อนุกรมวิธานทางเคมีของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบางชนิด ซึ่งแยกจากบริเวณรากข้าว (Oryza sativa L.) ที่ปลูกในประเทศไทย

นางสาวอัญชัน ชุณหะหิรัญย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN 974-566-898-2

011557

1152950G5

Chemotaxonomy of some Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Rice (Oryza sativa L.) Grown in Thailand

Miss Anchan Choonhahirun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree in Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

ISBN 974-566-898-2

Thesis Title	Chemotaxonomy of some Nitrogen - Fixing Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Rice (*Oryza sativa* L.) Grown in Thailand
By	Miss Anchan Choonhahirun
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Manoo Veeraburus, Ph.D.)

Thesis Committee

Siriporn Sitthipraneed .....Chairman

(Assistant Professor Siriporn Sitthipraneed, Ph.D.)

Jariya Boonjawat .....Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Suganya Soontaros .....Member

(Suganya Soontaros, Ph.D.)

Nantakorn Boonkerd .....Member

(Nantakorn Boonkerd, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อนุกรมวิธานทางเคมีของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบางชนิด ซึ่งแยกจากบริเวณรากข้าว (Oryza sativa L.) ที่ปลูกในประเทศไทย

ชื่อนิสิต นางสาว อัญชัน ชุณหะหิรัญย์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2528

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

R15, R17 และ R25 เป็นสายเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนซึ่งแยกจากบริเวณรากข้าวที่ปลูกที่รังสิต และท่าพระ ในปี 2522-2524 การหาสกุลของแบคทีเรียเหล่านี้ทำโดยเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีกับสายเชื้อมาตรฐาน Klebsiella oxytoca 1301 จากประเทศญี่ปุ่น Azospirillum lipoferum FS A. lipoferum 34H Pseudomonas H8 และ P. KLH76 จากประเทศฟิลิปปินส์ องค์ประกอบของเบสใน ดี เอ็น เอ (DNA) ซึ่งหาโดยวิธีวัดอุณหภูมิหลอมตัว (melting-temperature, Tm) และความคล้ายคลึงกันในลำดับของเบสใน ดี เอ็น เอ (DNA sequence homology) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีรีแอชโชซิเอชัน (reassociation) แสดงให้เห็นว่าสามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบสกุลทั้งสามสายเชื้อนี้ ได้เป็น 2 กลุ่ม ที่แตกต่างกันคือ R15 และ R17 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Klebsiella (mol % G + C, 52-56 %) ส่วน R25 ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล Azospirillum (mol % G +C, 69-71 %) มากที่สุด สมบัติทางชีวเคมีอีกหลายประการประกอบกับสภาวะที่จำเพาะสำหรับการเจริญของเชื้อเหล่านี้ และความสามารถในการรีดิวซ์อะเซทิลีนภายใต้สภาวะจำเพาะสนับสนุนว่า R15 และ R17 เป็นแบคทีเรียในสกุล Klebsiella เนื่องจากสามารถผลิตอินโดล สามารถใช้มาโลเนตเป็นสารต้นตอคาร์บอน และให้ผลบวกในปฏิกิริยา Voges-Proskauer สำหรับ R25 ซึ่งต้องอาศัยไบโอทินในการเจริญ และให้โคโลนีสีชมพูบนจานอาหารวุ้นแข็ง แต่ให้โคโลนีสีเหลืองบนจานอาหารวุ้นอุดม รวมทั้งความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน ซึ่งเติมกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนแทนมาเลต R25 จัดเป็นสายเชื้อ Azospirillum ชนิด lipoferum โดยผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด นอกจากนี้พบว่ากลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญและการตรึงไนโตรเจนสำหรับเชื้อ K.R15 และ K.R17

ทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และเมื่อมีออกซิเจนจำกัด (microaerobic) ซึ่งตรงข้ามกับเชื้อ A.R25ซึ่งใช้มาเลตเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ดีที่สุดสำหรับการเจริญ และการตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (microaerobic) เท่านั้น

ลักษณะอื่น ๆ ของ K.R15 กับ K.R17 คือมีพลาสมิดอย่างน้อยหนึ่งอัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดของ A.R25 ทั้ง K.R15 และ K.R17 เป็นสายเชื้อที่สามารถทนต่อ เอส ดี เอส และเกลือได้และยังต้านยาแอมพิซิลิน คานามัยซิน สเตรปโตมัยซิน และซัลฟานิลาไมด์อีกด้วย ในขณะที่ A.R25 ต้านยาแอมพิซิลิน และซัลฟานิลาไมด์เท่านั้น ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า R15 กับ R17 และ R25 เป็นแบคทีเรียต่างสกุลกันแน่นอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Chemotaxonomy of Some Nitrogen-Fixing Dacteria Isolated from the Rhizosphere of Rice (Oryza sativa L.) Grown in Thailand.

Name Miss Anchan Choonhahirun

Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Department Biochemistry.

Academic Year 1985

ABSTRACT

R15, R17 and R25 are strains of N_2-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of rice grown at Rangsit adn Tapra during 1979-1981. To determine the genera of these bacteria, their biochemical properties were compared with standard reference strains Klebsiella oxytoca 1301 from Japan, Azospirillum lipoferum FS, A. lipoferum 34H, Pseudomonas H8 and P. KLH76 from the Philippines. The DNA base composition when determined by melting temperature (Tm) method and DNA sequence homology when analyzed by reassociation experiment indicated that the three unknown strains should be classified in two distinct groups; R15 and R17 were Klebsiella-liked (mol % G + C, 52-56 %) but R25 was most fitted in Azospirillum sp. (mol % G + C, 69-71 %). Several biochemical properties together with growth condition and acetylene reduction activity under specific conditions also supported that R15 and R17 were Klebsiella-liked strains because of their ability to produce indole, to utilize malonate as sole carbon source and positive test to Voges-Proskauer reaction. As for R25, which requires biotin for growth and forms pink-colony when grown on nutrient agar plate whereas it forms yellow-colony on rich agar plate, together with the ability to grown in NFb semisolid medium supplied

with 0.5 % glucose in place of malate, thus R25 is identified as A. lipoferum strain according to all results previously mentioned. In addition, glucose was the preferential carbon source for growth and N_2-fixation under either aerobic or microaerobic condition of both K. R15 and K. R17 in contrast to A. R25 that malate was preferred for growth and N_2-fixation under microaerobic condition only.

The other charcters of K. R15 and K. R17 were that they harbored at least one plasmid which were larger than the plasmid of A. R25. Both K.R15 and K.R17 were SDS and salt tolerant and also resisted to ampicillin, kanamycin, streptomycin and sulfanilamide while A. R25 resisted to ampicillin and sulfanilamide only. These results also indicated that R15/R17 and R25 belong to the distinct genus.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep sense of gratitude to Dr. Jariya Boonjawat for her encouragement, valuable suggestions, constructive criticism of the manuscript and support.

I am especially indebted to Dr. Siriporn Sitthipraneed, Dr. suganya Soontaros and Dr. Nantakorn Boonkerd for serving as thesis committee, helpful discussions and interpretationa about the work in this study.

I am also very grateful to Dr. Peerada Sirijintakarn for her constant help, understanding and for critical reading of the manuscript and I wish to thank Miss Jiraporn Limpananont for much aid in the initial stages of this study.

Appreciation is especially extended to Mr. Nopporn TIA and Miss Nittaya Wongnaratiwat for their excellence artwork and Miss Yingpit Yodyothi for the photographs. I also thank Miss Kittiwon Tawat for her constant help.

Lastly, I am very indebted to the Graduate School, Chulalongkorn University, the "Chulalongkorn University Alumni Association under the Royal Patronage of the King" for providing supporting fund, the Bio-chemistry Department and Dr. Pairor Thipayathasana, head of the unit cell of genetic engineering for providing of facilities for this thesis.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II MATERIALS AND METHODS	14
III RESULTS	
1. DNA base compositions	31
2. DNA sequence homology	37
3. Plasmid detection in N_2-fixing bacteria	50
4. Physiological characteristics of N_2-fixing bacterial strains	52
5. Antibiotic resistance	52
6. Growth pattern in nitrogen-free medium	54
7. Acetylene reduction activity	59
IV DISCUSSION	63
REFERENCES	72
APPENDIX	78
BIOGRAPHY	82

LIST OF TABLES

Table		page
1.	The original information of unknown bacterial culture.	3
2.	Information of reference strains.....	5
3.	Distinction between reference strains on the basis of phenotypic characters.....	12
4.	Melting points (Tm values) and statistical analysis of mole percentage G + C of bacterial DNA using the spectrophotometric technique.....	36
5.	The reassociation time (t_r) and the remelting temperature (T_r) of the hubrid - DNAs between R15 and standard reference strains (one of each genus).	46
6.	The reassociation time (t_r) and the remelting temperature (T_r) of the hybrid - DNAs between R17 and standard reference strains (one of each genus).	46
7.	The reassociation time (t_r) and the remelting temperature (T_r) of the hybrid - DNAs between R25 and standard reference strains.....	47
8.	The reassociation time (t_r) and the remelting temperature (T_r) of the hybrid - DNAs between standard reference strains.....	48
9.	The reassociation time (t_r) and the remelting temperature (T_r) of the hybrid - DNAs between unknown bacteria.....	48
10.	Physiological characteristics of unknown and reference bacterial strains.....	53
11.	Growth response of the unknown and reference strains to antibiotics.....	54

Table page

12. Specific acetylene reduction activity of unknown bacteria compared to standard reference strains in NF aerobic condition..... 61

13. Specific acetylene reduction activities of unknown bacteria compared to standard reference strains in microaerobic condition..... 62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure page

1. Thermal denaturation curves of DNA from calf thymus and E.Coli B..... 32
2. Thermal denaturation curves of DNA from R15, R17 and K. oxytoca 1301..... 33
3. Thermal denaturation curves of DNA from R25 and Azospirillum spp..... 34
4. Thermal denaturation curves of DNA from Pseudomonas spp 35
5. The remelting curves of hybrid - DNA with respect to self - hybridized R15 38
6. The remelting curves of hybrid - DNA with respect to self - hybridized R17 39
7. The remelting curves of hybrid - DNA with respect to the self - hybridized R25 40
8. The remelting curves of hybrid - DNA which formed between K. oxytoca 1301 and P. H8 or A. 34 H 41
9. The remelting curve of hybrid - DNA which formed between standard strains of Azospirillum spp. and Pseudomonas spp..... 42
10. The remelting curves of hybrid - DNA which formed between P. H8 and P.KLH 76..... 43
11. The remelting curves of hybrid - DNA which formed between unknown bacteria..... 44
12. The remelting curves of hybrid - DNA which formed between R 15 , R 17 and K. oxytoca 1301..... 45

figure page

13. Plasmid profiles of all N_2 - fixing bacteria on agarose gel electrophoresis..... 51

14. Growth curves of N_2 - fixing bacteria in aerobic NF medium..... 55

15. Growth curves of N_2 - fixing bacteria in stagnant culture containing 0.05 % agar..... 56

16. Growth curves of N_2 - fixing bacteria in NFb semisolid stagnant culture..... 57

17. Growth curves of N_2 - fixing bacteria in GYE semisolid stagnant culture..... 58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

A	Absorbance
ARA	Acetylene reduction activity
^{o}C	Degree celcius
d	Day
DNA	Deoxyribonucleic acid
%G + C	The percentage of guanine plus cytosine
h	Hour
K.U.	Klett unit
l	Litre
mg	Milligram (10^{-3} gram)
ml	Millilitre (10^{-3} Litre)
min	Minute
µl	Microlitre (10^{-6} Litre)
M	Molar
NaCl	Sodium chloride
nmol	Nanomole (10^{-9} mole)
OD	Optical density
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tm	Melting temperature
T_r	Remelting temperature
t_r	Reassociation time
V.P.	Voges-Proskauer reaction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย