

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

SCREENING OF CYANOBACTERIAL STRAINS SUITABLE FOR
BIOFERTILIER PRODUCTION



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณนางสาวศรินยา ใจตรง ผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการนี้ นักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัย นางสาวสุรัตน์ดิพร รัตนะ นางสาวรุ่งอรุณ สุขสำราญ และนายสามารถ ต่ายขาว ที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

Screening of Cyanobacterial Strains Suitable for Biofertilizer Production

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2552 จำนวนเงิน 200,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมายโทรศัพท์

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง จังหวัดกรุงเทพฯ 10520 โทร. 0-2329-8400-11 ต่อ 336 โทรสาร 0-
2329-8427

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการส่งออกส่วนใหญ่เป็นผลิตผลทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าว หนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตข้าวก็คือปุ๋ย ปัจจุบัน รัฐบาลได้ส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ปุ๋ยชีวภาพแทนปุ๋ยเคมี เนื่องจากไม่มีสารตกค้างและไม่เป็นอันตรายต่อดินและระบบนิเวศ ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียที่พืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียจากนาข้าวและดินนาในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งเหมาะสมจะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างน้ำและดินนามาคัดแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย พบว่าได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 15 ไอโซเลท จากนั้น นำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 เพื่อศึกษาการเจริญ ทดสอบการตรึงไนโตรเจนในแต่ละไอโซเลทโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11₀ ซึ่งปราศจากแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองพบว่า มีเพียงไอโซเลท B14 เท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ โดยสามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน จากนั้นคัดเลือกไอโซเลท B14 มาศึกษาความทนต่อยาปราบวัชพืช โดยเฉพาะเลี้ยงไอโซเลท B14 ในอาหารที่มียาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium และ Pyrazosulfuron-ethyl จากการทดลองพบว่า ไอโซเลท B14 สามารถทนต่อยาปราบวัชพืชได้ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 และ 1.0 ส่วนต่อพันส่วนตามลำดับ จากนั้น ศึกษาความทนต่อยาฆ่าแมลง โดยเฉพาะเลี้ยงไอโซเลท B14 ในอาหารสูตรที่มียาฆ่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมลง Abamectin พบว่าไอโซเลท B14 สามารถทนต่อยาฆ่าแมลงได้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.01 ส่วนต่อพันส่วน สุดท้าย ศึกษาความทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่า ไอโซเลท B14 สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.1 โมลาร์

ABSTRACT

Thailand is a agricultural country that mainly exports agricultural products especially rice. One of the factors affecting rice production yield is fertilizer. Today, the government encourages farmers in use of a biological fertilizer instead of a chemical fertilizer because it does not emit residual chemicals, affect much soil quality and ecology. In biofertilizer production, the nitrogen fixing cyanobacteria can be used as a raw material due to the presence of the atmospheric nitrogen fixation capability resulting in ammonia production that plant can use for growth. This research aims to screening cyanobacterial strains isolated from rice paddle fields and rice soils in North and Northeast part of Thailand that are suitable for using as biofertilizer. Water and soil samples were harvested and filamentous cyanobacteria were isolated. It was found that 15 cyanobacterial isolates were purified. Afterthat, they were cultivated in BG11 medium for growth study and in BG11₀ medium without nitrogen sources for nitrogen fixing determination. The result showed that only isolate B14 could fix atmospheric nitrogen and grow in BG11₀ medium. In addition the herbicides, insecticide and salt tolerance of isolate B14 were investigated. It was found that isolate B14 showed the herbicides tolerance of Glyphosate-isopropylammonium and Pyrazosulfuron-ethyl at final concentration of 0.1 and 1.0 ppt, respectively, the insecticide tolerance of Abamectin at final concentration of 0.01 ppt and the salt tolerance of NaCl at final concentration of 0.1 M.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญรูป.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	10
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์การทดลอง.....	13
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	23
บรรณานุกรม.....	24
ภาคผนวก ก.....	27
ภาคผนวก ข.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ลักษณะของตัวอย่างไฮยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคกลาง.....29-31
2	ลักษณะของตัวอย่างไฮยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....32-33



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	กระบวนการตรึงไนโตรเจนในเฮเทอโรซิสต์.....4
1.2	องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์.....5
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างดินนาและตัวอย่างน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....14
3.2	การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ในอาหาร BG11 และอาหาร BG11 ₀ และปริมาณคลอโรฟิลล์เอในอาหาร BG11 และในอาหาร BG11 ₀16-17
3.3	การเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium.....18
3.4	การเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl..... 19
3.5	การเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง Abamectin.....20
3.6	การเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ เอของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การพัฒนากระบวนการผลิตและการเพิ่มผลิตผลทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัย ปุ๋ยจัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่จะช่วยให้พืชได้รับธาตุอาหารที่เพียงพอและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ซึ่งส่งผลทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มสูงขึ้น ในปัจจุบันรัฐบาลให้การสนับสนุนและส่งเสริมเกษตรกรในการใช้ปุ๋ยชีวภาพทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยชีวภาพจึงจัดเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในทางการเกษตรมีการนำเอาไซยาโนแบคทีเรียมาใช้เป็นวัตถุชีวภาพในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียในการผลิตแหล่งอาหารไนโตรเจนให้แก่พืชเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในการเพาะปลูกข้าว เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติพิเศษในการเจริญเติบโตได้ดีในน้ำหรือที่ชื้นแฉะ และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปของสารประกอบแอมโมเนีย และแอมโมเนียที่ผลิตขึ้นนี้จะเป็อาหารสำหรับพืชต่อไป นอกจากนี้ เมื่อไซยาโนแบคทีเรียตายลงยังเป็นแหล่งแร่ธาตุให้แก่ดิน ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น

ในประเทศไทย ได้มีการนำเอาปุ๋ยชีวภาพมาใช้ทดแทนการใช้กับปุ๋ยเคมี โดยพบว่าสามารถทำให้ผลผลิตข้าวในกระถางสูงขึ้น 10-25 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการเพาะปลูกในนาข้าว ปุ๋ยชีวภาพสามารถทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นเพียง 3-5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการนำเอาไซยาโนแบคทีเรียมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในนาข้าว มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ทนต่อสารเคมีและความเค็ม และต้องอยู่รอดได้ดีหลังจากการทำแห้งและบรรจุขาย โครงการวิจัยนี้ ได้สนใจศึกษาการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพจากดินและน้ำในนาข้าวในบริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ของประเทศไทย รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการตรึงไนโตรเจน ทนต่อความเค็ม ทนต่อยาปราบวัชพืชและยาฆ่าแมลง

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยจัดเป็นวัสดุที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารชนิดต่างๆ เมื่อเติมลงสู่ดินจะช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินและส่งผลให้การเพาะปลูกพืชได้ผลผลิตในปริมาณสูงขึ้น ในอดีต เกษตรกรใช้ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด ฯลฯ เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ต่อมา ได้มีการคิดค้นปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นปุ๋ยที่มีธาตุอาหารในปริมาณสูง ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่หันมานิยมใช้ปุ๋ยเคมีแทนการใช้ปุ๋ยอินทรีย์เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย ได้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตาม ปุ๋ยเคมีนั้นมีข้อเสียหลายประการ คือ ไม่มีคุณสมบัติในการปรับปรุงโครงสร้างของดิน และเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะส่งผลทำให้ดินเสื่อมสภาพลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในดิน ทำให้ผลผลิตที่ได้อาจมีการปนเปื้อนสารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ กรรมวิธีในการผลิตปุ๋ยเคมีส่วนใหญ่มาจากขบวนการ Harber-Bosch process ที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง 300 ถึง 400 องศาเซลเซียส และความดัน 35 ถึง 100 เมกะปาสคาลในการทำปฏิกิริยา ดังนั้น การผลิตจึงเป็นขบวนการที่มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด (<http://haberchemistry.tripod.com>) ปัจจุบัน ภาครัฐได้ให้ความสำคัญในการอนุรักษ์ดินและรักษาสภาพแวดล้อม จึงได้มีการพัฒนาและวิจัยการใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) คือ ปุ๋ยที่มีจุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารประกอบของธาตุอาหาร หรือช่วยให้ธาตุอาหารเหล่านั้นอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ปุ๋ยชีวภาพมีข้อดีหลายประการ เช่น ราคาถูกจึงช่วยลดต้นทุนการผลิตทางการเกษตร ผลผลิตที่ได้ปลอดสารเคมี ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ในดินและปรับปรุงโครงสร้างของดิน ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ ที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้ เกษตรกรยังสามารถผลิตปุ๋ยชีวภาพไว้ใช้และจำหน่ายได้อีกด้วย

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing microorganism) ได้แก่ *Rhizobium* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Clostridium* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. และ *Azospirillum* sp. กลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ 2 วิชาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

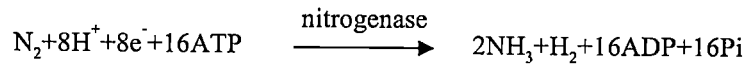
จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic microorganism) ได้แก่ *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Trichoderma* sp. จุลินทรีย์พวกนี้พบได้ในเศษพืช กิ่งไม้ เศษหญ้า ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และปุ๋ยพืชสด กลุ่มที่ 3 จุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตและธาตุอาหารอื่นๆ (phosphate and other nutrient elements solubilizing microorganism) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำให้ธาตุอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส ที่อยู่ในรูปไม่ละลายให้ละลายออกมา จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp., *Thiobacillus* sp. และเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhizal fungi)

ในต่างประเทศ มีการนำปุ๋ยชีวภาพมาใช้เพื่อปรับปรุงดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ยกตัวอย่าง เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย มีการใช้ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว ในประเทศอินเดียมีการทดลองใช้ *Azotobacter chroococcum* กับพืชหลายชนิด เช่น ข้าวเจ้า มะเขือเทศ กะหล่ำปลี ในประเทศไทย ได้มีการนำปุ๋ยชีวภาพมาใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ฯลฯ นอกจากนี้ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ยังได้ผลิตปุ๋ยชีวภาพทางการค้าจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีชื่อว่า “อัลจินัว” ซึ่งประกอบด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหลายชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Hapalosiphon* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp. และ *Tolypothrix* sp. ไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้ล้วนแต่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และให้ผลผลิตเป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่พืชต่อไป

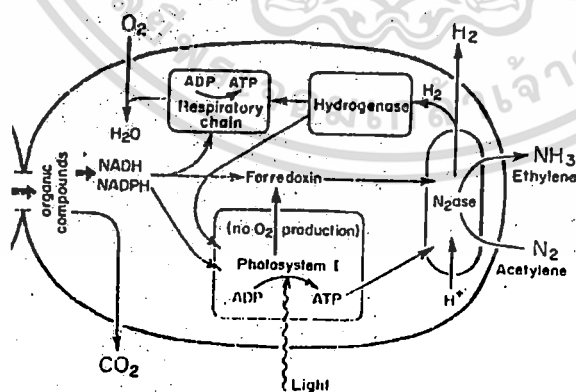
1.2.2 การตรึงไนโตรเจน

ในบรรยากาศของโลก ก๊าซไนโตรเจนจัดเป็นก๊าซที่มีปริมาณมากที่สุด โดยทั่วไป ก๊าซไนโตรเจนจะอยู่ในรูปที่ไม่ทำปฏิกิริยา สิ่งมีชีวิตบนโลกทั้งพืชและสัตว์จึงไม่สามารถใช้ไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยตรงได้ ดังนั้น พืช สัตว์และจุลินทรีย์จึงจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนในรูปที่ถูกตรึง การตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศสามารถเกิดขึ้นได้ในปริมาณเล็กน้อยจากการเกิดฟ้าแลบ ฟ้าผ่า คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด ในขณะที่การตรึงไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์เกิดจากจุลินทรีย์จำพวกโปรคาริโอตประเภทต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซีสต์ รวมถึงไซยาโนแบคทีเรีย การตรึงไนโตรเจนจากจุลินทรีย์เหล่านี้จัดเป็นการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation) โดยอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของไนโตรเจนไป

เป็นแอมโมเนีย กลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสแสดงดังสมการต่อไปนี้



ตัวอย่างของแบคทีเรียประเภทต่างๆ ที่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้แก่ แบคทีเรียที่เจริญในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เช่น *Azotobacter* sp. และ *Beijerinckia* sp. แบคทีเรียที่เจริญในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน *Clostridium pasteurianum* และแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง เช่น *Chromatium* sp., *Rhodospirillum* sp. และ *Rhodobacter* sp. รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรียหลายกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายสร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Trichodesmium* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Plectonema* sp. ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Gloeothece* sp. และ *Synechococcus* sp. เป็นต้น เฮเทอโรซิสต์จะเป็นเซลล์ที่มีขบวนการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นภายใน โดยในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศนั้น ไนโตรเจนจากอากาศจะถูกรีดิวซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส พร้อมกับปฏิกิริยาการควบคู่ของการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน ทำให้ในปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.1

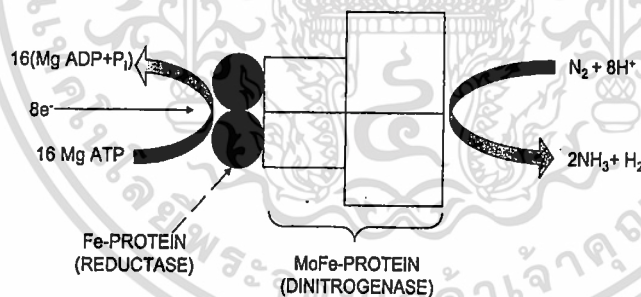


รูปที่ 1.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจนในเฮเทอโรซิสต์

ที่มา : พงศ์เทพ และ ประเสริฐ (2537)

1.2.3 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ (nitrogenase complex) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ส่วน (รูปที่ 1.2) ส่วนที่ 1 คือเอนไซม์รีดักเตส (reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โปรตีนนี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* (*nif* มาจาก *nitrogen fixation*) ส่วนที่สองคือเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* เอนไซม์นี้เป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) จึงสามารถเรียกชื่อเอนไซม์ชนิดนี้อีกชื่อหนึ่งว่าโมลิบดีนัมไนโตรจีเนส โดยประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสส่วนแรกประกอบด้วยสองหน่วยย่อย ที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่ส่วนที่สอง ส่วนที่สองประกอบด้วยสองหน่วยย่อย ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่ขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิกต่อไป แหล่งของอิเล็กตรอนที่ใช้อาจได้มาจากเฟอร์รีดอกซินในรูปรีดิวซ์ หรือเฟลโวโปรตีนในรูปรีดิวซ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน



รูปที่ 1.2 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์
ที่มา : มนตรี (2542)

ได้มีรายงานการวิจัยและศึกษากลไกการตรึงไนโตรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ อย่างกว้างขวาง (Bone, 1971; Smith and Evans, 1971; Weare and Benemann, 1973; Gaur and Singh, 1990) และยังมีรายงานการตีพิมพ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD*, *nifH* และ *nifK* ใน *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Anabaena* sp. PCC7120 (Mevarech *et al.*, 1980; Mazur and Chui, 1982), *Anabaena azollae* (Jackman and Mulligan, 1995)

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. TA1 ที่แยกได้จากดินนาในประเทศไทย (Antarikanonda, 1982) การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และองค์ประกอบของกรดอะมิโนของ *Anabaena siamensis* (พงศเทพ, 2528) การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ทนต่อความเค็มในระดับต่างๆ (พงศเทพ และประเสริฐ, 2531) นอกจากนี้ ได้มีการทดลองแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงจากดินในอำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายกและทุ่งกุลาร้องไห้ (เสนาะ, 2533; เสนาะ และคณะ, 2533)

1.2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติสำคัญที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์แสงและมีการปลดปล่อยออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุที่สำคัญ เช่น คลอโรฟิลล์ เบต้าแคโรทีน ไฟโคไซยานิน และ ไฟโคอิริทริน ฯลฯ รูปร่างของไซยาโนแบคทีเรียมีหลายแบบ เช่น มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) ไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ทั้งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน อาจอยู่แบบอิสระหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ ดังนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุที่ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) และไฟโคบิลินซึ่งมีอยู่ 4 ชนิดในไซยา

โนแบคที่เรีย ได้แก่ ซีไฟโคไซยานิน (c-phycoyananin) ซีอัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycoyanin) ไฟโคอีริโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซีไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin)

2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นในประกอบด้วยสารประเภทเซลลูโลส ชั้นกลางเป็นสารพวกเพคติน ส่วนชั้นนอกค่อนข้างหนาและหนักขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินและเมือก (ยูดี้, 2546)

3. ไซโตพลาสซึมของไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างใน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนในคือส่วนที่ไม่มีรงควัตถุเรียกว่าเซนโทรพลาสซึม (centroplasm) เป็นส่วนที่มีสารพันธุกรรมพบอยู่ในใจกลางเซลล์ ส่วนบริเวณรอบนอกเป็นบริเวณที่มีรงควัตถุอยู่เรียกว่าโครโมพลาสซึม (chromoplasm)

4. แวกิวโอลของไซยาโนแบคทีเรียจะมีขนาดเล็กกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ ในบางชนิดพบก๊าซแวกิวโอล (gas vacuole) หรือซูโดแวกิวโอล (pseudovacule) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วไป ก๊าซที่บรรจุอยู่ในก๊าซแวกิวโอลส่วนใหญ่คือก๊าซไนโตรเจนและสารประกอบไนโตรเจน

5. ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะมีการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement) (ถัดดา, 2542)

6. สารที่เก็บสะสม (reserve substance) ของไซยาโนแบคทีเรียเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งๆที่เรียกว่าแป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนกับไกลโคเจน (glycogen) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ของแป้งที่พบในพืชชั้นสูง (Carr and Whitton, 1973 ; Lewin, 1962) โดยแป้งไซยาโนไฟเซียนมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปเรียกว่า ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule)

7. ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด

7.1 เซลล์ปกติ (vegetative cell) คือเซลล์ทั่วไป ประกอบด้วยผนังเซลล์ ภายในเป็นที่อยู่ของโปรโตพลาสซึมและนิวเคลียสที่ไม่มีผนังหุ้ม มีรงควัตถุชนิดต่างๆ ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงและตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

7.2 เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) เป็นเซลล์พิเศษทำหน้าที่เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน พบในไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เป็นเส้นสายเท่านั้น โดยเซลล์ปกติสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ได้เมื่ออยู่ในแหล่งอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย ไนเตรท หรือ ยูเรีย

เป็นองค์ประกอบ เซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่มีผนังหนาประกอบด้วยชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์และไกลโคลิปิด โดยผนังเซลล์ที่หนาจะลดการแพร่ของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันเอนไซม์ในโตรจีนเนสจากออกซิเจน (Murry and Wolk, 1989; Walsby, 1985; Bryant, 1994) และภายในเซลล์ยังมีอัตราการหายใจที่สูงเพื่อรักษาระดับออกซิเจนในเซลล์ให้มีระดับที่ต่ำเพียงพอที่จะยอมให้มีการตรึงไนโตรเจนในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ถึงแม้ว่าเฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสง แต่ขาดระบบแสงที่ 2 (Photosystem II) ดังนั้นจึงไม่เกิดออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ (Tel-Or *et al.*, 1997) ภายหลังจากตรึงไนโตรเจนจะมีการขนส่งสารประกอบต่างๆ เช่นกลูตามีนหรือกรดอะมิโนจากเซลล์เฮเทอโรซิสต์ไปยังเซลล์ปกติ ส่วนเซลล์ปกติจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากการสังเคราะห์แสงแล้วขนส่งคาร์โบไฮเดรตเข้าสู่เซลล์เฮเทอโรซิสต์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและนำไปรีดิวซ์สารต่างๆ ภายในเซลล์ เฮเทอโรซิสต์จะมีลักษณะใส มีสีเหลืองจางๆ เนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์เอ

ตำแหน่งการเกิดเฮเทอโรซิสต์พบว่ามี 2 แบบ แบบแรก อินเตอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (intercalary heterocyst) เป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดระหว่างเซลล์ปกติภายในเส้นสาย พบใน *Nostoc sp.* และ *Anabaena sp.* บางสายพันธุ์ แบบที่สอง เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (terminal heterocyst) เป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้าง แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ชนิดแรก เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (basal heterocyst) พบในเส้นสายของเซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ส่วนมากมักเกิดติดกับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่สุด พบในไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix sp.* ชนิดที่สอง เพดิเซลเลทเฮเทอโรซิสต์ (pedicellate heterocyst) เกิดที่ปลายแขนงสั้นๆ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 1-3 เซลล์ และชนิดที่สาม แลเทอรัลเฮเทอโรซิสต์ (lateral heterocyst) เกิดข้างๆ เส้นสาย โดยแนบติดกับเซลล์ในเซลล์ในเส้นสายนั้นๆ สามารถพบเพดิเซลเลทเฮเทอโรซิสต์และแลเทอรัลเฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostochopsis sp.* นอกจากนี้ ยังพบว่าโดยปกติเฮเทอโรซิสต์มักเกิดเดี่ยวๆ ในแต่ละจุด แต่ในกรณีบางชนิดจะเกิดติดกันเป็นคู่ๆ และในแต่ละสายอาจเกิดเฮเทอโรซิสต์ได้เพียง 1 เซลล์หรือมากกว่า (ยูวดี, 2546)

7.3 เซลล์อะคิเน็ต (akinetete cell) หรือสปอร์ เป็นเซลล์พิเศษที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ปกติเพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ และมักพบในสาหร่ายที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด อะคิเน็ตอาจอยู่ติดกับเซลล์เฮเทอโรซิสต์ อะคิเน็ตเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์

ปกติ ภายในเซลล์มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปไกลโคเจนในปริมาณมาก และยังเก็บสะสม ไนโตรเจนในรูปของไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) อีกด้วย (Bryant, 1994)

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. แยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนสูงจากดินนาและนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. ศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต การตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ความทนทานต่อยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลง ความทนทานต่อความเค็มของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ เริ่มจากการเก็บตัวอย่างดินนาและเก็บตัวอย่างน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มาแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง เมื่อได้เชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จึงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ BG11₀ ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ความทนทานต่อยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และความทนทานต่อความเค็มที่ระดับต่างๆ

บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 สารเคมี

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

2.1.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11₀ (ภาคผนวก ก)

2.1.2 เคมีภัณฑ์

2.1.2.1 โซเดียมคลอไรด์

2.1.2.2 ยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium

2.1.2.3 ยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl

2.1.2.4 ยาฆ่าแมลง Abamectin

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) Olympus, UFX-DX, Japan

2.2.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) Hirayama, Hiclave HV-50, Japan

2.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle, Z383K, Germany

2.2.4 ตู้เขยเชื้อ (laminar flow) ISSCO, HS123, Thailand

2.2.5 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) Gallenkamp, T490188, UK

2.2.6 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) Scientific promotion, Binder control, Japan

2.2.7 เครื่องผสมสาร (vortex) Genies 2, USA

2.2.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan

2.2.9 กิวเวด (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA

2.2.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) Cyberscan, 2000, Singapore

2.2.11 ไมโครปิเปต (micropipette)

2.2.12 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)

2.3 วิธีการศึกษา

2.3.1 วิธีการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาและนาข้าว

เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาและน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยนำตัวอย่างดินและน้ำในนาข้าวมาใส่ลงในอาหารเหลวสูตร BG11 (Rippka *et al.*, 1979) จากนั้น ใช้ฟาสเจอร์รี่เปิดขวดไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์มาใส่ในหลอดที่มีอาหารเหลว BG11 และนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11 และทำให้เชื้อแต่ละชนิดบริสุทธิ์ จากนั้น เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 หรือในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน

2.3.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเชื้อจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์จากการสกัดด้วยเมทานอลและนำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร เป็นเวลา 21 วัน

2.3.3 วิธีการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11₀ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 2.3.2 เป็นเวลา 21 วัน

2.3.4 วิธีการศึกษาความทนทานต่อยาปราบวัชพืช

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 โดยแปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium (ชื่อทางการค้าคือ Glyphosate) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.01 0.1, 1.0, และ 10 ส่วนในพันส่วน และแปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl (ชื่อทางการค้าคือ Herbite) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.1, 1.0, 10 และ 100 ส่วนในพันส่วน เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 2.3.2

2.3.5 วิธีการศึกษาความทนทานต่อยาฆ่าแมลง

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 โดยแปรผันความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง Abamectin (ชื่อทางการค้าคือ Goldjak) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.01 0.1, 1.0, และ 10 ส่วนในพันส่วน เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 2.3.2

2.3.6 วิธีการศึกษาความทนทานต่อความเค็ม

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีในข้อ 2.3.2

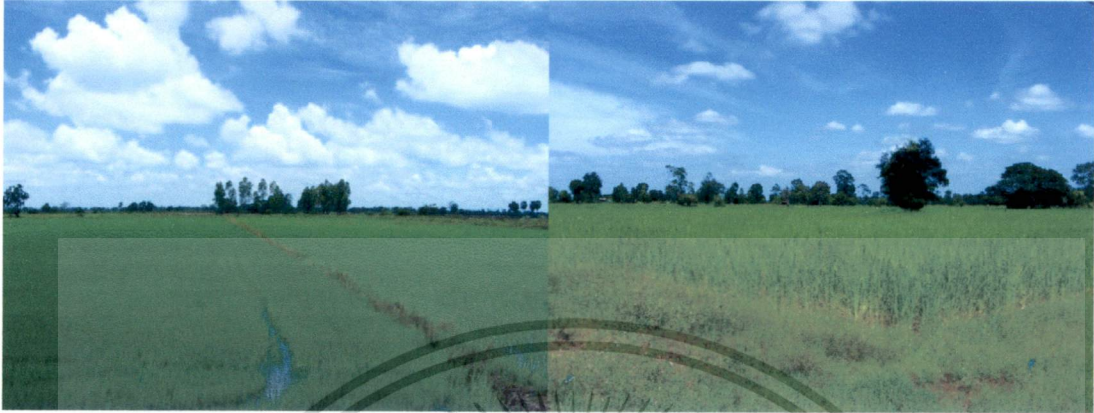
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศจากดินและน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างดินนาและเก็บตัวอย่างน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมาแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ความสามารถในการทนทานต่อยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลง และความเค็มที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.1 ผลการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาและนาข้าว

จากการเก็บตัวอย่างดินนาและตัวอย่างน้ำในนาข้าว ในแถบภาคกลาง จังหวัดชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทองและในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 และเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 (รูปที่ 3.1) จากนั้น ใช้พาสเจอร์ปีเปตูดไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11 พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถเจริญในอาหาร BG11 ได้ จึงคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยแยกได้จากตัวอย่างดินนาและตัวอย่างน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางจำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท A21, A22 และ A25.2 จากจังหวัดชัยนาท ไอโซเลท A31, A33, A34, A36จ และ A36ป จากจังหวัดสิงห์บุรี ไอโซเลท A47.1 จากจังหวัดอ่างทองและจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท B14 จากจังหวัดนครราชสีมา ไอโซเลท B21 จากจังหวัดบุรีรัมย์ ไอโซเลท B32, B34 และ B35 จากจังหวัดมหาสารคาม ไอโซเลท B44 จากจังหวัดร้อยเอ็ด ลักษณะของแต่ละไอโซเลทแสดงดังภาคผนวก ข นำทั้ง 15 ไอโซเลทมาแยกบนอาหารแข็ง BG11 เพื่อให้เชื้อแต่ละไอโซเลทบริสุทธิ์ พบว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดจำนวน 15 ไอโซเลท



ก

ข

รูปที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินนาและตัวอย่างน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลาง (ก) และแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ข)

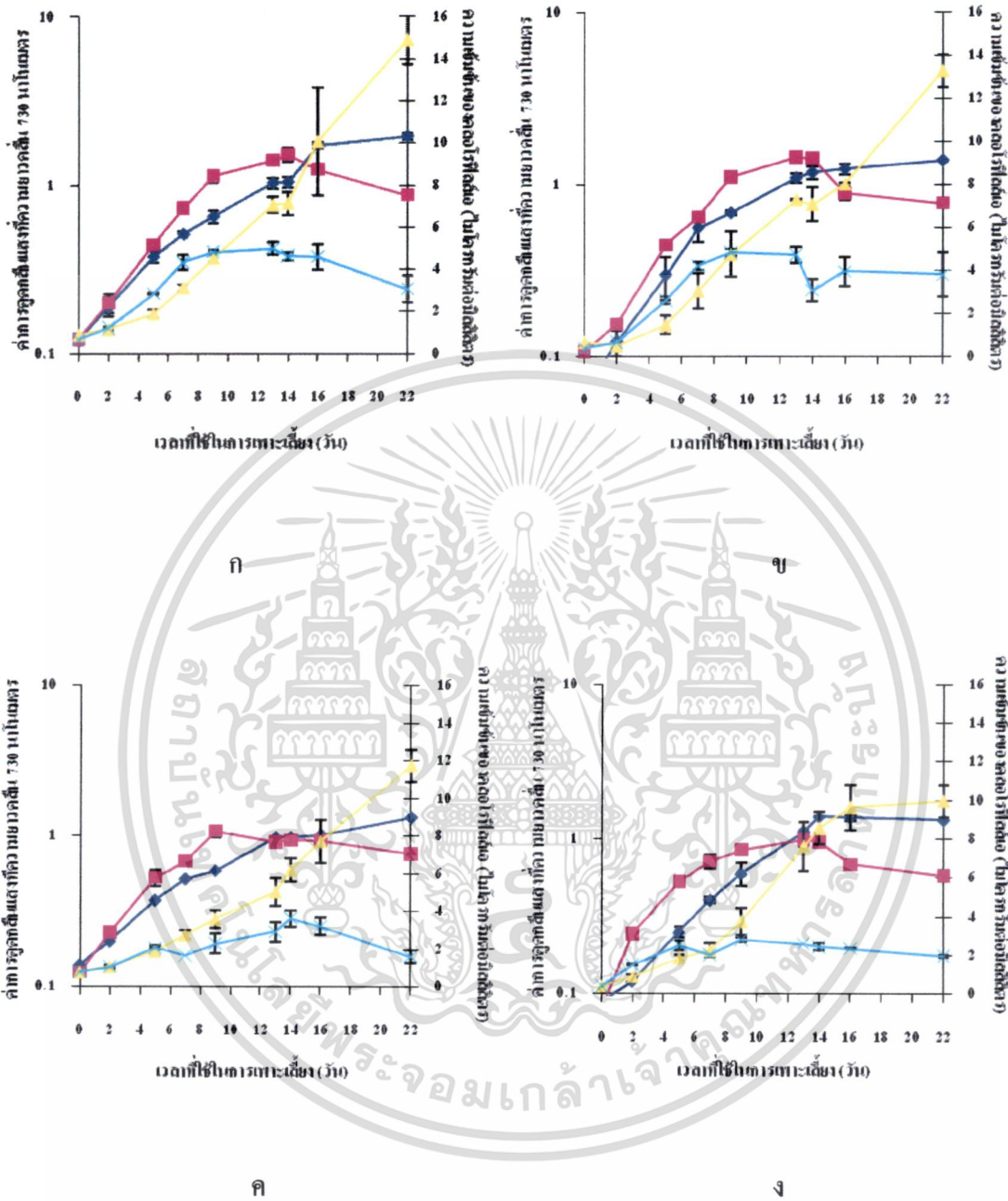
ในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลว BG11 ซึ่งเป็นอาหารสูตรสมบูรณ์ที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ แคลเซียม ไนโตรเจน คาร์บอน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม รวมทั้งธาตุอาหารรอง (trace element) ชนิดต่างๆ จึงเหมาะสมต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เช่นเดียวกับรายงานของ Fiore และคณะ (2005) ที่เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากดินตะกอนของแม่น้ำ Solimões และแม่น้ำ Amazon ในประเทศบราซิล ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Zhang และ Feng (2008) ที่ใช้อาหาร BG11₀ ซึ่งปราศจากแหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารที่ใช้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียจากดินเค็มในที่ราบ Songnen ในประเทศจีน

3.2 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

เมื่อคัดแยกได้เชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้ว นำไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ 15 ไอโซเลทมาศึกษาการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 22 วัน วัดการเจริญและปริมาณคลอโรฟิลล์ จากการทดลองพบว่า มีไซยาโนแบคทีเรียเพียง 7 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถวัดการเจริญเติบโตได้ ส่วนไซยาโนแบคทีเรียอีก 8 ไอโซเลทนั้นไม่สามารถวัดการเจริญเติบโตได้เนื่องจากมี

ลักษณะเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จากการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท คือ A22, A31, A33, A36จ, B14, B32 และ B35 พบว่ามีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน คือ เจริญเติบโตได้ช้าในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยงและหลังจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงประมาณวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 3.2) โดยจะมีเพียง ไอโซเลท B14 และไอโซเลท B34 ที่เข้าสู่ระยะ stationary phase ช้ากว่าไอโซเลทอื่นๆ คือ จะอยู่ในช่วง ประมาณวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์ของเชื้อทุกไอโซเลทจะแปรผันตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 3.2)

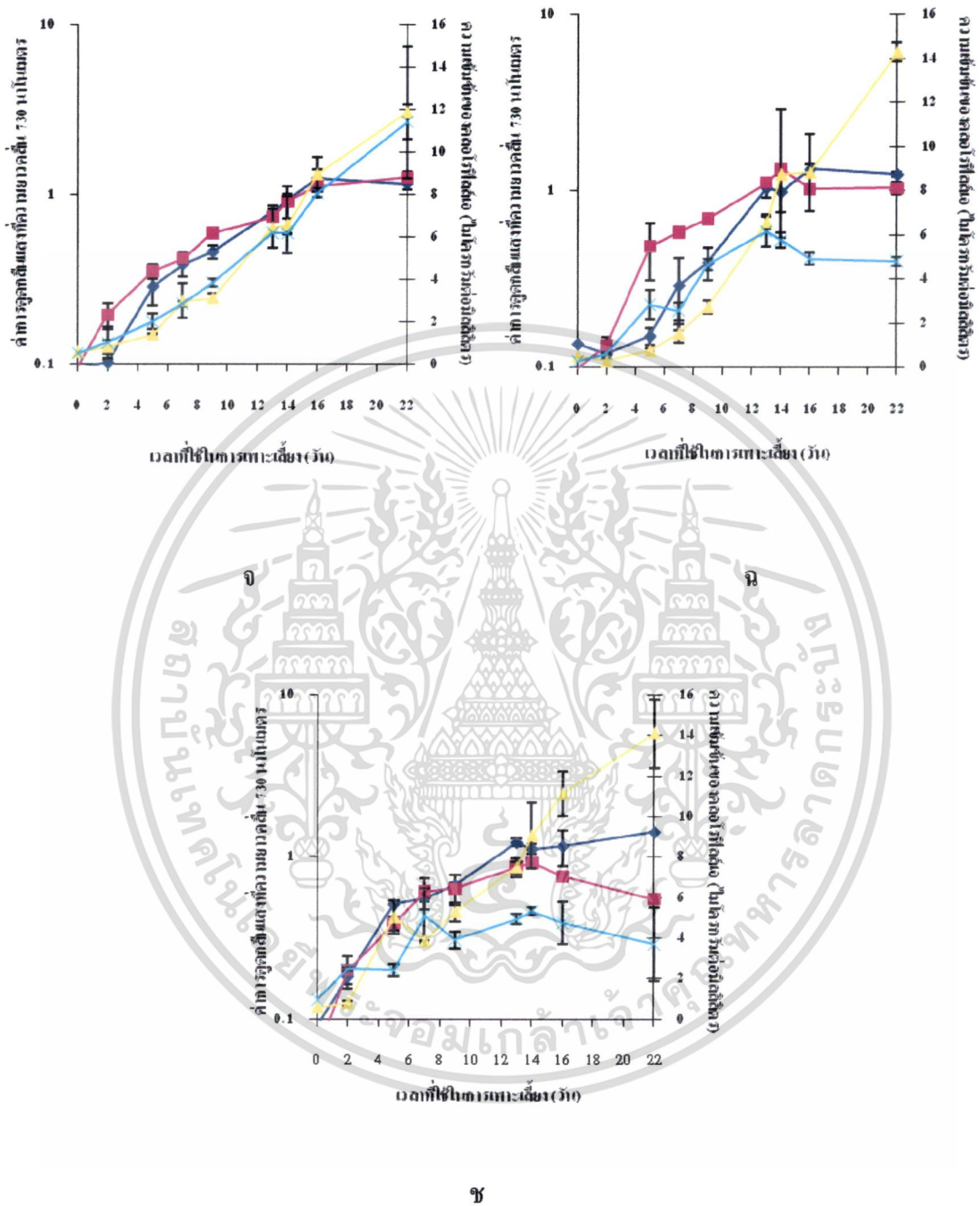
จากนั้น ศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลทในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11₀ ที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 21 วัน วัดการเจริญจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลทมีรูปแบบการเจริญในอาหารเหลว BG11₀ คล้ายคลึงกับผลการเจริญในอาหารเหลว BG11 แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A22, A31, A33, A36จ, B32 และ B35 มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ โดยจะสามารถสังเกตเห็นจากสีของเซลล์ ซึ่งจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงไปเป็นสีเหลือง เนื่องจากการขาดคลอโรฟิลล์ แสดงว่าเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศและเปลี่ยนให้เป็นไนเตรทซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ยกเว้นไอโซเลท B14 เท่านั้นที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ BG11₀ นอกจากนี้ เซลล์ยังคงมีสีเขียวแกมน้ำเงินตามปกติ แสดงให้เห็นว่า เชื้อไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท B14 สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการในการนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพ จึงได้ทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลท B14 ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.2 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท A22 (ก), A31 (ข), A33 (ค), A36 (ง), B14 (จ), B32 (ฉ) และ B35 (ช) ในอาหาร BG11 (—◆—) และอาหาร BG11₀ (—■—) และปริมาณคลอโรฟิลล์เอในอาหาร BG11 (—▲—) และในอาหาร BG11₀ (—×—)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ 16 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

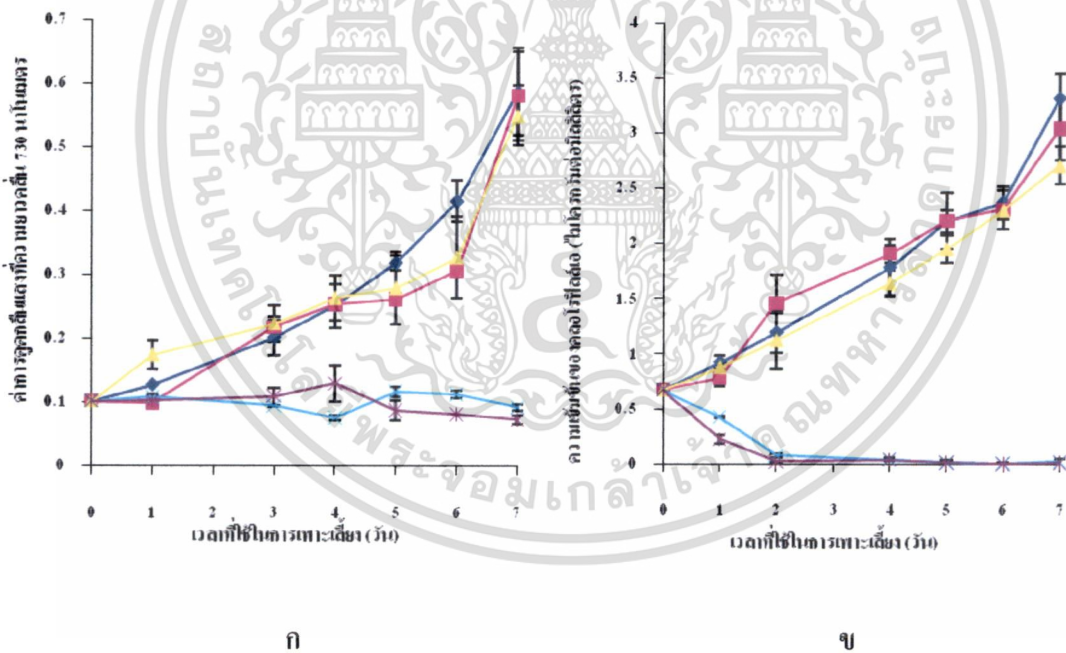


รูปที่ 3.2 (ต่อ) การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท A22 (ก), A31 (ข), A33 (ค), A36จ (ง), B14 (ฉ), B32 (ฉ) และ B35 (ช) ในอาหาร BG11 (—◆—) และอาหาร BG11₀ (—■—) และ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในอาหาร BG11 (—▲—) และในอาหาร BG11₀ (—×—)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการศึกษาความทนทานต่อยาปราบวัชพืช

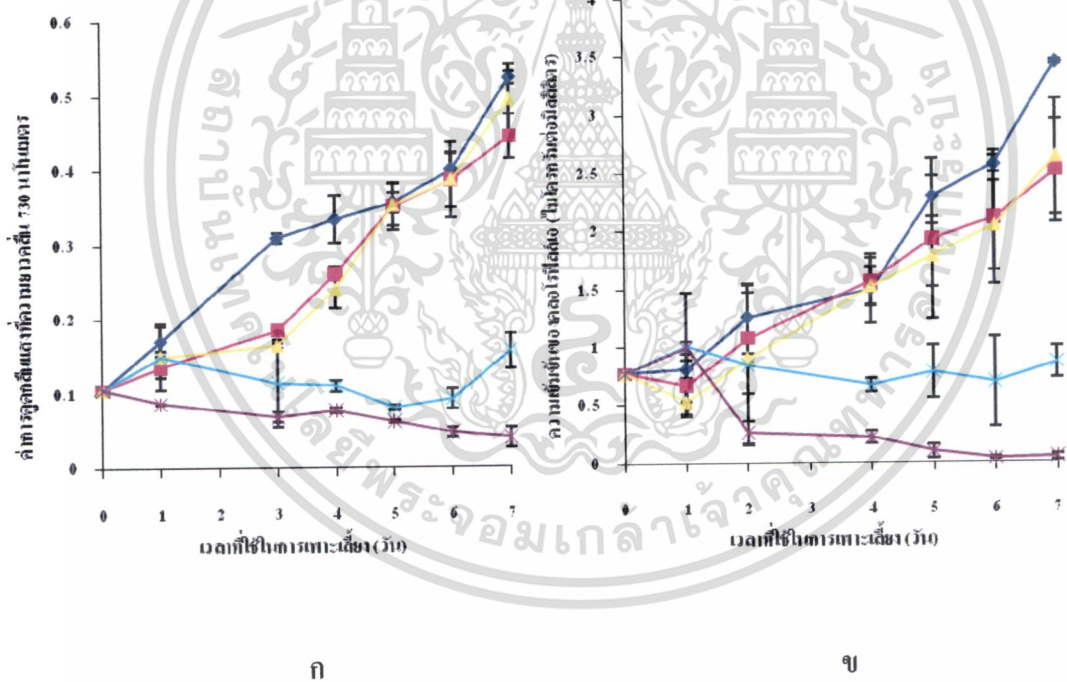
จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ที่ได้จากการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ในอาหาร BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.01, 0.1, 1.0 และ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ จากผลการทดลองพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium 0, 0.01 และ 0.1 ส่วนในพันส่วน และไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium 1.0 และ 10 ส่วนในพันส่วน (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 การเจริญ (ก) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (ข) ของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 (◆), 0.01 (■), 0.1 (▲), 1.0 (✕) และ 10 (✳) ส่วนต่อพันส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหาร BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.1, 1.0, 10 และ 100 ส่วนในพันส่วน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl 0, 0.1 และ 1.0 ส่วนในพันส่วน แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl 10 และ 100 ส่วนในพันส่วน (รูปที่ 3.4)

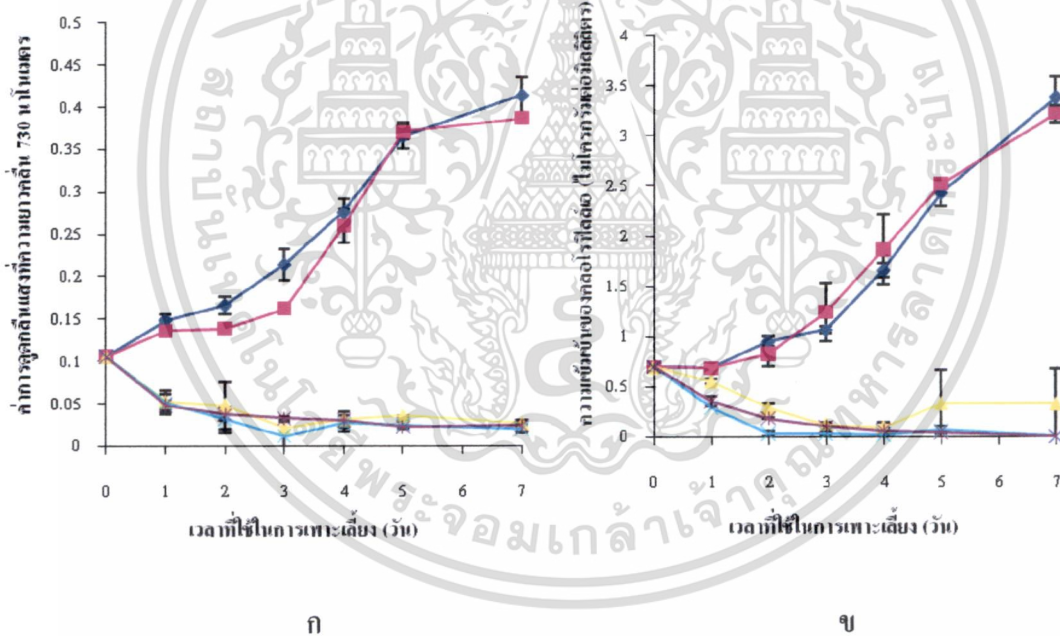


รูปที่ 3.4 การเจริญ (ก) และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ข) ของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Pyrazosulfuron-ethyl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 (◆), 0.1 (■), 1.0 (▲), 10 (×) และ 100 (✱) ส่วนต่อพันส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการศึกษาความทนทานต่อยาฆ่าแมลง

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 โดยแปรผันความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง Abamectin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.01, 0.1, 1.0, และ 10 ส่วนในพันส่วน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของยาฆ่าแมลง Abamectin 0 และ 0.01 ส่วนในพันส่วน แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของยาฆ่าแมลง Abamectin 0.1, 1.0 และ 10 ส่วนในพันส่วน (รูปที่ 3.5)



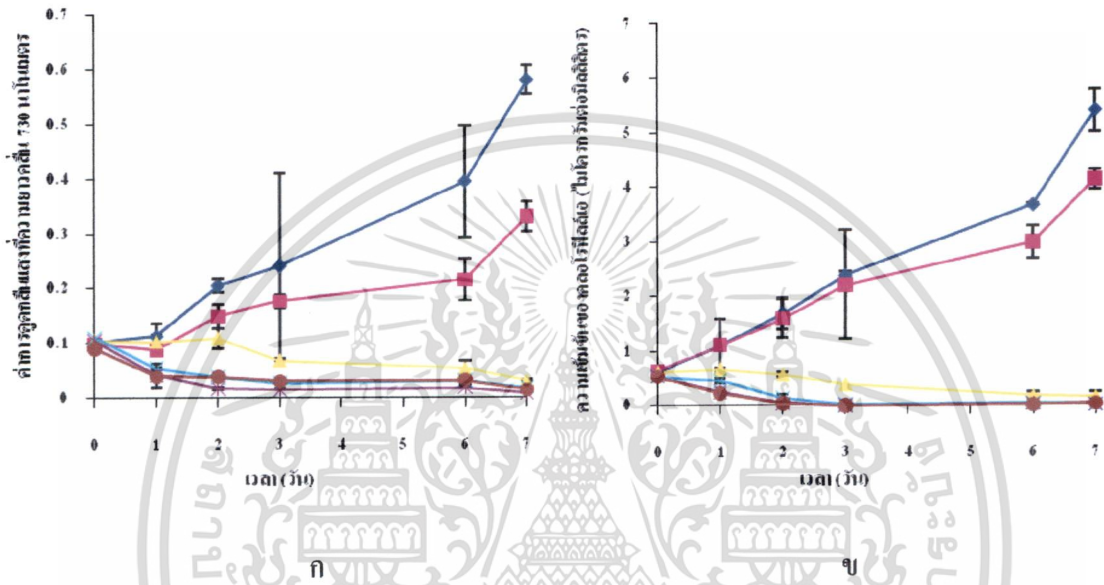
รูปที่ 3.5 การเจริญ (ก) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (ข) ของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของยาฆ่าแมลง Abamectin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 (◆), 0.01 (■), 0.1 (▲), 1.0 (×) และ 10 (✱) ส่วนต่อพันส่วน

Abamectin เป็นส่วนผสมของ Avermectin 2 ชนิด คือ Avermectin B1a อัตราส่วนร้อยละ 80 และ Avermectin B1b ร้อยละ 20 โดยสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์และความเป็นพิษที่คล้ายกัน สาร Abamectin ออกฤทธิ์ในการฆ่าแมลงและปลวก มีการใช้เพื่อควบคุมแมลงในพืชเศรษฐกิจอย่าง กว้างขวางทั้งไม้ผล ผักและไม้ประดับต่างๆ สาร Abamectin ทำงานโดยการออกฤทธิ์รบกวนการส่งผ่านสัญญาณประสาทระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทกล้ามเนื้อในบริเวณ synapse ที่จำเพาะและมีมากในสมองของแมลง จึงมีผลทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง ในไซยาโนแบคทีเรียไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ของยาฆ่าแมลงนี้ต่อไซยาโนแบคทีเรีย แต่จากงานวิจัยนี้พบว่ายาฆ่าแมลง Abamectin ออกฤทธิ์ได้ในไซยาโนแบคทีเรียเช่นกัน โดยเมื่อใช้ยาฆ่าแมลง Abamectin ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ส่วนในพันส่วนหรือมากกว่านี้ ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ไม่สามารถเจริญได้

3.5 ผลการศึกษาความทนทานต่อความเค็ม

จากการศึกษาความทนทานต่อความเค็มของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 โดยเฉพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าไอโซเลท B14 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีปราศจากความเค็ม (มีโซเดียมคลอไรด์ 0 โมลาร์) และเจริญได้ลดลงในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ (รูปที่ 3.6) แสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียมีความจำเป็นต้องใช้โซเดียมไอออนเพื่อใช้ในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมสูงเกินไปก็จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้ เนื่องจากสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงจะมีผลให้เกิดแรงดันออสโมติกสูง ซึ่งอาจมีผลให้เซลล์เกิดปรากฏการณ์พลาสโมไลซิส (plasmolysis) ทำให้เซลล์เหี่ยวได้ อย่างไรก็ตาม เซลล์อาจใช้เวลาหนึ่งในการปรับตัวให้สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงได้ มีรายงานได้กล่าวไว้ว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ใน

ปริมาณสูงนั้นมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของไซยาโนแบคทีเรีย รวมถึงส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง และกิจกรรมต่างๆ ของเอนไซม์ (Srivastava *et al.*, 2005)



รูปที่ 3.6 การเจริญ (ก) และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ข) ของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 (◆), 0.1 (■), 0.5 (▲), 1.0 (✕), 2.0 (✱) และ 3.0 (●) โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาและน้ำในนาข้าวในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าได้ไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น 9 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากภาคกลาง และ 6 ไอโซเลทได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อนำไซยาโนแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ จะได้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความบริสุทธิ์จำนวน 7 ไอโซเลท จากการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 21 วัน พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ไซยาโนแบคทีเรียจะเจริญเติบโตค่อนข้างช้า จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วงวันที่ 7-14 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อศึกษาการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (BG11₀) พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น คือ ไอโซเลท B14 ที่สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนได้ แสดงให้เห็นว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ และจากการศึกษาลักษณะของเซลล์จากการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย มีรูปทรงคล้ายถึงเบียร์มาต่อกันคล้ายลูกปัด และพบเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในเส้นสายอีกด้วย จากนั้นนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 มาศึกษาความทนทานต่อยาปราบวัชพืช โดยเฉพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาปราบวัชพืช Glyphosate-isopropylammonium และ Pyrazosulfuron-ethyl พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 สามารถทนต่อความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงได้สูงสุด 0.1 และ 1 ส่วนต่อพันส่วน ตามลำดับ จากการศึกษาความทนทานต่อยาฆ่าแมลงโดยเฉพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 ในอาหารเหลว BG11 ที่แปรผันความเข้มข้นของยาฆ่าแมลง Abamectin และเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท B14 สามารถทนต่อความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงและเกลือโซเดียมคลอไรด์ ได้สูงสุด 0.01 ส่วนต่อพันส่วน และสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์

บรรณานุกรม

- มนตรี จุฬาวัดทนทล 2542 การสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน ชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 589 หน้า
- พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ 2528 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเฮเทอโรซิสต์ การตรึงไนโตรเจน และส่วนประกอบของกรดอะมิโนของอัลจี *Anabaena siamensis* วทท.11 หน้า 250-251
- พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และ ประเสริฐ อมริต 2531 การคัดเลือกสายพันธุ์สีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนเค็มระดับต่างๆ รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26 สาขาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม หน้า 170-177.
- พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และ ประเสริฐ อมริต 2537 เอกสารประกอบการบรรยายสัมมนาทางวิชาการ เรื่อง “Microalgal Biotechnology Workshop” ระหว่างวันที่ 6-9 ธันวาคม 2537 ณ คณะพลังงานและวัสดุ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- ยุวดี พิรพรพิศาล 2546 สายพันธุ์วิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์ 2542 แพลงตอนพืช พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- เสนาะ บุญมี 2533 การวิเคราะห์สายพันธุ์สายพันธุ์สีเขียวแกมน้ำเงินที่ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินในพื้นที่อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก วารสารศรีนครินทร์วิโรฒวิจัยและพัฒนา 3(3): 54-73.
- เสนาะ บุญมี สมศักดิ์ แสนสุข นิยม บุญมี สอนอง จอมกะ วิรัตน์ พลศรี และ วิรัชย์ มาพร (2533) โครงการศึกษาสายพันธุ์ที่เป็นองค์ประกอบในการพัฒนาคุณภาพดินและเพิ่มผลผลิตในแหล่งน้ำทุ่งกุลาร้องไห้ รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการอีสานเขียว มศว ประสานมิตร 32 หน้า
- Antarikanonda, P. 1982 Effect of salinity on growth, nitrogen fixation and sodium uptake of rapidly growing N_2 -fixing blue-green alga *Anabaena* sp. TA1. *Microbios*. 34: 177-84.
- Bone, D.H. 1971. Nitrogenase activity and nitrogen assimilation in *Anabaena flos-aquae* growing in continuous culture. *Arch Mikrobiol*. 80(3): 234-241.
- Bryant, D.A., editor. 1994. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. The Netherland : Kluwar Academic Publishers.

- Carr, N.G. and Whitton, B.A., editor. 1973. In *The Biology of Blue-Green Algae*. Oxford : Blackwell.
- Fiore, M.F., Neilan, B.A., Copp, J.N., Rodrigues, J.L.M., Tsai, S.M., Lee, H. and Trevors, J.T. 2005. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazillian Amazon floodplain. *Water Research*. 39:5017-5026.
- Gaur, J.P., and Singh, A.K. 1990. Growth, photosynthesis and nitrogen fixation of *Anabaena doliolum* exposed to assam crude extract. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44(3): 494-500.
- Jackman, D.M., and Mulligan, M.E. 1995. Characterization of a nitrogen-fixation (*nif*) gene cluster from *Anabaena azollae* 1a shows that closely related cyanobacteria have highly variable but structured intergenic regions. *Microbiology* 141: 2235-2244.
- Lewin, R.A. editor. 1963. *Physiology and Biochemistry*. New York : Academic Press.
- Mazur, B.J., and Chui, F.F. 1982. Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6782-6786.
- Mevarech, M, Rice, D., and Haselkorn, R. 1980. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6476-6480.
- Rippka, R., Duruelles, J., Waterbury, B., Herdman, M. and Staier, R.Y. 1979. Genetic assignments, strains histories, and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- Smith, R.V., and Evans, M.C. 1971. Nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 105(3):913-917.
- Srivastava, A.K., Bhargava. P. and Rai. L.C. 2005. Salinity and copper-induced oxidative damage and change in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 22:1291-1298.
- Tel-Or, E., Lujik, L.W. and Packer, L. 1997. An inducible hydrogenase in cyanobacteria enhance N_2 fixation. *FEBS Lett.* 78:49-52.

Weare, N.M., and Benemann, J.R. 1973. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. II. Nitrogenase activity during induction and aging of batch cultures. Arch Mikrobiol. 93(2):101-112.

Zhang, W. and Feng, Y. 2008. Characterization of nitrogen fixing moderate halophilic cyanobacteria isolated from saline soils of Songnen Plain in China. Natural Science. 18:769-773.

<http://haberchemistry.tripod.com>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Rippka *et al.* 1979)

ส่วนประกอบ Trace mrtal mix 1,000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียม โมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.96	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบ BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (citric acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมเอ็ดทีเอ (Na_2EDTA)	249	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1,000 เท่า	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัมต่อมิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ($FeNH_4$ Citrate) (0.6 กรัม/ 100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง BG11 ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11,

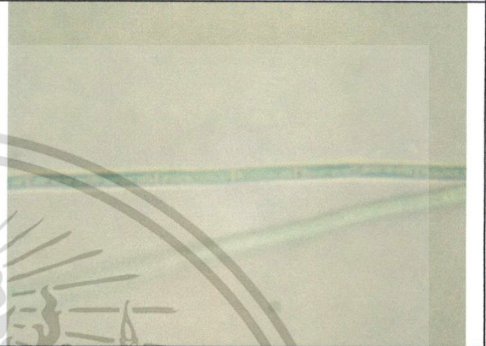
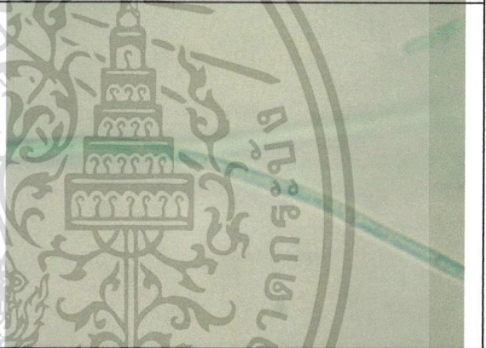


ส่วนประกอบแบบเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11 โดย BG11 100 เท่า จะไม่เติมโซเดียมไนเตรดลงในอาหาร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ 28 ศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

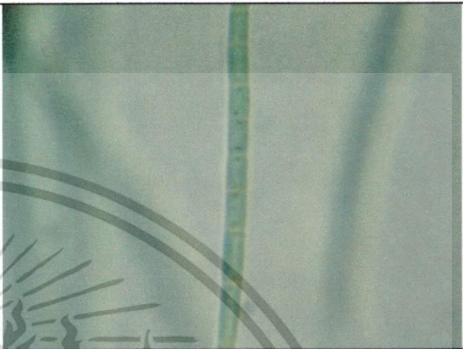

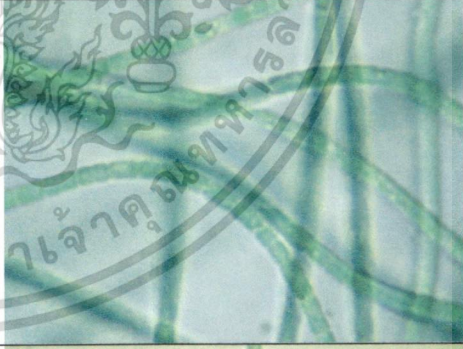

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ลักษณะของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคกลาง

ไอโซเลต	จังหวัด	รูปถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (1,000X)
A21	ชัยนาท	
A22	ชัยนาท	
A25.2	ชัยนาท	
A31	สิงห์บุรี	

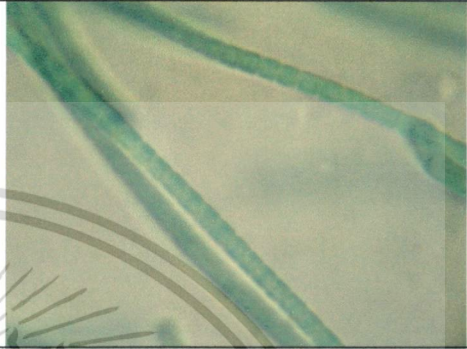



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคกลาง (ต่อ)

ไอโซเลท	จังหวัด	รูปถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (1,000X)
A33	สิงห์บุรี	
A34	สิงห์บุรี	
A36จ	สิงห์บุรี	
A36ป	สิงห์บุรี	


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ 30 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ไอโซเลท	จังหวัด	รูปถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (1,000X)
B14	นครราชสีมา	
B21	บุรีรัมย์	
B32	มหาสารคาม	
B34	มหาสารคาม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวและดินนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ต่อ)

ไอโซเลท	จังหวัด	รูปถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (1,000X)
B35	มหาสารคาม	
B44	ร้อยเอ็ด	