5

การคัดเลือกสายพันธุ์และศึกษาคุณสมบัติ ของ Rhizobium phaseoli ที่ทนเค็ม

นางสาวพัชรี เจียรนัยกูร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-972-4

009211

I16645480

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF SALT-TOLERANT STRAINS OF *RHIZOBIUM PHASEOLI*

Miss Patcharee Jearanaikoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

ISBN 974-564-972-4

Thesis Title	Selection and Characterization of Salt-Tolerant of Rhizobium phaseoli
By	Miss Patcharee Jearanaikoon
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associative Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nantakorn Boonkerd, Ph.D.

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

S. Bunnag ..... Dean of Graduate School

(Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Jariya Boonjawat ..... Chairman

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Pairor Thipayathasana ..... Member

(Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.)

Nantakorn Boonkerd ..... Member

(Nuntakorn Boonkerd, Ph.D.)

Suganya Soontaros ..... Member

(Suganya Soontaros, Ph.D.)

Prakitsin Sihanonth ..... Member

(Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์และศึกษาคุณสมบัติของ Rhizobium phaseoli ที่ทนเค็ม
ชื่อนิสิต	นางสาวพัชรี เจียรนัยกูร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. นันทกร บุญเกิด
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2528

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Rhizobium phaseoli สายพันธุ์ TAL 113 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มไรโซเบียมประเภทเจริญเร็ว และเกิดปมในถั่วแดงหลวง ได้ทำการแยกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวในอาหารที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ โดยวิธี sibling selection แยกได้ 4 สายพันธุ์และให้ชื่อว่า P_1, P_5, P_{19} และP_{21} ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้ยังคงความสามารถในการสร้างปมที่ตรึงไนโตรเจนกับต้นถั่วแดงหลวงได้ดี สมบัติเด่นของสายพันธุ์ทั้ง 4 ที่ต่างจากไวด์ไทพ์ คือ เมื่อเพิ่มโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมิวแตนท์จะเจริญได้ ในขณะที่ไวด์ไทพ์เจริญไม่ได้ แต่การแบ่งตัวของมิวแตนท์ในอาหารที่มีเกลือนั้น จะทำให้ค่าการแบ่งตัวสองเท่าเพิ่มขึ้นจากเมื่อไม่มีเกลือ 4-6 เท่า นอกจากนี้ความขุ่นสูงสุดในขณะที่มีเกลือยังต่ำกว่าเมื่อไม่มีเกลือประมาณ 1.5 เท่าด้วย

จากการทดสอบลักษณะของแอนติเจนบนผิวเซลล์ของมิวแตนท์ด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์เอนติบอดี พบว่าแอนติเจนของมิวแตนท์และไวด์ไทพ์เหมือนกัน นอกจากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์ GC เบสที่พบในโครโมโซมอลดีเอนเอของไวด์ไทพ์และมิวแตนท์ต่างมีค่าเท่ากับ 61.2% ในขณะที่ปริมาณ GC เบสของ R. japonicum ซึ่งเป็นกลุ่มไรโซเบียมที่เติบโตช้า จะให้ค่าเท่ากับ 64.9% จากคุณสมบัติทั้ง 2 ประการ ช่วยสนับสนุนว่ามิวแตนท์ทนเค็มเหล่านี้เป็นสายพันธุ์อาจสืบทอดมาจากไวด์ไทพ์ และการที่ลักษณะการเจริญเปลี่ยนรูปแบบจากไรโซเบียมชนิดเจริญเร็วเป็นชนิดเจริญช้านั้น เป็นผลสืบเนื่องจากการทนเค็มของมิวแตนท์

ได้ทำการตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ โดยกล้องจุลทัศน์อิเลกตรอนแบบส่แกน พบว่า ลักษณะภายนอกของทั้งไวด์ไทพ์และมิวแตนท์ ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการตรวจโครงสร้างภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลกตรอนแบบทรานส์มิชชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเจริญ มิวแตนท์ในสภาพที่มีเกลืออยู่ด้วย จะพบว่า ผนังเซลล์จะขรุขระ และนิวคลีโอพลาสมมีลักษณะอัดแน่น นอกจากนี้เมื่อมีเกลืออยู่ด้วย อัตราการหายใจของเซลล์จะเพิ่มขึ้นจากเมื่อไม่มีเกลือสองเท่า และอัตราการเพิ่มการหายใจนี้ พบว่าสูงกว่าอัตราการหายใจที่พบในไวด์ไทพ์อยู่สองเท่าเช่นกัน ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ ATPase ทั้งในมิวแตนท์และไวด์ไทพ์ยังคงเท่าเดิมโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ขึ้นกับการเพิ่มหรือไม่เพิ่มเกลือในสารอาหาร

จากการศึกษาความสามารถในการขับโซเดียมอิออนออกนอกเซลล์ พบว่าในมิวแตนท์ซึ่งเจริญในที่ไม่มีเกลือและมีเกลือนั้น เซลล์จะสามารถขับโซเดียมได้ด้วยอัตราเร็ว 1.0 และ 1.7 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยสูงกว่าในไวด์ไทพ์ซึ่งมีอัตราเร็วเพียง 0.2 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และพบว่า FCCP (p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazone) สามารถยับยั้งการขับโซเดียมออกจากเซลล์ได้ ในขณะที่ DCCD (N,N´-dicyclohexylcarbodiimide) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase นั้นไม่มีผลยับยั้งต่อการขับโซเดียมอิออน

จากผลการทดลอง ทำให้สรุปได้ว่า การเพิ่มขีดความสามารถในการขับเคลื่อนโซเดียมออกนอกเซลล์ของมิวแตนท์ อาจเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้มิวแตนท์นี้สามารถทนต่อความเค็มได้ และพลังงานที่ใช้ในการขับเคลื่อนนี้มาจากกระบวนลูกโซ่การหายใจ ที่ถูกยับยั้งได้โดย FCCP.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title Selection and Characterization of Salt-Tolerant Strains of Rhizobium phaseoli

Name Miss Patcharee Jearanaikoon

Thesis Advisor Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.

Thesis Co-advisor Nantakorn Boonkerd, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic 1985

ABSTRACT

Rhizobium phaseoli TAL 113 is one of the fast-growing type of Rhizobium which can nodulate Phaseolus vulgaris. By an application of a sibling selection, 4 strains of 0.3 M NaCl tolerant-mutants were isolated and named as P_1, P_5, P_{19} and P_{21} respectively. It was found that all isolated mutants still possessed a nodulated property as seen in their effectiveness of symbiotic nitrogen fixation. Multiplication of cells in the medium supplemented with 0.3 M NaCl was observed only in mutants and the generation time was markedly increased about 4-6 times compared to that without salt. The maximal growth yield under salted-condition was also decreased about 1.5 times compared to that under unsalted condition. Every isolates of mutants possessed a similar surface antigen comparing to that of the WT as revealed in the testification of cell-surface antigen based on the fluorescent antibody technique. In addition, an identical value of % GC content, determined from the chromosomal DNA of mutant P_{19} and WT was equal to 61.2%, whereas R. japonicum, a slow-growing rhizobium, possessed a higher value of 64.9%. It was concluded that a deviation in growth character

from a fast to a slow-growing type, found in all mutants, was *in situ* property hindered as a nature of a salt-tolerant mutant of *Rhizobium*.

The cellular morphology of the mutants when visualized by SEM was similar to that of the WT. But visualization of the cellular morphology of the mutants by TEM revealed a rough inclusion in the cell envelope including a more dense and compact character at the chromosomal center of the periplasm, especially when sample used was cells cultivated under salted condition. In addition, under salted condition the rate of oxygen consumption was two folds increased whereas a maintained level of ATPase activity was observed in both mutants and WT regardless of the presence of salt in the cultivating medium.

Kinetic studies of rate of Na^+ efflux revealed that cultivation of cells in the presence of salt caused an increased value in the initial rate of Na^+ efflux in the mutant from 1.0 to 1.7 ηmol per min per mg protein, whereas the initial rate of Na^+ efflux in the WT was only 0.2 ηmol per min per mg protein. Studying of the effect of oxidative inhibitors was resulted in that, only FCCP(p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazone)not DCCD (N,N´-dicyclohexylcarbodiimide) could inhibit the flux of Na^+ out from the cells.

The result from this study suggested that a mechanism to tolerate high salt concentration of the strains isolated was the enhancement in the rate of Na^+ efflux driven by the respiratory energy which being inhibited by FCCP.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest sincere gratitude to my advisor, Dr. Pairor Thipayathasana, for her valuable advice, guidance, criticisms and encouragement throughout the course of my study.

My special appreciation is also expressed to my co-advisor, Dr. Nantakorn Boonkerd, for his kindness in supporting all facilities. Without his help, my study could not be accomplished.

Very deep thanks are expressed to the members of advisory committee, Dr. Jariya Boonjawat, Dr., Sugunya Soontaros and Dr. Prakitsin Sihanonth for their extensive counsel about the work in this study.

I am particularly grateful to all fellows in the Department of Biochemistry, Faculty of Science who courteously assisted and provided not only facilities but also materials.

Special thanks are given to Miss Amporn Eongprakornkeaw and Miss Siripen Vethchagarun at the Scientific and Technological Research Equipment Center for their assistances in electron microscope analysis.

I wish to express my infinite thanks to my parents and everyone in my family, including graduate students at Department of Biochemistry for their help, understanding and encouragement. Appreciation is especially extended to Mr. Niwat Kupviwat and Mr. Chotechana Vilailukana for their excellence in preparation of the photographs in this work.

Finally, I am very indepted to the "Chulalongkorn University Alumni Association under the Royal Patronage of the King" and the Graduate School, Chulalongkorn University for their funding supports.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT vi

ACKNOWLEDGEMENT viii

CONTENTS ix

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

ABBREVIATIONS xiv

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II MATERIALS AND METHODS 12

III RESULTS

1. Growth characteristics of R. phaseoli 26
2. Selection of salt-tolerant mutants 30
3. Symbiotic ability of the isolated mutants : A test of 30
4. Growth of salt-tolerant mutants 35
5. The studies of cellular morphology by SEM and TEM 39
6. Checking of the difference on cell surface antigen by fluorescent antibody technique 45
7. Measurement of the GC content 49
8. Bioenergetic properties of WT and its mutants. 49
9. Comparison of the rate of sodium efflux 57

Page

9.1 Effect of starvation and reconcilation of O_2 consumption 57

9.2 Measurement of sodium efflux 57

IV DISCUSSION 65

REFERENCES 74

APPENDIX 80

BIOGRAPHY 98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Parameter of growth from one month old planta which being inoculated by WT and its mutants	33
2	The final numberical values of plant samples after treated with statistics	34
3	Character of growth of WT and its mutants under salted and unsalted condition	38
4	Effect of high concentration of sodium ion on O_2 consumption and ATPase activity of WT and its mutants.	54
5	Statistical analysis of salinity effect of sodium ion on O_2 consumption of WT (TAL 113) and its mutants	55
6	Statistical analysis of salinity effect of sodium ion on ATPase activity of WT (TAL 113) and its mutants	56
7	Effect of an addition of FCCP and DCCD on the Na^+ efflux in WT and mutant P_{19}	64
8 a	Comparison of P_{19} properties to the WT's.....	66
8 b	Comparison of P_{19} properties to the WT's.....	67
8 c	Comparison of properties of P_{19} cells grown under with and without salt.....	69

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Relation of cell density with respected to incubation time	27
2	Relation of viable cell count with respected to incubation time	28
3	A correlation of cell density and viable cell count	29
4	Nodule formation of planta being inoculated with WT and its mutants	32
5	Colonial morphology of the isolated salt-tolerant mutants on YM. + 0.3 M NaCl plate.	36
6	Comparison of growth profiles between WT and its mutants	37
7	Scanning electron micrographs of R. phaseoli (WT) and its mutants grown in YM. and YM. + 0.3 M NaCl	40
8	Transmission electron micrograph of WT	41
9	Transmission electron micrographs of mutant P_5 grown under salted and unsalted condition.....	42
10	Transmission electron micrographs of mutant P_{19} grown under salted and unsalted condition.....	43
11	Transmission electron micrographs of mutant P_{21} grown under salted and unsalted condition.....	44
12	Fluorescent micrographs of R. phaseoli (WT)	46
13	Fluorescent micrographs of the salt-tolerance mutants.	47

Figure | Page

14 Fluorescent micrograph of R. japonicum 48

15 The DNA melting curve of calf thymus 50

16 The DNA melting curve of TAL 113..... 51

17 The DNA melting curve of mutant P_{19} 52

18 The DNA melting curve of R. japonicum 53

19 Starvation effect on O_2 consumption of TAL 113 59

20 Starvation effect on O_2 consumption of mutant P_{19} 60

21 The reconcilation of O_2 consumption 61

22 Measurement of sodium efflux in WT and mutant P_{19} 62

23 Effect of an addition of FCCP and DCCD on sodium efflux of WT and mutant P_{19} 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A.R.A.	Acetylene reduction activity
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase
C.V.	Coefficient of variation
cpm.	Count per minute
^{o}C	Degree celcius
d	Day
DCCD	N,N´-dicyclohexylcarbodiimide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FCCP	p-Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone
%G + C	The percentage of guanine and cytosine
g.	Gram
hr.	Hour
K.U.	Klett unit
l.	Litre
mg	Milligram (10^{-3} gram)
ml	Millilitre (10^{-3} litre)
min	Minute
µl	Microlitre (10^{-6} litre)
µmole	Micromole (10^{-6} mole)
M	Molar
NaCl	Sodium chloride
Na^{+}	Sodium ion

n mole	Nanomole (10^{-9} mole)
OD	Optical density
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolution per minute
SEM	Scanning electron microscope
TEM	Transmission electron microscope
Tm	Melting temperature
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
wt.	Weight
WT	Wild Type
YM	Yeast mannitol medium
YM + 0.3 M NaCl	Yeast mannitol medium supplemented with o.3 M NaCl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย