รหัสโครงการ: MRG5480213

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายและความทนต่อแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะ

ชื่อนักวิจัย : ดร. ปิ่นสุรางค์ ดีวงษ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อีเมล: fsciprd@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2554 - 2555)

บทคัดย่อ

ดินที่มีโลหะหนักจัดเป็นสิ่งแวดล้อมวิกฤตที่มีสังคมจุลินทรีย์ที่หลากหลายและซับซ้อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายและความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียในบริเวณเหมืองสังกะสี การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียอาศัยทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีปราศจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในการวิจัยได้เก็บตัวอย่างดิน 9 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างน้ำ 3 ตัวอย่าง จากบริเวณต่างๆ ในเหมืองสังกะสี ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 7.5-8.3 จากนั้นแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างถูกนับจำนวนและคัดแยกบนอาหาร trypticase soil agar (TSA) ที่เติมและไม่เติม 0.5 mM $ZnSO_4$ ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันในแต่ละตัวอย่างได้ทั้งหมด 396 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้เหล่านี้ถูกนำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อจำแนกและศึกษาลักษณะสัณฐานของเซลล์ และทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ทั้งหมด 167 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการทดสอบความทนโลหะหนัก จากผลการทดลองพบไอโซเลตที่สามารถทนโลหะหนักได้สูงถึง 77 mM $ZnSO_4$, 11 mM $CdSO_4$, 3 mM $CuSO_4$ และ 4 mM $HgCl_2$ โดยพบว่าไอโซเลตที่ทนแคดเมียมสูง (Cd^{2+}) มีความใกล้ชิดกับ *Klebsiella* และ *Enterobacter* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่ 99% and 98% ตามลำดับ นอกจากนี้หลายไอโซเลตทนสังกะสีสูง (Zn^{2+}) และส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ *Ralstonia* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA มากกว่า 98% ส่วนการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียได้เลือกศึกษาตัวอย่างดินบ่อเหมือง S2 ซึ่งเป็นดินตามธรรมชาติที่พบแบคทีเรียจำนวนมากและมีลักษณะสัณฐานที่หลากหลาย จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธีการโคลนและการวิเคราะห์ T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) เมื่ออาศัยหลักการความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 98% จะจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน พบว่ามีแบคทีเรียในดินตัวอย่างหลายกลุ่ม คือ *Ralstonia* (เป็นกลุ่มเด่นด้วยจำนวน >85% ของเชื้อทั้งหมดในดิน), *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, Bacterium TG161 และ *Streptomyces* การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *Ralstonia* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่มีปริมาณมากในดินบ่อเหมืองสังกะสีนี้และมีความทนต่อโลหะหนักซึ่งอาจมีบทบาทในการบำบัดทางชีวภาพ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่และเป็นการค้นพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่มีประโยชน์ในการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพในอนาคต

คำสำคัญ: ความหลากหลายของแบคทีเรีย, โครงสร้างประชากร, เหมืองสังกะสี, ความทนโลหะหนัก, 16S rRNA, terminal- restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Project code: MRG5480213

Project title: Bacterial diversity and resistance to cadmium and zinc in metal- contaminated soil

Investigator : Dr. Pinsurang Deevong, Kasetsart University

E-mail Address: fsciprd@ku.ac.th

Project Period: 2 years (2011 - 2012)

Abstract

Heavy metal contaminated soils have become an extreme environment for the development and evolution of complex microbial communities. This study aims to investigate the diversity and heavy metal resistance of bacteria in zinc-mine areas. Bacterial diversity was studied using culture-dependent and culture-independent approaches. In the research experiment, 9 soil samples and 3 water samples were collected from different areas in zinc-mine. The pH of the samples is between 7.5-8.3. Bacterial colonies were count on trypticase soil agar (TSA) with 0.5 mM $ZnSO_4$ and without $ZnSO_4$. In total 396 isolates were collected based on macroscopic study. The isolates were characterized their morphology using Gram's stain and 167 selected isolates will be used for the test of heavy metal tolerance. Interestingly, the results showed isolates resisted to high heavy metal concentrations of 77 mM $ZnSO_4$, 11 mM $CdSO_4$, 3 mM $CuSO_4$ and 4 mM $HgCl_2$. The highly Cd^{2+} resistant isolate was closely related to *Klebsiella* and *Enterobacter* with 99% and 98% nucleotide identity of 16S rRNA gene, respectively. Many isolates exhibited high resistance to Zn^{2+} and most of them were closely related to *Ralstonia* with more than 98% nucleotide identity. To study the bacterial diversity and community structure, the natural mining soil sample S2 which showed high bacterial number and diversity of isolated bacteria was selected. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and clonal analyses of 16S rRNA gene revealed diverse bacteria in the soil community. Based on 98% sequence identical, the 16S rRNA gene sequences were assigned into groups: *Ralstonia* (dominant genus with >85% of total sequences), *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, Bacterium TG161 and *Streptomyces*. This study suggested that, *Ralstonia* would be majority in this zinc mine soil and the isolated bacteria may have the potential for heavy metal bioremediation. The results supplied new knowledge and potential bacterial materials for bioremediation of heavy metals in future.

Key words: Bacterial diversity, community structure, zin mine, heavy-metal resistance, 16S rRNA, terminal- restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)