หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การติดตามศึกษาอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิตในนาข้าวครั้งนี้ อาศัยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่นซึ่งเป็นการวัดทางอ้อม อาศัยหลักการที่ว่าอะเซธีลีนสามารถเกาะอยู่บนบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนสและยับยั้งการรีดิวซ์ไนโตรเจนได้ ดังนั้นผลของการรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นคือเอธีลีน เนื่องจากปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนใช้ 6 อิเล็กตรอนแต่อะเซธีลีนรีดักชั่นใช้ 2 อิเล็กตรอน ดังนั้นอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ออะเซธีลีนรีดักชั่นเท่ากับ 1 ต่อ 3 Hardy และคณะ (1973) ได้รวบรวมผลการทดลองที่ใช้กาอะเซธีลีนรีดักชั่นเป็นดัชนีของการตรึงไนโตรเจน ซึ่งปรากฏว่ามีบางระบบที่เป็นไปตามทฤษฎีคือมีอัตราส่วน 1:3 แต่บางระบบก็ได้อัตราส่วนแตกต่างไปเนื่องจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความสามารถในการละลายหรือการขนส่งของก๊าซไนโตรเจนและอะเซธีลีนในระบบนั้น ๆ อย่างไรก็ดีในรากข้าว Dommergues และคณะ (1973) พบว่ารากข้าวมีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ออะเซธีลีนรีดักชั่นใกล้เคียง 1:3 แต่ Yoshida(1973 a) ซึ่งวัดการตรึงไนโตรเจนในดิน, รากข้าว (IR 20) และน้ำท้องนา โดยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่นเปรียบเทียบกับการใช้ไอโซโทป ^{15}N และวัดการตรึง ^{15}N โดยใช้ mass spectrometer พบว่าตัวอย่างดินเท่านั้นที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนต่ออะเซธีลีนรีดักชั่นใกล้เคียง 1:3 ดังนั้นในการศึกษาที่กล่าวนี้จึงได้แสดงปริมาณการตรึงไนโตรเจนในหน่วยของจำนวนโมลเอธีลีนที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลาและปริมาณตัวอย่าง โดยมิได้คำนวณเป็นจำนวนโมลของไนโตรเจนที่ถูกตรึง ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นในกรณีที่อัตราส่วนระหว่างการตรึงไนโตรเจนและอะเซธีลีนรีดักชั่นไม่เท่ากับ 1:3 นอกจากนั้นการใช้วิธีวัด ^{15}N โดย mass spectrometerยังมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่มีเครื่องมือที่วัดได้ในประเทศ และวิธีนี้ยุ่งยากไม่สะดวกเมื่อเทียบกับวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่น (Hardy และคณะ 1968)

จากการทดสอบความไวในการวัดปริมาณของก๊าซเอธีลีนในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Pye Unicam, 104) ปรากฏว่าเครื่องมือที่ใช้สามารถตรวจวัดก๊าซทั้ง 2 ชนิดได้ตั้งแต่ 0.020-400.00 nmole ในช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ในขณะที่ตัวอย่างทั้งหมด

ที่นำมาวัด แสดงปริมาณของเอธีลีนอยู่ในช่วง 0.10-50.0 nmole

ในการศึกษาสภาพเหมาะสมที่ใช้ในการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่นในห้องปฏิบัติการนั้นพบว่า ช่วงเวลาของการอินคิวเบทมีผลต่อ ARA คือ รากข้าวแสดง lag phase ประมาณ 5 ชม. แล้วแอคติวิตีจึงเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเทียบกับเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทจนถึง 48 ชม. Lee และคณะ (1975) ซึ่งทดลองวัดARA ของข้าวในนาทดลองพบ lag phase ประมาณ 3 ชม. แสดงว่าในสภาพธรรมชาติก็ต้องการช่วงเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะวัดแอคติวิตีได้ แต่ Yoshida(1973 b) ซึ่งวัดแอคติวิตีของรากข้าวในห้องปฏิบัติการ โดยอินคิวเบทในบรรยากาศที่มีแต่ออกซิเจนและฮีเลียม (20:80) และบรรจุอะเซธีลีน 0.2 บรรยากาศ พบ lag phase เพียง 30 นาทีแรกเท่านั้น ในการทดลองนี้พบ lag phase ยาวนานกว่าคือ 5 ชม. อาจเนื่องจากตัวอย่างรากข้าวที่ใช้ทดลองเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 2 วัน หรือชนิดพันธุ์ข้าวต่างกัน หรือสภาพก๊าซในขวดอินคิวเบทต่างกันก็ได้ อย่างไรก็ดีในภาวะการทดลองปกติใช้ช่วงเวลาอินคิวเบท 24 ชม. ซึ่งพ้น lag phase อย่างแน่นอน สำหรับปริมาณของ $^{P}C_2H_2$ ในขวดทดลองก็มีผลต่อการวัด ARA กล่าวคือ เมื่อเพิ่ม $^{P}C_2H_2$ แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อ $^{P}C_2H_2$ เท่ากับ 0.1บรรยากาศ และคงที่จนถึง 0.4 บรรยากาศ ซึ่งเป็นผลให้ผู้ทดลองใช้ $^{P}C_2H_2$ 0.2 บรรยากาศในการทดลองต่อๆ ไป เพราะอยู่ในช่วงแอคติวิตีสูงสุด และยังไม่เกิดการยับยั้งอันเนื่องมาจากปริมาณก๊าซอะเซธีลีนมากเกินพอ จาก Lineweaver-Burk Plot (รูปที่ 7)พบว่า Km ของอะเซธีลีนในสภาพการทดลองนี้ประมาณ 0.04 บรรยากาศ Yoshida และ Ancajas(1971) ทดลองโดยใช้รากข้าว IR 8 พบว่า ARA สูงสุดเมื่อใช้ $^{P}C_2H_2$ 0.3 บรรยากาศ และ Km ประมาณ 0.09 บรรยากาศ เมื่ออินคิวเบทในบรรยากาศที่มีออกซิเจนและฮีเลียม (20:80) ซึ่ง Yoshida เชื่อว่าค่า Km สูงเนื่องมาจากการทำลายก๊าซเอธีลีนที่เกิดจากอะเซธีลีนรีดักชั่นโดยแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณรากข้าว IR 8 (Yoshida,1975) นอกจากนั้น Flett(1975) ได้รายงานว่า Methane Oxidizing bacteria สามารถเปลี่ยนเอธีลีนเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ ซึ่งผลของแบคทีเรียนี้ทำให้เกิดการประเมินค่าอะเซธีลีนรีดักชั่นต่ำกว่าความจริง สำหรับการทดลองนี้ค่า Km (0.04 บรรยากาศ) ต่ำกว่ารายงาน

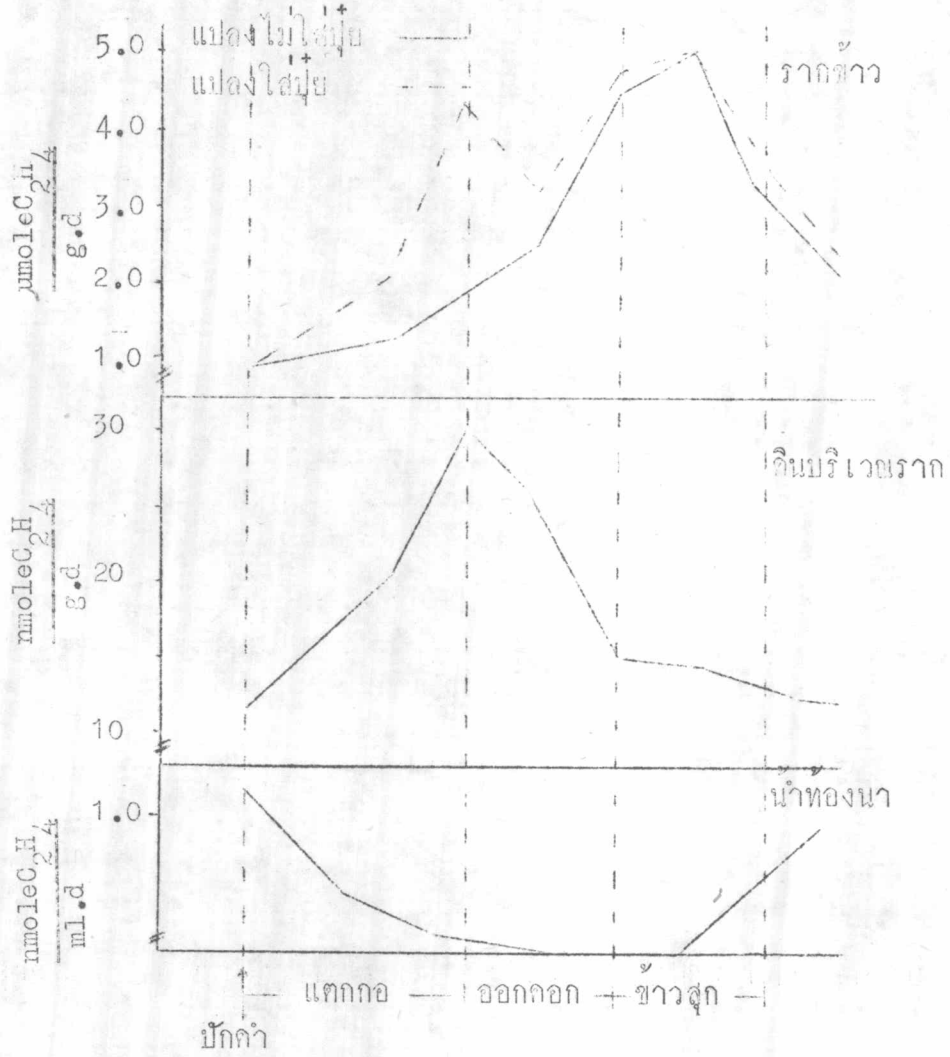
ของ Yoshida ทำให้สงสัยว่า รากข้าว กข 1 อาจมี affinity ต่อก๊าซอะเซทิลีนสูง หรืออาจมีการสร้างเอธิลีนโดยรากข้าวเองตามธรรมชาติ (Gambory, 1968) หรือไม่มีการทำลายก๊าซเอธิลีนโดยแบคทีเรียที่รากข้าวก็ได้ ดังนั้นจึงทดลองวัดการทำลายเอธิลีนและสร้างเอธิลีนโดยรากข้าวและดินบริเวณราก (ตารางที่ 2 และ 3) ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบการทำลายและสร้างเอธิลีนโดยรากข้าว และดินบริเวณรากในสภาพการทดลองเลย แสดงว่ารากข้าว กข 1 มี affinity ต่อก๊าซอะเซทิลีนสูง และไม่มีแบคทีเรียที่จะมาทำลายหรือสร้างเอธิลีนที่จะทำให้ผลการวัดต่ำหรือสูงจากที่เป็นจริง นอกจากนั้นการทดลองเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียส แสดงว่า ARA ลดลงเพียงเล็กน้อยในระยะการเก็บ 2 วัน แต่ถ้าเก็บนานถึง 7 วัน แอคติวิตีลดลงเหลือประมาณ 70% แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างส่วนใหญ่จะนำมาหาแอคติวิตีภายในวันเดียวกับที่เก็บจากนาทดลองนั่นเอง

สำหรับการติดตามศึกษาอัตราการตรึงไนโตรเจนในแปลงนาทดลองตลอดฤดูการเพาะปลูกโดยวิธีการทดสอบข้างต้นปรากฏว่า ในช่วงแรกคือระยะปักดำ การตรึงไนโตรเจนในแปลงนาทดลองส่วนใหญ่มาจากตัวการที่ตรึงไนโตรเจนในน้ำท้องนา (1.2 nmole C_2H_4/ml.d) เมื่อข้าวเริ่มแตกกอการตรึงไนโตรเจนในระยะนี้มาจากดินบริเวณรากข้าว (30 nmoleC_2H_4/g.d) ส่วนระยะออกดอกการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่เกิดที่รากข้าว (3.5-5.5 µmoleC_2H_4/g.d) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุดอีกด้วย เมื่อข้าวสุกถึงระยะเก็บเกี่ยวน้ำท้องนาจะกลับเป็นตัวการตรึงไนโตรเจนอีกครั้ง แต่ถึงแม้นว่าจะพบว่ามีการตรึงไนโตรเจนโดยรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา แต่ปริมาณการตรึงไนโตรเจนก็ยังไม่พอเพียงกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวอย่างเต็มที่ สังเกตุได้จากแปลงที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจะมีการเจริญเติบโตของข้าวมากกว่าแปลงที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยยังอาจมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนโดยรากข้าว (รูปที่ 9 ก, ข, ค และ ง) ซึ่งแสดงว่าอัตราการตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้น ถ้าได้รับปุ๋ยเพิ่มเติมในจำนวนพอเหมาะจะทำให้มีระยะเวลาที่เกิดการตรึงไนโตรเจนยาวนานขึ้น

การศึกษาทำนองนี้ Yoshida(1973 a) ซึ่งใช้ข้าวพันธุ์ IR 20 ปลูกในนาลุ่มและนาดอน และติดตาม ARA ตลอดระยะการเจริญเติบโต รายงานว่า ในนาลุ่ม ARA ในราก-

ข้าวมีแอคติวิตีสูงสุดในช่วงข้าวเป็นเมล็ด (Heading) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองนี้แต่ต่ำกว่าเล็กน้อย แต่รูปแบบของการตรึงไนโตรเจนที่พบในรากข้าวนั้นคล้ายคลึงกัน สำหรับดินในนาข้าวนั้น Yoshida เปรียบเทียบดินในแปลงที่มีการปลูกข้าว (planted soil) และแปลงที่ไม่ได้เพาะปลูก (unplanted soil) และสรุปว่า ดินในแปลงที่มีการเพาะปลูกมี ARA สูงกว่าแปลงที่ไม่มีต้นข้าว แต่การตรึงไนโตรเจนในน้ำท้องนาของนาลุ่มที่ทำการเพาะปลูกนั้นมีรูปแบบคล้ายกันคือ พบแอคติวิตีสูงในช่วงปักดำต่อจากนั้นแอคติวิตีจะลดลง

จากการทดลองนี้จะเห็นความสัมพันธ์ของตัวตรึงไนโตรเจนต่าง ๆ ในแปลงนาอันประกอบด้วยตัวตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในน้ำ ดิน และรากข้าวดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ของตัวตรึงไนโตรเจนต่าง ๆ ในแปลงนาตลอดระยะการเจริญเติบโต

ในน้ำท้องนาตัวตรึงไนโตรเจนได้แก่ พวกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ซึ่งในการทดลองนี้แสดงแอคติวิตีต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับรากข้าวและดินบริเวณรากคือมีแอคติวิตี 0.1-2.0 nmoleC_2H_4/ml.d เนื่องจากพบสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Watanabe และคณะ (1976) ที่รายงานว่า คลองหลวงมีปริมาณสาหร่ายในน้ำท้องนาน้อยมาก ไม่สามารถพบเห็นด้วยตาเปล่า แอคติวิตีของสาหร่ายเหล่านี้พบในช่วงปักดำแล้วลดลงและไม่พบอีกจนในระยะข้าวสุกและเก็บเกี่ยว เนื่องจากขณะที่ต้นข้าวยังเล็กสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเจริญได้ดี แต่เมื่อต้นข้าวเติบโตขึ้นมีใบบังแสงแดดทำให้การเจริญของสาหร่ายลดลงวัดแอคติวิตีไม่ได้ เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวไม่มีใบบังแสงแดด สาหร่ายพวกนี้จึงเจริญได้ดีอีกครั้งทำให้พบ ARA ในระยะนี้อีก สำหรับปุ๋ยที่ใส่ในแปลงนาทดลองนี้ไม่มีผลต่อ ARA ในน้ำท้องนานี้เลย

ในดินบริเวณรากซึ่งพบประมาณ 2.5-30.0 nmoleC_2H_4/g.d เมื่อเทียบกับรากข้าว (1.5-5.5 μmoleC_2H_4/g.d) ยังต่ำกว่ามาก แสดงว่าแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเกาะติดอยู่กับรากข้าวมากกว่าบริเวณ outer rhizosphere ARA ในดินบริเวณรากมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นหลังจากปักดำข้าว (ก่อนปักดำ 2.5 nmoleC_2H_4/g.d) จนถึง 6 สัปดาห์หลังปักดำ (12.5-30.0 nmoleC_2H_4/g.d) ซึ่งเป็นช่วงระยะที่ข้าวแตกกอ การที่พบแอคติวิตีเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากรากข้าวขับสารพวก monosaccharide และกรดอะมิโนที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียออกมา (Mac Rae และ Castro, 1967) ทำให้แบคทีเรียบริเวณ outer rhizosphere มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น พอถึงระยะออกดอกแอคติวิตีในดินกลับลดลงทั้งที่ในรากข้าวเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจอธิบายได้ 2 กรณีคือ

กรณีที่ 1 อาจเนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่บริเวณ outer rhizosphere เคลื่อนไป associate ที่ผิวรากข้าวให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

กรณีที่ 2 อาศัยรายงานของ Aimi (1960) ที่ว่าออกซิเจนบริเวณรากข้าว มาจากออกซิเจนในอากาศที่ขนส่งมายังบริเวณรากโดยผ่านระบบพิเศษทางสรีระวิทยาของต้นและใบข้าว เมื่อรากมีแบคทีเรียมาเกาะจำนวนมากจะเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนในบริเวณนี้และ

มีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาจำนวนมาก (Alexander, 1960) น่าจะทำให้สภาพของ outer rhizosphere ซึ่งเดิมเป็น aerobic เปลี่ยนเป็น anaerobic แอคติวิตีของแบคทีเรียพวกที่เป็น aerobes ในดินจึงลงต่ำลง และคงค่าต่ำ(5-10nmoleC_2H_4/g.d) ไปตลอดจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสปรากฏว่าไม่มีผลต่อรูปแบบหรือระดับของการตรึงไนโตรเจนในดิน อาจเนื่องมาจากปริมาณปุ๋ยที่ใส่อยู่ในระดับต่ำ ซึ่ง Rajaramamohan-Rao (1976) พบว่า ปุ๋ย $(NH_4)_2SO_4$ ประมาณ 65ppmN (16-24 กก.ต่อไร่) จะเริ่มมีการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนของดินที่ดุม หรือถูกรากข้าวดึงไปใช้ได้รวดเร็วกว่า

สำหรับรากข้าวซึ่งแสดง ARA สูงสุดนั้น เนื่องจาก Yoshida (1971) ได้ทดลองเพาะต้นข้าวจากเมล็ดที่ปราศจากเชื้อและให้ต้นข้าวเติบโตโดยให้อาหารสังเคราะห์ พบว่ารากข้าวเองไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แสดงว่า ARA ที่วัดได้ในรากข้าวนั้นเนื่องมาจากแบคทีเรียจากดินมาเกาะอยู่หรืออาจเข้าไปอาศัยที่ส่วนผิวของรากทำนองเดียวกับที่ Dobereiner และคณะ (1972) พบแบคทีเรีย Azotobacter paspalum อยู่เป็นโคโลนีภายใต้ผิวที่เป็นยางเหนียวของรากหญ้าเขตร้อน(Paspalum notatum) การที่แบคทีเรียในดินมาเกาะอยู่บริเวณรากข้าวอาจเนื่องจาก มีสารที่ถูกปล่อยจากรากข้าวซึ่งเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรียเหล่านี้ Mac Rae และ Castro(1967) ได้รายงานว่าข้าวที่กำลังงอกสามารถปล่อยสารบางอย่างเช่น กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรทเช่น น้ำตาล glucose fructose, arabinose, xylose และ sucrose ผ่านทางรากได้ ดังนั้นรากในระยะออกดอกและข้าวสุก อาจมีการปล่อยสารเหล่านี้ออกมาได้มากกว่าในระยะอื่น ๆ เป็นผลให้ ARA ในระยะนี้มากกว่าช่วงอื่น ในระยะเก็บเกี่ยวรากข้าวเริ่มตายและเน่าเปื่อยจึงปล่อยสารออกมาน้อยลง ทำให้แบคทีเรียที่รากข้าวมีแอคติวิตีต่ำลงด้วย สำหรับในกรณีรากข้าวนี้การใส่ปุ๋ยน่าจะมีผลทางอ้อมต่อการตรึงไนโตรเจน โดยกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าวทำให้การตรึงไนโตรเจนบริเวณรากเกิดได้เร็วขึ้น แต่การใส่ปุ๋ยปริมาณมากเกินไปจะเกิดผลเสียได้ Day (1975) รายงานว่า NH_4-N 10ppm จะยับยั้งการตรึงไนโตรเจนของรากหญ้า P.notatum ภายใน 2 ชม. หลังใส่ปุ๋ย แต่ผลนี้จะหายไปภายใน 1 สัปดาห์หลังใส่ปุ๋ย

Watanaba และคณะ (1976) รายงานว่าปุ๋ยฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมจะเพิ่ม ARA ในนาข้าวเฉพาะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ จากรายงานเหล่านี้จึงทำให้ต้องคำนึงถึงปริมาณของปุ๋ยที่จะใช้ใส่แปลงนาด้วย ทั้งนี้เพราะปุ๋ยอาจมีผลทั้งในทางยับยั้งหรือเพิ่มอัตราการตรึงไนโตรเจน

สำหรับปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนานั้นพบว่า ตัวอย่างรากข้าวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนัก ตามอายุข้าวโดยมีปริมาณสูง (13-15 มก.ต่อ กรัม) ในระยะต้นข้าวอ่อน (ตารางที่ 5) ดังนั้นในระยะนี้รากข้าวจึงควรมีโปรตีนสูง เมื่อต้นข้าวโตเต็มที่จะมีการสะสมสารพวกคาร์โบไฮเดรท เช่น เซลลูโลสมากขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนอาจจะคงที่หรือเพิ่มน้อยกว่า ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ต่อหน่วยน้ำหนัก จึงลดลง ส่วนตัวอย่างดินและน้ำท้องนามีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาที่เก็บตัวอย่าง ดินบริเวณรากพบประมาณ 1.69มก.ต่อ กรัม ใกล้เคียงกับปริมาณที่หาโดย Motomura(1973) ที่รายงานว่าดินคลองหลวงในระยะลึก 0-15 ซม. จะมีไนโตรเจนทั้งหมด (total N) ประมาณ 1.3 มก.ต่อ กรัม แต่น้ำท้องนามีไนโตรเจนอินทรีย์ต่ำมาก 0.2 มก.ต่อ 100 มล. ข้อมูลที่ได้จากการหาไนโตรเจนอินทรีย์นี้ ยังไม่สามารถใช้อธิบายอะไรมากนัก เพราะไม่ใช่การหาไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ในสภาวะที่ทำการทดลองโดยปลูกต้นข้าวในกระถาง ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนของต้นข้าวทั้งหมดและของดินที่อยู่ในกระถางกับอัตราการตรึงไนโตรเจนที่พบในระยะต่าง ๆ

เนื่องจากพบว่าในแปลงนาทดลองนี้มีการตรึงไนโตรเจนโดยรากข้าวสูงสุด รองลงมาคือดินบริเวณราก ส่วนน้ำท้องนาต่ำสุด แสดงว่าตัวการตรึงไนโตรเจนสำคัญในแปลงนาทดลองนี้ น่าจะเป็นพวกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและที่เกาะอยู่กับรากข้าว และจากการทดลองคัดเลือกหาตัวตรึงไนโตรเจนในตัวอย่างรากข้าว non sterile, sterile ผิว รวมทั้ง sterile ผิวและบดละเอียด ก็พบ ARA น้อยครั้งที่สุดเทียบกับตัวอย่างดินและน้ำ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรีย เกาะอยู่กับรากข้าวแน่นพอสมควร โดยอยู่แบบ associative symbiotic type ในการทดลองนี้แยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ตามลำพัง 3 ชนิดคือ NF 1, NF 2และ NF 3 Yoshida(1973 a)ใช้ Burk's nitrogen free agar medium

แยกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบริเวณรากข้าว IR 20 ได้ถึง 9 ชนิด เป็นพวก Gram negative, rod shape Kumari (1976) รายงานว่าพบ Spirillum sp. ในรากข้าวด้วย แต่สำหรับรายงานในประเทศไทยซึ่งได้ทำการวิจัยโดย Matsugushi และคณะ (1975) พบว่ามี Azotobacter sp. C.butyricum, non sulfur purple bacteria และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวในท้องที่ดินชนิด Brackish Water Alluvial Soil เป็นดินลักษณะเดียวกับที่ใช้ในการวิจัยนี้ สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิดนี้ NF 1, NF 2 และNF 3 เป็น Gram negative ทั้งหมด มีรูปร่างลักษณะเซลล์คือ NF 1 และNF 2 เป็น short rod ขนาดเล็ก แต่ NF 3 เป็น short rod ขนาดใหญ่ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นพวกที่สามารถมีชีวิตได้อย่างอิสระและเป็น aerobic diazotrophs เนื่องจากโตได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนและอาหารเสริม ใน aerobic condition และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ เชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนต่างกัน กล่าวคือ แบคทีเรีย NF 1, NF 2 และ NF 3 ที่แยกได้บริสุทธิ์มีอัตราการตรึงไนโตรเจน 0.198 0.033 และ 0.892 μmoleC_2H_4/mgProtein.hr ตามลำดับ วิธีการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์มาศึกษามีข้อเสียคือ เป็นการเปลี่ยนสภาพที่เคยเป็นอยู่ตามธรรมชาติ ดังนั้นเฉพาะแบคทีเรียที่ดำรงชีพได้อย่างอิสระและสามารถตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้นที่จะถูกแยกออกมาได้ แต่พวก associative symbiotic diazotrophs ซึ่งอาจต้องการปัจจัยที่สร้างโดยแบคทีเรียอื่นหรือสารที่ปล่อยจากรากข้าวในการดำรงชีวิตและตรึงไนโตรเจน ยังไม่สามารถศึกษาได้ นอกจากนี้ยังไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่รวมกันที่ผิวรากอีกด้วย อย่างไรก็ดีการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ตรึงไนโตรเจนได้นี้ทำให้สามารถเข้าใจคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคทีเรียดังกล่าว จึงเลือกศึกษาตัวที่มีแอคติวิตีสูงสุดคือ NF 3 พบว่า NF 3 เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 31-37 องศาเซลเซียส แต่มีแอคติวิตีสูงสุดที่ 31 องศาเซลเซียส ความเป็น กรดด่าง ของน้ำเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตด้วย pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อการเจริญตัวของ NF 3 คือ 6.5 ถ้าน้ำเลี้ยงเชื้อมี pH ค่อนข้างเป็นกรด หลังจากอินคิวเบทกับ NF 3 24 ชม. pH จะเพิ่มขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียนี้ได้ปล่อยสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างออกมาเพื่อเพิ่ม pH ในทางตรงกันข้าม ถ้าเลี้ยง NF 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ค่อนข้างเป็นด่าง pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจะลดลงแสดงว่ามีการปล่อยสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดออกมา Becking (1974)

รายงานว่า Beijerinckia sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนตัวหนึ่ง สามารถปล่อยกรดอะเซติคออกมาได้เมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ค่อนข้างเป็นด่าง แต่สำหรับสารที่เพิ่ม pH ของแบคทีเรียยังไม่มีรายงานว่าเป็นสารชนิดใด pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อมีผลต่อ ARA ของแบคทีเรียนี้ด้วย คือที่ pH 7 จะมีแอคติวิตีสูงสุด ซึ่งต่างจาก optimum pH ของการเจริญเติบโตเล็กน้อย การที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลต่อ ARA อาจเป็นผลทางอ้อม เนื่องจากสภาวะทั้ง 2 นี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงมีผลต่อ ARA อีกทีหนึ่ง สำหรับผลของ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อการยับยั้งอัตราการตรึงไนโตรเจนของ NF 3 พบว่าปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ประมาณ 16 ppm N หรือ 0.5 mM สามารถยับยั้ง ARA ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ Hardy และคณะ (1973) รายงานว่าต้องใช้แอมโมเนียถึง 20 mM ในการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสใน C.pasteurianum และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 50 mM ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสใน Azotobacter sp. ซึ่งแสดงว่าไนโตรจีเนสแอคติวิตีของ NF 3 ไวต่อการเพิ่มปริมาณของเกลือแอมโมเนียมสูงกว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มาก

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สภาพที่เหมาะสมในการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชันในห้องปฏิบัติการคือ อินคิวเบทตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนาในขวดทดลองที่มีอากาศและอะเซทิลีน 0.2 บรรยากาศ 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามี lag phase ประมาณ 5 ชม. และค่า Km ของอะเซทิลีนประมาณ 0.04 บรรยากาศ และไม่พบการสร้างหรือการทำลายก๊าซเอทิลีนในภาวะที่ทดลอง สำหรับการตรึงไนโตรเจนของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่เก็บจากนาทดลองนี้ พบว่าตัวอย่างรากข้าวมีแอคติวิตีต่อหน่วยน้ำหนักสูงสุด รองลงมาคือดิน น้ำท้องนาต่ำสุด และรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนในตัวอย่างแต่ละชนิดต่างกันตลอดฤดูการเพาะปลูก กล่าวคือ รากข้าวมีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในระยะสร้างรวงอ่อนและออกดอก ดินบริเวณรากมีแอคติวิตีสูงในระยะข้าวแตกกอ และน้ำท้องนามีแอคติวิตีสูง 2 ระยะ คือระยะปักดำและเก็บเกี่ยว

นอกจากนี้ยังได้แยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จากนาทดลองนี้ 3 ชนิด(NF 1, NF 2 และ NF 3) ซึ่งเป็นพวกที่ดำรงชีวิตได้อย่างอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ปราศจากไนโตรเจนและอาหารเสริม แบคทีเรียทั้ง 3 เป็นพวก Gram negative aerobic diazotrophs ลักษณะเซลล์เป็น short rod ขนาดต่างกัน NF 3 มี ARA สูงสุดและเจริญเติบโตได้ดีในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ในช่วงสะเทินและอุณหภูมิประมาณ 31-37 องศาเซลเซียส เมื่อมีไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำเลี้ยงเชื้อมากกว่า 16 ppmN ARA ของ NF 3 จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์

ประโยชน์ของข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่าตัวการที่ตรึงไนโตรเจนในนาข้าวนี้มีทั้งในรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา ซึ่งแต่ละส่วนมีช่วงเวลาที่มีแอคติวิตีสูงต่างกัน ไม่มีตัวอย่างใดมีแอคติวิตีสูงตลอดฤดูการเพาะปลูก ดังนั้นจึงคิดว่า ถ้าสามารถเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในตอนปักดำให้สูงขึ้น โดยการทำให้สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเจริญเติบโตดีขึ้นหรือเพาะเลี้ยงเพิร์นน้ำ จะเป็นการเพิ่มไนโตรเจนให้กับนาข้าวซึ่งจะทำให้ต้นข้าวแตกกอได้มากและในระยะแตกกอนี้ต้นข้าวต้องการปุ๋ยไนโตรเจน และเมื่อต้นข้าวแตกกอเจริญเติบโตได้ดี โอกาสที่แบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากจะมีการตรึงไนโตรเจนก็สูงขึ้นด้วย เป็นผลให้มีการเพิ่มไนโตรเจนในนาข้าว ส่วนการตรึงไนโตรเจนที่พบที่รากข้าวซึ่งมีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงในระยะออกดอก ก็จำเป็นสำหรับการทำให้ต้นข้าวดำรงชีวิตต่อไปได้ตามปกติและใช้ในการสร้างเมล็ดข้าว ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในระยะนี้ให้สูงขึ้นไปอีกโดยการใส่แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงและดำรงชีวิตได้อย่างดีในสภาพธรรมชาตินั้น ๆ ก็จะเป็นการลดปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ต้องใส่ในตอนข้าวแตกกอสูงสุด ในด้านที่เกี่ยวกับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้ใส่ในนาข้าวนั้น นอกจากจะต้องคำนึงถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการดำรงชีวิตในสภาพท้องนานั้นเช่น ทนต่อความเป็นกรดหรือด่างของดินได้สูงแล้ว ยังต้องไม่ไวต่อปริมาณแอมโมเนียที่จะมายับยั้งความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย และควรเป็นแบคทีเรียที่สามารถแข่งขันกับแบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในนานั้นได้