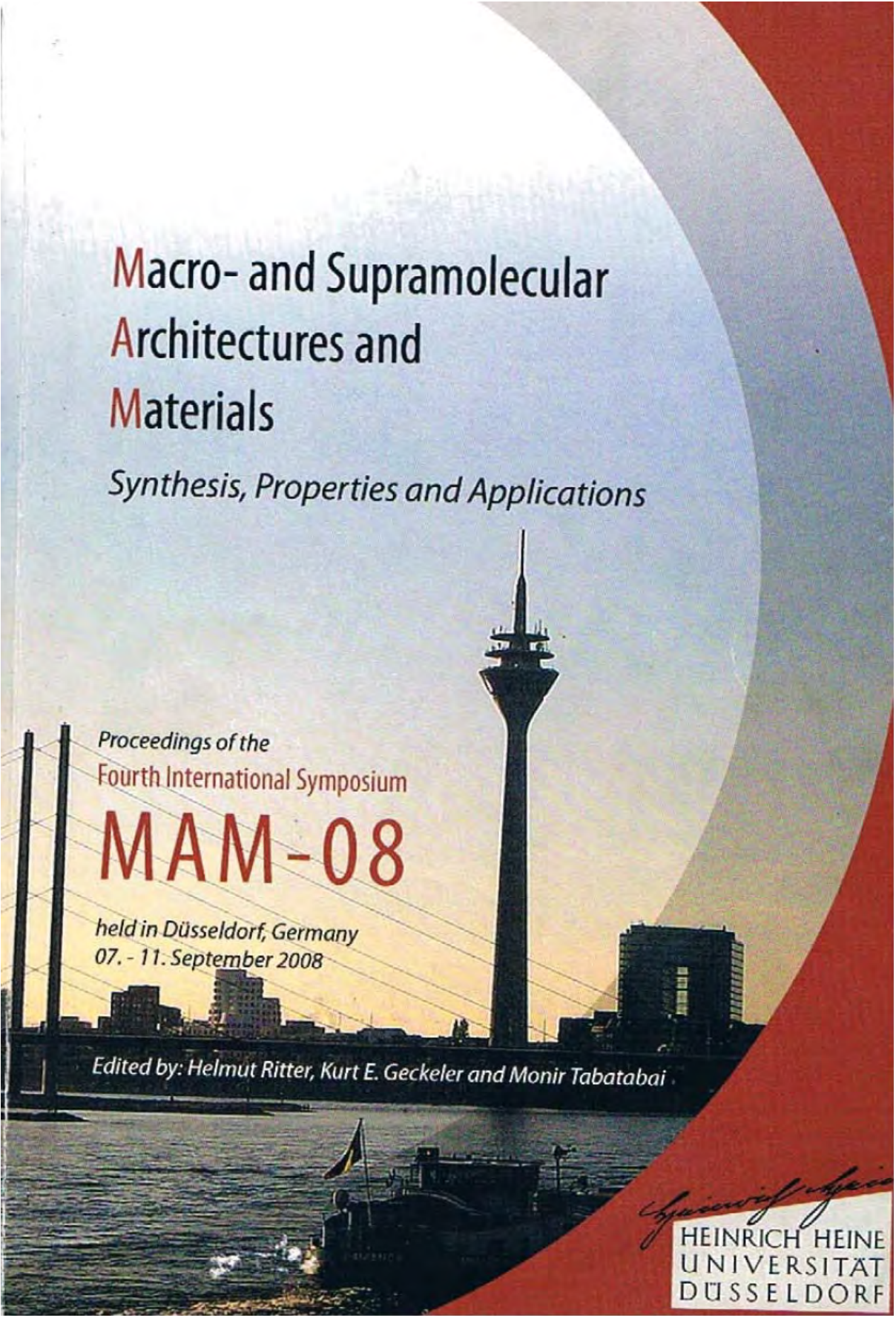
¹*Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn Univesity, Maung, Nakorn
Prathom 73000, Thailand*

²*Bio/polymers Research Group (BRG), BABS, University of New South Wales, NSW
2054, Australia*

Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Rhizobium etli* strain M4, which was isolated from mining ore at Groote Eylandt located in Northern Territory, Australia. The EPS demonstrated its capability in heavy metal removal and sequestration^{[1],[2]}. Although this novel EPS has potential in metal removal application, the downstream process of liquid phase separation can be a hindrance. To facilitate the downstream of metal removal and sequestration process, solid-phase separation employing EPS-alginate beads as metal biosorbent offers advance alternatives. The EPS-alginate beads were prepared and preliminary characterized. Bead average size measurement, water uptake determination, swelling studies, SEM and FTIR analyses were performed. The EPS-alginate beads were examined of their metal removal capability for divalent metals; Mn²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺. Equilibrium and kinetics of metal biosorption by EPS-alginate beads were studied. Conventional Langmuir and Freundlich isotherms were applied to experimental biosorption results.

References

- [1] L.J.R. Foster, Y.P. Moy and P.L. Rogers, *Biotechnol. Letts.* **22**, 1757-1760, (2000).
- [2] W. Pulsawat, N. Leksawasi, P.L. Rogers and L.J.R. Foster, *Biotechnol. Letts.* **25**, 1267-1270, (2003).



Macro- and Supramolecular Architectures and Materials

Synthesis, Properties and Applications

Proceedings of the
Fourth International Symposium

MAM-08

held in Düsseldorf, Germany
07. - 11. September 2008

Edited by: Helmut Ritter, Kurt E. Geckeler and Monir Tabatabai

Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

เอกสารอ้างอิง

- (1) Laus MC, van Brussel AA, Kijne JW. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. Molecular plant-microbe interactions : MPMI. 2005;18(6):533-8.
- (2) Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A, Downie JA. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. J Bacteriol. 2008;190(13):4706-15.
- (3) Fraysse N, Couderc F, Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. European journal of biochemistry / FEBS. 2003;270(7):1365-80.
- (4) Tavernier P, Portais J, Nava S, Courtois J, Courtois B, Barbotin J. Exopolysaccharide and Poly-(beta)-Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. Appl Environ Microbiol. 1997;63(1):21-6.
- (5) Staudt AK, Wolfe LG, Shrout JD. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. Arch Microbiol. 2012;194(3):197-206.
- (6) สำนักนิเทศและการถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การปรับปรุงดินเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง. ในเอกสารเพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยี ชุดความรู้และเทคโนโลยีการพัฒนาดิน. 2550 [เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 5555]:1-2. เข้าถึงได้จาก :URL:http://www.ddd.go.th/menu_Dataonline/G2/G2_08.pdf
- (7) Smit G, Swart S, Lugtenberg BJ, Kijne JW. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. Molecular microbiology. 1992;6(20):2897-903.
- (8) Gonzalez JE, York GM, Walker GC. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. Gene. 1996;179(1):141-6.
- (9) Gonzalez JE, Reuhs BL, Walker GC. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(16):8636-41.
- (10) Glazebrook J, Walker GC. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell. 1989;56(4):661-72.
- (11) Skotnicki ML, Rolfe BG. Differential stimulation and inhibition of growth of *Rhizobium trifolii* strain T1 and other *Rhizobium* species by various carbon sources. Microbios. 1977;20(79):15-28.
- (12) Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. Int J Mol Sci. 2011;12(11):7898-933.
- (13) Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Donate-Correa J, Rivas R, Velazquez E, Hernandez M, et al. Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. Systematic and applied microbiology. 2003;26(4):611-23.
- (14) Wei GH, Tan ZY, Zhu ME, Wang ET, Han SZ, Chen WX. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003;53(Pt 5):1575-83.
- (15) Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2002;52(Pt 6):2219-30.

- (16) Dreyfus BL, Dommergues YR. Nodulation of acacia species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl Environ Microbiol*. 1981;41(1):97-9.
- (17) Pankhurst CE. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast- and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can J Microbiol*. 1977;23(8):1026-33.
- (18) Martinez-De Drets G, Arias A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. *J Bacteriol*. 1972;109(1):467-70.
- (19) Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi E, Virelizier H, Glushka JN, Endre G, et al. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(1):192-6.
- (20) Spaink HP, Sheeley DM, van Brussel AA, Glushka J, York WS, Tak T, et al. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*. 1991;354(6349):125-30.
- (21) Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC, et al. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 1990;344(6268):781-4.
- (22) Anolles GC, Favelukes G. Host-Symbiont Specificity Expressed during Early Adsorption of *Rhizobium meliloti* to the Root Surface of Alfalfa. *Appl Environ Microbiol*. 1986;52(2):377-82.
- (23) Dazzo FB, Napoli CA, Hubbell DH. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol*. 1976;32(1):166-71.
- (24) Vance CP. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? *Annual review of microbiology*. 1983;37:399-424.
- (25) Long SR. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*. 1989;56(2):203-14.
- (26) Denarie J, Debelle F, Prome JC. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*. 1996;65:503-35.
- (27) Halverson LJ, Stacey G. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis : evidence for the involvement of lectin in nodulation. *Plant physiology*. 1985;77(3):621-5.
- (28) de Vasconcelos MA, Cunha CO, Arruda FV, Carneiro VA, Mercante FM, do Nascimento Neto LG, et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. *Molecules*. 2012;17(5):5244-54.
- (29) Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, Van Brussel AA, Carlson RW, Kijne JW. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular microbiology*. 2006;59(6):1704-13.
- (30) Philip-Hollingsworth S, Hollingsworth RI, Dazzo FB, Djordjevic MA, Rolfe BG. The effect of interspecies transfer of *Rhizobium* host-specific nodulation genes on acidic polysaccharide structure and in situ binding by host lectin. *J Biol Chem*. 1989;264(10):5710-4.
- (31) Kijne JW, Smit G, Diaz CL, Lugtenberg BJ. Lectin-enhanced accumulation of manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. *J Bacteriol*. 1988;170(7):2994-3000.
- (32) Hollingsworth RI, Dazzo FB, Hallenga K, Musselman B. The complete structure of the trifoliin A lectin-binding capsular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* 843. *Carbohydr Res*. 1988;172(1):97-112.

