

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

แยกแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย

การแยกแบคทีเรียเอนโคไฟท์จากอ้อยพันธุ์อุทอง 3 อ้อยป่า และอ้อยเขียวพันธุ์มะลิษาที่ปลูกในสภาพ sand culture รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ในส่วนใบ ลำต้น และราก การทดลองครั้งแรกหลังจากฆ่าเชื้อที่ผิวและตัดตัวอย่างชิ้นพืชมาวางบนอาหาร nitrogen free agar (NFA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่าแบคทีเรียเจริญออกมาจากชิ้นพืชน้อยมาก หรือบางชิ้นไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียออกมาเลย และแบคทีเรียที่พบมีลักษณะเป็นเมือกใสเท่านั้น อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษามีปริมาณแบคทีเรียน้อยหรือแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถออกมาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโคไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในอ้อย ดังนั้นจึงทดลองนำตัวอย่างมาบดด้วยโกร่งที่ปลอดเชื้อ และใส่ในอาหาร nitrogen free broth (NFB) เป็นเวลา 1 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NFA มีความหลากหลายมากขึ้น วิเคราะห์จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NFA ทางสถิติโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range Test พบว่าสายพันธุ์และส่วนต่างๆ ของอ้อยที่ใช้ในการศึกษามีผลต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากการเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยจากทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากมีมากที่สุดให้อ้อยเขียว (C34M) และอ้อยพันธุ์อุทอง 3 (AT3) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ รวมทั้งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุดในอ้อยป่า (W2) เมื่อพิจารณาในส่วนต่างๆ ของอ้อยที่ใช้ในการศึกษาพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเฉลี่ยหลังจากการเพิ่มจำนวน จากภายในส่วนใบและลำต้นมีมากกว่าในส่วนราก ตัวอย่างการรายงานถึงปริมาณเชื้อแบคทีเรียในอ้อย โดยอาจพบแบคทีเรียจากส่วนรากในปริมาณถึง 10^8 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยพบแบคทีเรียได้ทั้งภายในไซเล็มและภายในส่วนยอดของพืช ได้แก่ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ที่พบในอ้อย (James and Olivares, 1998) และ *Herbaspirillum frisingense* ที่พบใน *Miscanthus sinensis* ซึ่งเป็นพืช C4 (Rothballer et al., 2008) Mendes et al. (2007) พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในลำต้น ราก และจากดินบริเวณรอบรากของอ้อยจำนวน 2.87×10^2 , 3.27×10^6 และ 7.90×10^7 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบในพืชชนิดอื่นๆ เช่น ภายในส่วนรากและลำต้นของหญ้าสกุลธูปฤๅษี (*Typha australis*) พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 1.0×10^7 และ 2.0×10^6 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ

ภายในส่วนรากและลำต้นของข้าวสาลีพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3×10^5 และ 3×10^4 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (Jha and Kumar, 2007; 2009) Singh *et al.* (2011) พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในส่วนรากและลำต้นข้าวจำนวน 3×10^5 และ 3×10^4 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสดตามลำดับ

การจัดจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในระดับจีโนม

การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อทราบความหลากหลายของแบคทีเรียจากภายในส่วนราก ลำต้น และใบของอ้อยพันธุ์ต่างๆ โดยอ้างอิงจากหลักการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ในการทดลองนี้การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทอาจยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควรเนื่องจากจำนวนไอโซเลทที่คัดเลือกได้มีจำนวน 89 ไอโซเลท ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากในการตรวจสอบการเตรียมอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีเพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้อย่างครอบคลุม ดังนั้นจึงควรศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในโครโมโซมและคัดเลือกไอโซเลทที่สนใจเพื่อทำการศึกษาคต่อไป ซึ่งจำนวนไอโซเลทที่ไม่มากส่งผลให้การจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีประสิทธิภาพและครอบคลุมการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ มากขึ้นภายในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมทั้งใช้อุปกรณ์และสารเคมีน้อยลง จากการตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของไอโซเลทที่แยกได้ พบแบคทีเรียลักษณะคล้ายจีโนม *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthobacter*, *Staphylococcus* และ *Bacillus* จำนวน 9, 8, 5, 2, 2 และ 15 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งยังไม่สามารถระบุจีโนมได้จำนวน 48 ไอโซเลท ตัวอย่างการรายงานถึงแบคทีเรียเอนโคไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่พบในอ้อยและพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Pseudomonas* พบได้ในอ้อย ข้าว และมันเทศ (Desnoves *et al.*, 2003; Govindarajan *et al.*, 2007; Koomnok *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2007; Prakamhang *et al.*, 2009; Khan and Doty, 2009; Magnani *et al.*, 2010) *Klebsiella* พบได้ในอ้อย ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด มันเทศ และกล้วย (Dong *et al.*, 2002; Asis and Adachi, 2003; Martínez *et al.*, 2003; Rosenblueth *et al.*, 2004; Govindarajan *et al.*, 2007) *Enterobacter* พบได้ในอ้อย ข้าว กล้วย และฝ้าย (McInroy and Kloepper, 1995; Elbaltagy *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Prakamhang *et al.*, 2009; Magnani *et al.*, 2010) *Xanthobacter* พบได้ในข้าวโพด ข้าว และมันเทศ (Roesch *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Khan and Doty, 2009) *Staphylococcus* พบได้ในอ้อย และกล้วยไม้ (เฉลิม, 2548; Magnani *et al.*, 2010) และ *Bacillus* พบได้ในอ้อย กาแฟ กล้วยไม้ ข้าว ข้าวโพด แครอท และมันเทศ (เฉลิม, 2548; วรยุวัน, 2549; McInroy *et al.*, 1994; Boddey *et al.*, 2003; Surette *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Terkado - Tonooka *et al.*, 2008) เป็นต้น

