พรรณลดา ติตตะบุตร : การพัฒนาการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมชนิดเหลว
(DEVELOPMENT OF RHIZOBIAL LIQUID INOCULANT PRODUCTION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด, 228 หน้า. ISBN 974-533-459-6

การพัฒนาการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมชนิดเหลวจะต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิต เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุพาหะ และเชื้อไรโซเบียม ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตจึงได้นำวัสดุที่มีราคาถูกมาศึกษาเพื่อผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม จากการศึกษาพบว่ามันสำปะหลังเป็นวัสดุที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุดเมื่อนำไปหมักกับเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักมันสำปะหลังหนัก 100 กรัม (น้ำหนักสด) สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเลี้ยงไรโซเบียมได้ทุกสายพันธุ์ ยกเว้น *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 อย่างไรก็ดีพบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลีเซอรอลซึ่งได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* F3109 ซึ่งเซลล์ยีสต์ที่ได้นี้ยังสามารถใช้ทดแทน Yeast extract ในสูตรอาหารได้อีกด้วย โดยสามารถเลี้ยง *B. japonicum* USDA110 ให้เจริญได้ถึง 3.61×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกวัสดุพาหะชนิดเหลวที่สนับสนุนให้หัวเชื้อไรโซเบียมมีอายุการเก็บรักษาได้นาน โดยทำการศึกษาวัสดุพาหะ 6 ชนิด เปรียบเทียบกับพีท (peat) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หัวเชื้อไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ในวัสดุพาหะที่เป็นพีทมีอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุด ในขณะที่อายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อไรโซเบียมชนิดเหลวจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไรโซเบียม และวัสดุพาหะที่ใช้ เมื่อทำการคลุกเมล็ดถั่วเหลืองกับหัวเชื้อไรโซเบียมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าพีทสามารถรักษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมให้มีชีวิตอยู่รอดบนเมล็ดได้มากที่สุด คือ 10^5 เซลล์ต่อเมล็ด และเมื่อใช้ arabic gum, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP) และแป้งมันสำปะหลัง เป็นวัสดุพาหะในหัวเชื้อไรโซเบียมชนิดเหลวพบว่ามีปริมาณเชื้อไรโซเบียมมีชีวิตเหลืออยู่ 10^4-10^5 เซลล์ต่อเมล็ด ในขณะที่ polyethyleneglycol (PEG) และ polyvinylalcohol (PVA) เป็นวัสดุพาหะที่สามารถรักษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมให้มีชีวิตอยู่รอดบนเมล็ดได้เพียง 10^3 เซลล์ต่อเมล็ด เมื่อทดสอบในสภาพไร่พบว่า หัวเชื้อไรโซเบียมชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด สามารถเข้าสร้างปม และให้ผลผลิตของถั่วเหลืองได้ดีเช่นเดียวกับการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมที่ใช้พีทเป็นวัสดุพาหะ

การใช้หัวเชื้อไรโซเบียมคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองก่อนการปลูกนั้นทำให้เชื้อไรโซเบียมสัมผัสกับเมล็ดโดยตรง โดยสารที่หลั่งออกมาจากถั่วบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมที่อยู่บนเมล็ดได้ ดังนั้นเมื่อนำถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทยจำนวน 5 สายพันธุ์มาทดสอบ พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วเหลือง และความสามารถของเชื้อไรโซเบียมที่จะทนต่อสารยับยั้ง รวมทั้งปริมาณของสารที่หลั่งออกมาด้วย โดย

พบว่าสารที่หลั่งออกจากถั่วเหลืองอย่างน้อย 10 เมล็ด จึงจะทำให้เห็นผลการยับยั้ง โดยสารที่หลั่งออกมาจากถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมได้มากที่สุด อีกทั้งยังพบว่าเซลล์ที่ไม่ได้ทำการล้าง exopolysaccharide (EPS) ออกไปนั้น มีความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งที่หลั่งออกมาจากเมล็ดได้ดีขึ้น แสดงให้เห็นว่า EPS ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อไรโซเบียมเอง สามารถป้องกันเซลล์จากสารยับยั้งที่หลั่งออกมาจากเมล็ดถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่า EPS สามารถป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ ดังนั้นเพื่อทำให้เชื้อไรโซเบียมสร้าง EPS เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล จึงได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน *rpoH2* ต่อการควบคุมการผลิต EPS ในเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาคือ *Sinorhizobium* sp. BL3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้สร้าง genomic DNA library ไว้แล้ว โดยคัดเลือกยีนส์นี้ด้วยวิธีการทำคอมพลีเมนเทชั่น (complementation) กับเชื้อ *Rhizobium* sp. TAL1145 *(rpoH2$^-$)* และเมื่อทำให้ยีนส์นี้ใน BL3 ไม่แสดงออกโดยการทำให้กลายพันธุ์ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ได้ ไม่แสดงความแตกต่างของการผลิต EPS การ symbiosis และการเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ BL3 เดิม แต่ RpoH2 ที่ได้จาก BL3 สามารถทดแทนการทำงานของ RpoH2 ในการควบคุมการสร้าง EPS และการ symbiosis ใน TAL1145 *(rpoH2$^-$)* ได้ นอกจากนี้เชื้อไรโซเบียมควรจะมีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติที่ไม่เหมาะสมอื่น ๆ อีก เช่น สภาวะดินที่เป็นกรดซึ่งพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นในการพัฒนาเชื้อไรโซเบียม จำเป็นที่จะต้องศึกษากลไกที่ทำให้สามารถทน หรือเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนี้ได้ ทั้งนี้พบว่า BL3 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถพัฒนาตัวเองให้ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้มากขึ้น เมื่อถูกเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำกว่าแล้วเพิ่มขึ้นเป็นลำดับขั้นไป (Adaptive acid Tolerance Response; ATR) ดังนั้นจึงใช้สายพันธุ์ BL3 เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยคัดเลือกคอสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับ ATR ซึ่งอาศัยหลักการการเพิ่มการแสดงออกของยีนส์ผ่านทางจำนวนคอสมิดที่เพิ่มขึ้น แล้วถ่ายทอดเข้าไปสู่ BL3 พบว่า BL3 มีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าเดิม จากนั้นตรวจสอบยืนยันโดยการทำให้กลายพันธุ์ ซึ่งในที่สุดพบว่ายีน *actX* ซึ่งสร้างโปรตีน histidine kinase sensor มีส่วนเกี่ยวข้องกับ ATR อีกทั้งพบว่าความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดของเชื้อ BL3 ที่กลายพันธุ์ (*actX$^-$*) จะลดลงกว่าเดิม ในขณะที่เชื้อซึ่งเพิ่มการแสดงออกของ *actX* สามารถสร้างปมกับถั่วผี (*Phaseolus lathyroides*) ได้มากขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา พรรณลดา ศิวพรมงคล

