

การเปลี่ยนแปลงโปรตีนโพรไฟล์ของ *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii* S173, S174
และ *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, S162, S178 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง



นางสาวปวีณา เพิ่มพูนพัฒนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2815-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20917466

CHANGES IN PROTEIN PROFILES OF *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii*
S173, S174 AND *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, S162, S178
WHEN CULTURED AT HIGH TEMPERATURES



Miss Patima Permpoonpattana

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2815-8

ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา : การเปลี่ยนแปลงโปรตีนโพรไฟล์ของ *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii* S173, S174 และ *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, S162, S178 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง. (CHANGES IN PROTEIN PROFILES OF *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii* S173, S174 AND *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, S162, S178 WHEN CULTURED AT HIGH TEMPERATURES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช, 93 หน้า. ISBN 974-17-2815-8.

ผลการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR ที่ใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพรเมอร์ พบว่าแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเซลล์เร็ว 3 สายพันธุ์ (S172, S173 และ S174) และแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเซลล์ช้า 3 สายพันธุ์ (S76, S78 และ S162) เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ซ้ำกัน โดยสายพันธุ์ S162 เป็นสายพันธุ์เดียวกับ S178 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม การสร้างปมบนรากถั่วเหลือง 7 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ สจ 4, สจ 5, ชม 2, ชม 60, สข 1, สข 2, สข 3 และสำหรับแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเซลล์เร็ว เพิ่มวิธีการตรวจหาชนิดและจำนวนของแฟลกเจลลาโดยวิธีย้อมสีและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า สายพันธุ์ S172 เป็น *Burkholderia* sp. S172, และ สายพันธุ์ S173, S174 อาจเป็น *Sinorhizobium fredii* S173 และ *Sinorhizobium fredii* S174 ส่วนแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเซลล์ช้าคือ *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, และ S162 (S178) ผลการเลี้ยงถั่วเหลืองเจ็ดพันธุ์ โดยเติมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นลงใน Leonard jars ที่บรรจุสารอาหารซึ่งไม่มีธาตุไนโตรเจนสำหรับปลูกถั่วเหลืองที่พีเอช 5.0 หรือ 6.8 และใช้ Duncan's Multiple Range Test วิเคราะห์น้ำหนักลำต้นแห้ง พบว่าการที่ *B. japonicum* สายพันธุ์ S76, S78 อยู่ในปมรากถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 2, ชม 60, ทำให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักลำต้นสูงสุด (ค่าเฉลี่ย 2.17 กรัมต่อต้น) ส่วนสายพันธุ์ S162 (S178) ในปมรากถั่วเหลืองพันธุ์ สข 2 ทำให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักลำต้นถั่วเหลือง มีค่าสูงสุด (ค่าเฉลี่ย 2.24 กรัมต่อต้น) นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า *Burkholderia* sp. S172 ไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลืองทุกพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง แต่สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้นถั่วเหลืองทุกพันธุ์ในระดับใกล้เคียงกับ positive control เมื่อเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนที่พีเอช 5.0 และ 6.8 (ค่าเฉลี่ย 1.51 กรัมต่อต้น) โดยให้น้ำหนักแห้งถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 สูงสุด (ค่าเฉลี่ย 1.79 กรัมต่อต้น) รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่จำแนกชนิด *Burkholderia* sp. จากบริเวณรอบปมถั่วเหลือง ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของถั่วเหลือง ส่วน *S. fredii* S173 และ S174 ไม่สร้างปมในรากถั่วเหลืองพันธุ์ สข 1, สข 2 และ ชม 2, สข 1, สข 3 ตามลำดับ และทำให้น้ำหนักแห้งลำต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ 4 และ สจ 5 มีค่าสูงเมื่อเลี้ยงถั่วเหลืองในสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนที่พีเอช 5.0 หรือ 6.8 (ค่าเฉลี่ย 2.07 กรัมต่อต้น) ผลการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร yeast extract mannitol broth ที่ 30°C, 35°C, 40°C และ 45°C พบว่า *Burkholderia* sp. S172, *S. fredii* S173 และ S174 เป็นแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง (30°C- 45°C) ในขณะที่ *B. japonicum* S76, S78, S162 (S178) ทนร้อน ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโปรตีนโพรไฟล์ในแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมีการตอบสนองทางด้านชนิดและปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง กล่าวคือ *Burkholderia* sp. S172 มีโพลีเปปไทด์ขนาด 40 kDa เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C, 45°C *B. japonicum* S162 (S178) มีโพลีเปปไทด์ขนาด 43 kDa เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง และ *S. fredii* S173, *S. fredii* S174, *B. japonicum* S162 (S178) มีโพลีเปปไทด์ขนาด 55, 38 และ 25 kDa เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง ไม่พบการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับฮีทช็อกโปรตีน Clp (100 kDa), DnaK (70 kDa), GroEL (60 kDa) และ GroES (10 kDa) ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ไม่พบแถบโปรตีนใดมีปริมาณลดลงและไม่พบแถบโปรตีนใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเหล่านี้ที่อุณหภูมิสูง

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ปรึกษา.....กาญจนา ชาญสง่าเวช.....

4472316723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : PROTEIN PROFILES AT HIGH TEMPERATURES, *Burkholderia* sp., *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum*

PATIMA PERMPOONPATTANA : CHANGES IN PROTEIN PROFILES OF *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii* S173, S174 AND *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78, S162, S178 WHEN CULTURED AT HIGH TEMPERATURES. THESIS ADVISOR : Associate Professor Kanjana Chansangavej, Ph.D., 93 pp. ISBN 974-17-2815-8.

Comparisons of RAPD-PCR DNA fingerprints when either RPO1 or CRL-7 was used as the primer revealed that three fast-growing isolates (S172, S173, and S174) and three slow-growing isolates (S76, S78, and S162) were distinct strains. Isolates S162 and S178 were found to be the same strain. Identification of the bacterial strains by Gram staining, ability to nodulate 7 soybean cultivars (SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST 1, ST 2, ST3) and for the fast-growing bacteria, by additional negative staining and observation for flagella under the electron microscope and comparisons of 16S rDNA sequences with corresponding sequences deposited at GenBank showed strain S172 was *Burkholderia* sp. S172, and strains S173, S174 were tentatively identified as *Sinorhizobium fredii* S173 and *Sinorhizobium fredii* S174. The slow-growing strains S76, S78 and S162 (S178) were identified as *Bradyrhizobium japonicum* S76, S 78 and S162 (S178). Duncan's Multiple Range Test showed inoculation of each of the above-mentioned strains onto germinating seeds of the seven soybean cultivars grown in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 or 6.8 resulted in high nitrogen-fixing potential of strains S76 and S78 when nodulated soybean cultivars CM 2, CM 60 (average plant dry weight 2.17 g.plant⁻¹). Similarly, strains S162, and S178 showed high nitrogen-fixing potential when nodulated soybean cultivars ST 2 (average plant dry weight 2.24 g.plant⁻¹). *Burkholderia* sp. S172 was not found to nodulate the seven soybean cultivars used in the experiments but was found to yield comparable soybean dry weight with that of the positive control in Leonard jars when pH of the nitrogen-free medium was either 5.0 or 6.8 (average plant dry weight 1.51 g.plant⁻¹) *Burkholderia* sp. S172 was found to promote the most growth in soybean cv. CM 60. This is the first report on the identification of *Burkholderia* sp. from soybean rhizosphere which promoted soybean growth. *Sinorhizobium fredii* S173, S174 were not found to nodulate soybean cultivars ST 1, ST 2 and CM 2, ST 1, ST 3 respectively. The two bacterial strains were found to yield high plant dry weight for soybean cultivars SJ 4 and SJ 5 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 or pH 6.8. (average plant dry weight 2.07 g.plant⁻¹) Growth of the seven bacterial strains in yeast extract mannitol broth at 30°C, 35°C, 40°C and 45°C showed *Burkholderia* sp. S172, *Sinorhizobium fredii* S173, S174 grew equally well over a broad temperature range (30°C-45°C) while *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78 and S162 and S178 were thermotolerant. Analysis of changes in protein profiles showed different responses in term of quantity of proteins when the seven bacterial strains were cultured at high temperatures. More 40 kDa polypeptide was found in *Burkholderia* sp. S172 when cultured at 40°C and 45°C. More 43 kDa polypeptide was found in *B. japonicum* S162(S178) when cultured at high temperatures. *S. fredii* S173, *S. fredii* S174, and *B. japonicum* S162(S178) were found with more 55, 38, and 25 kDa polypeptides when cultured at high temperatures. No increase was observed for polypeptides with similar molecular weight as those of the heat shock proteins Clp (100 kDa), DnaK (70 kDa), GroEL (60 kDa) and GroES (10 kDa). Neither new protein bands nor decrease in protein quantity was observed in protein profiles of the seven bacterial strains cultured at high temperatures.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2002

Student's signature... P. Permpoonpattana
Advisor's signature... K. Chansangavej

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express sincere thanks and gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Kanjana Chansa-ngavej, for her tireless efforts as well as valuable advice and comments throughout the course of this study.

I would also like to thank Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat for serving as the thesis committee chairperson and Professor Dr. Nantakorn Boonkerd, Associate Professor Dr. Lerluck Chitradon for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

Special thanks are given to fellow student members in laboratory 404, all friends, and all officers in the Department of Microbiology, especially, Mr.Veerarak Jungfungprinya for their help and friendship during my study.

This research was partially funded by a grant from the Graduate School, Chulalongkorn University which is gratefully acknowledged.

Last but not least, I would like to express my deepest appreciation and gratefulness to my parents, my sisters, and my brother for their warmest love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร Patima Permpoonpattana
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
Abstract (in Thai).....	iv
Abstract (in English).....	v
Acknowledgement.....	vi
Content of Figures.....	viii
Content of Tables.....	x
Chapters	
1. Introduction.....	1
2. Literature Survey.....	3
3. Materials and Methods	
3.1 Source of isolates.....	21
3.2 Strain identification	
3.2.1 Gram staining.....	21
3.2.2 RAPD-PCR fingerprinting.....	21
3.2.3 16S rDNA sequencing.....	22
3.2.4 Electron microscopy and negative staining of flagella.....	24
3.2.5 Nodulation responses : determination of plant dry weight and nodule dry weight.....	24
3.3 Determination of changes in protein profiles.....	25
4. Results.....	26
5. Discussion.....	45
6. Conclusion.....	49
References.....	51
Appendix A : Bacterial Growth Media and Plant Nutrient Solutions.....	56
Appendix B : Chemicals and Solutions.....	58
Appendix C : Raw Data.....	60
Biography.....	93

Content of Figures

		Page
Figure 1.1	Map of Thailand showing areas of soybean cultivation.....	2
Figure 2.1	Nucleotide sequence of the REP and ERIC primers.....	8
Figure 2.2	PCR amplification of genomic DNA from different soil bacteria.....	10
Figure 2.3	DGGE patterns of 16S rDNA fragments of <i>Burkholderia</i> spp.....	12
Figure 2.4	The reaction cycle of the <i>E. coli</i> . Chaperonins GroEL and GroES in protein folding.....	14
Figure 2.5	(A) Partial genetic map of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 showing 5 <i>groESL</i> operons (B) Enlarged region of symbiotic gene cluster.....	15
Figure 2.6	Promoter elements in all five <i>groESL</i> operons of <i>B. japonicum</i>	16
Figure 2.7	Diagram showing ROSE-dependent heat shock operons coding for small heat shock proteins in <i>B. japonicum</i>	18
Figure 2.8	(A) Predicted mRNA structure of ROSE ₁ from <i>B. japonicum</i> (B) Sequences of ROSE ₁ to ROSE ₅	19
Figure 2.9	Schematic representation of the translational ROSE ₁ - <i>hspA-lacZ</i> fusion for site-directed point mutations in ROSE.....	20
Figure 2.10	Model for temperature-responsive regulation by ROSE.....	20
Figure 4.1	Gram stain reaction of isolates S172, S173, S174, S76, S78, S162 and S178.....	26
Figure 4.2	RAPD-PCR fingerprints of isolates S171-S175 using either RPO1 or CRL-7 as primer.....	27
Figure 4.3	RAPD-PCR fingerprints of isolates S76, S78, S162, S178 using either (a) RPO1 or (b) CRL-7 as primer.....	27
Figure 4.4	Types of flagella of strains (a) S172 (b) S173 (c) S174 as revealed by negative staining.....	28

Figure 4.5	Dry weight of soybean <i>Glycine max</i> CV SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST1, ST2, and ST3 after inoculation with <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76, S78, S162 and S178 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	30
Figure 4.6	Nodule dry weight of soybean <i>Glycine max</i> CV SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST 1, ST 2, and ST 3 after inoculation with <i>Bradyrhizobium. japonicum</i> S76, S78, S162 and S178 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	31
Figure 4.7	Amplified PCR products of 16S rDNA of strains S172, S173, and S174.....	32
Figure 4.8	Partial sequence of 16S rDNA of strain S172.....	33
Figure 4.9	Partial sequence of 16S rDNA of strain S173.....	33
Figure 4.10	Partial sequence of 16S rDNA of strain S174.....	33
Figure 4.11	Diagram showing partial sequences used in the NCBI BLAST program alignments of 16S rDNA sequence of strain S172 with 16S rDNA sequence of <i>Burkholderia graminis</i>	34
Figure 4.12	Nodule dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars SJ4, SJ5, CM2, CM60, ST1,ST2, and ST3 after inoculation with <i>Sinorhizobium fredii</i> S173 and S174.....	37
Figure 4.13	Dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars SJ4, SJ5, CM2, CM60, ST1, and ST3 after inoculation with <i>Burkholderia</i> sp. S172 , <i>Sinorhizobium fredii</i> S173 , S174 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH6.8 or pH5.0 for 28 days.....	38
Figure 4.14	Effects of temperature on growth of <i>Burkholderia</i> sp. S172, <i>Sinorhizobium fredii</i> S173, S174 and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76, S78, S162 and S178.....	41
Figure 4.15	Changes in protein profiles of <i>Burkholderia</i> sp.S172, <i>Sinorhizobium fredii</i> S173, S174, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76,S78, S162 and S178 when cultured at high temperatures.....	43

Content of Tables

		Page
Table 2.1	Comparisons among <i>Bradyrhizobium</i> spp. <i>Rhizobium</i> spp. and <i>Sinorhizobium</i> spp.....	4
Table 2.2	Taxonomic classification of the rhizobia.....	5
Table 2.3	Host-microbe specificity in nitrogen fixation.....	5
Table 2.4	Types of flagellation in <i>Burkholderia</i> spp., <i>Sinorhizobium fredii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	7
Table 2.5	Sequences of primers used for PCR amplification nodbox1, nodbox3, mucRf, mucRr.....	10
Table 4.1	Duncan's Multiple Range Test for plant dry weight when each of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78, S162, S178 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST 1, ST 2, ST 3 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	29
Table 4.2	Percentages of 16S rDNA sequences homology	34
Table 4.3	Duncan's Multiple Range Test for plant dry weight when each of <i>Burkholderia</i> sp. S172, <i>Sinorhizobium fredii</i> S173, S174 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST 1, ST 2, ST 3 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	39
Table 4.4	Duncan Multiple Range Test for plant dry weight obtained when <i>Burkholderia</i> sp. S172, <i>Sinorhizobium fredii</i> S173, S174 was inoculated onto germinating seeds of <i>Glycine max</i> CV SJ4 SJ 4, SJ 5, CM 2, CM 60, ST 1, ST 2, ST 3 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 for 28 days.....	39
Table 4.6	Specific growth rates of <i>Burkholderia</i> sp. S172, <i>Sinorhizobium fredii</i> S173, S174, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76, S78, S162 and S178.....	40