บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ปริมาณจุลินทรีย์ในดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากพืช

จากการแยกจุลินทรีย์จากดิน กาบใบและบริเวณรอบรากข้าวพบว่า จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณดินมีปริมาณเฉลี่ย 2.2 x 10^8 cfu ต่อกรัม ซึ่งน้อยกว่าจุลินทรีย์ในบริเวณกาบใบและบริเวณรากข้าวที่มีปริมาณเฉลี่ย 2.7 x 10^8 และ 8.9 x 10^8 cfu ต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และ 5) การที่จุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืชมีปริมาณสูงกว่าในดินบริเวณที่อยู่ห่างรากพืชออกไป เนื่องจากที่บริเวณรอบรากพืชมีกรดอินทรีย์ และกรดอะมิโนบางชนิดสะสมอยู่ เช่น citrate, oxalate และ aspartic acid สารเหล่านี้มาจากการปลดปล่อยจากรากพืช (root exudate) และจากการเน่าสลายของชิ้นส่วนของรากพืชที่หลุดออกมา จุลินทรีย์ดินจะใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งพลังงาน (สมศักดิ์, 2528) เช่นเดียวกับรายงานของ Yang และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ดินที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากสนมีปริมาณสูงกว่าบริเวณที่อยู่ห่างรากออกไปอย่างชัดเจน นอกจากนี้บริเวณรอบรากพืชจะเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนอยู่ในสัดส่วนที่มากกว่าบริเวณที่อยู่ห่างออกไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวเป็นพืชที่ปลูกในสภาพน้ำขังที่บริเวณรอบรากพืช และบริเวณกาบใบซึ่งอยู่เหนือรากเพียงเล็กน้อยจะเป็นบริเวณที่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ดินที่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดี ทำให้มีปริมาณมากกว่าในดินซึ่งอยู่ห่างออกไปจากรากพืช แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในส่วนต่าง ๆ ของข้าวที่ปลูกในสภาพใส่และไม่ใส่ปูนพบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณใกล้เคียงกัน ยกเว้นปริมาณเชื้อรอบรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ช่อลุง ที่พบว่าในสภาพที่ใส่ปูนมีปริมาณสูงกว่าไม่ใส่ปูน (ตารางที่ 4) อาจเนื่องมาจากการใส่ปูนทำให้สภาพของดินเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดทำให้มีปริมาณมากขึ้น เช่นเดียวกับเชื้อไรโซเบียมที่อยู่บริเวณรอบรากถั่วเหลืองซึ่งปลูกในดินที่ไม่มีการใส่ปูน (พีเอช 3.9) พบว่ามีเชื้อในปริมาณต่ำมากคือ น้อยกว่า 10 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม แต่เมื่อมีการใส่ปูนซึ่งทำให้พีเอชของดินเพิ่มขึ้นเป็น 4.9 พบว่าปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.9 x 10^4 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม (Andrade *et al.*, 2000) และจากการศึกษาของ Coventry และ Hirth (2003) เมื่อปรับพีเอชของดินที่ปลูกข้าวฟ่างสลับด้วยพืชคลุมให้เพิ่มสูงขึ้นทำให้จำนวนของ *Rhizobium trifolii* เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 1.0 x 10^5 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม

2. ความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และการเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์

สามารถแยกจุลินทรีย์จากดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากข้าวได้ถึง 157 สายพันธุ์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ โดยการแปรสภาพของอินทรีย์ฟอสฟอรัสต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส จึงทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส คือสายพันธุ์ AR101 และ AR102 และทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ต่างกัน และเชื้อสายพันธุ์ AR102 มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสายพันธุ์ AR101 เมื่อพิจารณาจากความขุ่นที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร (ตารางที่ 6) เมื่อนำทั้งสองสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า ทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่จีนัส *Ustilago* sp. ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสได้นั้น ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp. (Illmer and Schinner, 1992) *Bacillus subtilis* (Rodriguez and Fraga,1999) *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* และ *R. loti* (Halder, 1993) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อ *Ustilago* sp. ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อราชนิดที่มีเซลล์เดี่ยวจึงสามารถทนและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยจุลินทรีย์ที่พบในดินกรดจัดส่วนใหญ่เป็นประเภทเชื้อราซึ่งสามารถทนต่อสภาพเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

มีรายงานว่า *Ustilago* sp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชเช่น *Ustilago maydis* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค smut ในข้าวโพด โดยเชื้อเข้าทำลายที่บริเวณฝัก ทำให้ฝักข้าวโพดเกิดลักษณะผิดปกติ เช่น เกิดเป็นปุ่มปมขนาดใหญ่ สีของฝักเปลี่ยนเป็นสีขาวและดำ (Kahmann *et al*., 1999; Banuett and Herskowitz, 2002) และ *Ustilago scitaminea* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค smut ในอ้อย ทำให้ลำต้นไม่เจริญเติบโตและแตกกอเป็นต้นเล็ก ๆ คล้ายแส้ ข้อที่ลำต้นสั้นลง เนื้อด้านในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ (Fontaniella *et al*., 2002; Wada, 2003) แต่เท่าที่มีรายงานในปัจจุบัน พบว่า *Ustilago* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่พบได้ในส่วนเหนือดินของพืชเท่านั้น แต่ไม่มีรายงานว่าพบในบริเวณรอบรากพืช หรือส่วนที่อยู่ใต้ดินของพืช เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจาก *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 พบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจนแม้จะอยู่ในสภาวะเดียวกัน และเชื้อสายพันธุ์ AR102 มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสายพันธุ์ AR101 เมื่อพิจารณาจากความขุ่นของเชื้อหลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 12 วัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสอง สายพันธุ์ไม่ได้เป็นตัวเดียวกัน ดังนั้นการนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสไม่ควรคัด

เลือกเฉพาะเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเท่านั้น แต่ควรศึกษาการตอบสนองของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แล้วจึงคัดเลือกไปใช้ให้เหมาะสมในแต่ละสภาวะ

3. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp.

เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 3.5-4.5 (รูปที่ 2) ซึ่งไม่แตกต่างกับแอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มากนัก เช่น แอซิดฟอสฟาเทสจากเชื้อ *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 2.0-3.5 (Gargovar and Sariyska, 2003) และแอซิดฟอสฟาเทสจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DPC2739 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 3.5-5.0 (Magboul and McSweency, 1999) กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะไม่เกิดขึ้นเมื่อระดับพีเอชสูงกว่า 5.5 (รูปที่ 2) แต่เชื้อ *Ustilago* sp. ทั้งสองสายพันธุ์คัดแยกมาจากดินกรดจัด ซึ่งมีพีเอชประมาณ 4 ดังนั้นในสภาพธรรมชาติพีเอชไม่ได้เป็นตัวจำกัดการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ถ้านำเชื้อเหล่านี้ไปใช้เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินกรดจัดซึ่งโดยทั่วไปพีเอชของดินอยู่ที่ประมาณ 4 ก็ไม่จำเป็นต้องปรับพีเอชของดินแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามในดินที่มีพีเอชต่ำอาจมีไอออนบางชนิดเช่น อะลูมินัม เฟอรัส และแมงกานีสละลายออกมามากจนส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

4. วิธีการทดสอบการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตโดยเชื้อ *Ustilago* sp.

การที่พีเอชของสารละลายโซเดียมไฟเทตในทรีตเมนต์ที่เติมเชื้อซึ่งผ่านและไม่ผ่านการต้ม อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าทรีตเมนต์ที่ใส่น้ำ และอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3ก) เนื่องจากในขั้นตอนการทดสอบได้นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 12 วัน ซึ่งในขณะนั้นอาหารมีพีเอชประมาณ 2.3 เมื่อนำมาใส่ในสารละลายทำให้พีเอชของสารละลายลดลงได้ แต่ไม่ได้ส่งผลต่อการปลดปล่อยฟอสฟอรัส เพราะแม้พีเอชลดลงจนถึง 2 ก็ไม่ได้ทำให้ฟอสฟอรัสปลดปล่อยออกมาจากโซเดียมไฟเทต (มนูญ, 2548) และจากผลการทดสอบการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทต (รูปที่ 3ค) พบว่า ในทรีตเมนต์ที่เติมน้ำ อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อที่ผ่านการต้มมีฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาใกล้เคียงกันประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งนี้ไม่ได้เป็นผลมาจากเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส แต่อาจเป็นเพราะโซเดียมกับไฟเทตจับกันอยู่ด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรงมากนัก จึงถูก

ทำลายได้ด้วยน้ำ และเมื่อบ่มสารละลายผ่านไป 14 และ 24 ชั่วโมงพบว่าฟอสฟอรัสในทรีตเมนต์ที่เติมน้ำ อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อที่ผ่านการต้ม ไม่ได้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด แตกต่างกับทรีตเมนต์ที่เติมเชื้อซึ่งไม่ผ่านการต้มมีฟอสฟอรัสเพิ่มสูงขึ้นชัดเจน ทั้งนี้เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ยังคงดำเนินอยู่ (รูปที่ 3ข) แต่ในทรีตเมนต์ที่เติมเชื้อซึ่งผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีลงไปในสารละลาย พบว่าความร้อนทำให้เชื้อตาย (ตารางที่ 8) และเอนไซม์เสื่อมสภาพไม่สามารถทำงานได้ (รูปที่ 3ข) จึงไม่สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสได้เพิ่มขึ้น โดยมีรายงานว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ทำให้เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DPC2739 เสื่อมสภาพ (Magboul and McSweency, 1999) เช่นเดียวกับเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Aspergillus niger* จะเสื่อมสภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส (Gargovar and Sariyska, 2003) และหากจะทดสอบหรือเปรียบเทียบผลของเชื้อต่อการละลายฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตในครั้งต่อไปก็สามารถนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร modified Pikovskaya's medium เป็นเวลา 12 วัน มาบ่มในสารละลายโซเดียมไฟเทตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 หรือนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนวิเคราะห์ฟอสฟอรัสในสารละลายโดยทำให้เกิดสีด้วยโมลิบดินัมบลู

5. ความสามารถของ *Ustilago* sp. ในการเจริญเติบโตและการละลายโซเดียม ไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต

จุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ในรูปโซเดียมไฟเทตเท่านั้น (ตารางที่ 9) ส่วนรูปของอะลูมินัมไฟเทตและไอรอนไฟเทตนั้นสามารถละลายได้น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อไฟเทตเข้าไปจับกับอะลูมินัม และไอรอนทำให้พันธะมีความแข็งแรงมากกว่าจับกับโซเดียม ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถช่วยให้มีการปลดปล่อยฟอสฟอรัสเกิดขึ้นได้ แม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวยังคงดำเนินอยู่ เช่นเดียวกับสภาพที่เกิดขึ้นในดินกรดซึ่งมีอะลูมินัมและไอรอนละลายอยู่มาก ไฟเทตมักรวมตัวอยู่กับไอรอนและอะลูมินัมในดินกลายเป็นรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ยากเพราะเอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ อย่างไรก็ตามที่พีเอชประมาณ 2-4 อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตสามารถละลายและปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้เล็กน้อย (มนูญ, 2547) ในช่วงที่ *Ustilago* sp. ทั้งสองสายพันธุ์เจริญเติบโตพบว่า พีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วโดยลดลงจากพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 มาอยู่ที่ระดับ 2.5-3.3 (รูปที่ 4ก และ 4ข) ในช่วงสี่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ จึงอาจทำให้ฟอสฟอรัสบางส่วนถูกปลดปล่อยออกมาจากอะลูมินัมไฟเทตและไอรอนไฟเทตได้เล็กน้อย และจุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ โดยอาจเป็นไปได้ว่าแม้มีฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์เพียงเล็กน้อยก็เพียงพอต่อการนำไปใช้

ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อและเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจากทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมใกล้เคียงกัน แม้จะเลี้ยงในอาหารที่มีฟอสฟอรัสแตกต่างกัน (รูปที่ 4ค – 4ฉ) และเมื่อเชื้อตายลงฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จะถูกย่อยสลายและอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืชได้ต่อไป การที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงอย่างรวดเร็วในช่วงสี่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อไม่ได้มีสาเหตุมาจากการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ของเชื้อแต่อย่างใด เพราะมีรายงานว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาในระหว่างการเจริญเติบโต (Pengnoo, 2005) แต่การลดลงของพีเอชน่าจะเกิดจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกมาจากเซลล์ของจุลินทรีย์เมื่อจุลินทรีย์มีการดูดใช้แอมโมเนียมไอออนและแคตไอออนอื่น ๆ (Paul and Clark, 1996) เช่นเดียวกับ *Penicillium simplicissimum* และ *Pseudomonas* sp. ที่ไม่มีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาในช่วงที่เชื้อเจริญเติบโต แต่มีการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกมาเมื่อมีการดูดใช้แอมโมเนียม ทำให้สารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัสเช่น อะลูมินัมฟอสเฟตและไอรอนฟอสเฟตละลายและปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้ (Illmer *et al*., 1995) ดังนั้นนอกจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้แล้วยังช่วยละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ด้วย

6. ผลของอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีส และแคลเซียมไอออนต่อการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และการปลดปล่อยฟอสฟอรัสของ *Ustilago* sp.

หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Ustilago* sp. ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารซึ่งเติมและไม่เติมแคตไอออนทั้งสี่ชนิดพบว่า พีเอชของอาหารลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4ก–4ซ) เช่นเดียวกับที่เลี้ยงในอาหารซึ่งมีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมไฟเทต โซเดียมไฟเทต และไอรอนไฟเทต แต่ในทรีตเมนต์ที่มีอะลูมินัมเพิ่มขึ้นพบว่าการลดลงของพีเอชจะน้อยกว่าทรีตเมนต์ที่มีแคตไอออนอื่น ๆ ทั้งที่จำนวนเชื้อใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากอะลูมินัมเข้าไปขัดขวางการดูดแอมโมเนียมและแคตไอออนอื่น ๆ ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้ไฮโดรเจนไอออนถูกปลดปล่อยออกมาได้น้อยลง

เชื้อ *Ustilago* sp. ที่นำมาศึกษาครั้งนี้คัดแยกมาจากดินบริเวณรากข้าวที่ปลูกในดินกรดจัด ซึ่งมีอะลูมินัม เฟอรัส และแมงกานีสละลายอยู่มาก และจากการทดสอบพบว่าแคตไอออนเหล่านี้ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวแต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีแคตไอออนเหล่านี้ละลายอยู่มาก โดยเฉพาะอะลูมินัมแม้ว่าจะมีความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ไม่ได้ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวลดลง (รูปที่ 6ก และ 6ข) แตกต่างกับ *Pseudomonas* sp. ที่พบว่ามีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอะลูมินัมเข้มข้นมากกว่า 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (lllmer and Schinner, 1999) และ

เชื้อ *R.trifilii* ที่พบว่าอะลูมินัมระดับ 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวในระยะ log phase (Wood and Cooper, 1988) และมีรายงานว่าอะลูมินัมความเข้มข้นสูงกว่า 8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ *Pseudomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. (lllmer and Schinner, 1997)

การต้านทานอะลูมินัมของ *Ustilago* sp. AR101 น่าจะเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เข้าจับกับอะลูมินัมที่ละลายอยู่ ทำให้อะลูมินัมในสารละลายลดลงและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจาก *Ustilago* sp. AR101 ลดลงชัดเจนเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอะลูมินัมสูง หรือบ่มสารละลายโซเดียมไฟเทตที่มีอะลูมินัมสูง (รูปที่ 7ก และรูปที่ 9ก) รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์และอะลูมินัมในทรีตเมนต์ที่บ่มสารละลายโซเดียมไฟเทตร่วมกับอะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *Ustilago* sp. AR101 ลดลงทันทีตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นการบ่ม (รูปที่ 10ข และ 10ง) ส่วนการต้านทานอะลูมินัมของ *Ustilago* sp. AR102 นั้นอาจเกิดขึ้นโดยอะลูมินัมถูกดูดเข้าไปภายในเซลล์ แล้วจับกับโปรตีนบางชนิดเปลี่ยนเป็นรูปที่ไม่เป็นพิษ หรืออาจสะสมไว้ในส่วนของแวคคิลโอล (Taylor, 1988 อ้างโดย Jo *et al*. 1997) เพราะแม้จะเลี้ยงหรือบ่มเชื้อสายพันธุ์นี้ในสภาพที่มีอะลูมินัมสูงก็ไม่ได้ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง การต้านทานความเป็นพิษของเฟอรัส และแมงกานีสไอออนอาจจะอาศัยกลไกเดียวกัน ส่วนแคลเซียมไอออนที่เพิ่มขึ้นไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ustilago* sp. ทั้งสองสายพันธุ์เช่นเดียวกับเชื้อ *Rhizobium trifolii* (Wood and Cooper, 1984) แต่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเติมแคลเซียมไอออนลงไป 204 มิลลิกรัมต่อลิตร (Maccio *et al*., 2002)

การที่กิจกรรมของเอนไซม์ จาก *Ustilago* sp. AR101 ลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีอะลูมินัม และแคลเซียมสูงหรือบ่มเชื้อในสารละลายที่มี อะลูมินัม เฟอรัส และแคลเซียมสูงนั้น สามารถพิจารณาได้สองประเด็นคือ ประเด็นแรกอาจเป็นกลไกป้องกันไม่ให้แคตไอออนเหล่านี้เป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์โดยเอนไซม์เข้าไปจับกับแคตไอออนทำให้แคตไอออนลดปริมาณลง แต่อีกประเด็นคือแคตไอออนเหล่านี้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยแคตไอออนอาจเข้าไปจับกับเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม การเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจึงเกิดขึ้นได้น้อยลง เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นเมื่อบ่ม *Ustilago* sp. AR101 ในสารละลายที่มีอะลูมินัม แมงกานีส และแคลเซียมสูง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงทันทีในช่วงเริ่มต้น และกลับเพิ่มสูงในช่วงหลังบ่มจนไม่แตกต่างกับทรีตเมนต์ที่ไม่เติมแคตไอออนดังกล่าว (รูปที่ 9ก, 9จ และ 9ซ) ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใส่ลงไปยังเจริญเติบโตได้แม้บ่มเป็นเวลา 14 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) จึงทำให้เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสถูกปลดปล่อยออกมาเรื่อย ๆ แต่ปริมาณอะลูมินัมที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์มีอยู่อย่างจำกัด เพราะอะลูมินัมส่วนหนึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ บางส่วนตกตะกอนกับไฟเทต และบางส่วนเข้าไปจับกับฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้เอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใหม่สามารถทำงานได้

อย่างปกติและมีกิจกรรมสูงขึ้นจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกับทรีตเมนต์ที่ไม่เติมแคตไอออน อย่างไรก็ตามถ้ากลไกเหล่านี้เกิดขึ้นที่บริเวณรอบรากพืชซึ่งปลูกในสภาพดินกรด หรือกรดจัดที่มักมีอะลูมินัม และแมงกานีสละลายอยู่มาก จะส่งผลดีต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในบริเวณดังกล่าว เพราะเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะเข้าจับกับแคตไอออนดังกล่าวให้ลดปริมาณลง ลดโอกาสที่จะเข้าจับกับฟอสฟอรัสและเป็นพิษต่อพืช ส่วนจุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาได้ เรื่อย ๆ ช่วยให้อินทรีย์ฟอสฟอรัสเปลี่ยนเป็นรูปที่เป็นประโยชน์กับพืชได้ ประกอบกับจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชมีการดูดใช้แอมโมเนียมและแคตไอออนอื่น ๆ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนถูกปลดปล่อยออกมา พีเอชของดินบริเวณรอบรากพืชอาจลดต่ำลงจนช่วยให้ อะลูมินัมฟอสเฟต ไอรอนฟอสเฟต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตละลายและปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้

กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสจากสายพันธุ์ AR102 ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งมีเฟอรัสไอออนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีเฟอรัสไอออน (รูปที่ 7ง) อาจเป็นเพราะเฟอรัสไอออนมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส โดยเฟอรัสอาจเป็นองค์ประกอบสำคัญในโครงสร้างของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส เช่นเดียวกับเอนไซม์เพอร์เพิลแอซิดฟอสฟาเทส ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีโมเลกุลของ Fe^{3+}-Fe^{2+} เป็นองค์ประกอบอยู่ (Schenk *et al*. 1999) หรือเฟอรัสอาจช่วยให้เชื้อสายพันธุ์ AR 102 ปลดปล่อยเอนไซม์ได้มากขึ้นแต่ไม่ได้ช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์แล้ว เพราะเมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR102 ในสารละลายที่มีการเติมเฟอรัสไอออน (รูปที่ 9ง) พบว่าหลังจากเติมเฟอรัสไอออนกิจกรรมของเอนไซม์ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับไม่เติม ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยการตรวจสอบปริมาณเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยออกมาในทรีตเมนต์ที่เติมและไม่เติมเฟอรัสไอออน แต่เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR 102 ที่เติมเฟอรัสไอออนในช่วงหลังบ่มพบว่า ทรีตเมนต์ที่เติมและไม่เติมเฟอรัสมีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 9ง) แสดงให้เห็นว่าการที่เฟอรัสไอออนจะกระตุ้นให้เชื้อปลดปล่อยเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นนั้นต้องอาศัยระยะเวลาที่นานกว่านี้ และจำนวนเชื้อที่ใส่ลงในสารละลายโซเดียมไฟเทตก็น้อยกว่าเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารซึ่งมีเฟอรัสไอออนละลายอยู่ (รูปที่ 6ง) ทำให้การกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์โดยเฟอรัสในการทดลองนี้ไม่ชัดเจนนัก

แมงกานีส และแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายโซเดียมไฟเทตของเชื้อ *Ustilago* sp.ทั้งสองสายพันธุ์ โดยฟอสฟอรัสในสารละลายช่วงหลังบ่มสูงกว่าช่วงเริ่มต้นการบ่มชัดเจน และไม่มีความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ที่เติมและไม่เติมแมงกานีสและแคลเซียมไอออน (รูปที่ 8จ-8ซ) ในขณะที่การเติมอะลูมินัมและเฟอรัสไอออนทำให้ฟอสฟอรัสในสารละลายต่ำลง (รูปที่ 8ก-8ง) แม้ว่าอะลูมินัมจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (รูปที่ 9ก) แต่การลดลงของฟอสฟอรัสในสารละลายเมื่อได้รับอะลูมินัมและเฟอรัสไอออนเพิ่มขึ้นนั้น ไม่น่าจะเกิดเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสถูกยับยั้งแต่อย่างใด เพราะถึง

แม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจากเชื้อสายพันธุ์ AR101 ในทรีตเมนต์ที่เติมอะลูมินัมลดต่ำลงในช่วงเริ่มต้นการบ่ม (รูปที่ 9ก) แต่ก็ยังอยู่ในระดับที่สูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยจากเชื้อสายพันธุ์ AR102 ที่ไม่ได้เติมอะลูมินัม (รูปที่ 9ข) ซึ่งฟอสฟอรัสก็สามารถถูกปลดปล่อยออกมาได้ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีของเฟอรัสไอออน พบว่าในทรีตเมนต์ที่เติมและไม่เติมเฟอรัสไอออน มีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสไม่แตกต่างกันทั้งช่วงเริ่มต้นและหลังบ่ม การลดลงของฟอสฟอรัสเมื่อได้รับอะลูมินัมและเฟอรัสไอออนเพิ่มขึ้นนั้นน่าจะเกิดเนื่องจาก ฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมาไปทำปฏิกิริยากับอะลูมินัม และเฟอรัสไอออน กลับไปอยู่ในรูปของอะลูมินัมฟอสเฟต และไอรอนฟอสเฟตซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก

โดยในกรณีของอะลูมินัมสามารถยืนยันได้ด้วยการทดลองที่ 3.3.3 คือเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและอะลูมินัมในสารละลาย พบว่าฟอสฟอรัสในทรีตเมนต์ที่เติมอะลูมินัมลดต่ำลงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นการบ่ม (รูปที่ 10ค) แสดงให้เห็นว่าฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายที่มีอะลูมินัมละลายอยู่มาก ฟอสฟอรัสจะเข้าไปจับกับอะลูมินัมและกลายเป็นรูปที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ยากอีกครั้งหนึ่ง และเมื่อบ่มสารละลายต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าฟอสฟอรัสลดต่ำลงกว่าช่วงเริ่มต้น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมอะลูมินัมลงไปเป็นครั้งที่ 2 แต่เมื่อบ่มต่อไปจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าไม่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เหลืออยู่เลย ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของอะลูมินัมในสารละลายที่พบว่าช่วงเริ่มต้นการบ่มมีอะลูมินัมอยู่ 2.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 2.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเป็น 12.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเติมอะลูมินัมเป็นครั้งที่ 2 และเมื่อบ่ม 72 ชั่วโมงพบว่า อะลูมินัมลดต่ำลงมาอยู่ที่ 9.7 มิลลิกรัมต่อลิตร การลดลงของอะลูมินัมในสารละลายที่เกิดขึ้นนอกจากมีสาเหตุมาจากอะลูมินัมเข้าไปจับกับเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และฟอสฟอรัสที่ปลดปล่อยออกมาแล้ว ยังมีสาเหตุมาจากอะลูมินัมอาจเข้าไปไล่ที่โซเดียมในสารประกอบโซเดียมไฟเทต กลายเป็นอะลูมินัมไฟเทตซึ่งเอนไซม์สามารถเข้าไปปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสรูปนี้ได้น้อยมาก หรืออะลูมินัมเข้าไปทำปฏิกิริยากับโซเดียม ไฟเทตทำให้โครงสร้างซับซ้อนขึ้น อะลูมินัมช่วงเริ่มต้นการบ่มจึงลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากนั้นอะลูมินัมลดลงเพียงเล็กน้อยเพราะไปจับกับฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมา และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเติมอะลูมินัมในครั้งที่ 2 เพราะโซเดียมที่จับอยู่กับไฟเทตถูกแทนที่ด้วยอะลูมินัมจนเต็มที่แล้วตั้งแต่เติมลงไปครั้งแรก อะลูมินัมที่เติมลงไปในครั้งที่ 2 จึงเหลืออยู่ในสารละลายทั้งหมด และเข้าจับกับฟอสฟอรัสในสารละลายที่เหลืออยู่ ทำให้อะลูมินัมในสารละลายลดต่ำลงเล็กน้อยหลังจากบ่มครบ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 10ง)

7. ผลของเชื้อ *Ustilago* sp. สายพันธุ์ AR 101 ต่อการเจริญเติบโต และการดูดใช้ฟอสฟอรัสของข้าวในอาหารวุ้น

ข้าวที่ปลูกในอาหารวุ้นซึ่งมีฟอสฟอรัสรูปโซเดียมไฟเทตในสภาพที่ใส่เชื้อ สายพันธุ์ AR101 มีน้ำหนักแห้ง และสามารถดูดใช้ฟอสฟอรัสได้สูงกว่าข้าวที่ปลูกในสภาพไม่ใส่เชื้อ (รูปที่ 10ก และ 10ข) และสามารถดูดใช้ฟอสฟอรัสได้ใกล้เคียงกับข้าวที่ปลูกโดยใส่ฟอสฟอรัสรูปไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตซึ่งเป็นรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ง่ายทั้งในสภาพที่ใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ เนื่องจากเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 มีความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส ซึ่งสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตได้ (ตารางที่ 9) ข้าวจึงนำฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมาไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่ทรีตเมนต์ที่ปลูกโดยใส่ฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมไฟเทตและไอรอนไฟเทตทั้งในสภาพใส่และไม่ใส่เชื้อกลับพบว่ามีน้ำหนักแห้ง และสามารถใช้ฟอสฟอรัสได้น้อยกว่าทรีตเมนต์ที่ปลูกโดยใส่ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมไฟเทต เนื่องจากอะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตละลายได้น้อยมากเมื่ออาศัยกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (ตารางที่ 9) และพีเอชของอาหารที่ใช้ปลูกข้าวอาจจะไม่ได้ลดลงจนถึงระดับที่ทำให้ฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาได้ ทำให้ข้าวดูดใช้ฟอสฟอรัสได้น้อย

8. แนวทางการนำเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 มาใช้ประโยชน์

เชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตซึ่งเป็นฟอสฟอรัสที่ละลายยาก แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถนำฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้ โดยสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากสารละลายโซเดียมไฟเทตให้ออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ได้ และถึงแม้ว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากอะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทตซึ่งเป็นอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่มีอยู่มากในดินเขตร้อนได้เพียงเล็กน้อย แต่ทั้งสองสายพันธุ์สามารถนำฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสทั้งสองรูปมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ เมื่อเซลล์ของเชื้อตายลงฟอสฟอรัสในเซลล์จะถูกแปรสภาพไปอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืชต่อไป เชื้อทั้งสองสายพันธุ์เป็นยีสต์ที่คัดแยกมาจากดินกรดจัดจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกรด และเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการทำงานสูงที่พีเอช 3.5-4.5 ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอชของดินกรดจัด และในขณะที่เชื้อเจริญเติบโตพบว่าพีเอชลดต่ำลง ซึ่งการลดต่ำลงของพีเอชช่วยให้อนินทรีย์ฟอสฟอรัส เช่น อะลูมินัมฟอสเฟตและไอรอนฟอสเฟตละลายและปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินกรดจัด

ถึงแม้ว่าในดินกรดจัดมีไอออนของอะลูมินัม เฟอรัสและแมงกานีสละลายอยู่มาก แต่ไอออนเหล่านี้ไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แต่อะลูมินัมมีผลยับยั้งกิจ

กรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR101 แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR102 ในขณะที่เฟอรัสช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR102 นอกจากนี้ฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมามักตกตะกอนกับอะลูมินัมหรือเฟอรัสที่ละลายอยู่มากในดิน แต่สามารถลดปริมาณของอะลูมินัมและเฟอรัสที่ละลายอยู่ได้โดยการใส่วัสดุปูน โดยเฉพาะยิปซัมที่สามารถลดความเป็นพิษของอะลูมินัมได้โดยไม่ทำให้พีเอชของดินเพิ่มขึ้น ทำให้ลดปัญหาเรื่องผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสายพันธุ์ AR101 จะเข้าจับกับอะลูมินัมและเฟอรัสให้ลดปริมาณลงได้อีกทางหนึ่ง และถึงแม้ว่าเอนไซม์ที่เข้าจับกับ อะลูมินัม และเฟอรัสจะไม่สามารถช่วยปลดปล่อยฟอสฟอรัสได้อีกต่อไป แต่จุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาได้ เรื่อย ๆ ส่วนที่ไม่ได้เข้าจับกับแคตไอออนดังกล่าวยังคงทำงานได้อย่างปกติ ไฟเทตส่วนใหญ่ในดินกรดจัดทำปฏิกิริยากับอะลูมินัมและเฟอรัสไอออน แล้วเปลี่ยนไปอยู่ในรูปอะลูมินัมไฟเทตและไอรอนไฟเทต ซึ่งเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปนี้ได้น้อยมาก แต่การลดปริมาณของอะลูมินัมและเฟอรัสไอออนในสารละลายดินเป็นหนทางหนึ่งที่จะป้องกันไม่ให้ไฟเทตเข้าทำปฏิกิริยากับไอออนเหล่านี้ โดยที่บริเวณรอบรากพืชมักพบว่ารากพืชมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์หลายชนิดออกมา กรดอินทรีย์เหล่านี้เข้าทำปฏิกิริยากับอะลูมินัมและเฟอรัสที่ละลายออกมาจึงส่งผลให้ปริมาณของอะลูมินัมและเฟอรัสลดลงได้ทางหนึ่ง โดยถ้าใช้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ร่วมกันอาจทำให้ประสิทธิภาพในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปว่าเมื่อนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไปใช้กับดินแล้วสามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้มากน้อยเพียงใด