การแยกและศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบางชนิดจากรากข้าว

นางสาว ปุณฑริกา หะริณสุต

003736

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2524

I16564130

Isolation and Characterization of some Nitrogen Fixing Aerobic Diazotrophic Bacteria from Rice Rhizosphere

Miss Poontariga Harinasut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1981

Thesis Title	Isolation and Characterization of some Nitrogen Fixing Aerobic Diazotrophic Bacteria from Rice Rhizosphere.
By	Miss Poontariga Harinasut.
Department	Biochemistry.
Thesis Advisor	Assistant Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate School Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

S. Bunnag
..... Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Kamchad Mongkolkul
..... Chairman
(Associate Professor Kamchad Mongkolkul, Ph.D.)

Jariya Boonjawat
..... Member
(Assistant Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

P. Thipayathasana
..... Member
(Associate Professor Pairoh Thipayathasana, Ph.D.)

Prakitsin Sihanonth
..... Member
(Assistant Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)

Chob Kanareugsa
..... Member
(Dr. Chob Kanareugsa)

Copyright of the Graduate School Chulalongkorn University.

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบางชนิดจากรากข้าว

ชื่อนิสิต นางสาว ปุณฑริกา หะริณสุต

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2523

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตบริเวณรากข้าว ซึ่งปลูกในสถานีทดลองที่มีคุณสมบัติของดินต่างกัน 3 แห่ง 2 แห่งแรกได้แก่สำนักงานเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และสถานีทดลองข้าวชุมแพ ที่จังหวัดขอนแก่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และอีกแห่งคือที่สถานีทดลองข้าวรังสิต จังหวัดปทุมธานีในภาคกลาง เมื่อประเมินโดยใช้วิธีอะเซทีลีนรีดักชั่นในขวดทดลองปรากฏว่า ชนิดของดินน่าจะมีอิทธิพลต่อรูปแบบของศักยภาพการตรึงไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบในแปลงนาทดลองที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและปลูกข้าวพันธุ์เดียวกัน คือ กข. 7 ดินที่เป็นกรด เช่นที่รังสิต ซึ่งมี pH 4.0 พบว่า ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่อยู่ภายในราก ขณะที่ดินที่ชุมแพซึ่งมี pH สูงกว่า คือ 5.8 - 6.1 มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนทั้งที่ผิวรากและภายในราก ดังนั้น ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนในดินกรด จึงค่อนข้างต่ำ การใส่ปุ๋ยชนิดต่าง ๆ และการปลูกข้าวต่างพันธุ์กันมีส่วนทำให้ค่าศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในที่นั้นเปลี่ยนแปลงได้ แต่ไม่เปลี่ยนรูปแบบการตรึงไนโตรเจน ปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดที่ถูกตรึงโดยแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในบริเวณรากข้าว ที่สถานีทดลองทั้ง 3 แห่ง อยู่ในช่วง 20 - 72 กิโลกรัมต่อเฮคตาร์ต่อหนึ่งฤดูการเพาะปลูก

จากตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณราก ซึ่งตรวจพบอะเซทีลีนรีดักชั่นแอคติวิตี ได้แยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ 259 ตัว โดยทดสอบว่ามีการเจริญดีบนอาหารวุ้นที่ปราศจากไนโตรเจน แบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้เมื่อย้อมสีแกรมเป็นลบ และมีรูปร่างเป็นแท่งลักษณะโคโลนี โดยทั่วไปเป็นชนิดกลมขนาดเล็กเท่าปลายเข็มหมุด (เล็กกว่า 1 มม.) และผลิตเมือก ระยะเวลาที่สังเกตเห็นโคโลนีคือภายหลังจากบ่ม

เป็นเวลา 1 - 5 วัน หลังจากเพาะเชื้อ กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แยกได้จากชุมแพมีความคล้ายคลึงของอัตราการฟอร์มโคโลนีมากที่สุด กล่าวคือมากกว่า 90% ของแบคทีเรีย (30/33) สร้างโคโลนี หลังจากใช้เวลาบ่มเพียง 1 วัน ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียที่แยกมาจากรังสิตและท่าพระใช้เวลาสร้างโคโลนี 1 - 3 วัน และ 1 - 5 วัน ตามลำดับ จากการทดสอบอะเซธีลีนรีดักชั่นแอคติวิตีของแบคทีเรีย ทั้งหมดนี้ปรากฏว่า แบคทีเรีย 22 ตัว หรือ 8% ของทั้งหมด มีแอคติวิตีสูงกว่า 1 ไมโครโมล/OD 420/วัน จึงได้คัดเลือกเอาแบคทีเรียในกลุ่มนี้มา 8 ตัว เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่อไป

จากลักษณะการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และ pH ของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ทำให้แบ่งแบคทีเรียได้อย่างน้อย 3 กลุ่ม กลุ่ม A และ B มีการเจริญดีที่สุดที่อุณภูมิ 37 °ซ และ pH ของอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่เสริมด้วย 10% อาหารเหลวอุดม เป็น 7.5 แต่การเจริญของกลุ่ม B ไวต่อการลดลงของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อน้อยกว่ากลุ่ม A และตอบสนองต่อการลดลงของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสองช่วง ส่วนกลุ่ม C แตกต่างอย่างเด่นชัดจากกลุ่มอื่นเนื่องจากเจริญได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 42 - 46 °ซ และการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่เสริมด้วย 10% ของอาหารเหลวอุดมจาก 7.5 ถึง 5.5 มีอิทธิพลต่อการเจริญเพียงเล็กน้อย แบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มปล่อยสารที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งทำให้ pH ลดลงจนสังเกตได้ภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง กลุ่ม A แสดงอะเซธีลีนรีดักชั่นแอคติวิตีสูงสุด 52 นาโนโมล /OD_{420}/ชม. ที่ตอนต้นของระยะการเจริญคงที่ในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจน กลุ่ม B แสดงอะเซธีลีนรีดักชั่นแอคติวิตีสูงสุด 75 นาโนโมล/OD_{420}/ชม. ในระยะกึ่งกลางล็อค ส่วนกลุ่ม C ภายหลังการถ่ายเชื้อหลายครั้ง ไม่สามารถวัดอะเซธีลีนรีดักชั่นแอคติวิตี ในระยะการเจริญต่าง ๆ ได้เพราะปริมาณเซลที่เลี้ยงได้ในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนมีน้อยมาก จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลและโคโลนีประกอบกับคุณสมบัติทางสรีรวิทยาบางอย่างของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มชี้แนะว่าแบคทีเรียในกลุ่ม A และ B อาจจะอยู่ในจีนัส Derxia gumosa และกลุ่ม C อาจจะเป็นสายพันธุ์ ในจีนัส Azospirillum lipoferum หรือ Azospirillum brasilense อย่างใดอย่างหนึ่ง

Thesis Tittle	Isolation and Characterization of some Nitrogen Fixing Aerobic Diazotrophic Bacteria from Rice Rhizosphere.
Name	Miss Poontariga Harinasut.
Thesis Advisor	Assistant Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
Department	Biochemistry.
Academic Year	1980.

ABSTRACT.

The rhizospheric biological nitrogen-fixing potential was evaluated throughout one rice growing season by using the in vitro acetylene reduction method at three experimental sites with different soil properties. Chumpae and Tapra are the two sites in Khonkan Province in the North-Eastern part, and Rangsit is the only one site in the central plain. Our study showed that the soil type may influence the profiles of the nitrogen fixing potential of the same rice variety (RD. 7) grown in the absence of fertilizer application. In the acid soil (Rangsit, pH 4.0), the dominant nitrogen fixing potential seemed to reside in the inner rhizosphere, whereas at Chumpae (pH 5.8-6.1) both rhizophane and inner rhizospheric activity were observed, therefore the rhizospheric dinitrogen fixing potential was rather low in acid soil. Different types of fertilization and rice varieties might cause variable values of the maximum nitrogen fixing potential but did not change the profiles. The amount of total nitrogen fixed by the aerobic bacteria in the rhizosphere at

the three sites studied was in the range of 20-72 kg per hectare per crop.

Two hundred and fifty nine pure bacterial cultures were isolated from the rice root and rhizospheric soil samples showing positive acetylene reduction activity, and by testing their growth on nitrogen free plates in aerobic condition. All the rhizospheric nitrogen fixing bacteria isolated were the Gram negative rod. In general the colonial morphology were slimy, circular shape and pin-point size. The rate of colony formation ranged from 1-5 days after incubation. The bacterial population isolated from Chumpae showed the highest order of homogeneity according to the rate of colony formation. More than 90% of the bacterial cultures (30/33) formed colony after one day of incubation, whereas the bacterial population at Rangsit and Tapra required 1-3 days and 1-5 days of incubation respectively. There were 22 bacterial cultures (8%) that showed acetylene reduction activity higher than 1 umol/OD_{420}/d. Eight bacterial cultures selected from these top 8% were used for further characterization.

According to their responses to changes of temperature and pH of the growth medium, at least three catagories of rhizospheric nitrogen fixing bacteria were observed. Group A and B showed the optimum temperature and pH for growth at 37°C and 7.5 in the nitrogen free nedium supplemented with 10 % rich medium, but Group B was less sensitive to a slightly decrease in the temperature and showed the biphasic responses to the decrease

in pH comparing to Group A. Group C was distinguished by showing the optimum temperature at 42-46°C and the variation of the pH of the nitrogen free medium supplemented with 10 % rich medium from 7.5 to 5.5 slightly affected their growth. All of the three groups produced acidic substances in glucose and yeast extract based broth which decreased pH of medium after 5 hours of incubation. Group A showed the maximum acetylene reduction activity of 52 nmol/OD_{420}/hr at early stationary phase of growth in nitrogen free medium. Group B showed the maximum acetylene reduction activity of 75 nmol/OD_{420}/hr in their midlog phase. Because of the failure to produce a large number of bacterial cells of Group C in the nitrogen free medium after several transfers, the acetylene reduction activity related to stages of growth of the bacteria in Group C was not detected. Cellular and colonial morphology and some physiological studies indicated that the bacteria in Group A and B may be in the Genus Derxia gumosa and the bacteria in Group C may be some variant strains of either Azospirillum lipoferum or Azospirillum brasilense.

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGMENTS.

The author has a deep sense of gratitude to Dr. Jariya Boonjawat for her supervision, valuable advice and encourangement to this thesis.

Her deep appreciation is also expressed to Dr. Kamchad Mongkolkul, Dr. Pairoh Thipayathasana, Dr. Prakitsin Sihanonth and Dr. Chob Kanareugsa for serving as thesis committee and for encourangement, comments and useful suggestions during the preparation of this thesis.

The author is much obliged to Mrs. Yenchai Vasuwat and Mr. Woravich Rungrathanakasin for their kind permission to use the gas chromatograph.

The author is indebted to the personal of the three rice experimental sites, Tapra, Chumpae and Rangsit for their good care of the experimental plots and their sincere help in samples collection.

Lastly the author would like to thank the Graduate School, Chulalongkorn University and the National Research Council of Thailand for providing supporting fund and the Biochemistry Department for providing of facilities for this thesis.

CONTENTS.

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	ix
CONTENTS	x
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER.	
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	19
III. RESULTS.	
1. The influence of soil type on the N_2-fixing potential	32
2. The influence of fertilizer application on the N_2-fixing potential	34
3. The influence of rice variety on the N_2-fixing potential	38
4. The evaluation of total N_2-fixing potential percrop	41
5. The morphology of isolated purs bacterial culture	45
6. Screening for heterotrophic diazotroph having high N_2-fixing activity	49
7. Characterization of the aerobic diazotrophic bacteria	51

Page

IV. DISCUSSION.

1. The sample collection..... 59

2. The samples preparation..... 61

3. ARA associated with the rice root and rhizospheric soil samples..... 63

4. The N_2-fixing potential profiles..... 65

5. The morphology and ARA of the isolated N_2-fixing bacteria..... 69

6. The characteristics of the selected rhizospheric diazotrophs..... 70

REFERENCES..... 75

APPENDIX..... 83

BIOGRAPHY..... 84

LIST OF TABLES.

Table. Page

1. Evaluation of the N_2-fixing activity of the rice paddy fields in Thailand..... 16
2. Soil types and composition of the experimental sites..... 19
3. The application of chemical fertilizer at Tapra, North-Eastern Agricultural Bureau..... 20
4. The application of chemical fertilizer at Chumpae Rice Experiment Station..... 20
5. The application of chemical fertilizer and rice straw compost at Rangsit Rice Experiment Station..... 21
6. The rice varieties grown at the three experimental sites. 21
7. Date of sample collections..... 22
8. Operating condition of the gas chromatographs..... 25
9. The morphology of the bacterial cultures isolated from rice rhizosphere at Chumpae 44
10. The morphology of the bacterial cultures isolated from rice rhizosphere at Rangsit..... 45
11. The morphology of the bacterial cultures isolated from rhizospheric non-stricky rice at Tapra..... 47
12. The morphology of the bacterial cultures isolated from rhizospheric sticky rice at Tapra..... 48
13. The taxonomic characteristics of some aerobic diazotrophic bacteria..... 73
14. The original information of eight characterized bacterial cultures..... 83

LIST OF FIGURES.

Figure.		Page
1.	The principle of reactions of the Nitrogen Cycle.....	2
2.	Hypothetical structure of a nitrogenase molecule.....	6
3.	The principal agents of biological N_2-fixation in a rice paddies.....	11
4.	The N_2-fixing potential in the non-fertilized plot....	33
5.	The N_2-fixing potential in the non-fertilized and fertilized plots at Rangsit.....	35
6.	The N_2-fixing potential in the non-fertilized and fertilized plots at Chumpae.....	37
7.	The N_2-fixing potential associated with non-sticky rice (RD.15, Kowmali) and sticky rice (RD. 6, Sanpatong).....	39
8.	The evaluation of total nitrogen fixed by rhizospheric bacteria per hectare per crop.....	42
9.	The histograns of the number of isolated bacterial cultures from difference screened by the difference in the level of ARA.....	50
10.	The effect of temperature on the growth of aerobic diazotrophs.....	52
11.	The effect of pH on the growth of aerobic diazotrophs.....	54
12.	The growth curve of the nitrogen fixing bacteria in NF + 10 % rich medium.....	56

Figure. Page

13. The relationship between ARA and stage of growth of the rhizospheric diazotrophs..... 58

ABBREVIATIONS.

ARA	=	Acetylene reduction activety
ha	=	Hectare
N	=	Nitrogen
NF	=	Nitrogen free
YE	=	Yeast extract.