หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

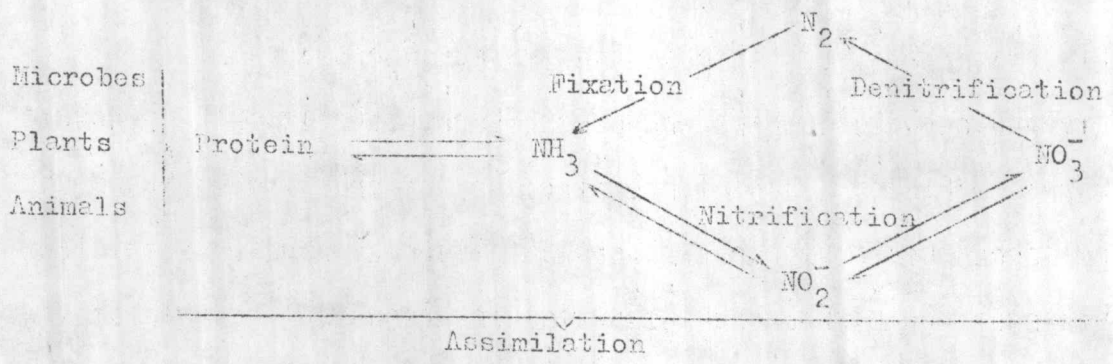
บทที่ 1

บทนำ

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิค ไนโตรเจนจึงเป็นส่วนประกอบของอาหารที่สำคัญซึ่งเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์จะได้อาหารไนโตรเจน เช่น โปรตีน จากพืช และไนโตรเจนทั้งหมดสำหรับการเจริญเติบโตของพืชได้มาจากไนโตรเจนในอากาศโดยวิธีการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นการจักหาไนโตรเจนที่อยู่ในสภาพซึ่งพืชใช้ได้สำหรับการเกษตร เช่น แอมโมเนีย ไนเตรทหรือยูเรีย จึงเป็นปัญหาสำคัญต่อการบรรเทาความอดอยากของมนุษยชาติ

ถึงแม้ไนโตรเจนจะเป็นธาตุที่มีมากมายประมาณ 80% ของบรรยากาศ แต่กลับพบความขาดแคลนอาหารจำพวกไนโตรเจน เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะไนโตรเจนในบรรยากาศไม่ได้อยู่ในสภาพที่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ได้ ไนโตรเจนจะต้องผ่านขบวนการที่เรียกว่าการตรึงไนโตรเจนได้แอมโมเนีย (รูปที่ 1) สิ่งมีชีวิตจึงสามารถนำมาใช้ได้

วัฏจักรของไนโตรเจน (Nitrogen cycle)



รูปที่ 1 วัฏจักรของไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนมี 2 วิธีคือ

1 การตรึงไนโตรเจนโดยการสังเคราะห์ ซึ่งได้แก่ การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมี (Chemical Nitrogen Fixation)

2 การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางธรรมชาติ แบ่งออกเป็น

2.1 การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมีแบบธรรมชาติ (Spontaneous Chemical Nitrogen Fixation)

2.2 การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological Nitrogen Fixation)

<u>การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมี</u>

วิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลายซึ่งได้รับการปรับปรุงโดย Fritz Haber และ Karl Bosch เมื่อต้นศตวรรษที่ 20 เรียกว่า Haber-Bosch process

$$3\,H_2 + N_2 \xrightarrow[800\,^{\circ}C]{100\ atm} 2\,NH_3$$

ไฮโดรเจนได้จาก ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติหรือน้ำมันปิโตรเลียม ผสมกับอากาศ ภายใต้ความกันและความร้อนสูงพร้อมทั้ง metal catalyst จะได้แอมโมเนียออกมา กรรมวิธีนี้ได้ใช้กันมานานโดยไม่เปลี่ยนแปลง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1974 ได้มีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียมและยังมีแนวโน้มว่าราคาน้ำมันจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ รวมทั้งเหตุผลทางเศรษฐศาสตร์และปัญหาสิ่งแวดล้อม จึงเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตปุ๋ยโดยวิธีนี้ (Shanmugan และ Valentine, 1975) และทำให้ปุ๋ยมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ

Chatt และคณะ (1975) ได้ทำการวิจัยเพื่อปรับปรุงการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีเคมี โดยใช้ organo-metallic complex ที่มีลักษณะคล้ายบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนส ทำให้ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนเกิดได้ในสภาวะไม่รุนแรง (mild condition) สามารถที่จะรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียได้ผลถึง 90% ซึ่งจะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนได้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

การตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมีแบบธรรมชาติ

วิธีนี้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เป็นการทำปฏิกริยาระหว่างไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนโดย ฟ้าผ่า หรือแสงอุลตร้าไวโอเล็ต มีผู้คำนวณว่าการตรึงไนโตรเจนที่เกิดแบบวิธีนี้ประมาณ 44×10^6 เมตริกตันต่อปี (Burns และ Hardy,1975)

การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต

Burns และ Hardy (1975) ได้คำนวณค่าการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตนั้นประมาณ 2 ใน 3 ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด คือประมาณ 175×10^6 เมตริกตันต่อปี สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (diazotrophs) จัดอยู่ในพวกProkaryotic organisms กล่าวคือ เป็นแบคทีเรียประมาณ 26 genera ซึ่งมีรายชื่ออยู่ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Breed และคณะ1957) และเป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว 23 genera (Burns และ Hardy,1975) การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้แบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

1. พวกพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันแบบถาวร(obligatory symbiotic type)
2. พวกพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันแบบชั่วคราว (associative symbiotic type)
3. พวกมีชีวิตได้อย่างอิสระ(free-living type)

พวกพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันแบบถาวร

การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มนี้ยังแบ่งออกได้เป็น 2 พวกคือ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในปมที่รากพืชที่ไม่ได้อยู่ในตระกูลถั่ว (non-leguminous plant) พืชที่จัดอยู่ในจำพวกนี้ได้แก่พวก Angiosperms มีมากกว่า 300 species (Bond,1967) พบว่าประมาณ 1 ใน 3 สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จุลินทรีย์ที่คิดว่าเกี่ยวข้องในการตรึงไนโตรเจนซึ่งพบในปมเป็นพวก Actinomycetes (Becking,1970) อีกพวกได้แก่ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในปมของรากพืชตระกูลถั่ว (leguminous plant) จุลินทรีย์นี้ได้แก่ Rhizobium sp.รายละเอียดดังที่ Bergersen (1971) ได้รวบรวมเรื่องเกี่ยวกับ legume symbiosis ไว้เป็นจำนวนมาก

พวกพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันแบบชั่วคราว

ในกลุ่มนี้จะเป็นการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันเพียงแค่สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จะให้สารประกอบพวกการ์บอนแก่แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และในทางกลับกันแบคทีเรียพวกนี้จะให้สารประกอบไนโตรเจนแก่สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่เช่น แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณใบ (Phyllophane) ของหญ้าเขตร้อนพบว่าสามารถที่จะตรึงไนโตรเจนได้ (Ruinen, 1970) ที่บริเวณราก (Rhizosphere) ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่น หญ้าเขตร้อนบางชนิด ข้าว อ้อย และข้าวโพด ก็พบแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ Dobereiner และคณะ (1972) พบ Azotobacter paspalum อยู่เป็นโคโลนีภายใต้ผิวที่เป็นยางเหนียวบนรากของหญ้า Paspalum notatum Von Bulow และ Dobereiner (1975) พบแบคทีเรีย Spirillum lipoferum อยู่บนรากของหญ้า Digitaria ducumbens และข้าวโพดบางชนิด นอกจากนั้น Yoshida และ Ancajas (1971) และ Dommergues และคณะ(1973) ยังพบการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียในรากข้าว แบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้ของสัตว์ก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้ Bergersen และ Hipsley (1970) พบ Klebsilla sp ในอุจจาระของคนและหมูซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน สำหรับการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวนั้นมักพบแบบพึ่งพาอาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่น สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว Anabaena sp. อาศัยอยู่ในรูใบของเฟิร์นน้ำที่ชื่อ Azolla sp. (Lang,1965)

พวกมีชีวิตได้อย่างอิสระ

สิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้และดำรงชีพอย่างอิสระแบ่งออกตามสภาพการเป็นอยู่ได้ 3 แบบ

1 Aerobic diazotrophs แบคทีเรียที่รู้จักกันดีในพวกนี้ได้แก่ Azotobacter sp. Beijerinckia sp., Derxia sp., Myobacterium sp., Methane-oxidising bacteria Spirillum lipoferum ส่วน diazotroph ที่สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ เช่น สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว Anabaena sp., Nostoc sp.

2. Facultative diazotrophs ได้แก่ Klebsiella sp. Bacillus polymyxa, B.macerans และ Escherichia coli สำหรับ E.coli นั้นปกติไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ต้องเป็น E.coli ที่ได้รับยีนส์ที่เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน(nif gene) จาก K.pneumoniae (Dixon และ Postgate, 1971) สำหรับ Rhodospirillum sp. และ Rhodopseudomonas sp. เป็นพวกที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ด้วย

3. Anaerobic diazotrophs ได้แก่ Clostridium pasteurianum, C.butyricum, Desulfotomaculum sp., Desulfovibrio sp. Chromatium sp. และ Chlorobium sp. และยังมีพวกที่สังเคราะห์แสงได้ด้วยเช่น Chloropseudomonas sp.

วิธีวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน

ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนจะต้องทราบถึงวิธีการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีหลายวิธี

1. วิธีวัดทางอ้อมโดยดูการเจริญเติบโตและรูปร่างลักษณะ (morphology) เช่น ดูการเพิ่ม bio-mass หรือ optical density ของ organism ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน หรือในสภาพร่ายอาจใช้วิธีดูการเกิด heterocyst ในพืชตระกูลถั่วดูจำนวนปม

2. โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนซึ่งมีหลายวิธีเช่น หา N-content ที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี Kjeldahl หรือหาปริมาณ ^{15}N หรือ ^{13}N ที่พบในแอมโมเนีย เมื่อเลี้ยงเซลล์ในบรรยากาศที่มี $^{15}N_2$ หรือ $^{13}N_2$ แล้วตรวจหาโดย mass spectrometry หรือ optical mass emission สำหรับกรณี ^{15}N หรือ radioactive counting สำหรับกรณี ^{13}N

3. โดยอาศัยความสามารถของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนส ที่สามารถรีดิวซ์substrate ได้หลายชนิดนอกเหนือจากไนโตรเจน (Burns และ Hardy, 1975) ทำให้พบวิธีวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนอีกหลายวิธีเช่น ใช้ radioactive counting หา $^{14}CH_3NH_2$ ที่เกิดจากปฏิกริยา $H^{14}CN \longrightarrow {}^{14}CH_3NH_2$ หรือใช้เครื่อง gas chromatography ที่ใช้

hydrogen flame เป็นเครื่องตรวจหา C_2H_4 หรือ CH_4 จากปฏิกิริยาอะเซทิลีนรีดักชัน $C_2H_2 \longrightarrow C_2H_4$ หรือ $HCN \longrightarrow CH_4 + NH_3$ หรือวัด H_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยา $H_3O \longrightarrow H_2$

การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าว

งานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวได้มีผู้ศึกษาค้นคว้ากันมานาน และกำลังได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวาง สืบเนื่องมาจากราคาปุ๋ยที่ใช้มีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นถ้ามีความเข้าใจเกี่ยวกับขบวนการตรึงไนโตรเจนที่พบในนาข้าวดีพออาจลดปริมาณการใช้ปุ๋ยลงได้ การศึกษาเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าวได้เริ่มมีมานานแล้ว ในปี 1959 Chakarborty และ Sen Gupta ได้ทดลองปลูกข้าวพันธุ์ Aman ในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน พบว่าไนโตรเจนทั้งหมดของต้นข้าวเพิ่มขึ้นโดยไม่พบสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เขาจึงสรุปว่าข้าวอาจมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ (Chakarborty และ Sen Gupta, 1959) ในเวลาต่อมา Yoshida และ Ancajas (1971) ได้ทำการทดลองปลูกข้าวโดยใช้เมล็ดที่ปราศจากเชื้อปลูกในอาหารเหลวที่ sterile และไม่พบการตรึงไนโตรเจนจึงยืนยันว่า การตรึงไนโตรเจนที่พบในบริเวณรากข้าวนั้นเนื่องมาจากมีแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้อาศัยอยู่ในบริเวณรากข้าว ซึ่งต่อมา Yoshida และ Ancajas (1973 a) ได้รายงานอีกว่า พบการตรึงไนโตรเจนในดิน น้ำ และบริเวณรากข้าวอยู่ในช่วง 3-63 Kg/ha โดยได้ทำการทดลองในแปลงนาทดลอง และใช้ข้าวพันธุ์ IR 20 และยังพบอีกว่า การตรึงไนโตรเจนที่พบในบริเวณรากข้าวนั้น ในสภาพนาลุ่มมีน้ำท่วมเสมอจะมีปริมาณสูงกว่านาดอนและการตรึงไนโตรเจนของดินที่ลุ่มจะเพิ่มขึ้นหลังจากข้าวเริ่มสร้างรวงอ่อน (panicle initiation) นอกจากนั้นดินที่ทำการเพาะปลูกจะมีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าดินที่ไม่ได้ทำการเพาะปลูก

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวประเทศไทย ได้เริ่มมีการศึกษาในปี 1974 โดย Matsuguchi และคณะ ได้ศึกษาการตรึงไนโตรเจนของพวกที่มีชีวิตได้อย่างอิสระโดยวัดความหนาแน่นของแบคทีเรียและอัตราการตรึงไนโตรเจนในท้องนาประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำท้องนา ผิวดิน(0-2 ซม.) เพื่อหาจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ตรึงไนโตรเจน

ได้ แบคทีเรียที่พบได้แก่ Azotobacter sp. Clostridium butyricum และ Non sulfur purple bacteria ทั้งพบสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวอีกด้วย อัตราการตรึงไนโตรเจนหาโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชั่นมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจน คณะผู้ทดลองนี้รายงานว่า ท้องนาประเทศไทยส่วนใหญ่มีการตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า 10 KgN/ha (Matsuguchi และคณะ 1975) ในปี 1976 Watanabe และคณะได้วัดอัตราการตรึงไนโตรเจนที่สถานีทดลองข้าว 3 แห่งคือ ชัยนาท สุพรรณบุรี และคลองหลวง(ปทุมธานี) โดยใช้ถุงพลาสติกคลุมต้นข้าว RD 9 แล้วอินกิวเบทในบรรยากาศที่มีอะเซทิลีน 20% วัดเอทิลีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากอะเซทิลีนรีดักชั่น(Lee และคณะ1975) พบว่านาที่สุพรรณบุรีมีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดคือประมาณ 21.40-35.0 μmoleC_2H_4/chamber.d (สำหรับแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ย) และ 48.9-64.0 μmoleC_2H_4/chamber.d (สำหรับแปลงที่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโปแตสเซียม) รองลงมาคือ คลองหลวงและชัยนาท (Watanabe และคณะ 1976)

เหตุที่ทำการวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีผู้ศึกษาอัตราการตรึงไนโตรเจนในดิน น้ำท้องนา และรากข้าว ในระยะต่าง ๆ ของข้าวตลอดระยะการเพาะปลูก และการศึกษาการตรึงไนโตรเจนในประเทศไทยที่กล่าวมาแล้วเป็นการทดลองแบบ Field study ซึ่งสิ้นเปลืองกำลังมากและลงทุนสูง ข้อดีคือ เป็นการศึกษาสภาพการตรึงไนโตรเจนที่เป็นไปตามธรรมชาติ แต่เป็นการวัดอย่างรวม ๆ ไม่สามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวชนิดใดเป็นตัวการสำคัญในระยะเวลาใดของการเพาะปลูก

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชั่นในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและสิ้นเปลืองน้อย สามารถศึกษาแต่ละชนิดของตัวอย่างได้ แต่ก็มีข้อเสียคือไม่ใช่สภาพธรรมชาติและไม่สามารถใช้ตัวอย่างเดิมมาศึกษาได้ตลอดฤดูเพาะปลูก ตัวอย่างที่นำมาศึกษาคือ รากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา จากแปลงนาทดลองที่สถานีทดลองข้าวคลองหลวงซึ่งปลูกข้าวพันธุ์ กข 1

ลักษณะของข้าว กข 1 เป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์ IR 8 ซึ่งมีความสามารถต้านทานต่อโรคใบสีส้ม ต้นเตี้ย ให้ผลผลิตสูงเมื่อใส่ปุ๋ยมากขึ้น กับพันธุ์ไทยชื่อเหลืองทองซึ่งมีลำต้นสูงไม่ต้านทานต่อโรคใบสีส้ม คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน ดังนั้นข้าว กข 1 จะมีลักษณะที่ให้ผลผลิต

สูง ต้านทานโรคใบสีส้ม คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน และตอบสนองต่อปุ๋ยสูง เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง (non-photosensitive) อายุประมาณ 120 วัน จึงปลูกได้ทั้งนาปรังและนาปี

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าวในห้องปฏิบัติการและโดยใช้วิธีอะเซธีลีนรีดักชั่นติดตามอัตราการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของต้นข้าว โดยเปรียบเทียบอัตราการตรึงไนโตรเจนของรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา นับตั้งแต่ระยะปักดำจนถึงเก็บเกี่ยวทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตรึงไนโตรเจนในแต่ละตัวอย่างกับอายุของข้าว พร้อมทั้งดูผลของการใส่ปุ๋ยต่อการตรึงไนโตรเจน และหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างทั้ง 3 โดยวิธี Kjeldahl เพื่อหาความแปรปรวนของปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์จากตัวอย่างทั้ง 3 กับระยะการเติบโตของข้าว

จุดประสงค์ต่อไปคือ ศึกษาแบคทีเรียที่เป็นตัวการในการตรึงไนโตรเจนให้กับนาข้าว โดยแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณรากข้าว และน้ำท้องนา เพื่อศึกษาลักษณะ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียดังกล่าว ในห้องปฏิบัติการ

ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะทำให้ทราบถึงระดับและช่วงเวลาของการตรึงไนโตรเจนในนาข้าว ซึ่งอาจเป็นแนวความคิดในการใช้การตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในธรรมชาติให้เป็นประโยชน์ยิ่งขึ้น และอาจช่วยลดปริมาณของปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ในนาข้าว