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยวิธี acetylene reduction assay เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสค่อนข้างสูงในการทดลองนี้ โดยคัดเลือกได้จากจีส *Pseudomonas* จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ *Pseudomonas* (C32ML2) และจากไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุจีสได้จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 เพื่อทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01 และ 0.05% ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) เท่ากับ 0, 5.55, 11.10 และ 55.50 ppm ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกันใน yeast extract ระดับต่างๆ โดยแบคทีเรียไอโซเลท C2HL2 ที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มี yeast extract ปริมาณ 0.005% (ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 5.55 ppm) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุดในการทดลองนี้เท่ากับ 403.8 nmol C₂H₄/mg protein/h รองลงมาคือ ไอโซเลท C2HL2 ที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มี yeast extract ปริมาณ 0% และ 0.01% ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเท่ากับ 354.1 และ 320.9 nmol C₂H₄/mg protein/h ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพิ่มขึ้นในอาหารที่มี yeast extract ปริมาณเพียงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจาก yeast extract มีแหล่งไนโตรเจนและวิตามินหลายชนิดซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเมื่อให้ yeast extract ในปริมาณที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิดจึงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส การรายงานของ Reis *et al.* (2004) พบว่า yeast extract ปริมาณ 0.01% ที่เติมลงในอาหาร nitrogen free medium จะช่วยกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียได้ Cavalcante and Döbereiner (1988) รายงานว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ของ *Herbaspirillum* จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ yeast extract เพิ่มขึ้น และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อเติม NH₄Cl จนถึงความเข้มข้น 10 mM ในการทดลองนี้แบคทีเรียหลายไอโซเลทที่ทดสอบในอาหาร nitrogen free semi-solid ที่มีปริมาณ yeast extract 0.01% และ 0.05% มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยลง อาจเนื่องมาจาก yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยเมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารอาหารที่มีไนโตรเจนในปริมาณที่เพียงพอสำหรับแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนได้ทันทีโดยไม่ต้องตรึงไนโตรเจนจากอากาศ รวมทั้งเกิดการแย่งพลังงานระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียมให้เป็น

กรดอะมิโนจึงส่งผลต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย (Hardy *et al.*, 1973; Mulder, 1975; Alexander, 1977) Tejera *et al.* (2005) แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากอ้อย และคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ระหว่าง 91.5 – 135.1 nmol C₂H₄/culture/h โดยพบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum* spp. Njoloma *et al.* (2005) แยกเชื้อแบคทีเรียจากลำต้นอ้อยสายพันธุ์ NIF8 ได้จำนวน 28 ไอโซเลท ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ระหว่าง 0.0012 – 1.178 nmol C₂H₄/tube/h Zhang *et al.* (2008) แยกเชื้อแบคทีเรียในข้าวจากส่วนลำต้นและรากของข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) ได้แบคทีเรียจำนวน 70 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 23 ไอโซเลท ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงอยู่ระหว่าง 79.2 – 1771.7 nmol C₂H₄/ml/h Jha and Kumar (2009) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนรากและลำต้นของข้าวสาลี พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในระดับที่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0.51 – 1.70 μ mol C₂H₄/mg protein/h Singh *et al.* (2011) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ภายในรากข้าว พบเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Burkholderia* จำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ระหว่าง 0.51 – 1.70 μ mol C₂H₄/mg protein/h วรยุวัน (2549) แยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อส่วนลำลูกกล้วยของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสามสี พบแบคทีเรียที่ลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสระหว่าง 0.0045 – 6.234 nmol C₂H₄/ 10⁶ cells/h จากตัวอย่างการรายงานถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส จะเห็นได้ว่าหน่วยที่ใช้ในการรายงานนั้นค่อนข้างแตกต่างกัน ดังนั้นการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงอาจเห็นผลได้ไม่ชัดเจน

