

การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในน้ำจืด วัฏจักรชีวิตอะเซตีลีนรีกักชั้น



นายรัชชัย สิมะสาธิตกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๑

000630

115498335

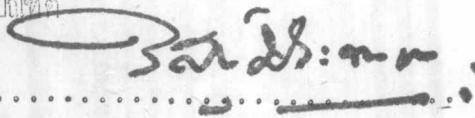
BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN RICE PADDY FIELD
AS MEASURED BY ACETYLENE REDUCTION METHOD

Mr. Chatchai Simasatitkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Education
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1978

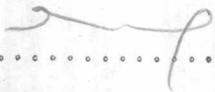
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การครึ่งไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าว วัชก้วยวิธีอะเซทิลีนรีดักชัน
โดย นายชัยชัย สิมะสาธิตกุล
แผนกวิชา ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาโท



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)

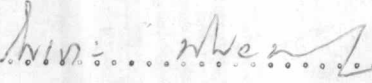
คณะกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กำจักษ์ มงคลกุล)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพย์ทัศน์)



.....กรรมการ
(ดร. ประภคคีสิน สิทนันทน์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไดแกนาทอลง (0.1-2.0 nmoleC₂H₄/ml.d) แสดงว่าตัวการตรึงไนโตรเจนที่สำคัญใน
 แปลงนาทดลองนั้นจะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในดินและที่เกาะอยู่กับรากข้าว การทดลองแยก
 เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้จากตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากเป็นการยืนยัน
 ผลการทดลองข้างต้นซึ่งพบ aerobic diazotrophs บริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ NF 1, NF 2
 และ NF 3 เป็น Gram negative short rod ตัวที่มีแอกติวิตีสูงสุดคือ NF 3 (0.892
 nmoleC₂H₄/mgProt.hr) มีคุณสมบัติคือ เติบโตได้ดีในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ในช่วง
 สะเทิน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเติบโตคือ 31-37 องศาเซลเซียส และ ARA ถูกยับยั้ง
 อย่างสมบูรณ์เมื่อมีปริมาณไนโตรเจน (NH₄)₂SO₄ ในน้ำเลี้ยงเชื้อมากกว่า 16ppmN



4

Thesis Title Biological Nitrogen Fixation in Rice Paddy Field as
 Measured by Acetylene Reduction Method .

Name Mr. Chatchai Simasatitkul

Thesis Advisor Dr. Jariya Boonjawat

Department Biochemistry

Academic Year 1977

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation in rice paddy field was studied by using an in vitro acetylene reduction method. Rice (Oryza sativa strain RD 1) were grown in confined experimental plots at the Rice - experimental station, Klong Loung, Patumtani. Washed rice root, rhizospheric soil and paddy water samples were collected from the paddy plot and incubated in the presence of air and 0.2 atm acetylene for 24 hrs. in laboratory condition and measured ethylene produced from acetylene reduction in a gas chromatograph. Lag phase about 5 hrs. and Km for C_2H_2 of 0.04 atm were observed in this reaction. Neither ethylene consumption nor ethylene production besides that resulted from acetylene reduction was detectable in this experimental condition.

The above method was used to trace the rate of nitrogen fixation in the 3 types of paddy samples collected from experimental plots, without fertilizer, with nitrogen fertilizer, with phosphorus fertilizer and with both kinds of fertilizer. Comparative studies

on the pattern and level of nitrogen fixation rate per unit weight of rice root, rhizospheric soil and paddy water samples showed that, rice root contributed highest nitrogen fixation in flowering stage, rhizospheric soil showed highest activity in tillering - to- panicle initiation stage, and paddy water conferred activity in two separated phase which are transplanting and harvesting stages. Comparing among samples, rice root highest nitrogen fixing activity of 1.5 -5.5 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{g.d}$, followed by rhizospheric soil, 2.5 -30.0 $\text{nmole C}_2\text{H}_4/\text{g.d}$ and paddy water 0.1 -2.0 $\text{nmole C}_2\text{H}_4/\text{ml.d}$ respectively. This result indicates that the dominant N-fixer in this experimental plot are soil and rhizospheric bacteria. Isolation of bacteria from rice root and rhizospheric soil confirmed the presence of N-fixer. The three pure aerobic diazotrophs NF 1, NF 2 and NF 3 are Gram negative short rod NF 3 shows highest activity of 0.892 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{mg Prot. hr}$. the optimum pH and temperature for growth of NF 3 are neutral and the range of 31 -37 °C. Acetylene reduction activity of NF 3 is completely inhibited when the concentration of nitrogen, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the media reaches 16 ppm N .



กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอขอบคุณท่านผู้มีรายงานต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาเริ่มเป็นผู้
ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับ
นี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

รองศาสตราจารย์ ดร. กำจิด มงคลกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทัพยทัศน์

ดร. ประทีปศิณี สีนันทน์

คุณวิศิษฐ์ โชติสิทธิ์กุล

คุณบรรหาร แกงฉ่ำ

เจ้าหน้าที่สถานีทดลองข้าวคลองหลวงทุกท่าน

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ในครั้งนี้

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๕
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๖
กิตติกรรมประกาศ.....	๗
รายการตารางประกอบ.....	๘
รายการรูปประกอบ.....	๙
คำย่อ.....	๑๐
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วัสดุและเคมีภัณฑ์.....	9
3. วิธีการวิจัย.....	12
4. ผลการวิจัย.....	25
1. การแยกและหาปริมาณกำมะถะเซลีเนียมและเอซีลีเนียมด้วยเครื่อง GC เมื่อใช้คอลัมน์ Porapak N	25
2. สภาพที่เหมาะสมในการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA	25
3. ARA ในรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำที่ออกมา ตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตของต้นข้าว.....	35
4. ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำที่ออกมา.....	42
5. การแยกตัวการที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากรากข้าว ดินและน้ำในแปลงนาทดลอง.....	43
6. ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ (NF 1, NF 2 และ NF 3	49
5. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย.....	60
เอกสารอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	75
ประวัติผู้เขียน.....	76



รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	การทดสอบ C_2H_4 consumption โดยรากข้าวและดินบริเวณรากในสภาพของการทดลอง.....	31
2	ความสามารถในการผลิตก๊าซเอมีนโดยรากข้าวและดินบริเวณรากในสภาพของการทดลอง.....	33
3	ผลการเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียสต่อARA	34
4	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของรากข้าวระยะต่างๆ.....	44
5	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของดินบริเวณราก.....	45
6	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของน้ำทองนา.....	46
7	ARA ของตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำทองนาที่อินทิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อตั้งเคราะห์และน้ำเลี้ยงเชื้อบวกรอาหารเสริม.....	48
8	ARA ของ subculture ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน.....	50
9	การเปรียบเทียบ ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	54

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	วัฏจักรของไนโตรเจน.....	1
2	แสดงระยะเวลาเจริญเติบโตของข้าว กข	13
3	แสดงลักษณะซากทดลองที่บรรจุตัวอย่าง.....	15
4	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณก๊าซอะเซทิลีนและเอธีลีนโดยวิธีก๊าซโครมา- โทกราฟี.....	26
5	ผลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตต่อ ARA ของรากข้าว.....	27
6	ผลของ $P C_2H_2$ ใน gas phase ของซากทดลองต่อ ARA ของรากข้าว..	29
7	Lineweaver-Burk Plot ($\frac{1}{ARA}$ Vs $\frac{1}{P C_2H_2}$)	30
8	ARA ของรากข้าวในระยะต่างๆของอายุข้าว.....	36
9	ผลของการใส่ปุ๋ยต่อ ARA ของรากข้าวในระยะต่างๆของอายุข้าว.....	37
10	ARA ของดินบริเวณรากข้าวตามระยะเวลาต่างๆของอายุข้าว.....	40
11	ARA ในน้ำห้องนาคตามระยะเวลาต่างๆของอายุข้าว.....	41
12	ลักษณะโคโลนีของ NF 1, NF 2 และ NF 3 กำลังขยาย 160 เท่า....	52
13	ลักษณะเซลล์ของ NF 1, NF 2 และ NF 3 กำลังขยาย 4000 เท่า...	53
14	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและ ARA ของ NF 3	56
15	อิทธิพลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและ ARA ของ NF 3	57
16	การเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนต่อ ARA ของ NF 3	59
17	ความสัมพันธ์ของตัวตั้งไนโตรเจนต่างๆในแปลงนาตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโต	63

คำย่อ

คำย่อ

คำเต็ม

ARA

Acetylene reduction activity

BSA

Bovine serum albumin

ha

Hectare

N

Nitrogen

NF medium

Nitrogen free medium