- (33) Kaci Y, Heyraud A, Barakat M, Heulin T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in microbiology*. 2005;156(4):522-31.
- (34) Bossio JC, Semino CE, Inon de Iannino N, Dankert MA. The in vitro biosynthesis of the exopolysaccharide produced by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, strain NA 30. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1996;42(5):737-58.
- (35) Loris R, Casset F, Bouckaert J, Pletinckx J, Dao-Thi MH, Poortmans F, et al. The monosaccharide binding site of lentil lectin: an X-ray and molecular modelling study. *Glycoconjugate journal*. 1994;11(6):507-17.
- (36) Sharon N, Lis H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1990;4(14):3198-208.
- (37) Cosme AM, Becker A, Santos MR, Sharypova LA, Santos PM, Moreira LM. The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. 2008;21(7):947-57.
- (38) Leigh JA, Coplin DL. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual review of microbiology*. 1992;46:307-46.
- (39) Janczarek M, Kutkowska J, Piersiak T, Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiol*. 2010;10:284.
- (40) Vanderlinde EM, Harrison JJ, Muszynski A, Carlson RW, Turner RJ, Yost CK. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS microbiology ecology*. 2010;71(3):327-40.
- (41) Soto MJ, Dominguez-Ferreras A, Perez-Mendoza D, Sanjuan J, Olivares J. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular microbiology*. 2009;11(3):381-8.
- (42) Soto MJ, Sanjuan J, Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*. 2006;152(Pt 11):3167-74.
- (43) Huang KH, Chen BY, Shen FT, Young CC. Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28(4):1367-73.
- (44) Breedveld MW, Zevenhuizen LP, Canter Cremers HC, Zehnder AJ. Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993;64(1):1-8.
- (45) Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Krol J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories*. 2006;5:7.
- (46) Avelar Ferreira PA, Bomfeti CA, Lima Soares B, de Souza Moreira FM. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28(5):1947-59.
- (47) Santamaria M, Diaz-Marrero AR, Hernandez J, Gutierrez-Navarro AM, Corzo J. Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*. *Environmental microbiology*. 2003;5(10):916-24.

- (48) Doherty D, Leigh JA, Glazebrook J, Walker GC. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the R. meliloti acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. J Bacteriol. 1988
- (49) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. 1956;28(3):350-356.
- (50) Poole P, Allaway D. Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium. Advances in microbial physiology. 2000;43:117-63.
- (51) Moy YP, Neilan BA, Foster LJ, Madgwick JC, Rogers PL. Screening, identification and kinetic characterization of a bacterium for Mn(II) uptake and oxidation. Biotechnology letters. 2003;25(17):1407-13.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและสารเคมี

1. สูตรอาหารเหลว YM

Mannitol	10	g L ⁻¹
Yeast extract	0.5	g L ⁻¹
NaCl	0.1	g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0.5	g L ⁻¹
pH 6.8		

การเตรียม Bromthymol blue (BTB) สำหรับการทดสอบการสังเคราะห์ของไรโซเบียม

1. Bromthymol blue (BTB): stock solution 0.5 g/ 100 ml ethanol

2. เติม 5 ml stock solution / L ของอาหารเหลว YM

การปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM แทน Mannitol

Sucrose	9.42	g L ⁻¹
Glucose	9.89	g L ⁻¹

การปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM แทน yeast extract

Peptone	0.35	g L ⁻¹
Malt extracts	0.53	g L ⁻¹

2. สูตรอาหารเหลว OMA

MnSO ₄ ·H ₂ O	5	g L ⁻¹
Peptone	2	g L ⁻¹
Yeast extract	1	g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	g L ⁻¹
NaCl	0.2	g L ⁻¹
CaCl ₂	0.1	g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.05	g L ⁻¹
Agar	15	g L ⁻¹
pH 7.0		

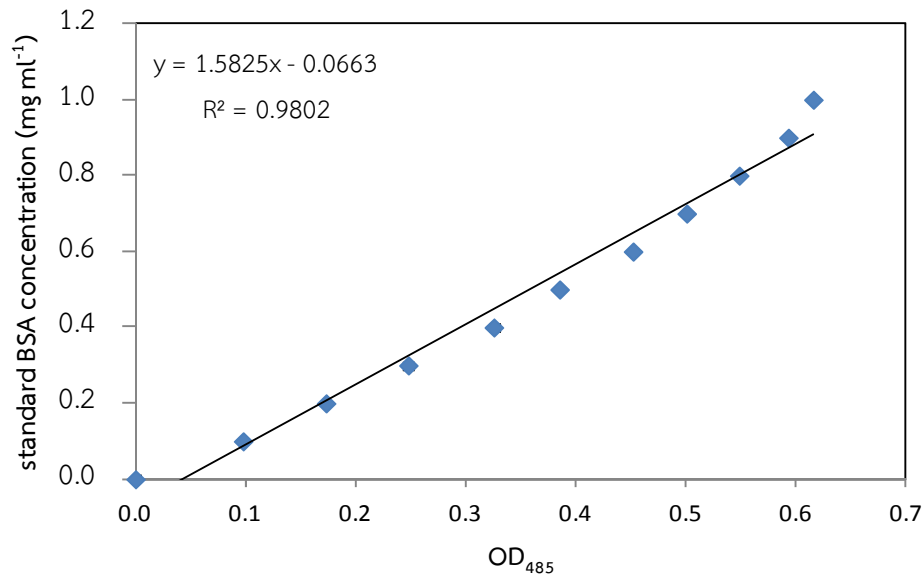
3. สูตรอาหารเหลว DM3

MnSO ₄ ·H ₂ O	5	g L ⁻¹
Glucose	4	g L ⁻¹
Yeast extract	0.5	g L ⁻¹
Urea	1	g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	g L ⁻¹
NaCl	0.2	g L ⁻¹
CaCl ₂	0.1	g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.05	g L ⁻¹
pH 7.0		

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องแยกสารเป็น 3 กลุ่มในการทำปราศจากเชื้อ โดยแยกระหว่างสารละลายของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ออกจากกัน แล้วทำปราศจากเชื้อโดยการนึ่งอัดไอ เมื่อผ่านการทำปราศจากเชื้อแล้วจึงนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในขณะที่สารละลายไม่ร้อน นอกจากนี้ต้องแยกยูเรียทำปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 μ เนื่องจากยูเรียไม่ทนต่อความร้อน

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total carbohydrate assay) โดยวิธี Bradford assay และใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

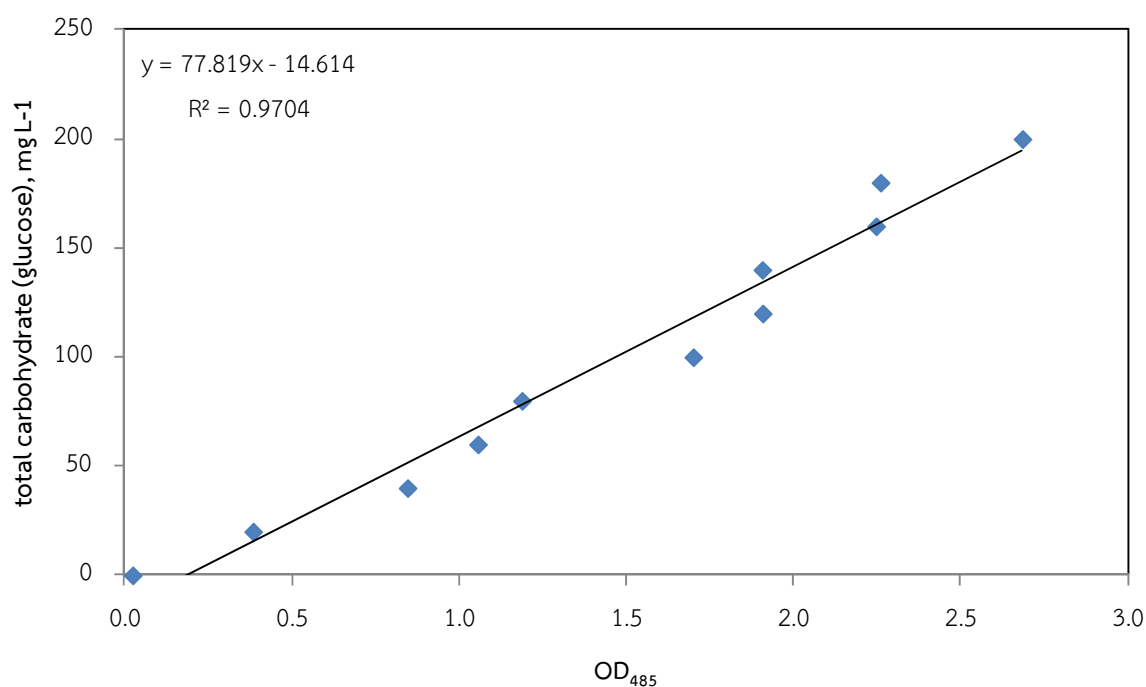


ภาพ ก. กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total carbohydrate assay) โดยวิธี Bradford assay และใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total carbohydrate assay) โดยวิธี Phenol- sulfuric acid method และใช้ glucose เป็นสารมาตรฐาน

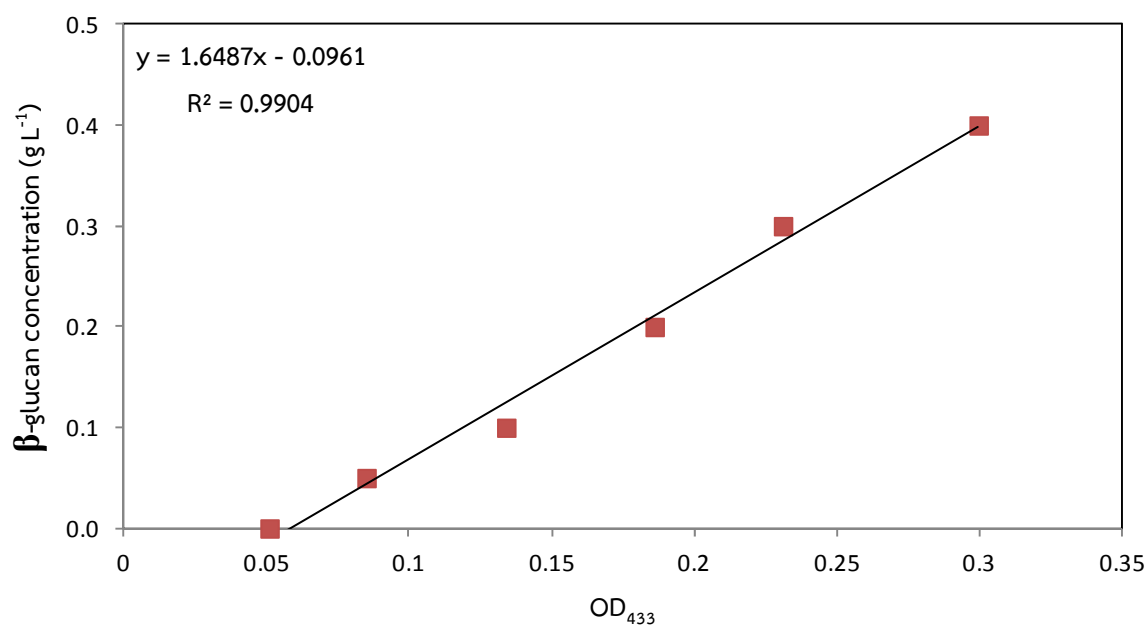
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 ug/ml												
A												glucose
B												
C												

ภาพ ข. สารละลาย glucose และ hydrolysed cellulose ความเข้มข้น 0 - 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 nm



ภาพ ค. กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total carbohydrate assay) โดยวิธี Phenol- sulfuric acid method และใช้ glucose และ hydrolysed cellulose เป็นสารมาตรฐาน

3. กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณ β -glucan โดยใช้ calcofluor method และใช้ cellulose เป็นสารมาตรฐาน



ภาพ ง. กราฟมาตรฐานการวัดปริมาณ β -glucan โดยใช้ calcofluor method และใช้ cellulose เป็นสารมาตรฐาน