

247397

รายงานการวิจัย

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



247397



การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร่อ้อย

Screening of high efficiency nitrogen-fixing bacteria  
from field-grown sugarcane

ผศ.ดร.สุวรรณ เนียมสนิท

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.ดร.นิภา มลิณฑวิสัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจคิด

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

600252 686

247397

รายงานการวิจัย

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



247397



การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร่อ้อย

Screening of high efficiency nitrogen-fixing bacteria  
from field-grown sugarcane



ผศ.ดร.สุวรรณ เนียมสนิท

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.ดร.นิภา มลิณฑิสมัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจคิด

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

## บทคัดย่อ

247397

ในการปลูกอ้อยจำเป็นต้องเติมปุ๋ยเคมี ปุ๋ยไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และ โพแทสเซียม (K) เพื่อเพิ่มผลผลิตอ้อย การที่ฝนตกหนักและมีการย่อยสลายของสารอินทรีย์ทำให้เกิดการชะและสูญเสียปุ๋ยไนโตรเจน นอกจากนี้ปุ๋ยไนโตรเจนยังหายากและมีราคาแพง ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของปุ๋ยไนโตรเจนที่จะเพิ่มผลผลิตและทำให้เกิดการเกษตรที่ยั่งยืนโดยไม่ทำอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินรอบรากอ้อยจากราก ลำต้นของอ้อยในจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียง การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้อาหาร LGIP medium ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในเบื้องต้นได้จำนวน 48 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อไปทดสอบต่อโดยวิธี ARA พบเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ 15 ไอโซเลท โดยเชื้อ 3KLW, 1LS6pH7w และ 2LAPh7w มีกิจกรรมของ nitrogenase enzyme สูงสุด แต่ถ้าเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ mg protein ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อ 1LSO1, 1LS7 และ 3KLW มีค่ากิจกรรมของ nitrogenase enzyme/mg protein สูงสุด โดยเชื้อ isolate 1LS6pH7w และ 1LSO1 ซึ่งเป็น endophyte และ free living bacteria สร้าง IAA มีปริมาณสูงสุดคือ 36.48 และ 37.84  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ วิธีทดสอบความสามารถของเชื้อในการละลายฟอสเฟตที่เหมาะสมควรใช้ Pikovskaya's agar ที่มีการเทอาหาร 2 ชั้น คือชั้นล่าง 10 ml ไม้ได้ tricalcium phosphate ส่วนอาหารชั้นบน 10 ml ไม้ได้ tricalcium phosphate ครั้งหนึ่งของสูตรอาหาร ทำให้อ่านผลได้หลังจากบ่มเชื้อ 1-3 วัน เชื้อแบคทีเรีย isolate 4LSpH7 เป็น endophytic bacteria ที่คัดแยกได้จากส่วนของลำต้นของอ้อย และเชื้อแบคทีเรีย isolate 3LSO4 เป็น free living bacteria ที่คัดแยกได้จากดินรอบรากอ้อยมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด โดยให้ค่า solubilizing index (SI) เท่ากับ 3.66 และ 2.5 ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทดสอบต่อในกระถาง ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนไอโซเลทต่างๆ ดังนี้คือ 5LSO2, 3LSO1, และ 1LSO1 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน อีกกลุ่มคือ 1LS6pH7w และ 2LAPh7w ที่คัดแยกได้จากลำต้นของอ้อยและยอดอ้อย ตามลำดับ

## Abstract

247397

In sugarcane crop, application of chemical, nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) fertilizer are necessary to increase yield. Heavy rains and rapid decomposition of organic matter in soil cause leaching and rapid loss of N-fertilizers. In addition, nitrogenous fertilizers are becoming more scarce and costly. Therefore, nitrogen-fixation is one of the possible biological alternatives to nitrogen fertilizers and could lead to more productive and sustainable agriculture without harming the environment. The present works aim to isolate nitrogen fixing bacteria (NFB) from rhizosphere, root and shoot of sugarcane in Khon Kaen Province and nearby. Forty-eight isolates of NFB were isolated by using LGIP medium, which have no N content. Fifteen isolates of the bacteria showed high efficient acetylene reduction activity (ARA) assay. The isolate 3KLW, 1LS6pH7w and 2LAPh7w showed highest activity of nitrogenase enzyme, respectively. However, isolate 1LSO1, 1LS7 and 3KLW had highest nitrogenase activity/mg protein in culture media, respectively. Isolate 1LS6pH7w and 1LSO1, which are endophyte and free living bacteria produced highest IAA to 36.48 and 37.84  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Doublelayer of Pikovskaya's agar was he appropriate method for evaluating phosphate solubilization. The bottom layer of the 10 ml of the medium had no tricalcium phosphate, while the 10 ml of the upper layer contained half strength of tricalcium phosphate. This led to rapid evaluate the results within 1-3 days after incubation. The isolate 4LSpH7, endophytic bacteria isolated from stem of sugarcane, and the isolate 3LSO4, free living bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane exhibited highest ability to solubilized phosphate with SI of 3.66 and 2.5, respectively. The isolate 5LSO2, 3LSO1, and 1LSO1; free living bacteria from rhizosphere, and isolate 1LS6pH7w and 2LAPh7w; endophytic bacteria from shoot and apical of sugarcane, were selected for future cultivation of sugarcane in pot.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 จาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณัฐวุฒิ มีศิลป์ ผู้ช่วยวิจัยและขอขอบคุณ ผศ.วิรัช ว่องพัฒนากุล ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับ Gas Chromatography จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

# สารบัญเรื่อง

| เรื่อง  | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย   | i    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ  | ii   |
| กิตติกรรมประกาศ   | iii  |
| สารบัญเรื่อง  | iv   |
| สารบัญตาราง   | vi   |
| สารบัญรูปภาพ  | vii  |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ   | viii |
| บทที่ 1 บทนำ  | 1    |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย  | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย   | 2    |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย   | 3    |
| 1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี  | 3    |
| 1.5 แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย   | 3    |
| 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ   | 4    |
| 1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง   | 4    |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการศึกษา  | 7    |
| 2.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน ราก และลำต้นอ้อยจากแปลงปลูกอ้อย  | 7    |
| 2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดิน<br>(Free living bacteria) ขึ้นปฐมภูมิ                      | 7    |
| 2.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยในส่วนของราก ลำต้นและ<br>ยอดอ้อยแบบพึ่งพากัน (Endophytic bacteria) ขึ้นปฐมภูมิ | 7    |
| 2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนขึ้นทุติยภูมิ   | 8    |
| 2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry  | 8    |
| 2.6 การศึกษาการสร้าง Indole acetic acid (IAA) ของเชื้อแบคทีเรีย   | 9    |
| 2.7 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต  | 9    |

| เรื่อง   | หน้า |
|--|------|
| บทที่ 3 ผลการวิจัย   | 11   |
| 3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน ราก และลำต้นย่อยจากแปลงปลูกอ้อย                                   | 11   |
| 3.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เป็น free living และที่เป็น endophyte<br>ในชั้นปฐมภูมิ | 11   |
| 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชั้นทุติยภูมิ                                | 12   |
| 3.4 การศึกษาการสร้าง Indole acetic acid (IAA) ของเชื้อแบคทีเรีย                                  | 15   |
| 3.5 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต   | 16   |
| 3.6 สรุปคุณสมบัติโดยรวมของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน   | 21   |
| บทที่ 4 วิจารณ์ผลการวิจัย  | 22   |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย   | 25   |
| เอกสารอ้างอิง  | 26   |
| ภาคผนวก  | 29   |
| ภาคผนวก 1    อาหารเลี้ยงเชื้อ  | 29   |
| ภาคผนวก 2    สารเคมี   | 32   |
| ภาคผนวก 3    กราฟมาตรฐานแก๊สเอทิลีน  | 33   |
| ภาคผนวก 4    กราฟมาตรฐานโปรตีน   | 34   |
| ภาคผนวก 5    กราฟมาตรฐาน Indole Acetic Acid  | 35   |

## สารบัญตาราง

|            | หน้า   |    |
|------------|--|----|
| ตารางที่ 1 | จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่เรียงใน โตรเจนที่คัดแยกได้โดยใช้<br>อาหาร LGIP จากดินและส่วนต่างๆ ของอ้อยจากแต่ละจังหวัด                             | 11 |
| ตารางที่ 2 | จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้อาหาร Nutrient agar<br>และ King's B medium จากดินและส่วนต่างๆ ของอ้อยจากแต่ละจังหวัด                     | 17 |
| ตารางที่ 3 | ค่า Solubilization index (SI) ของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้บาง<br>ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหาร double-layer Pikovskaya's agar เป็น<br>ระยะเวลา 7 วัน | 18 |
| ตารางที่ 4 | การเปลี่ยนสีและค่า pH ในการทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหาร<br>NBRIP medium  | 19 |
| ตารางที่ 5 | ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบในอาหาร Pikovskaya's agar 2 ชั้นและ<br>NBRIP medium   | 20 |
| ตารางที่ 6 | คุณสมบัติโดยรวมของเชื้อแบคทีเรียที่เรียงใน โตรเจน  | 21 |

## สารบัญรูปภาพ

|           | หน้า  |    |
|-----------|---|----|
| รูปที่ 1  | โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร LGIP   | 12 |
| รูปที่ 2  | Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส ethylene เมื่อฉีด ethylene อย่างเดียว  | 12 |
| รูปที่ 3  | Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส acetylene เมื่อฉีด acetylene อย่างเดียว  | 13 |
| รูปที่ 4  | Chromatogram, retention time และ peak area ของแก๊ส ethylene และ acetylene เมื่อฉีด ethylene และ acetylene ร่วมกัน                   | 13 |
| รูปที่ 5  | Nitrogenase activity ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท หน่วยเป็น nmol ethylene/hr เมื่อตรวจสอบด้วย Acetylene Reduction Assay            | 14 |
| รูปที่ 6  | Nitrogenase activity ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท หน่วยเป็น nmol ethylene/hr/mg protein เมื่อตรวจสอบด้วย Acetylene Reduction Assay | 14 |
| รูปที่ 7  | ปริมาณสาร Indole-3 acetic acid ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอ้อย ที่เป็น endophytic bacteria                             | 15 |
| รูปที่ 8  | ปริมาณสาร Indole-3 acetic acid ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน รอบรากอ้อยที่เป็น Free living bacteria                   | 16 |
| รูปที่ 9  | การเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน  | 18 |
| รูปที่ 10 | การเปลี่ยนสีของอาหาร NBRIP ที่มี Bromophenol blue เป็น indicator  | 19 |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|       |   |
|-------|---|
| ARA   | acetylene reduction assay                                       |
| ACC   | 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid                           |
| cfu   | colony forming unit   |
| °C    | degree Celsius  |
| FID   | flame ionized detector  |
| g     | gram  |
| GC    | gas chromatography  |
| IAA   | indole-3-acetic acid  |
| IAM   | indole acetamide  |
| kg    | kilogram  |
| l     | liter   |
| μl    | microliter  |
| min   | minute  |
| ml    | milliliter  |
| nm    | nanometer   |
| N     | nitrogen  |
| NBRIP | National Botanical Research Institute's phosphate growth medium |
| %     | percent   |
| PGPB  | plant growth promoting bacteria                                 |
| rpm   | round per minute  |
| rRNA  | ribosomal ribonucleic acid                                      |
| SAR   | systemic acquired resistance                                    |