

**ผลของไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย
Synechococcus PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *Aphanothece halophytica*
ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ**

**บงกช บุญบุรพงค์¹ อารมณ์ บัวหลวง¹ อรัญ อินเจริญศักดิ์¹ ยุวธิดา นิลผาย² ปนัดดา พ่วงขวัญ²
อภิญญาณ บุญประกอบกุล¹ และสุรศักดิ์ ละลอกหน้า^{2,3*}**

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110

³หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110

*E-mail: Lsurasak2005@yahoo.com

รับบทความ: 8 มกราคม 2554 ยอมรับตีพิมพ์: 9 มีนาคม 2554

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *Aphanothece halophytica* ในอาหารเลี้ยง BG₁₁ ภายใต้ภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0 – 3 โมลาร์ พบว่า อัตราการเจริญที่เหมาะสมภายใต้ภาวะที่มีความเค็มของเกลือ NaCl ต่อไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* คือ 0, 0.2 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ที่ทำให้อัตราการเจริญลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะที่เหมาะสม (ภาวะปกติ) ของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* คือ 0.1, 0.5 และ 2.0 โมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl พบว่า ไกลซีน โพรลีน และ กลูตาเมต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechocystis* PCC 6803 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl รวมถึงภาวะปกติของ *A. halophytica* ในขณะที่ ไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ความเข้มข้นเดียวกันทำให้อัตราการเจริญของ *A. halophytica* สูงขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl และกลูตาเมตเป็นกรดอะมิโนที่ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด โดยมีโพรลีนและไกลซีน รองลงมาตามลำดับ ดังนั้น กลูตาเมต โพรลีน และไกลซีน แสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ที่มีความจำเพาะต่อไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

คำสำคัญ: ไกลซีน โพรลีน กลูตาเมต ไซยาโนแบคทีเรีย ความเครียดจากเกลือ

Effect of Glycine, Proline and Glutamate on Growth of Cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 and *Aphanothece halophytica* under Normal and Salt Stress Conditions

Bongkoj Boonburapong¹, Aporn Bualuang¹, Aran Incharoensakdi¹, Yuwathida Nilapai², Panadda Puangkwan², Arpinyan Boonprakobku¹ and Surasak Laloknam^{2,3*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110

³Research Unit on Science Technology and Environment for Learning, Faculty of Science,

Srinakharinwirot University, Bangkok 10110

*E-mail: Lsurasak2005@yahoo.com

Abstract

The growth of cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 and *Aphanothece halophytica* was stimulated by increasing salinity ranging from 0 – 3 M NaCl in BG₁₁ medium. The optimal growth rate of *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 and *A. halophytica* under salinity was 0, 0.2 and 0.5 M NaCl, respectively. The salt stress condition that half of optimal growth rate of *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 and *A. halophytica* was 0.1, 0.5 and 2.0 M NaCl, respectively. The three amino acids, glycine, proline or glutamate were supplemented in BG₁₁ medium under normal and salt stress conditions. Growth rates of *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 and *A. halophytica* were determined. Additions of 1 mM of glycine, proline or glutamate had no effect on growth rate of *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 at both normal and salt stress conditions as well as normal condition of *A. halophytica*. However, at the equal level of amino acid could improve growth rate of *A. halophytica* at salt stress condition. Glutamate was the best amino acid to support growth of *A. halophytica* and follow by proline and glycine, respectively. Therefore, glutamate, proline and glycine can act as osmoprotectant and has high specificity on growth rate of halotolerant cyanobacterium *A. halophytica*.

Keywords: Glycine, Proline, Glutamate, Cyanobacteria, Salt stress

บทนำ

ความเค็มเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต ทำให้การเจริญของสิ่งมีชีวิตลดลง เพราะความเป็นพิษของโซเดียมไอออน (Na⁺) ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำและโพแทสเซียมไอออน (K⁺) ภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว รวมถึงทำให้เอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ทำงานผิดปกติ ทั้งนี้สิ่งมีชีวิตมีกลไกการควบคุมการเข้าและออกของ Na⁺ และรักษาความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในภาวะสมดุล โดยการขับ Na⁺ ออกนอกเซลล์ และรักษาสมดุลโปรตอน (H⁺) ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยโปรตีนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โซเดียม-

เอทีพีเอส (Na⁺ - ATPase) ปั๊มโซเดียมโพแทสเซียม (Na⁺/K⁺ pump) และโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์ (Na⁺/H⁺ antiporter) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการรักษาสมดุลของไอออนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตทั้งยูแคริโอตและโพรแคริโอต (Padan and Schuldiner, 1996; Kapper et al., 1996; Waditee et al., 2001; Waditee et al., 2002)

นอกจากโซเดียม-เอทีพีเอส ปั๊มโซเดียมโพแทสเซียม และโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์แล้ว เซลล์ยังมีกลไกรักษาสมดุลของเซลล์แบบอื่น ๆ เช่น การสะสมสารคอมแพทิเบิลโซลูท (compatible solute) หรือสารออสโมโพรเทคแทนต์

(osmoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ช่วยรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้คงที่ สารกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มน้ำตาล อนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น เทรฮาโลส (trehalose) กลุ่มของกรดอะมิโน และอนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น เอกโตอิน (ectoine) โพรลีน (proline) โคลีน (choline) และไกลซีน-บีเทน (glycine betaine) เป็นต้น (Mackey et al., 1984; Bohnert and Jenzen, 1996 ; Zhu et al., 1997; Laloknam et al., 2006)

การสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสิ่งมีชีวิตทำได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์สารชนิดนั้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิและความเค็ม สารที่สะสมนั้นอาจจะเป็นกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น การสะสมไกลซีนบีเทน ในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl โดยเปลี่ยนไกลซีนเป็นซาร์โคซีน (sarcosine) ไดเมทิลไกลซีน (dimethyl glycine) และไกลซีนบีเทน ตามลำดับ โดยอาศัยเอนไซม์ Glycine sarcosine methyl transferase (GSMT) และ Dimethyl transferase (DMT) (Waditee et al., 2005)

นอกจากการสังเคราะห์สารออสโมโพรเทคแทนต์แล้วยังมีอีกหนึ่งกลไก คือ การนำเข้าสารออสโมโพรเทคแทนต์โดยอาศัยกลไกการทำงานของโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เช่น ใน *Escherichia coli* จะมีระบบการขนส่งสารออสโมโพรเทคแทนต์หลายระบบ เช่น ProP ProU และ BetT มีการแสดงกลไกการทำงานแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะในการขนส่งสารแต่ละชนิด เช่น ProU มีความจำเพาะต่อชนิดของสารน้อยสามารถขนส่งสารได้หลายชนิด เช่น โพรลีน ไกลซีนบีเทน และไดเมทิลโพรลีน (dimethyl proline) BetT มีความจำเพาะต่อชนิดของสารสูงมากขนส่งเฉพาะไกลซีนบีเทน และ OpuB ของ *Bacillus subtilis* นำเข้าเฉพาะโคลีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Kempf and Bremer, 1998)

กรดอะมิโนเป็นสารชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งที่แสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโพรแคริโอตและยูแคริโอต สารออสโมโพรเทคแทนต์ใช้ในการรักษาสมดุลของเซลล์ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ *B. subtilis* มีการสะสมโพรลีน (proline) และ กลูตาเมต (glutamate) (Kempf and Bremer, 1998) ส่วนไกลซีนนั้นยังไม่มียางานว่าเป็นสารออสโม-

โพรเทคแทนต์ แต่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนในไซยาโนแบคทีเรีย (Waditee et al., 2005)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของกรดอะมิโน ไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง เจริญเติบโตเร็ว ดังนั้นจึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปเป็นต้นแบบการศึกษาในพืชชั้นสูงต่อไป ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้มี 2 ประเภทเพื่อเปรียบเทียบกลไกการใช้กรดอะมิโนในการเจริญของสิ่งมีชีวิตภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยประเภทแรกเป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด (fresh water cyanobacteria) ได้แก่ *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechocystis* PCC 6803 กลุ่มที่สองเป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม (marine cyanobacteria) ได้แก่ *A. halophytica* โดยไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาังไม่มีรายงานการใช้กรดอะมิโนเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ โดยปกติไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืดสะสมสารพวกน้ำตาลภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ และ *A. halophytica* สะสมไกลซีนบีเทนด้วยการสังเคราะห์และการนำเข้าโดยอาศัยโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ บีเทนทรานสปอร์เตอร์ (betaine transporter) (Waditee et al., 2005; Laloknam et al., 2006) ดังนั้นการศึกษานี้เป็นศึกษาผลของความเค็มของเกลือ NaCl ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechocystis* PCC 6803 และไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม *A. halophytica* และผลของกรดอะมิโน ไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทดสอบผลของเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

นำไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ ที่มีการแปรผันเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ภาวะที่มีแสงสีขาว และเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Jenway 6405 ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เพื่อหาภาวะปกติคือภาวะที่ทำให้การเจริญ

ของไซยาโนแบคทีเรียที่ดีที่สุด และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl คือ ภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะปกติ

ทดสอบผลของกรดอะมิโน ไกลซีน กลูตาเมต และโพรสลิน ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

นำ *Synechococcus* PCC 7942 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ ภาวะปกติ (ไม่มีเกลือ NaCl) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl (NaCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) ที่เติมและไม่เติมกรดอะมิโนไกลซีน (บริษัท Sigma) กลูตาเมต หรือโพรสลิน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ภาวะที่มีแสงสีขาว และเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Jenway 6405 ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และศึกษาเช่นเดียวกันใน *Synechocytis* PCC 6803 และ *A. halophytica* แต่เปลี่ยนภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl โดย *Synechocytis* PCC 6803 ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ และ *A. halophytica* ใช้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 โมลาร์ ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

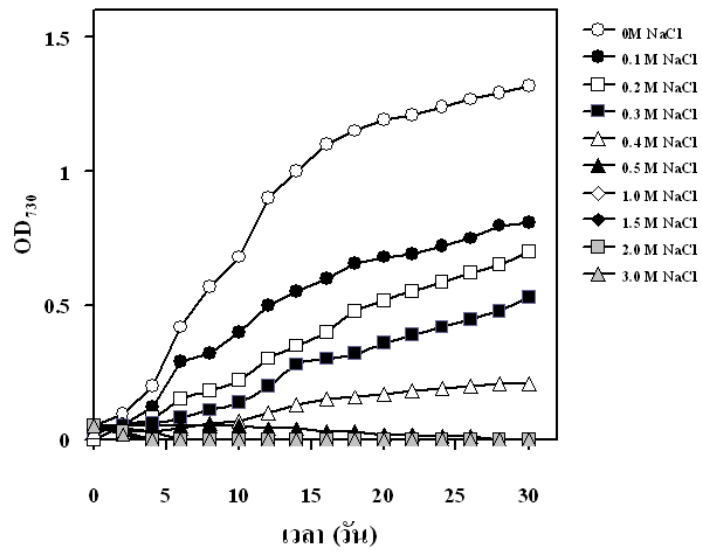
ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocytis* PCC 6803 และ *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ โดยแปรผันเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 3 โมลาร์ และติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid log phase) ประมาณ 10 วัน และ *Synechococcus* PCC 7942 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีเกลือ NaCl และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้คือภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น การเจริญของ *Synechococcus* PCC 7942 จะลดลง และเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 โมลาร์ขึ้นไป ไซยาโน-

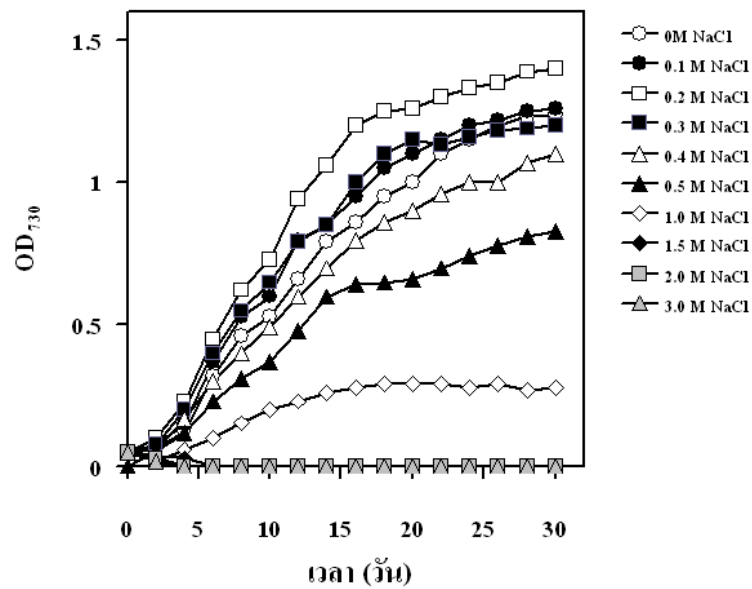
แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 1) การที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942 ไม่สามารถเจริญได้เมื่อในอาหารเลี้ยงมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เนื่องจาก *Synechococcus* PCC 7942 เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืดและความเข้มข้นของเกลือ NaCl ในระดับน้ำทะเลมีค่ามากกว่า 0.45 โมลาร์

Synechocytis PCC 6803 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้คือภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมี NaCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และเมื่อ NaCl ความเข้มข้นสูงขึ้น การเจริญของ *Synechocytis* PCC 6803 จะลดลง และเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 1.5 โมลาร์ขึ้นไป ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 2) ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocytis* PCC 6803 ปกติพบในน้ำจืดแต่สามารถเจริญได้เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 0.45 โมลาร์ ซึ่งเป็นระดับน้ำทะเลได้ อาจเนื่องมาจาก *Synechocytis* PCC 6803 สร้างสารบางอย่างขึ้นมา เช่น กลูโคซิลกลีเซอรอล (glucosyl glycerol) (Hagemann et al., 1997) ทำให้ทนความเค็มระดับมากกว่าน้ำทะเลได้ แสดงว่า เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม แต่ไม่สามารถทนความเค็มตั้งแต่ 1.5 โมลาร์ได้ เนื่องจากเซลล์อาจขาดกลไกที่สำคัญในการทนเค็มชนิดอื่นๆ เช่น ออสโมโพรเทคแทนต์ทรานสปอร์ตเตอร์ ได้แก่ บีเทนทรานสปอร์ตเตอร์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* (Laloknam et al., 2006)

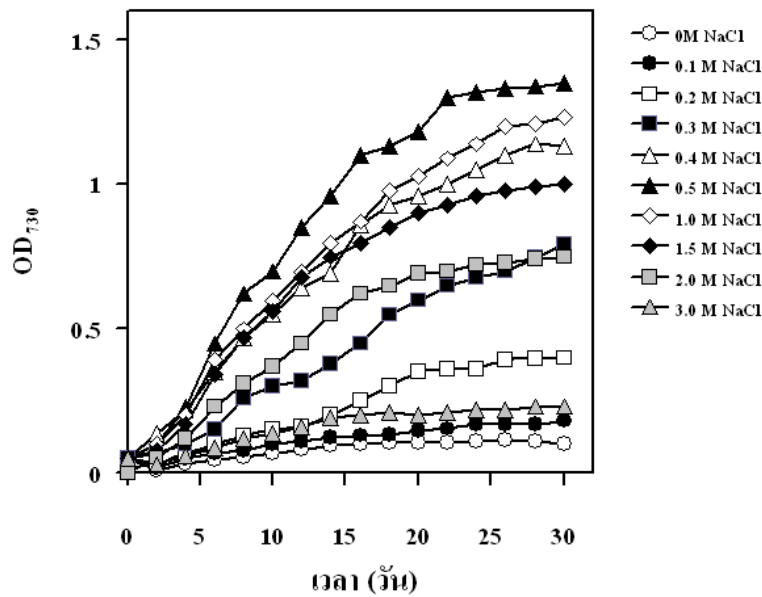
A. halophytica เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียชนิด *A. halophytica* คือ ภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมี NaCl ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ และเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น การเจริญของ *A. halophytica* จะลดลง และไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (ภาพที่ 3) การที่ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ทนเค็มได้ 3.0 โมลาร์ เนื่องจากเป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม และมีกลไกที่ส่งเสริมการทนเค็มอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ การสังเคราะห์สารไกลซีน บีเทน การนำเข้าสารไกลซีนบีเทนโดยใช้ ไกลซีนบีเทนทรานสปอร์ตเตอร์ และการแลกเปลี่ยนของโซเดียมไอออนและโปรตอนโดยใช้โซเดียมโปรตอน แอนติพอร์ตเตอร์ (Waditee et al., 2001; Waditee et al., 2002; Waditee et al., 2005; Laloknam et al., 2006)



ภาพที่ 1 ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942



ภาพที่ 2 ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC 6803



ภาพที่ 3 ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

จากภาพที่ 1-3 สามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl และภาวะที่

ทำให้ไม่สามารถเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ดังตาราง 1

ตาราง 1 ภาวะต่างๆ ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl* (โมลาร์)		
	ภาวะที่เหมาะสม	ภาวะที่มีความเครียด	ความสามารถในการทนเค็ม
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	0	0.1	0.4
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	0.2	0.5	< 1.5
<i>A. halophytica</i>	0.5	2.0	3.0

*ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ใช้อยู่ในช่วง 0 – 3 โมลาร์

ผลของกรดอะมิโนไกลซีน กลูตาเมต และโพรลีน ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803 และ *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG₁₁ ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ที่มีการเติมหรือไม่เติมกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน กลูตาเมต และโพรลีน ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน (ภาพที่ 4 – 6)

ภาพที่ 4 และ 5 แสดงการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechococcus* PCC 6803 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ที่เติมและไม่เติมกรดอะมิโนไกลซีน กลูตาเมต และโพรลีน พบว่า กรดอะมิโนทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบทั้งสองภาวะไม่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยอาหารที่มีการเติมกลูตาเมตแสดงผลไม่แตกต่างจากเมื่อไม่เติมกลูตาเมต (ภาพที่ 4A และ 5A) ในขณะที่ไกลซีนและโพรลีนที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มที่จะทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทั้งสองภาวะลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมไกลซีนหรือ

โพรลีน (ภาพที่ 4B, 4C, 5B และ 5C) มีรายงานว่าการดอะมิโน ไกลซีนมีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืดและ ไกลซีนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ไม่สามารถทำให้ไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืดเจริญได้ (Eisenhut et al., 2007)

ภาพที่ 6 แสดงการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ที่เติมและไม่เติมกรดอะมิโนไกลซีน กลูตาเมต และโพรลีน พบว่า กรดอะมิโนทุกชนิดที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติไม่ส่งผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ แต่การเติมกรดอะมิโนทุกชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่มีความเครียดจากเกลือที่ไม่เติมกรดอะมิโน โดยกลูตาเมต ส่งเสริมการเจริญได้สูงสุดใกล้เคียงกับภาวะปกติ (ภาพที่ 6A) โดยมีโพรลีนและไกลซีน ส่งเสริมการเจริญได้รองลงมา ตามลำดับ (ภาพที่ 6B และ 6C) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด มีสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ เพราะสามารถลดความเครียดจากเกลือ NaCl ให้กับ *A. halophytica* ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารออสโมโพรเทคแทนต์ในแบคทีเรีย ได้แก่ *E. coli* และ *B. subtilis* ที่ใช้กลูตาเมตและโพรลีนเป็นสารลดความเครียดจากเกลือ NaCl โดยอาศัยโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ไกลซีน-บีเทนทรานสเฟอร์เตอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความจำเพาะของการนำเข้าสู่สารแต่ละชนิด (Kempf and Bremer, 1998)

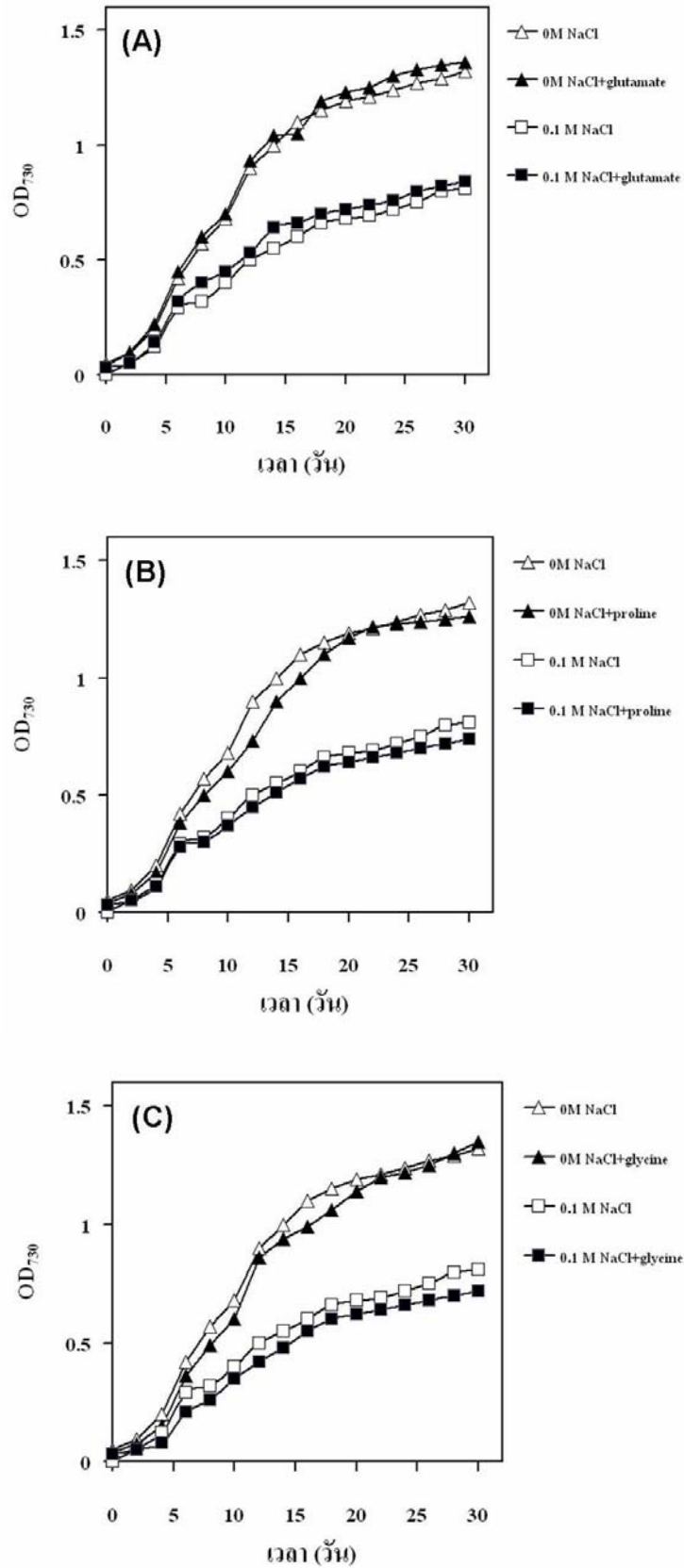
กรดอะมิโนไกลซีนยังไม่มีรายงานว่า เป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ แต่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์ใน *A. halophytica* คือ ไกลซีนบีเทน โดยเปลี่ยนไกลซีนเป็นซาร์โคซีน โดยเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ GSMT และเปลี่ยนซาร์โคซีนเป็นไดเมทิลไกลซีน และไกลซีนบีเทนตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวคือ DMT (Waditee et al., 2005) ดังนั้นการที่ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีการนำเข้าไกลซีนและทำให้การเจริญดีขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงไกลซีนเปลี่ยนเป็นไกลซีนบีเทน

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบกลไกการใช้กรดอะมิโนเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์เพื่อลดความเครียดจากเกลือ NaCl ในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน โดยไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechocystis* PCC 6803 ไม่สามารถใช้กรดอะมิโนดังกล่าว

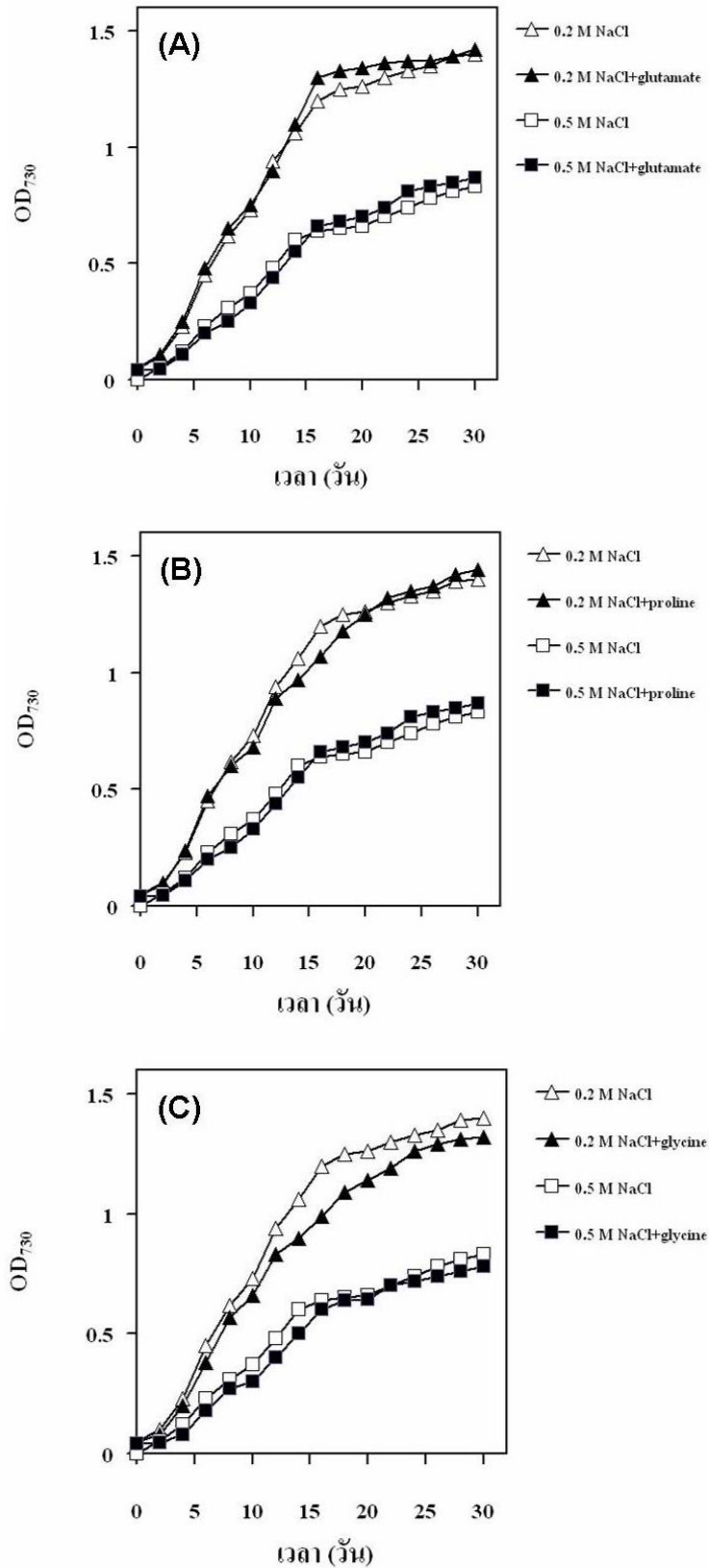
เป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ได้ ส่วนไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม *A. halophytica* สามารถใช้กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ได้ โดยเฉพาะกลูตาเมตและโพรลีน ส่วนไกลซีนน่าจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารออสโมโพรเทคแทนต์เท่านั้น เนื่องจากไกลซีนบีเทนเป็นสารที่มีความเสถียรสูงนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่า ไกลซีนนอกจากเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนแล้ว ยังสามารถเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์หรือไม่ ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

สรุป และอภิปรายผลการวิจัย

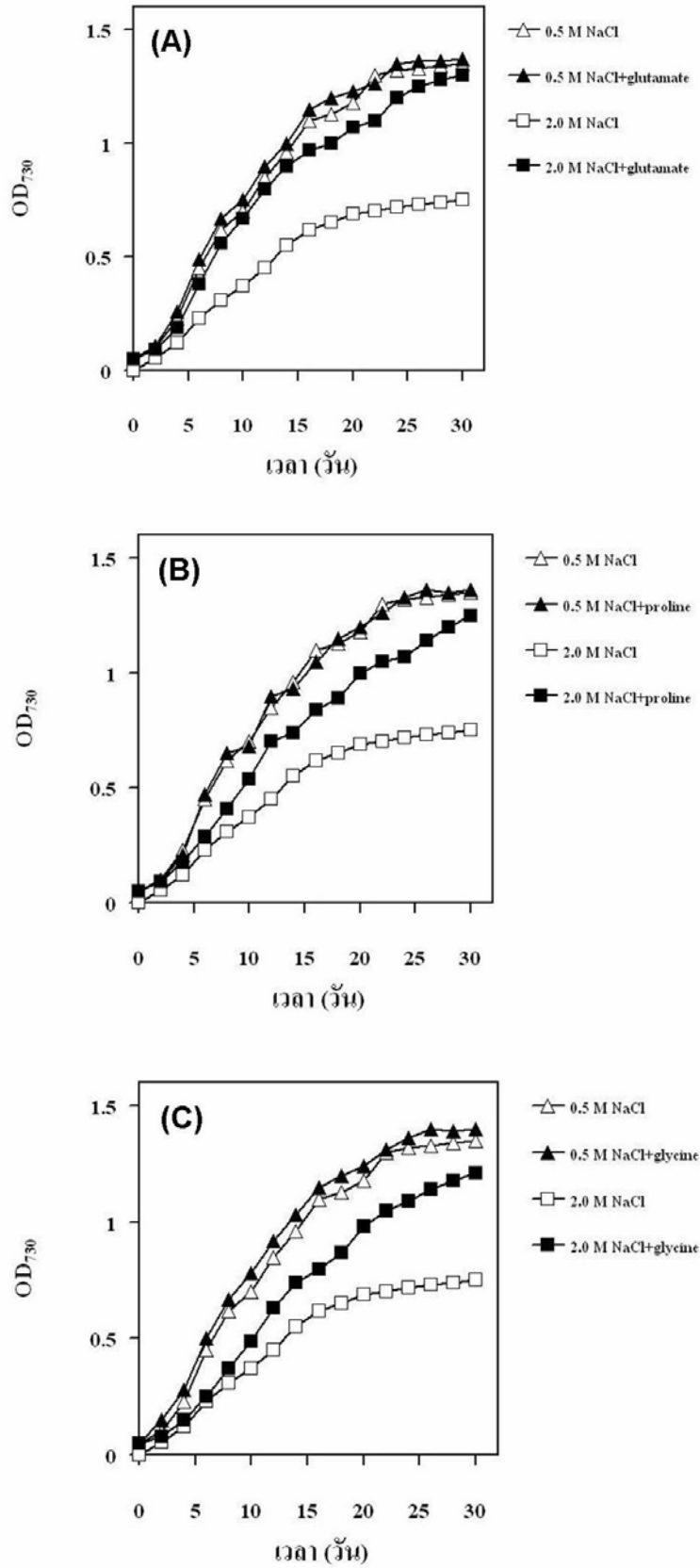
ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถเจริญในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ได้แตกต่างกัน โดย *A. halophytica* สามารถทนความเค็มได้สูงสุด และ รองลงมา *Synechocystis* PCC 6803 กับ *Synechococcus* PCC 7942 ตามลำดับ และพบว่ากรดอะมิโนไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ไม่ส่งเสริมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด *Synechococcus* PCC 7942 และ *Synechocystis* PCC 6803 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ในขณะที่กรดอะมิโนไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมตไม่ส่งเสริมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม *A. halophytica* ภายใต้ภาวะปกติ แต่ส่งเสริมการเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl โดยกลูตาเมต ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โพรลีน และไกลซีน ตามลำดับ ดังนั้นกรดอะมิโนไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต มีสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เพราะสามารถลดความเครียดจากเกลือ NaCl ได้ และการนำเข้าสู่กรดอะมิโนสู่ไซยาโนแบคทีเรียมีกลไกที่แตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับภาวะที่เจริญ และ/หรือ อยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดแตกต่างกัน เช่น *A. halophytica* ภาวะปกติกรดอะมิโนไม่ส่งเสริมการเจริญ แต่เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl กรดอะมิโนช่วยทำให้การเจริญดีขึ้น



รูปที่ 4 ผลของกรดอะมิโนกลูตาเมต โพรลีน และไกลซีนต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942 ภายใต้ภาวะปกติ (0 M NaCl) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (0.1 M NaCl) (A) กลูตาเมต (B) โพรลีน และ (C) ไกลซีน



รูปที่ 5 ผลของกรดอะมิโนกลูตาเมต โพรลีน และไกลซีนต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC 6803 ภายใต้ภาวะปกติ (0.2 M NaCl) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (0.5 M NaCl) (A) กลูตาเมต (B) โพรลีน และ (C) ไกลซีน



รูปที่ 6 ผลของกรดอะมิโนกลูตาเมต โพรลีน และไกลซีนต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้ภาวะปกติ (0.5 M NaCl) และ ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (2.0 M NaCl) (A) กลูตาเมต (B) โพรลีน และ (C) ไกลซีน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน และงบรายได้มหาวิทยาลัย ของฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตามสัญญาเลขที่ 027/2552 และ 312/2551

เอกสารอ้างอิง

- Bohnert, H. J., and Jenzen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends Biotechnol.** 14: 89-97.
- Eisenhut, M., Bauwe, H., and Hagemann, M. (2007). Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. **FEMS Microbiol. Lett.** 277: 232-237.
- Hagemann, M., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, A., and Joset, F. (1997). The *stpA* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock. **J. Bacteriol.** 179(5): 1727-1733.
- Kapper, R. M., Kempf, B., and Bremer, F. (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of *OpuD*. **J. Bacteriol.** 178: 5071-5079.
- Kempf, B., and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. **Arch. Microbiol.** 170: 319-330.
- Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2006). Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(9): 6018-6026.
- Mackey, M. A., Norton, R. S., and Borowitzka, L. J. (1984). Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.** 130: 2177-2191.
- Padan, E., and Schuldiner, S. (1996). Bacterial Na^+/H^+ antiporters: molecular biology, biochemistry, and physiology. In **Handbook of Biological Physics** (W.N. Konings, H.R. Kaback and Lolkema, J.S., eds.) pp. 501-531. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands.
- Waditee, R., Bhuiyan, M.N.H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A.T., Takabe, T., and Takabe, T. (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 1318-1323.
- Waditee, R., Hibino, T., Nakamura, T., Incharoensakdi, A., and Takabe, T. (2002). Overexpression of a Na^+/H^+ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 4109-4114.
- Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Incharoensakdi, A. and Takabe, T. (2001). Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na^+/H^+ antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by c-terminal tail. **J. Biol. Chem.** 276: 36931-36938.
- Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plant. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16: 253-277.