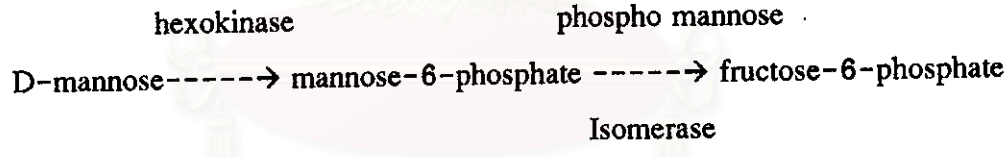
บทที่ 5

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงจากใบข้าว เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนให้แก่พืช ซึ่งอาจเป็นหนทางที่จะนำไปสู่การลดปริมาณการใช้ปุ๋ยยูเรียในอนาคต โดยจากการทดลองนี้สามารถแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ก็จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกันไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการทดลองนี้ได้เลือกใช้อาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ทำให้มีการเจริญ และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ต่ำ หรืออาจเป็นผลจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ แบคทีเรียที่คัดเลือกมาจำนวน 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่ 2, 6 และ 12 ซึ่งวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยใช้อะเซทิลีน รีดักชั่น เทคนิค พบว่ามีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอย่างเด่นชัด ดังการเปรียบเทียบในรูปที่ 7 และเมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก สามารถจำแนกได้เป็น *Azomonas insignis Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* ตามลำดับ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *Azomonas insignis Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* มาทำการแปรผันหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการตรึงไนโตรเจน พบว่าสำหรับแบคทีเรีย *Azomonas insignis* สามารถเจริญ และตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีงานวิจัยของ O'Toole และ Knowles ในปี ค.ศ. 1973 ว่าการเติมกลูโคสลงไปจะมีผลต่อการตรึงไนโตรเจน โดยกลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานให้แก่พวก heterotroph ซึ่งถ้ายิ่งมีกลูโคสมากก็จะมีการมีปริมาณไนโตรเจนได้เพิ่มมากขึ้น ส่วนในอาหารที่มีซูโครส และแมนนิ

ทอลอยู่แบคทีเรียเหล่านี้จะมีการเจริญ และการตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลูโคสมีโครงสร้างเป็นโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) แบคทีเรียจึงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าน้ำตาลซูโครสซึ่งมีโครงสร้างเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) แต่ก็สามารถนำไปใช้ได้เหมือนกัน โดยจะสลายซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรักโตส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ตัวนี้สามารถนำไปใช้ในขบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) โดยเปลี่ยนกลูโคสเป็น กลูโคส -6-ฟอสเฟต(glucose-6-phosphate) และเปลี่ยนฟรักโตสเป็น ฟรักโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) โดยทั้ง 2 ตัวนี้จะเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehyde-3-phosphate) ได้ต่อไป (McKee และ McKee, 1999) ส่วนในอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน จะตรวจพบการเจริญ และการตรึงไนโตรเจนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถนำแมนนิทอลไปใช้ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียชนิดนั้นไม่มีเอนไซม์ฟอสโฟ แมนโนส ไอโซเมอเรส (phospho mannose isomerase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนแมนโนส-6-ฟอสเฟต (mannose-6-phosphate) ให้เป็นฟรักโตส-6-ฟอสเฟต เพื่อที่จะสามารถเข้าสู่ขบวนการไกลโคไลซีสต่อไปได้ ดังสมการดังนี้



เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *Azomonas insignis Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* พบว่าสามารถเจริญ และตรึงไนโตรเจนได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Brouzes และKnoweles ในปี ค.ศ.1973 ที่รายงานว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการตรึงไนโตรเจน โดยที่อุณหภูมิต่ำ และอุณหภูมิปานกลางจะกระตุ้นการนำก๊าซเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีสุดที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านั้นกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะลดลงซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของเอนไซม์ และโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เป็นกลไกที่สำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจนของสิ่งมีชีวิต โดยที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์ไนโตรจีเนสก็เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูง อาจทำให้โปรตีนนี้เกิดการ denatureไป ทำให้

โครงสร้างเปลี่ยนไป จึงไม่สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียได้ และนอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการละลายของออกซิเจนด้วย โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการละลายของออกซิเจนจะลดลง ซึ่งอาจทำให้ปริมาณออกซิเจนมีไม่เพียงพอต่อขบวนการหายใจของแบคทีเรียนั้น จึงทำให้แบคทีเรียมีการเจริญลดลง

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญและตรึงไนโตรเจนได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 และใน *Azotobacter chroococcum* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 เช่นกัน แต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเป็น 5 อัตราการเจริญและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้จะมีค่าต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jergensen และ Davey ในปี ค.ศ.1971 ที่รายงานว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่า 6 จะมี *Azotobacter* เพียงส่วนน้อยบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญ และตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งต้องเป็นพวกที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจน อิออนที่สูงๆได้ แต่ก็ไม่เหมาะต่อการเจริญของ *Azotobacter*

ส่วนในการทดลองที่พ่นเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ลงบนผิวใบข้าวที่มีอายุ 1 เดือน พบว่าเชื้อ *Azotobacter chroococcum* จะมีอัตราการเจริญที่สูงกว่า *Azomonas insignis และ Azomonas agilis* โดยวัดจากน้ำหนักแห้งทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติที่ *Azotobacter chroococcum* มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่า *Azomonas insignis และ Azomonas agilis* จึงทำสามารถเจริญบนผิวใบข้าว ซึ่งเป็นพืชที่ต้องการแสงมากและต้องทนต่ออุณหภูมิสูงๆได้ดี หรืออาจเกิดจากการที่ได้แหล่งคาร์บอนจากหลายแหล่งคือสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และแมนนิทอลได้ใกล้เคียงกัน ทำให้มีแหล่งอาหารเพียงพอต่อการเจริญ แต่เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* กับชุดการทดลองที่ไม่ได้พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียพบว่าในชุดที่มีการพ่นด้วยเชื้อต้นข้าวจะมีการเจริญที่ดีกว่าชุดที่ไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรีย คล้ายกับการทดลองของ Shende และคณะ ในปี ค.ศ. 1977 พบว่าการใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* จะมีผลต่อการงอกของเมล็ด และก่อนหน้านั้นในปี ค.ศ. 1969 Mishutin และ Shilnikova ได้มีการศึกษาถึงผลของการใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* ที่เมล็ดพืช

หลายชนิด พบว่าในชุดที่มีการใส่เชื้อลงไปจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าในชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* ถึง 12 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการทดลองที่ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้ปุ๋ย และการใช้เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พ่นที่ผิวใบของข้าว พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่มีการตรึงไนโตรเจนได้สูงคือ *Azotobacter choococum* ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งกับการใช้ปุ๋ยปริมาณ 5 10 และ 12 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่ามีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยปริมาณ 12 กิโลกรัมต่อไร่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสามารถช่วยลดการใช้ปุ๋ยยูเรียลงไปได้ โดยในอนาคตต่อไปอาจใช้เชื้อแบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตลงไปได้

จากการทดลองนี้เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ที่ 2, 6 และ 12 ที่พ่นบนใบข้าวด้วยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนน้อยที่คงติดอยู่บนใบข้าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียถูกชะล้างไปในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังไม่ตรวจพบแบคทีเรียบนใบข้าวในชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าการตรึงไนโตรเจนบนใบข้าวที่พ่นด้วยแบคทีเรียเกิดจากแบคทีเรียที่ได้พ่นไป ส่วนในชุดควบคุมซึ่งไม่ตรวจพบแบคทีเรีย แต่จะมีการสร้างเอทิลีน (ตารางที่ 12) ซึ่งอาจเป็นเอทิลีนที่สร้างขึ้นจากใบข้าวซึ่งเป็นผลจากการตัดใบข้าวออกจากต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย