

การคัดเลือกแบบที่เรียบง่ายในตรีจนบนผ้าใบข้าว

นางสาว จารุรัตน์ เอียนศิริ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-210-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

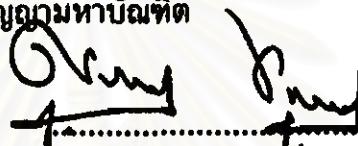
Chulalongkorn University

Academic Year 1998

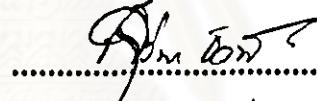
ISBN 974-332-210-8

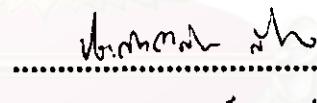
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบบที่เรียบริงในໂຕເຈນບນຜົວໃບຂ້າວ
โดย นางสาว ຈາກุลີຕົນ ເອີນຕືຣີ
ภาควิชา ຊຸລະວິທີຍາ
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน ສີຫນນກນ

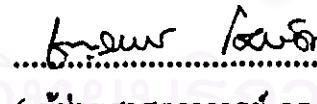
บັນທຶກວິທາລັຍ ຈຸ່າສັງກրດົມຫາວິທາລັຍ ອຸນຸມັດໃຫ້ນັບວິທີຍານິພັນທຶກບັນທຶກ
ໜຶ່ງຂອງການສຶກສາຕາມຫຼັກສູດປະລາຍງານຫາບັນທຶກ

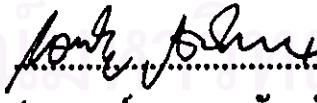
.....ຄະບົບດີບັນທຶກວິທີຍາລັຍ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชิตวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ປະທານກຽມກາ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินา ชานิชย์)

.....ອະນາກົດ ກຽມກາ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน ສີຫນນກນ)

.....ຜູ້ອໍານວຍຄະດີກຽມກາ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ ใจฉิตานันท์)

.....ກຽມກາ
(อาจารย์ ดร. กองชัย ກົດຖາວຸພິຈີນ)

คิมูร์ตันจุนบกคัดเลือกวิทยานิพนธ์ภายในเอกสารานศึกษาที่มหาวิทยาลัย

รารัตน์ เอชมนตรี : การคัดเลือกแบคทีเรียที่เรียกไนโตรเจนในโตรเจนบนผิวใบข้าว (SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA ON RICE PHYLLOSPHERE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ประภิตติสิน สิงหนาท ; 111 หน้า. ISBN 974-332-210-8.

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถดึงไนโตรเจนจากบริเวณผิวใบข้าวจากแหล่งต่างๆ สามารถแยกได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการดึงไนโตรเจนได้สูง คือ *Azomonas insignis*, *Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* ซึ่งเมื่อวิเคราะห์อะเซติก ริดักชั่น จะมีค่าเป็น 0.3782, 0.7095 และ 0.4048 เอกทินไมโครโมลต่อมิลลิกรัมหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง จึงได้ศึกษาปัจจัยได้แก่ แหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดึงไนโตรเจน และอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Azomonas insignis* และ *Azomonas agilis* สามารถดึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่มีกรดูลิโคนเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* สามารถดึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มี曼นนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส

ผลของการดึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อการเจริญของต้นข้าว โดยพ่นเชื้อลงบนใบข้าวเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยเรียบ 5, 10 และ 12 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่าต้นข้าวที่พ่นด้วยเชื้อ *Azotobacter chroococcum* จะทำให้ต้นข้าวมีการเจริญที่ดีกว่า *Azomonas insignis* และ *Azomonas agilis* และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยกับชุดการทดลองที่พ่น *Azotobacter chroococcum* ลงบนใบข้าว พบว่าชุดการทดลองที่มีการพ่นเชื้อจะทำให้ต้นข้าวมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ใส่ปุ๋ยเรียบ 12 กิโลกรัมต่อไร่

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับที่ดัดแปลงวิทยานิพนธ์ภายในการอนุสืบเชิงแต่งเติม

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 SAEHANONT,

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 μ mole/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 วิศวกรรมศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต ๗๗๗๗๗๗๗๗๗๗๗๗๗

สาขาวิชา วิศวกรรมศาสตร์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ๗๗๗๗๗๗๗

ปีการศึกษา ๒๕๔๑

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีอิ่มของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีหันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่า ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น คิมย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี่

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชานิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โขเมตานนท์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวัฒย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริงคุลกะ คุณจิราวรรณ ชนะ คุณศิริวิทย์ สิตาเรช และคุณอดิศักดิ์ หรรษ์รัตนการ เพื่อนผู้ช่วยให้ความช่วยเหลือมาตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรักอย่างสูงสุดของผู้วิจัย ที่เคยเป็นกำลังใจ และกำลังทรัพย์อย่างดี แด่ และขอบคุณ พี่และน้องที่เคยสนับสนุน และช่วยเหลือตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๔
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๕
กิตติกรรมประจำศศ.....	๖
สารบัญตาราง.....	๗
สารบัญรูป.....	๘
คำย่อ.....	๙
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. แสดงชนิดของประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงในโตรเจนได้	7
2. แสดงตัวรับอิเลคตรอนหรือชั้บสเตรท, ผลที่เกิดขึ้นและจำนวนอิเลคตรอน ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอ็นไซม์ในโตรเจนส์ 24	
3. แหล่งที่มาของแบคทีเรียที่สามารถตรึงในโตรเจนทั้ง 15 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากในข้าว 45	
4. ผลการวิเคราะห์อัตราการตรึงในโตรเจนโดยวิธีอะเซธิลีน ริดกชั่น และ ¹⁴ น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ปราศจากในโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 46	
5. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 กับ ¹⁴ แบคทีเรีย <i>Azomonas insignis</i> 51	
6. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 กับ ¹⁴ แบคทีเรีย <i>Azotobacter chocoococcum</i> 52	
7. เปรียบเทียบคุณสมบัติ และลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 กับ ¹⁴ แบคทีเรีย <i>Azomonas agilis</i> 53	
8. สรุปพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการตรึงในโตรเจนของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ 3 สายพันธุ์ ซึ่งวัดโดยอะเซธิลีน ริดกชั่น เทคนิค 74	
9. สรุปพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้...74	
10. ปริมาณในโตรเจนที่วิเคราะห์ได้จากการดินแหล่งต่าง 75	
11. ความสูงและน้ำหนักแห้ง ของต้นข้าวที่ปลูกในระบบทดลองต่าง ¹⁴ เมื่อต้นข้าวอายุได้ 3 เดือน 76	

สารบัญ

รูปที่	หน้า
1. วัฏจักรของไนโตรเจน	5
2. ความสัมพันธ์ระหว่าง Phyllosphere กับ Rhizosphere ในระบบนิเวศน์.....	12
3. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ในโตรจีเนส ในการเกิดอะเซติลีน ริดักชั่น.....	17
4. องค์ประกอบของเอนไซม์ในโตรจีเนส	21
5. ปฏิกิริยาชั้นแรกที่เกิดขึ้นระหว่างก๊าซในโตรเจน กับเอนไซม์ในโตรจีเนส.....	26
6. กลไกการทำงานของเอนไซม์ GDH GS และ GOGAT.....	28
7. เปรียบเทียบความสามารถในการดึงในโตรเจนของแบคทีเรีย ^{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. ประสิทธิภาพการดึงในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่ปรับผันแปรลงcarbон กลูโคส ชูโคลส หรือmannitol ที่อุณหภูมิห้อง.....	55
12. ประสิทธิภาพการดึงในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่ปรับผันแปรลงcarbон กลูโคส ชูโคลส หรือmannitol ที่อุณหภูมิห้อง.....	57
13. ประสิทธิภาพการดึงในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่ปรับผันแปรลงcarbон กลูโคส ชูโคลส หรือmannitol ที่อุณหภูมิห้อง.....	59

สารบัญ

รูปที่	หน้า
14. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส	62
15. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส	64
16. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส	66
17. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิ ห้อง.....	68
18. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิ ห้อง.....	70
19. ประสิทธิภาพการตรวจในโตรเจน (ก) และอัตราการเจริญ (ข) ของ แบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 12 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากในโตรเจน ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ณ.ที่อุณหภูมิ ห้อง.....	73
20. เปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวในชุดการทดลองต่าง ๆ	77
21. เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในชุดการทดลองต่าง ๆ	79
22. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กช 1 อายุ 3 เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด แสดงแบบที่เรียสายพันธุ์ที่ 2 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว.....	80

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
23. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กข1 อายุ 3เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 6 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว.....	81
24. ภาพถ่ายใบข้าวเจ้าสายพันธุ์ กข1 อายุ 3เดือน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 12 ที่เจริญอยู่บนใบข้าว.....	81
25. ใบข้าวที่ไม่ได้พ่นเชือแบคทีเรีย เมื่อถูกนำไปตั้งกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด.....	82

**สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

อักษรย่อ

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย