การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบนผิวใบข้าว

นางสาว จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-210-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19194316

SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA ON RICE PHYLLOSPHERE

Miss Jaruratana Eamsiri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Acadamic Year 1998

ISBN 974-332-210-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบนผิวใบข้าว
โดย	นางสาว จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ : การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบนผิวใบข้าว (SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA ON RICE PHYLLOSPHERE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ; 111 หน้า. ISBN 974-332-210-8.

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบริเวณผิวใบข้าวจากแหล่งต่างๆ สามารถแยกได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง คือ *Azomonas insignis, Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* ซึ่งเมื่อวิเคราะห์อะเซธิลีน รีดักชั่น จะมีค่าเป็น 0.3762, 0.7095 และ 0.4048 เอทิลีนไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง จึงได้ศึกษาปัจจัยได้แก่ แหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Azomonas insignis* และ *Azomonas agilis* สามารถตรึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* สามารถตรึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส

ผลของการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อการเจริญของต้นข้าว โดยพ่นเชื้อลงบนใบข้าวเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรีย 5, 10 และ 12 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่าต้นข้าวที่พ่นด้วยเชื้อ *Azotobacter chroococcum* จะทำให้ต้นข้าวมีการเจริญที่ดีกว่า *Azomonas insignis* และ *Azomonas agilis* และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยกับชุดการทดลองที่พ่น *Azotobacter chroococcum* ลงบนใบข้าว พบว่าชุดการทดลองที่มีการพ่นเชื้อจะทำให้ต้นข้าวมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรีย 12 กิโลกรัมต่อไร่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประกิตติ์สิน

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C826670 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: PHYLLOSPHERE / NITROGEN FIXING BACTERIA / RICE
JARURATANA EAMSIRI : SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA ON RICE PHYLLOSPHERE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SAEHANONTH, Ph.D. 111 pp. ISBN 974-332-210-8.

Selected fifteen nitrogen fixing bacterial strains were isolated from rice phyllosphere from various sources in Thailand. Three strains were identified as *Azomonas insignis*, *Azotobacter chroococcum* and *Azomonas agilis*, gave the high efficiency of nitrogen fixing activity were 0.3762, 0.7095 and 0.4048 ethylene µmole/mg cell dry wt/hr, respectively. The carbon sources, pH of media and incubation temperature affected on the efficiency of nitrogen fixation and the growth rate efficiency of these 3 strains of bacteria. We also found that *Azomonas insignis and Azomonas agilis* had high growth rate and nitrogen fixing efficiency when cultured in nitrogen free medium with glucose as a carbon source with optimum pH of 7 and temperature of 30°C. Moreover, *Azotobacter chroococcum* had high growth rate and nitrogen fixing efficiency when cultured in nitrogen-free medium with mannitol as a carbon source.

The effect of nitrogen fixation by these three strains of bacteria on rice growth rate was also studied by comparing with the usage of nitrogen fertilizer with amounts of 5, 10 and 12 kg/Rai. It was found that rice sprayed with *Azotobacter chroococcum* gave significantly higher growth rate than those sprayed with other two strains, and gave average growth rate close to the usage of nitrogen fertilizer with 12 kg/Rai.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ด.. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่าตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆรวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โมษิตานนท์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆในภาควิชาทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริ้งศุลกะ คุณจิราวรรณ ธนะ คุณศิรวิทย์ สิตปรีชา และคุณอดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร เพื่อนผู้คอยให้ความช่วยเหลือมาตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรักอย่างสูงสุดของผู้วิจัย ที่คอยเป็นกำลังใจและกำลังทรัพย์อย่างดียิ่ง และขอขอบคุณ พี่และน้องที่คอยสนับสนุน และช่วยเหลือตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
คำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทรรศน์	4
3. อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย	33
4. ผลการวิจัย	44
5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	83
รายการอ้างอิง	87
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	111

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงชนิดของประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 7
2. แสดงตัวรับอิเลคตรอนหรือซับเสตรท, ผลที่เกิดขึ้นและจำนวนอิเลคตรอน ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส 24
3. แหล่งที่มาของแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนทั้ง 15 สายพันธ์ ที่แยกได้จากใบข้าว 45
4. ผลการวิเคราะห์อัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซธิลีน รีดักชั่น และ น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ปราศจากไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 46
5. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธ์ที่ 2 กับ แบคทีเรีย *Azomonas insignis* 51
6. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธ์ที่ 6 กับ แบคทีเรีย *Azotobacter choococcum* 52
7. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 กับ แบคทีเรีย *Azomonas agilis* 53
8. สรุปพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ 3 สายพันธุ์ ซึ่งวัดโดยอะเซธิลีน รีดักชั่น เทคนิค 74
9. สรุปพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้...74
10. ปริมาณไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้จากดินแหล่งต่าง 75
11. ความสูงและน้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวที่ปลูกในกระบะทดลองต่าง เมื่อต้นข้าวอายุได้ 3 เดือน 76

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. วัฏจักรของไนโตรเจน 5
2. ความสัมพันธ์ระหว่าง Phyllosphere กับ Rhizosphereในระบบนิเวศน์..... 12
3. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในการเกิดอะเซธิลีน รีดักชั่น.....17
4. องค์ประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส 21
5. ปฏิกิริยาขั้นแรกที่เกิดขึ้นระหว่างก๊าซไนโตรเจน กับเอนไซม์ไนโตรจีเนส.....26
6. กลไกการทำงานของเอนไซม์ GDH GS และ GOGAT.....28
7. เปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย ที่แยกได้ทั้ง 15 สายพันธุ์ 47
8. ลักษณะของเซลล์ และการติดสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า 48
9. ลักษณะของเซลล์ และการติดสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า 49
10. ลักษณะของเซลล์ และการติดสีแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า 49
11. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน กลูโคส ซูโครส หรือแมนนิทอล ที่อุณหภูมิห้อง.....55
12. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน กลูโคส ซูโครส หรือแมนนิทอล ที่อุณหภูมิห้อง.....57
13. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน กลูโคส ซูโครส หรือแมนนิทอล ที่อุณหภูมิห้อง.....59

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

14. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส 62
15. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส 64
16. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส 66
17. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิห้อง..... 68
18. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิห้อง..... 70
19. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิห้อง..... 73
20. เปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวในชุดการทดลองต่าง ๆ..... 77
21. เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในชุดการทดลองต่าง ๆ..... 79
22. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กข1 อายุ 3เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว..... 80

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

23. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กข1 อายุ 3เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว..... 81

24. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กข1 อายุ 3เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว..... 81

25.ใบข้าวที่ไม่ได้พ่นเชื้อแบคทีเรีย เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด..... 82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อักษรย่อ

ATP	= Adenosine Tri Phosphate
ADP	= Adenosine Di Phosphate
Fe	= Iron
μ	= ไมโคร
cell dry wt.	= น้ำหนักเซลล์แห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย