บทคัดย่อ

แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมจัดเป็น PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) อีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถอยู่ร่วมอาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชตระกูลถั่ว โดยสามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เปลี่ยนเป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับถั่วได้ในที่สุด อย่างไร ก็ตามในสภาพการเพาะปลูกอาจต้องเผชิญกับสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น ดินกรด ดินเค็ม สภาพแล้ง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อความสามารถในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วได้ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งที่จะศึกษากลไกของแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ได้แก่ สภาพที่เป็นกรด และสภาพที่มีเกลือ ได้ทำการเลือกตัวแทนแบคทีเรียในจีนัส *Bradyrhizobium* มาศึกษากลไกการปรับตัวของเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ปรับตัวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เป็นกลางแล้วค่อย ๆ ถ่ายเชื้อสู่อาหารที่มีค่า pH ต่ำลงเรื่อย ๆ (pH 7, pH 5.5 และ pH 4.5 ตามลำดับ) จากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค 2D-gel และ proteomic

ผลการทดลองพบว่า มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 29 ชนิด สามารถจำแนกได้ 8 ประเภท และโปรตีน Hypothetical, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงและการจับเกาะ, และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัสถูกสร้างมากกว่าปกติในสภาวะที่เซลล์เจริญในอาหารที่มีค่า pH 4.5 ในขณะที่เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ค่อย ๆ ปรับค่า pH ไปเป็น 4.5 พบว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์ การแปลรหัส การสร้างพลังงาน การควบคุมหน้าที่ต่าง ๆ เมตาบอลิซึมของนิวคลีโอไทด์และนิวคลีโอไซด์ และ Hypothetical ถูกสร้างมากกว่าในสภาวะที่มีค่า pH ที่เป็นกลาง การศึกษาครั้งนี้ทำให้เห็นแนวโน้มที่จะพัฒนาหัวเชื้อโดยใช้เทคนิคดังกล่าวไปใช้ในสภาพจริงได้ ส่วนในสภาวะเครียดที่มีเกลือได้เลือกใช้แบคทีเรียจีนัส *Sinorhizobium* เป็นตัวแทน โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 M และ 0.5 M เป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการตอบสนองของโปรตีนที่เซลล์เมมเบรน โดยเทคนิค Nano flow liquid Chromatography ร่วมกับ mass spectrometry (LC-MS/MS) ผลการทดลองพบว่า สามารถจำแนกโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้ 105 ชนิด จำแนกได้ 17 ประเภท ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน และกลุ่มที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ การใช้เทคนิคดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดนี้ สามารถทำให้เข้าใจกลไกของแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างดี และมีศักยภาพในการที่จะพัฒนาให้เป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

Abstract

Rhizobia are one group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that can elicit the formation of nitrogen-fixing nodules on the legumes. Environmental conditions usually affect symbiosis between rhizobia and their host. The stress conditions as soil acidity, salinity, draught etc. may adversely affect the survival or growth of rhizobia and symbiosis. Therefore, this study focused on elucidation of rhizobial mechanisms in stress conditions as acidity and salinity. In case of mechanisms in acidity condition, Bradyrhizobia was selected as model. The bacterial cultivation approach was conducted in the manner of adaptive acid tolerance. The inoculum preparation was started at pH 6.8 and then subsequently inoculated into the medium at pH 5.5 and 4.5. The 2D-gel and proteomic analyses were used to investigate the protein regulation. The 29 identified proteins were grouped into 8 categories. Hypothetical protein, transport and binding proteins, and translation proteins were up-regulated at pH 4.5 (non-adaptive). While up-regulated proteins found during growth at pH 4.5 (adaptive) consisted of proteins in cellular processes, translation, energy metabolism, regulatory functions, interconversions and salvage of nucleosides and nucleotides, and hypothetical proteins. These results suggested that the use of adaptive response in acid condition could provide an improvement in the inoculant production. For salt stress tolerant mechanism, *Sinorhizabium* was selected. The cell cultivation in salt conditions were 0.4 M, 0.5M of NaCl for 1 and 6 h. The protein contents of membrane were analyzed by nanoflow liquid chromatography interfaced with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LS-MS/MS). A lot all 105 membrane proteins were identified. These proteins could be classified into 17 functional categories, the two biggest of which were energy production and conversion, and unknown proteins. These techniques would be useful for further comparative analysis of bacterial mechanisms against stress conditions in environment.