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

PANLADA TITTABUTR : DEVELOPMENT OF RHIZOBIAL LIQUID INOCULANT PRODUCTION. THESIS ADVISOR : PROF. NANTAKORN BOONKRED, Ph.D. 228 PP. ISBN 974-533-459-6

ACID TOLERANCE/CARRIER/INOCULANT/RHIZOBIA/SEED EXUDATES

To develop the formulation of rhizobial liquid inoculant, several components such as culture media, carriers, and rhizobia must be concerned. To reduce the cost of production, low-cost materials for culture medium production are important. By comparing several materials, it was found that cassava produced the highest amount of reducing sugar after fermentation with fungus (*Chlamydomucor* SUT1). All strains of rhizobia, except *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, could grow well in the medium containing sugar derived from 100 g (wet weight) steamed cassava per liter. The derived sugar was further used for glycerol production by using yeast (*Saccharomyces cerevisiae* F3109). After fermentation, the formulated culture containing glycerol and heat-killed yeast cells, which might support as yeast extract supplement could promote bradyrhizobial growth up to 3.61×10^9 c.f.u./ml. In liquid inoculant production, 6 different carriers were investigated for their protective function with various strains of rhizobia compared with peat-based inoculant. Peat could promote long-term survival of all rhizobial strains, while the shelf-life of liquid inoculant was depended on strains of rhizobia and carriers, when stored at room temperature. Moreover, rhizobial survival in carriers after applied to seed under 40°C was also conducted and found that peat could maintain the highest number of rhizobial cell on seed at 10^5 cells/seed after stored for 48 h. Whereas, liquid inoculant containing arabic gum, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP), cassava starch

could maintain at 10^4-10^5 cells/seed, and polyethyleneglycol (PEG) and polyvinylalcohol (PVA) could maintain only at 10^3 cells/seed. For nodulation test under field condition, it was found that all liquid inoculants showed equal performance as peat-based inoculant.

Since liquid inoculant must be contacted the seeds, it is important to determine whether the Thai soybean seed exudates affect growth of rhizobia. From five cultivars of soybean, CM2 showed the highest inhibition effect and the toxicity occurred only when exudates was derived from 10 seeds or more. The toxicity of exudates varied in soybean variety and the sensitivity of each rhizobial strain. However, there was no toxicity effect on the unremoved exopolysaccharide (EPS) cells. This indicated that the EPS naturally produced by rhizobia could protect itself from the toxicity of soybean seed exudates. The EPS has also known to protect cell from environmental stresses. Thus, it is interesting to increase EPS production in rhizobia by using molecular technique. *Sinorhizobium* sp. BL3 was used for this study since the genomic DNA library of BL3 has been constructed. To investigate the role of *rpoH2* in BL3 on EPS production, *rpoH2* gene of BL3 was isolated by complementation of *Rhizobium* sp. TAL1145 (*rpoH2*$^-$). Then *rpoH2* mutants of BL3 were generated by transposon mutagenesis. The *rpoH2* mutants of BL3 did not show significant difference on the EPS production, symbiosis, and the growth at high temperature when compared to wild-type. However, the clone containing *rpoH2* gene of BL3 could restore both EPS production and nodulation defects of TAL1145 *rpoH2* mutants. Besides EPS mechanism to protect toxic substances, inoculated rhizobia should also survive in acidic condition which is the most common found in Thai soil. To improve rhizobial strain, it is necessary to determine the mechanism of rhizobia in order to well

establish in soil acidity condition. Since BL3 showed the property of adaptive acid tolerance response (ATR), thus rendering used as a model for this study. The gene involved in ATR was identified on the basis of enhancing its expression through increasing its copy number in acid sensitive strain. It was found that *actX* gene encoded for a histidine kinase sensor protein is involved in ATR. This was also identified and confirmed by transposon mutagenesis. The *actX* mutant of BL3 performed the increment of acid sensitivity. Inoculation of *Phaseolus lathyroides* seedlings with the complemented mutant containing multiple copies of *actX* was able to enhance nodulation efficiency at low pH.

School of Biotechnology

Academic Year 2005

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____