บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ปริมาณจุลินทรีย์ในดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากพืช

จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณดินซึ่งสามารถเจริญเติบโตในอาหารสูตร modified Pikovskaya's medium ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตมีปริมาณอยู่ในช่วง 2.6 x 10^7- 5.8 x 10^8 cfu ต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์ในบริเวณกาบใบและบริเวณรากข้าวอยู่เล็กน้อย โดยจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณกาบใบและบริเวณรอบรากข้าวมีปริมาณตั้งแต่ 4.8 x 10^7-7.3 x 10^8 และ 1.7 x 10^7-3.8 x 10^9 cfu ต่อกรัม ตามลำดับ สำหรับข้าวที่ปลูกในสภาพกระถางพบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ดินในสภาพที่มีการใส่และไม่ใส่ปูนมีความแตกต่างเล็กน้อย และจุลินทรีย์บริเวณรอบรากของข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานีที่ปลูกในดินซึ่งไม่ใส่ปูนมีปริมาณสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่ปลูกในสภาพเดียวกัน (3.8 x 10^9 cfu ต่อกรัม) แต่ในสภาพที่ใส่ปูนพบว่า จุลินทรีย์บริเวณรอบรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ (2.2 x 10^9 cfu ต่อกรัม) (ตารางที่ 4 และ 5) ส่วนข้าวที่ปลูกในสภาพแปลงปลูกพบว่าจุลินทรีย์ในดิน บริเวณรอบรากพืช และกาบใบมีปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน บริเวณรอบราก และกาบใบของข้าวพันธุ์ ต่าง ๆ ที่ปลูกในชุดดินระแงะ (สภาพกระถาง)

ข้าว	การใส่ปูน	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu ต่อกรัม)		
		ดิน	บริเวณรอบราก	กาบใบ
ขาวดอกมะลิ 105	ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	2.2 $\pm$ 0.2 x 10^9	1.2 $\pm$ 0.2 x 10^8
	ไม่ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	7.3 $\pm$ 0.2 x 10^8	2.9 $\pm$ 0.3 x 10^8
ลูกแดงปัตตานี	ใส่ปูน	2.22 $\pm$ 0.35 x 10^7	1.0 $\pm$ 0.2 x 10^9	5.7 $\pm$ 0.4 x 10^7
	ไม่ใส่ปูน	4.78 $\pm$ 0.42 x 10^7	3.8 $\pm$ 0.3 x 10^9	2.7 $\pm$ 0.4 x 10^8
ช่อลุง	ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	2.3 $\pm$ 0.3 x 10^8	4.4 $\pm$ 0.4 x 10^8
	ไม่ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	1.6 $\pm$ 0.2 x 10^8	2.9 $\pm$ 0.4 x 10^8
ญาเหวย	ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	1.1 $\pm$ 0.3 x 10^9	7.3 $\pm$ 0.3 x 10^8
	ไม่ใส่ปูน	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	ต้นข้าวตาย	ต้นข้าวตาย

ตารางที่ 5 ปริมาณของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน บริเวณรอบราก และกาบใบของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 ที่ปลูกในชุดดินมูโน๊ะ (สภาพแปลงปลูก)

สภาพแปลงปลูกข้าว	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu ต่อกรัม)		
	ดิน	บริเวณรอบราก	กาบใบ
ไม่ใส่ปูน ไม่ใส่ปุ๋ย	$5.8 \pm 0.4 \times 10^8$	$5.7 \pm 0.4 \times 10^7$	$4.8 \pm 0.3 \times 10^7$
ไม่ใส่ปูนแต่ใส่ปุ๋ยตามปกติ	$2.0 \pm 0.5 \times 10^8$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^7$	$3.7 \pm 0.4 \times 10^8$
ใส่ปูน 1.25 ตันต่อไร่และใส่ปุ๋ยตามปกติ	$2.6 \pm 0.3 \times 10^7$	$2.5 \pm 0.3 \times 10^7$	$8.8 \pm 0.3 \times 10^7$

2. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากข้าว พบ จุลินทรีย์จำนวน 157 สายพันธุ์ และเมื่อทำการคัดเลือกเบื้องต้นโดยพิจารณาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารสูตร modified Pikovskaya's medium ซึ่งมีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต พบว่ามี 44 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (เจริญได้หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง) และเมื่อนำ 44 สายพันธุ์ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 12 วัน ก่อนทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสพบว่า พีเอชของอาหารที่เลี้ยงเชื้อทั้ง 44 สายพันธุ์ลดลงจากพีเอช 4 มาอยู่ในช่วง 2.44-2.92 และมีความขุ่นที่ 630 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.11-1.39 (ตารางที่ 6) และพบว่ามีจุลินทรีย์เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ โดยพิจารณาจากความขุ่นคือสายพันธุ์ที่มีรหัส RSNF10 ซึ่งแยกได้จากรากข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 ในแปลงที่ไม่มีการใส่ปูนและไม่ใส่ปุ๋ย มีกิจกรรมของเอนไซม์ 614.43 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตรและวัดความขุ่นของเชื้อได้ 1.04 และสายพันธุ์ที่มีรหัส SHKN8 ซึ่งแยกได้จากกาบใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าสายพันธุ์แรกคือ 441.30 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร และวัดความขุ่นของเชื้อได้ 1.39 (ตารางที่ 6) และถึงแม้ว่าเอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์ที่มีรหัส SHKN8 จะมีกิจกรรมต่ำกว่าเอนไซม์จากสายพันธุ์ที่มีรหัส RSNF10 แต่

เชื้อ SHKN8 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อ RSNF10 เมื่อพิจารณาจากความขุ่น ดังนั้นจึงนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไปทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อไป

3. การเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิด-ฟอสฟาเทสสูง

จากการนำเชื้อ RSNF10 และ SHKN8 ซึ่งแยกได้จากรากและกาบใบของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในดินกรดจัดไปวิเคราะห์ลำดับเบสและเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์พบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Ustilago* sp. (อันดับ : Ustilaginales, วงศ์ : Ustilaginaceae, สกุล : *Ustilago*) ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นวงรีและเซลล์จะหดสั้นลงเมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ (รูปที่ 1) โดยโคโลนีของเชื้อทั้งสอง สายพันธุ์มีสีครีม บริเวณขอบของโคโลนีมีรอยย่น และได้กำหนดให้เชื้อ RSNF10 และ SHKN8 เป็น *Ustilago* sp. สายพันธุ์ AR101 และ AR102 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

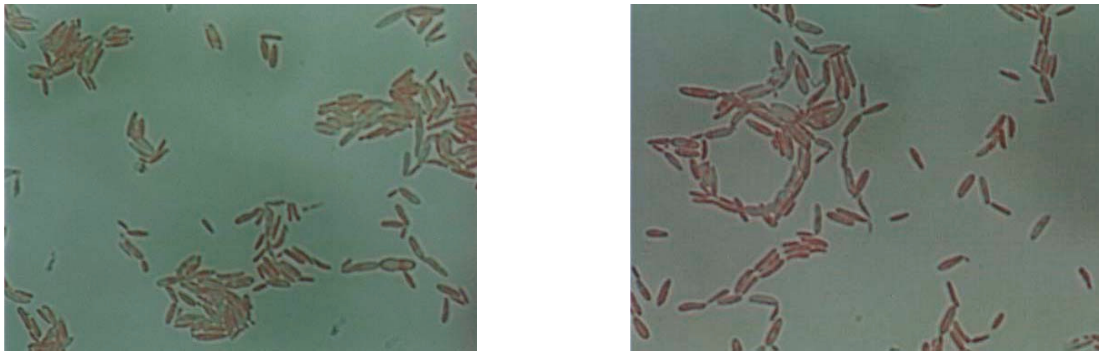
ตารางที่ 6 การปลดปล่อยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน

รหัส	พีเอช	ความขุ่นที่ 630 nm (absorbance)	แอซิดฟอสฟาเทส (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร)	รหัส	พีเอช	ความขุ่นที่ 630 nm (absorbance)	แอซิดฟอสฟาเทส (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร)
SL(4)	2.80	0.21	0.00	RKN(6)	2.73	0.97	0.00
SL(24)	2.64	0.75	0.00	RKN(8)	2.83	0.84	0.00
SLN(4)	2.71	0.81	0.00	RKN(9)	2.70	0.75	0.00
SLN(5)	2.75	0.70	0.00	RKN(12)	2.80	0.47	0.00
SLN(27)	2.81	0.81	0.00	RKN(18)	2.64	0.47	0.00
SLN(28)	2.87	0.67	0.00	SHCN(11)	2.44	0.97	0.00

SLN(34)	2.57	1.07	0.00	SHCN (13)	2.74	0.21	0.00
SLN(35)	2.51	1.01	0.00	SHCN(21)	2.64	0.79	0.00
SHLN (7)	2.66	0.97	0.00	SHCN(23)	2.87	0.84	0.00
SHLN (23)	2.70	1.01	0.00	SHCN(24)	2.80	0.88	0.00
SHLN (26)	2.72	0.76	0.00	RCN(10)	2.57	0.97	0.00
SHLN (30)	2.84	0.61	0.00	RCN (22)	2.68	1.09	0.00
SHLN (31)	2.50	1.12	0.00	RCN(25)	2.83	0.80	0.00
SHLN (32)	2.68	1.02	0.00	SSN(NF)(5)	2.81	0.38	0.00
RLN(3)	2.77	0.76	0.00	SHS(F)(19)	2.52	1.06	0.00
RLN (29)	2.78	0.87	0.00	SHSN(F)(2)	2.83	0.72	0.00
RLN (33)	2.46	0.99	0.00	SHSN(NF) (16)	2.71	0.93	0.00
SHKN (8)	**2.54**	**1.39**	**441.30**	RS(F)(9)	2.76	0.79	0.00
SHKN (9)	2.78	0.84	0.00	RS(F)(20)	2.80	0.28	0.00
SHKN (10)	2.72	0.76	0.00	RS(F)(25)	2.53	1.01	0.00
SHKN (20)	2.72	0.11	0.00	RSN(F)(7)	2.92	0.81	0.00
SHKN (21)	2.66	1.01	0.00	**RSN(F)(10)**	**2.81**	**1.04**	**614.43**

ตารางที่ 7 ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากข้าวที่ปลูกในดินกรดจัด

รหัส	สายพันธุ์	ข้าว	บริเวณที่เก็บ	genus
RSNF10	AR101	สุพรรณบุรี 2	บริเวณรอบราก	*Ustilago* sp.
SHKN8	AR102	ขาวดอกมะลิ 105	กาบใบ	*Ustilago* sp.

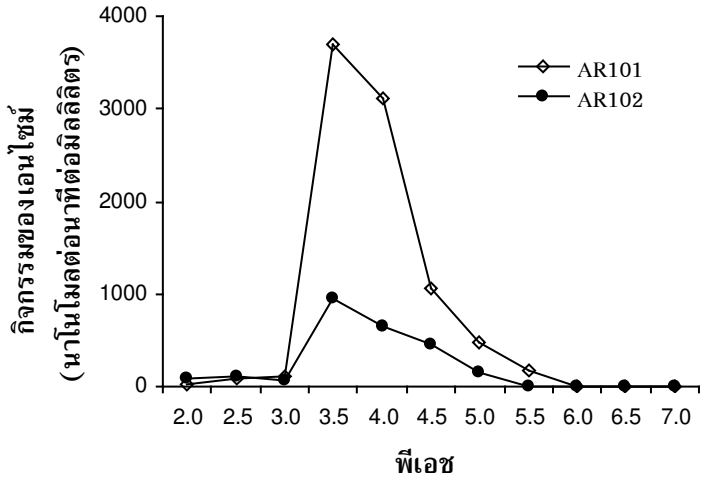


(ก) (ข)

รูปที่ 1 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Ustilago* sp. สายพันธุ์ AR101 (ก) และ AR102 (ข) ที่ผ่านการย้อมสี simple stain เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

4. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp.

เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสามารถทำงานได้ที่ระดับพีเอช 3.5-4.5 โดยที่พีเอช 3.5 เอนไซม์ซึ่งปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 มีกิจกรรมสูงที่สุด คือ 3,690 และ 956 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิตร ตามลำดับ โดยเอนไซม์จากสายพันธุ์ AR101 มีกิจกรรมสูงกว่าสายพันธุ์ AR102 ชัดเจน เมื่อระดับพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับที่ต่ำมาก แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อระดับพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 3.5 อย่างไรก็ตามเมื่อ พีเอชเพิ่มสูงขึ้นจนอยู่ในระดับ 3.5-4.5 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้เมื่อพีเอชอยู่ในระดับที่สูงกว่า 5.5 (รูปที่ 2)

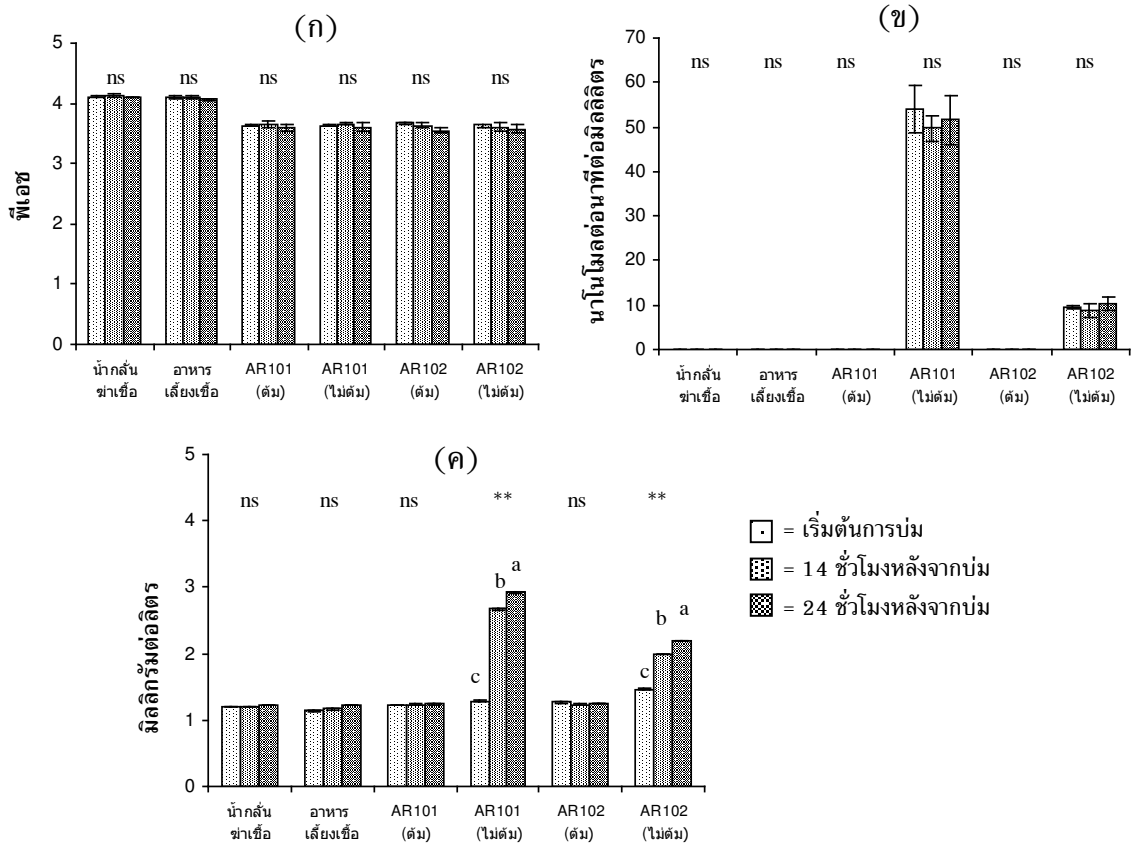


รูปที่ 2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102

5. วิธีการทดสอบการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตโดยเชื้อ *Ustilago* sp.

การใส่เชื้อสายพันธุ์ AR101 และ AR102 ทั้งที่ผ่านการต้มและไม่ผ่านการต้มลงในสารละลายโซเดียมไฟเทตทำให้พีเอชของสารละลายลดลงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับทรีตเมนต์ที่ใส่น้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3ก) เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสหลังจากบ่มเชื้อในสารละลายพบว่า มีเพียงทรีตเมนต์ที่ใส่เชื้อซึ่งไม่ผ่านการต้มเท่านั้นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้น โดยทรีตเมนต์ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ AR101 มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ระดับ 49-54 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ AR102 (4-10 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร) (รูปที่ 3ข) เมื่อพิจารณาการปลดปล่อยฟอสฟอรัสพบว่า ทรีตเมนต์ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ AR101 และ AR102 ซึ่งไม่ผ่านการต้มสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เท่ากับ 2.67 และ 1.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อบ่มต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง

ฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นไม่มากนัก (รูปที่ 3ค) เมื่อนับจำนวนเชื้อทั้งสองสายพันธุ์หลังจากบ่มเชื้อในสารละลายโซเดียมไฟเทต พบว่าจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากบ่มเป็นเวลา 14 ชั่วโมง และเมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงพบว่าจำนวนเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ตารางที่ 8) โดยไม่พบเชื้อในทรีตเมนต์อื่น ๆ



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงพีเอช (ก) กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (ข) และความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ (ค) ในช่วงเริ่มต้นและหลังบ่มเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฟเทต (ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และ ** = แตกต่างทางสถิติที่ P = 0.01) (I = ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มเชื้อ *Ustilago* sp. ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฟเทต

ทรีตเมนต์	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu ต่อมิลลิลิตร)		
	เริ่มต้น	14 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	0	0	0
อาหารเลี้ยงเชื้อ	0	0	0
AR101 (ต้ม)	0	0	0
AR101 (ไม่ต้ม)	$4.3 \pm 0.4 \times 10^6$	$8.0 \pm 0.4 \times 10^6$	$9.8 \pm 0.5 \times 10^6$
AR102 (ต้ม)	0	0	0
AR102 (ไม่ต้ม)	$4.6 \pm 0.2 \times 10^6$	$7.8 \pm 0.3 \times 10^6$	$8.1 \pm 0.7 \times 10^6$

6. ความสามารถของเชื้อ *Ustilago* sp. ในการละลายโซเดียมไฟเทต อะลูมินัม ไฟเทต และไอรอนไฟเทต

เชื้อ *Ustilago* sp. ทั้งสองสายพันธุ์สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียม ไฟเทตให้ออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ได้ โดยในระยะเวลาที่เท่ากันสายพันธุ์ AR101 ปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้สูงกว่าสายพันธุ์ AR102 (3.24 และ 1.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อปล่อยให้ย่อยสลายโซดียมไฟเทตต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ฟอสฟอรัสก็ไม่ได้ถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (ตารางที่ 9) ในขณะที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากไอรอนไฟเทตและอะลูมินัมไฟเทตออกมาได้น้อยมาก

ตารางที่ 9 ความสามารถของเชื้อ *Ustilago* sp. ในการละลายโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อย (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
		โซเดียมไฟเทต	อะลูมินัมไฟเทต	ไอรอนไฟเทต
Control (ไม่ใส่เชื้อ)	0	1.30 ± 0.01	trace	trace
	14	1.45 ± 0.00	trace	trace
	24	1.29 ± 0.05	trace	trace
F-test		ns	-	-
C.V. (%)		14.56	-	-
AR101	0	1.68 ± 0.04b	trace	trace
	14	3.24 ± 0.12a	trace	trace