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจน

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1, C2HL2, C7HL1 และ C34MR1 ในอาหาร NFB ที่มีปริมาณ yeast extract สองระดับ คือ 0% และ 0.005% (มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0 ppm และ 5.55 ppm ตามลำดับ) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ทุก 6 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทเจริญเติบโตค่อนข้างช้าในอาหาร NFB ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลท C34MR1 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลท C2HL2, *Pseudomonas* (C32ML2), AT3R1 และ C7HL1 รวมทั้งพบว่า yeast extract ปริมาณ 0.005% สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทุกไอโซเลท เนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NFB ที่เติม yeast extract ปริมาณ 0.005% มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NFB ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลท C2HL2 และ C34MR1 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ ไอโซเลท AT3R1, C7HL1 และ *Pseudomonas* (C32ML2) จากการ

รายงานของ Reis *et al.* (2004) พบว่าการเติม yeast extract ปริมาณ 100 mg/L หรือ 0.01% ที่เติมลงในอาหาร nitrogen free medium จะช่วยกระตุ้นการเจริญ รวมทั้งส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียได้ แต่ในการทดลองนี้ใช้ yeast extract ปริมาณเพียง 0.005% ก็สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการทางอนุชีววิทยา

การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการทางอนุชีววิทยาโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด และลักษณะเป็น conserved sequence ซึ่งมีหน้าที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตโดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ รวมทั้งลำดับเบสมีความยาวประมาณ 1500 bp ซึ่งเพียงพอสำหรับเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรียแต่ละชนิดจึงนิยมใช้ในการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรีย (Pate, 2001) ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ถ้าค่าความคล้ายคลึง (% similarity) น้อยกว่า 97% จัดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ แต่ถ้ามากกว่า 97% ก็ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน (Petti, 2001) รวมทั้งการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียในระดับจีโนม สปีชีส์และการระบุสปีชีส์ใหม่นั้นค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากมีข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่มีความคล้ายคลึงกันหรือเหมือนกันระดับสปีชีส์ในฐานข้อมูลค่อนข้างน้อย รวมทั้งอาจเกิดปัญหาจากการตั้งชื่อซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ได้ (Janda and Abbott, 2007) ดังนั้นการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียจึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการตรวจสอบคุณสมบัติอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพื่อให้การจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีความใกล้เคียงมากที่สุด ในงานวิจัยนี้การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยแบคทีเรียไอโซเลท AT3R1 มีลักษณะบางประการตรงตามหลักการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ได้แก่ เชลล์ติดสีแกรมลบ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไคไลนีสีขาวลักษณะทึบแสง ผลการทดสอบ catalase test, oxidase test และ urease test เป็นบวก รวมทั้งจาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถระบุได้ว่าไอโซเลท AT3R1 จัดเป็นแบคทีเรียในจีโนม *Ancylobacter* โดย Young (1992) รายงานว่าแบคทีเรียในจีโนม *Ancylobacter* สามารถเจริญได้บนอาหาร nitrogen free medium ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ได้แก่ *A. rudongensis* ซึ่งแยกได้จากส่วนรากของหญ้าเจ้าชู้ทะเล

(*Spartina anglica*) รวมทั้ง *A. vacuolatus* sp. nov. ที่แยกได้จากดิน และ *A. polymorphus* sp. nov. ที่แยกได้จากโคลนแม่น้ำ (Xin *et al.*, 2004; 2006)

แบคทีเรียไอโซเลท C2HL2 และ C34MR1 มีลักษณะบางประการคล้ายกับ *Novosphingobium* ได้แก่ โคโลนิที่มีสีเหลือง ดิสเกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และการทดสอบ catalase test เป็นบวก (Takeuchi *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2010) จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท C2HL2 พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ *N. sediminicola* HU1-AH51^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 74% รวมทั้งไอโซเลท C34MR1 พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ *N. capsulatum* GIFU11526^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 96% ดังนั้นไอโซเลท C2HL2 น่าจะจัดอยู่ในสปีชีส์ *N. sediminicola* และไอโซเลท C34MR1 น่าจะจัดอยู่ในสปีชีส์ *N. capsulatum* การรายงานถึงแบคทีเรียในจินัส *Novosphingobium* ได้แก่ *N. rosa* พบจากส่วนรากของกุหลาบ (Takeuchi *et al.*, 1995) Addison *et al.* (2007) สามารถแยก *N. nitrogenifigens* sp. nov. ได้จากน้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ โดยพบว่ามีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนและมีการสะสม polyhydroxyalkanoate granule ซึ่งเป็นครั้งแรกของการรายงานถึงแบคทีเรียในจินัสนี้ที่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน *N. tardaugens* พบภายในรากข้าว (*Oryza sativa*) (Mano and Morisaki, 2008; Sun *et al.*, 2008) *N. capsulatum* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนซึ่งแยกได้จากดินนาข้าว (Islam *et al.*, 2010)

แบคทีเรียไอโซเลท C7HL1 มีลักษณะบางประการตรงตามหลักการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) คือ เซลล์รูปแท่ง ดิสเกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ โคโลนิที่เจริญบนอาหารอาหาร nutrient agar ไม่สร้างสารสี ผลการทดสอบ catalase test และ oxidase test เป็นบวก indole production เป็นลบ รวมทั้งจาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถระบุได้ว่าไอโซเลท C7HL1 จัดเป็นแบคทีเรียในจินัส *Ochrobactrum* การรายงานถึงแบคทีเรียในจินัสนี้ ได้แก่ *Ochrobactrum oryzae* sp. nov. พบเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในรากข้าวน้ำลึก (Tripathi *et al.*, 2006) *Ochrobactrum* sp. และ *O. anthropi* พบเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเมล็ดและรากข้าว (*Oryza sativa*) รวมทั้งพบเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนซึ่งแยกได้จากดินนาข้าว (Mano and Morisaki, 2008; Islam *et al.*, 2010)

แบคทีเรียไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2) มีลักษณะบางประการคล้าย *P. psychrotolerans* C36^T (Hauser *et al.*, 2004) และ *P. oryzae* IAM 1568^T (Kodama *et al.*, 1985) ได้แก่ เซลล์รูปแท่ง ดิสเกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ การทดสอบ catalase test เป็นบวก oxidase test เป็นลบ เคลื่อนที่ได้ รวมทั้งสามารถสร้างกรดเมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จาก phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท *Pseudomonas* (C32ML2) พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับ

P. psychrotolerans C36^T สนับสนุนโดย bootstrap values เท่ากับ 89% ซึ่ง Hauser *et al.* (2004) รายงานว่า *P. psychrotolerans* C36^T สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4°C ขณะที่แบคทีเรีย *Pseudomonas* (C32ML2) ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากบ่มบนอาหาร NA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C จะเจริญได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งการรายงานถึงแหล่งที่พบเชื้อแบคทีเรีย โดย *P. psychrotolerans* C36^T แยกได้จากน้ำได้กรองสุ้นของโรงพยาบาลสัตว์เล็ก ขณะที่ *P. oryzihabitans* IAM 1568^T แยกได้จากดินนาข้าว แต่ไม่ได้มีการรายงานถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ รวมทั้งจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่าง *Pseudomonas* (C32ML2) กับ *P. psychrotolerans* C36^T และ *P. oryzihabitans* IAM 1568^T พบว่ามี % similarity แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (99.72% และ 99.38% ตามลำดับ) จึงอาจเป็นไปได้ว่าไอโซเลต *Pseudomonas* (C32ML2) น่าจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *P. oryzihabitans* มากกว่า *P. psychrotolerans* เนื่องจากแหล่งที่พบแบคทีเรียมีความใกล้ชิดกับพืช โดยทั้งข้าวและอ้อยเป็นพืชตระกูลหญ้าเช่นเดียวกัน ดังนั้นน่าจะมีโอกาสพบแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับพืชได้ในลักษณะคล้ายกัน

การศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในพืชหลายชนิดจึงทำให้ในปัจจุบันมีข้อมูลของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีอย่างกว้างขวาง ซึ่งเป็นผลดีต่อการพัฒนาความรู้ทางวิทยาศาสตร์ควบคู่กับการรักษาสังแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางสำหรับการนำไปขยายผลของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้และก่อให้เกิดประโยชน์ทางเกษตรกรรมต่อไป