การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าว วัดก้วยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่น

นายชัชชัย สิมะสาธิกกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๒๑

000630

I15498335

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	การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าว วัดด้วยวิธีอะเซทีลีนรีดักชั่น
โดย	นายชัชชัย สิมะสาธิตกุล
แผนกวิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. วิภัช ปรัชญเหมาะ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ

(ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนท์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าว วัดด้วยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่น
ชื่อนิสิต นาย ชัชรัย สิมะสาธิตกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. จริยา บุญญวัฒน์
แผนกวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2520

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าวนี้ อาศัยวิธีวัดปฏิกิริยาอะเซธีลีนรีดักชั่นในขวดทดลอง สถานีปลูกข้าวคือ สถานีทดลองข้าวคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 1 (Oryza sativa strain RD 1) ปลูกในแปลงนาทดลองที่มีขอบเขต นำตัวอย่างรากข้าวที่ล้างสะอาด ดินบริเวณราก และน้ำท้องนามาวัดแอคติวิตี โดยอินคิวเบทตัวอย่างน้ำ ดิน และรากที่เก็บจากแปลงทดลองนี้ในขวดทดลองที่มีอากาศและอะเซธีลีน 0.2บรรยากาศเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ แล้ววัดปริมาณเอธีลีนที่เกิดขึ้นโดยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ พบว่ามี lag phase ประมาณ 5 ชม. และค่า Km ของอะเซธีลีนประมาณ 0.04 บรรยากาศ และไม่พบการสร้างหรือการทำลายก๊าซเอธีลีนโดยปฏิกิริยาอื่นนอกเหนือจากอะเซธีลีนรีดักชั่นในภาวะที่ทดลอง

เมื่อใช้วิธีดังกล่าวติดตามอัตราการตรึงไนโตรเจนในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ตลอดฤดูการเพาะปลูก ในแปลงเพาะที่ไม่ใส่ปุ๋ย, ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน, ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสและใส่ปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบและระดับการตรึงไนโตรเจน ต่อหน่วย นน. ระหว่างรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา พบว่ารากข้าวมีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในระยะข้าวออกดอก ดินบริเวณรากมีแอคติวิตีสูงสุดในระยะข้าวแตกกอและสร้างรวงอ่อน ส่วนน้ำท้องนาพบแอคติวิตีสูง 2 ช่วงต่างกันคือ ในระยะปักดำและเก็บเกี่ยว ในการเปรียบเทียบระดับการตรึงไนโตรเจนต่อหน่วย นน.ของตัวอย่าง รากข้าวสูงสุด (1.5 - 5.5 µmole C_2H_4/g.d) รองลงมาได้แก่ ดินบริเวณราก (2.5-30.0 nmoleC_2H_4/g.d) และต่ำสุด

ได้แก่น้ำท้องนา (0.1-2.0 nmoleC_2H_4/ml.d) แสดงว่าตัวการตรึงไนโตรเจนที่สำคัญในแปลงนาทดลองนี้น่าจะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในดินและที่เกาะอยู่กับรากข้าว การทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้จากตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากเป็นการยืนยันผลการทดลองข้างต้นซึ่งพบ aerobic diazotrophs บริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ NF 1, NF 2 และ NF 3 เป็น Gram negative short rod ตัวที่มีแอคติวิตีสูงสุดคือ NF 3(0.892 μmoleC_2H_4/mgProt.hr) มีคุณสมบัติคือ เติบโตได้ดีในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ในช่วงสะเทิน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะกับการเติบโตคือ 31-37 องศาเซลเซียส และ ARA ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีปริมาณไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำเลี้ยงเชื้อมากกว่า 16ppmN

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

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 µmole C_2H_4/g.d, followed by rhizospheric soil, 2.5 -30.0 nmole C_2H_4/g.d and paddy water 0.1 -2.0 nmole C_2H_4/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 diazotophs NF 1, NF 2 and NF 3 are Gram negative short rod NF 3 shows highest activity of 0.892 µmole C_2H_4/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, $(NH_4)_2SO_4$ in the media reaches 16 ppm N .

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายงานต่อไปนี้ ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์
รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์
ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
คุณวิศิษฐ์ โชติลิทกุล
คุณบรรหาร แกงฉ่ำ
เจ้าหน้าที่สถานีทดลองข้าวคลองหลวงทุกท่าน

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ช

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

รายการตารางประกอบ..... ซ

รายการรูปประกอบ..... ฌ

คำย่อ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 9

3. วิธีการวิจัย..... 12

4. ผลการวิจัย..... 25

1. การแยกและหาปริมาณก๊าซอะเซทีลีนและเอธีลีนด้วยเครื่อง GC เมื่อใช้คอลัมน์ Porapak N 25

2. สภาพที่เหมาะสมในการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA 25

3. ARA ในรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา ตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว..... 35

4. ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา..... 42

5. การแยกตัวการที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากรากข้าว ดินและน้ำในแปลงนาทดลอง..... 43

6. ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ (NF 1, NF 2 และ NF 3 49

5. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 60

เอกสารอ้างอิง..... 70

ภาคผนวก..... 75

ประวัติผู้เขียน..... 76

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	การทดสอบ C_2H_4 consumption โดยรากข้าวและกินบริเวณรากในสภาพของการทดลอง.....	31
2	ความสามารถในการผลิตก๊าซเอธีลีนโดยรากข้าวและกินบริเวณรากในสภาพของการทดลอง.....	33
3	ผลการเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียสต่อARA	34
4	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของรากข้าวระยะต่างๆ.....	44
5	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของกินบริเวณราก.....	45
6	ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของน้ำท้องนา.....	46
7	ARA ของตัวอย่างรากข้าว กินบริเวณราก และน้ำท้องนาที่อินกิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และน้ำเลี้ยงเชื้อบวกอาหารเสริม.....	48
8	ARA ของ subculture ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน.....	50
9	การเปรียบเทียบ ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	54

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	วัฏจักรของไนโตรเจน.....	1
2	แสดงระยะการเจริญเติบโตของข้าว กข	13
3	แสดงลักษณะขวดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง.....	15
4	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณก๊าซอะเซทีลีนและเอธีลีนโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟ.....	26
5	ผลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทต่อ ARA ของรากข้าว.....	27
6	ผลของ $^{P}C_2H_2$ ใน gas phase ของขวดทดลองต่อ 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 ในน้ำท้องนาตามระยะเวลาต่างๆของอายุข้าว.....	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	ความสัมพันธ์ของตัวครึ่งไนโตรเจนต่างๆในแปลงนาตลอดระยะการเจริญเติบโต	63

คำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ARA	Acetylene reduction activity
BSA	Bovine serum albumin
ha	Hectare
N	Nitrogen
NF medium	Nitrogen free medium