บทที่ 4

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LGIP medium ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนเลย ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้จะต้องมีความสามารถในการนำไนโตรเจนจากแหล่งอื่นมาใช้ ซึ่งก็คือไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศ การเตรียมอาหารให้เป็นกรด (pH 5.5) ทำให้เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ไม่ดี แต่มีจุลินทรีย์บางกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรด และไม่มีไนโตรเจน เช่น *Acetobacter* spp. จึงทำให้ LGIP medium มีความจำเพาะในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Cavalcante และ DÖbereiner, 1988) แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเป็นกรดจะแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อกรดได้สูงเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเตรียมอาหารที่มีค่า pH 7 ด้วยเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบได้ทั่วไปไม่จำเพาะกับดินที่เป็นกรดเท่านั้น ทำให้แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในขั้นปฐมภูมิได้จำนวนทั้งสิ้น 48 ไอโซเลท โดยแยกเป็น free living และ endophytic bacteria 18 และ 30 ไอโซเลท ตามลำดับ โดย endophytic bacteria ที่แยกได้มาจากส่วนลำต้นมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากบริเวณรอบๆ ลำต้นมีแบคทีเรียอาศัยอยู่ไม่มากเท่ากับส่วนรากซึ่งอยู่ในดิน นอกจากนี้เมื่อพืชสังเคราะห์แสงแล้วก็จะลำเลียงอาหารผ่านทาง phloem ลงสู่ราก (Koomnok *et al*, 2007) การที่แก๊สไนโตรเจนในอากาศมี 3 พันธะ ทำให้พืชไม่สามารถใช้แก๊สไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ แต่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะมีเอนไซม์ nitrogenase ซึ่งสามารถเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียเพื่อให้พืชนำไปใช้ได้ การที่เอนไซม์ nitrogenase สามารถรีดิวส์แก๊ส acetylene ให้เป็นแก๊ส ethylene ได้ ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจึงใช้วิธี acetylene reduction assay (ARA) โดยฉีดแก๊ส acetylene เพื่อให้เชื้อรีดิวส์ แล้วตรวจวัดปริมาณของแก๊ส ethylene ที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง Gas chromatography ที่ใช้ flame ionized detector (Hardy *et al*, 1968) ในงานวิจัยนี้ พบเชื้อแบคทีเรีย isolate 1LSO1 ซึ่งเป็นเชื้อ Free-living bacteria ที่คัดแยกได้จากดินรอบรากอ้อยที่ได้จากแปลงอ้อยโรงงานน้ำตาลวังขนาย จังหวัดนครราชสีมา มี Nitrogenase activity สูงสุดคือ 247 nmol ethylene/ hr/mg protein ส่วนเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Endophytic bacteria isolate 1LS6pH7w มี Nitrogenase activity สูงสุดคือ 91.23 nmol ethylene/hr/mg protein โดยคัดแยกได้จากแปลงอ้อยในจังหวัดนครราชสีมาเช่นเดียวกัน จากรูปที่ 5 และ 6 พบว่าเชื้อบางไอโซเลทมีค่า nitrogenase activity มากเมื่อคิดเทียบหน่วยเป็น nmole ethylene/hr แต่เมื่อคิดเทียบให้หน่วยเป็น nmole ethylene/hr/mg protein ของเชื้อ อาจได้ค่าน้อยลงมาก แสดงให้เห็นว่าเชื้อนั้นมีการเจริญช้า (slow growth rate)

เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จาก LGIP medium นอกจากจะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศแล้วยังมีความสามารถในการสร้างสาร indole acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในส่วนของลำต้นโดยเฉพาะในส่วนของยอด นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการแตกรากใหม่ด้วย เนื่องจากการสร้าง IAA ต้องมี L-tryptophan เป็นตัวเริ่มต้น (Bialek *et al*, 1992) ดังนั้นในการศึกษาการสังเคราะห์ IAA จึงเติม L-tryptophan ลงไปใน DF medium ด้วย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 29 ไอโซเลท ที่สร้าง IAA โดยเชื้อแบคทีเรีย isolate 1LSO1 ซึ่งเป็น free-living bacteria สร้าง IAA มีปริมาณสูงสุดคือ 48.64 µg/ml ส่วนแบคทีเรีย isolate 1LS6pH7w ซึ่งเป็น ndophytic bacteria สร้าง IAA สูงสุดคือ 47.16 µg/ml

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร Pikovskaya's agar ที่มี tricalcium phosphate ที่ไม่ละลายน้ำจะตกตะกอนจมอยู่ที่ก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้อาหารขุ่นทั่วทั้งจาน ซึ่งแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้จะสร้างกรดแล้วไปละลาย tricalcium phosphate จึงเกิด halo/clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ ในขั้นต้นได้เตรียมอาหาร Pikovskaya's agar ที่เป็นอาหารชั้นเดียว (20 ml) พบว่าต้องใช้เวลานาน 3-10 วัน แบคทีเรียจึงจะเจริญได้ดี และสังเกต halo/clear zone ได้ค่อนข้างยาก เนื่องจาก tricalcium phosphate ตกตะกอนจมอยู่ที่ก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อสร้างกรดได้ไม่มากนักก็จะไม่สามารถละลาย tricalcium phosphate ที่อยู่ก้นจานและไม่เกิด halo/clear zone ให้เห็น ดังนั้นจึงได้ปรับปรุงวิธีการโดยการเทอาหารเป็น 2 ชั้น คือชั้นล่าง (10 ml) ไม่ใส่ tricalcium phosphate ส่วนชั้นที่ 2 (10 ml) จะใส่ tricalcium phosphate ลงไปตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (full strength tricalcium phosphate) ในที่นี้คือ 5 g/l พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีขึ้นและเชื้อบางไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟตได้หลังจากบ่มเชื้อไว้เพียง 2 วัน เนื่องจากกรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจะสามารถซึม (diffuse) ไปสัมผัสกับ tricalcium phosphate ได้ดีขึ้น จึงสังเกตผลได้เร็วขึ้นและชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทดลองเตรียมอาหารใหม่เป็น 2 ชั้น โดยเติม tricalcium phosphate ในอาหารชั้นที่ 2 เพียงครึ่งเดียว (half strength tricalcium phosphate) พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดียิ่งขึ้นและเห็นผลการทดลองได้ชัดเจนขึ้นอีก และยังได้ทดสอบโดยใช้อาหารชั้นเดียวที่เตรียมเป็น half strength tricalcium phosphate แต่จะเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารเพียง 10 ml ซึ่งก็พบว่าสามารถตรวจผลการทดลองได้เร็วขึ้นใกล้เคียงกับการเทอาหาร 2 ชั้น (10 ml ชั้นล่างและ10 ml ชั้นบนเป็น half strength tricalcium phosphate) (รูปที่ 9) แต่การเตรียมอาหารเป็นชั้นเดียว 10 ml อาจมีข้อเสียในกรณีที่เชื้อเจริญช้าก็อาจทำให้อาหารแห้งได้ ซึ่งกลไกการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียคือการสร้างกรดแล้วไปละลาย tricalcium phosphate จึงเกิด halo/clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ โดยกรดที่เชื้อแต่ละชนิดสร้างมีหลายชนิด ได้แก่ citric acid, oxalic acid, gluconic acid เป็นส่วนใหญ่ และมีส่วนน้อยที่เป็น succinic acid, formic acid และ acetic acid ซึ่งปริมาณกรดที่เชื้อแต่ละชนิดสร้างได้ก็ไม่เหมือนกันและไม่เท่ากัน (Alam et al, 2002) ดังนั้นการสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงสีอาหารเลี้ยงเชื้อหรือการวัด pH ของอาหาร NBRIP จึงอาจได้ค่าที่คลาดเคลื่อน

จากความเป็นจริง ซึ่งผลการศึกษาดังตารางที่ 5 แสดงค่า pH และการดู halo/clear zone และคำนวณค่า SI จึงน่าจะเป็นวิธีที่ดีกว่า โดยเชื้อแบคทีเรีย isolate 4LSpH7 ซึ่งเป็น endophytic bacteria ที่คัดแยกได้จากส่วนของลำต้นของอ้อยมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุดที่มีค่า SI เท่ากับ 3.66 และ isolate 3LSO4 ซึ่งเป็นเชื้อ free living bacteria ที่มีค่า Solubilization Index สูงสุดคือ 2.5

เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพบางไอโซเลท มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นการสร้างสาร IAA และการละลายฟอสเฟต ดังแสดงในตารางที่ 6 และได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน isolates ต่างๆ ดังนี้คือ 5LSO2, 3LSO1 และ 1LSO1 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน อีกกลุ่มคือ 1LS6pH7w และ2LAPh7w ที่คัดแยกได้จากลำต้นของอ้อยและยอดอ้อย ตามลำดับไปทดสอบเพื่อปลูกอ้อยในกระถางซึ่งขณะนี้ได้เริ่มดำเนินการแล้ว (ซึ่งจะทราบผลในปีถัดไป)