ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสและการดูดใช้ฟอสฟอรัสของข้าวโดยใช้จุลินทรีย์จากดินกรดจัด

ผู้เขียน นางสาวสายใจ กิ้มสงวน

สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ดินเขตร้อนมีฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่ำ และฟอสฟอรัสส่วนใหญ่อยู่ในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส ซึ่งสามารถแปรสภาพให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืชได้โดยอาศัยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสจากจุลินทรีย์ดิน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือก จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และสามารถแปรสภาพของอินทรีย์ฟอสฟอรัสให้กลายเป็นรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสจากดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากข้าวที่ปลูกในดินกรดจัด โดยใช้อาหารสูตร modified Pikovskaya's medium ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียม ไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ดีและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสไปเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ ดีเอ็นเอ รวมทั้งทดสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส ทดสอบความสามารถของเชื้อในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต โดยบ่มเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับสารละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัส ทดสอบผลของโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารซึ่งมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต รวมทั้งทดสอบผลของอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีส และแคลเซียมไอออนต่อการเจริญเติบโตและการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีสและแคลเซียมความเข้มข้น 0, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และบ่มจุลินทรีย์ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฟเทตที่เติมอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีส และแคลเซียมไอออน และทดสอบผลของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ฟอสฟอรัสของข้าวในอาหารวุ้นสูตร Murashige & Skoog ซึ่งมีฟอสฟอรัสรูปไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต

สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 157 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสคือ สายพันธุ์ AR101 และ AR102 ซึ่งจัดเป็นยีสต์ในจีนัส *Ustilago* sp. พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp. สายพันธุ์ AR101 และ AR102 อยู่ในช่วง 3.5-4.5 โดยเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR 101 มีกิจกรรม (3,690 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าสายพันธุ์ AR102 (956 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร) อย่างชัดเจน ในขณะที่อะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีส และแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ เชื้อสายพันธุ์ AR101 ปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากสารละลายโซเดียมไฟเทตได้สูงกว่าสายพันธุ์ AR102 ชัดเจน (3.24 และ 1.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แต่ทั้งสองสายพันธุ์สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากสารละลายอะลูมินัมไฟเทตและไอรอนไฟเทตได้น้อยมาก เฟอรัสไอออนไม่ได้ช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์ แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ AR102 เพิ่มสูงขึ้น แต่มีบทบาทในการช่วยให้เชื้อสายพันธุ์นี้ปลดปล่อยหรือสร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR102 ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติมเฟอรัสไอออน 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 วัน (189 และ 821 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สูงกว่าที่เลี้ยงในอาหารซึ่งไม่เติมเฟอรัสไอออน (53 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร) ชัดเจน ในขณะที่อะลูมินัม แมงกานีส และแคลเซียมไอออนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ AR101 ให้มีกิจกรรมลดลงเล็กน้อย แต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ยังสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากสารละลายโซเดียมไฟเทตให้ออกมาได้ อย่างไรก็ตามฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายที่มีอะลูมินัมละลายอยู่มากจะเข้าทำปฏิกิริยากับอะลูมินัมทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสลดลง

ข้าวที่ปลูกในอาหารวุ้นซึ่งมีฟอสฟอรัสรูปโซเดียมไฟเทตในสภาพที่ใส่เชื้อ สายพันธุ์ AR101 มีน้ำหนักแห้งสูงกว่าที่ปลูกในสภาพไม่ใส่เชื้อ (0.15 และ 0.11 กรัมต่อขวด ตามลำดับ) ส่วนน้ำหนักแห้งของข้าวที่ปลูกในอาหารที่มีฟอสฟอรัสรูปไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต ในสภาพที่ใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ มีค่าใกล้เคียงกัน (0.13 และ 0.12, 0.12 และ 0.10, 0.10 และ 0.11 กรัมต่อขวด ตามลำดับ) นอกจากนี้ข้าวที่ปลูกในอาหารวุ้นซึ่งมีฟอสฟอรัสรูปโซเดียมไฟเทตในสภาพที่ใส่เชื้อมีการดูดใช้ฟอสฟอรัสได้สูงกว่าข้าวที่ปลูกในสภาพไม่ใส่เชื้อชัดเจน (0.33 และ 0.21 ไมโครกรัมต่อขวด ตามลำดับ) และใกล้เคียงกับข้าวที่ปลูกในอาหารที่มีฟอสฟอรัสรูปไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตซึ่งเป็นรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ง่ายทั้งในสภาพที่ใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ (0.46 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อขวด ตามลำดับ)

Thesis Title	Enhancing of Organic Phosphorus Availability and Rice Phosphorus Uptake Using Soil Microorganism Isolated from Acid Sulphate Soil
Author	Miss Sayjai Gimsanguan
Major Program	Soil Resources Management
Academic Year	2005

ABSTRACT

The tropical soils contain low available phosphorus (P), and most of P are in the form of organic P which can be converted to available P by acid phosphatase secreted from soil microorganisms. The objective of this study was to isolate microorganisms which can secret acid phosphatase and release available P from organic P. Therefore, microorganisms secreting acid phosphatase were isolated from soil, rhizosphere and leaf sheath of rice, cultured in acid sulphate soil, by modified Pikovskaya's medium containing Na-phytate (P 5 mgL^{-1}). The fast growing and high acid phosphatase-secreting isolates were identified by DNA sequencing. The effect of pH on acid phosphatase activity was examined. The ability of selected isolates in solubilization of organic P (Na-phytate, Al-phytate and Fe-phytate) was studied by incubation of the isolates with these organic P forms, and determination of released P in the cultured solution. Moreover, the effect of Na-phytate, Al-phytate and Fe-phytate on the growth of the selected isolates and acid phosphatase activity was examined by culturing the isolates in the medium containing Na-phytate, Al-phytate and Fe-phytate. The effect of aluminum (Al), ferous (Fe), manganese (Mn) and calcium (Ca) ions on growth of two selected isolates was studied by culturing them in the Na-phytate medium containing 0, 5 and 10 mgL^{-1} of Al, Fe, Mn and Ca, and the effect of these ions on the ability of Na-phytate solubilization was detected by incubation the isolates with Na-phytate medium adding these ions separately. Finally, the effect of selected isolate on the growth and P uptake of rice culturing in Murashige & Skoog medium containing Na_2HPO_4, Na-phytate, Al-phytate and Fe-phytate was investigated.

It was found that 157 isolates can grow in the medium, but only two isolates, AR101 and AR102 can secrete high amount of acid phosphatase. Both 2 isolates were yeast,

genus *Ustilago*. The optimum pH on acid phosphatase activity was 3.5-4.5. The activity of acid phosphatase secreted from AR101 (3,690 nmol min^{-1} mL^{-1}) was remarkably higher than AR102 (956 nmol min^{-1} mL^{-1}). Aluminum, ferous, manganese and calcium ions in the medium did not effect on growth of both 2 isolates. The released P from Na-phytate by AR101 was higher than AR102 (3.24 and 1.80 mgL^{-1} respectively), but they solubilized only small amount of P from Al-phytate and Fe-phytate. The activity of secreted acid phosphatase of AR 102 was not stimulated by Fe ion, but the enzyme secretion and synthesis were possibly stimulated by this ion. The activity of acid phosphatase secreted from AR102 culturing in medium containing 5 and 10 mgL^{-1} of Fe ion for 16 days (189 and 821 nmol min^{-1} mL^{-1} respectively) was higher than the control treatment (without Fe ion) (53 nmol min^{-1} mL^{-1}). The activity of secreted acid phosphatase of AR101 was inhibited by Al, Mn and Ca ion, but phosphorus was still released from Na-phytate by activity of the remained enzyme. However, the released P was then precipitated with Al and Fe ion as the highly insoluble Al- or Fe-phosphate resulting in the reduction of released P in Na-phytate solution.

The dry weight of rice cultured in agar medium containing Na-phytate in using AR101 inoculation was higher than that without AR101 (0.15 and 0.11 g $bottle^{-1}$ respectively). Whereas, the dry weight of rice cultured in agar medium containing Na_2HPO_4 Al-phytate and Fe-phytate in using AR101 were not different when compared with and without AR101 inoculation treatments (0.13 and 0.12, 0.12 and 0.10, 0.10 and 0.11 g $bottle^{-1}$ respectively). In addition, the phosphorus uptake of rice cultured in agar medium containing Na-phytate in using AR101 inoculation was significant higher than that without AR101 (0.33 and 0.21 μg $bottle^{-1}$ respectively), and that was nearly the same as that cultured in medium containing Na_2HPO_4 with and without AR101 (0.46 and 0.39 μg $bottle^{-1}$ respectively).