บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากรากพืชบริเวณดินกรดจัด

4.1.1 สมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวอย่างดินกรดจัด

จากการศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพบางประการของดิน พบว่า ดินมีความเป็นกรดด่างค่อนข้างต่ำ ยกเว้นตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณบ้านท่านางหอมและบ้านบางเตง เนื่องจากบริเวณบ้านท่านางหอมในปัจจุบันยังได้รับอิทธิพลจากน้ำกร่อย และส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าสูง ส่วนบริเวณบ้านบางเตงที่มีน้ำขังเกือบตลอดปี ทำให้ดินบนยังมีความเป็นกรดด่างค่อนข้างสูง และในดินทุกบริเวณจะมีอะลูมินัมที่แลกเปลี่ยนได้สูงมาก เนื่องจากหากดินมีความเป็นกรดด่างต่ำมาก จะมีอะลูมินัมละลายออกมามาก (Lathwell and Peech, 1964 อ้างโดย van Uexkull, 1986) และในดินพบว่า มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำมาก เนื่องจากดินกรดจัดในการทดลอง มีอะลูมินัมสูง (ตารางที่ 3.1) และในดินกรดโดยทั่วๆ ไปมีเหล็กละลายออกมามากด้วยเช่นกัน โดยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์จะไปตกตะกอนกับอะลูมินัมและเหล็ก ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ยาก (van Uexkull, 1986) อย่างไรก็ตาม ในดินกรดจัดโดยส่วนใหญ่ มีอินทรีย์วัตถุสูงซึ่งเป็นแหล่งของอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดิน จึงเป็นแหล่งที่ช่วยเพิ่มฟอสฟอรัสในดินได้ เนื่องจากจุลินทรีย์มีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (รูปที่ 3.1)

4.1.2 เชื้อจุลินทรีย์จากดินและดินบริเวณรากพืช

จากการศึกษา ไม่พบจุลินทรีย์ดินที่ไม่อาศัยอยู่บริเวณเขตอิทธิพลรากพืชสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายน้ำได้ยาก แต่พบจุลินทรีย์บริเวณเขตอิทธิพลรากพืชเสม็ดและกก ที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถละลายฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์และนำมาใช้ได้ และในบริเวณรอบรากพืชมีสาร-อินทรีย์ต่างๆ ที่พืชผลิตขึ้นมาหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์ต่างๆที่รากพืชปลดปล่อยออกมา (Dakora and Phillips, 2002) และมีการเน่าสลายของชิ้นส่วนรากพืชบาง-ชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (สมศักดิ์, 2528) จุลินทรีย์ดินที่เจริญในดินกรดจัด

นั้นมีอยู่ในปริมาณน้อย เนื่องจากในสภาพดินกรดจัด เป็นดินที่มีความเป็นกรดด่างต่ำ และยังมีของอะลูมินัม เหล็ก และแมงกานีส ละลายออกมามากจนอาจถึงระดับที่เป็นพิษ ทำให้มีจุลินทรีย์ดินเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาพเช่นนี้ โดยส่วนใหญ่แล้ว จุลินทรีย์ดินที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพดินกรดจัด จะมีกลไกในการปรับตัวให้ทนต่อสภาพที่มีความเป็นกรดด่างต่ำๆ โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีกลไกบางอย่างที่จะรักษาความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ให้สูงกว่าพีเอชของดินโดยรอบ เพื่อป้องกันไม่ให้ไฮโดรเจนเป็นพิษต่อเซลล์ (Sylvia *et al*., 2005) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีกลไกที่ช่วยลดความเป็นพิษของแคตไอออน ที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลไกในการต้านทานความเป็นพิษของอะลูมินัมพบว่า มีทั้งการที่ จุลินทรีย์ดูดเอาอะลูมินัมไปไว้ภายในเซลล์ แล้วอะลูมินัมไปจับกับโปรตีนบางชนิดเปลี่ยนเป็นรูปที่ไม่เป็นพิษ หรืออาจสะสมไว้ในส่วนของแวคคิลโอล หรือจุลินทรีย์ดินมีการปลดปล่อยสารบางชนิดออกมา เช่น กรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์บางชนิดมาตกตะกอนกับอะลูมินัมที่อยู่รอบเซลล์ เปลี่ยนเป็นรูปที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Jo *et al*., 1997) ทำให้มีจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตได้ในดินกรดจัด โดยทั่วไป จึงมักพบว่าจุลินทรีย์ในดินกรดจัดจะมีปริมาณน้อยกว่าดินปกติ มีรายงานว่า เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Acidocella* sp. พบมากในดินที่เป็นกรดและมีโลหะหนักสูง (Kishimoto *et al*., 1995; Banerjee *et al*., 1996; Johnson *et al*., 2001) ในขณะเดียวกัน Oishi และคณะ (1999) ได้พบเชื้อ *A. facilis* ซึ่งคัดแยกมาจากรากของต้นกก (*Lepironia articulata*) และมีรายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* สามารถละลายฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมอะลูมินัม และไอรอนไฟเทตได้ (Unno *et al*., 2005) และได้พบเชื้อ *Ustilago* sp. ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อราชนิดที่มีเซลล์เดี่ยวจึงสามารถทน และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยจุลินทรีย์ที่พบในดินกรดจัดส่วนใหญ่เป็นประเภทเชื้อรา ซึ่งสามารถทนต่อสภาพเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น 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 อย่าง-ไรก็ตาม สายใจ (2006) ได้รายงานว่า เชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 ซึ่งคัดแยกมาจากรากพืชที่ปลูกในดินกรดจัด มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอส

ฟาเทสสูงถึง 3,690 และ 956 นาโน-โมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีศักยภาพในการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูง

4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส

4.2.1 กิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อจุลินทรีย์

กิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้ พบว่า *Ustilago* sp. PM103 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด เพื่อช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส เนื่องจากฟอสฟอรัสที่ใส่ เป็นฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต และเอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นอนินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ (Rodriguez and Fraga, 1999) โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสแตกต่างกันออกไป จากการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อ *Ustilago* sp. PM103 จัดอยู่จีนัส *Ustilago* ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง มีรายงานว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสได้นั้น ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp. *Bacillus amyloliquefaciens Bacillus subtilis Enterobacter* sp. *Escherichia coli Klebsiella terrigena Pseudomonas* sp. *Megasphaera elsdenii Mitsuokella multiacidus Prevotella ruminicola Selenomonas ruminantium* และ *Treponema* sp. เป็นต้น (Vats and Banerjee, 2004)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อ *Ustilago* sp. ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูงสุด โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อราชนิดที่มีเซลล์เดี่ยว จึงสามารถทนและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยจุลินทรีย์ที่พบในดินกรดจัดส่วนใหญ่เป็นประเภทเชื้อราซึ่งสามารถทนต่อสภาพเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และในดินกรดและดินกรดจัดโดยทั่วไป จะมีธาตุบางชนิดละลายออกมาในสารละลายดินสูง เช่น เหล็ก อะ-ลูมินัม และแมงกานีส ซึ่งอาจมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เชื้อ *Ustilago* sp. สามารถเจริญได้ดีและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นในอาหารที่มีแมงกานีส 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อยในอาหารที่เหล็กและอะลูมินัม 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.13 และ รูปที่ 3.14 ตามลำดับ) ดังนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวน่าจะมีศักยภาพในการช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินกรดและดินกรดจัดได้ อย่างไรก็ตาม หากจะนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ในสภาพจริง อาจต้องมีการทดลอง

การใส่แคตไอออนดังกล่าวผสมกัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่อไป

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ความเป็นกรดด่างในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะลดลงในช่วงแรก (รูปที่ 3.2) ซึ่งมีรายงานว่า การลดลงของความเป็นกรดด่างอาจเกิดจากจุลินทรีย์ผลิตกรดอินทรีย์ออกมา (Vassilev *et al*., 2001; Whitelaw *et al*., 1999) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้ ไม่มีการผลิตกรดอินทรีย์ออกมา ดังนั้น การลดลงของความเป็นกรดด่างในอาหาร มีสาเหตุจากประการอื่น ซึ่งสอดคล้องกับ Illmer และคณะ (1995) ได้รายงานว่า การลดลงของความเป็นกรดด่างในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Aspergillus niger Penicillium simplicissimum Pseudomonas* sp. และ *Penicillium aurantiogriseum* ไม่สัมพันธ์กับการผลิตกรดอินทรีย์ โดยสาเหตุของการลดลงของความเป็นกรดด่าง อาจเป็นเพราะเกิดจากการดูดใช้ไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเรื่องผลของรูปของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (รูปที่ 3.11) โดยการลดลงของแอมโมเนียมมีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับการลดลงของความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Whitelaw และคณะ (1999) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium radicum* ในอาหารที่ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม เปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้ไนโตรเจนในรูปไนเทรต พบว่า เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมจะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่ใช้ไนเทรต และจากการทดลองพบว่า การลดลงของแอมโมเนียม อาจมีผลต่อการลดลงของความเป็นกรดด่าง โดย Whitelaw และคณะ (1999) ได้รายงานว่า ในอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium radicum* ที่ใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม จะทำให้ความเป็นกรดด่างในอาหารต่ำว่าอาหารที่ใช้ไนเทรต ทั้งนี้เนื่องจากการดูดใช้แอมโมเนียมของจุลินทรีย์อาจมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมา

นอกจากนี้ Oh และคณะ (2003) ได้รายงานว่า การลดลงของความเป็นกรดด่างอาจเป็นเพราะการใช้กลูโคสของแบคทีเรีย โดยพบว่า *Citrobacter* sp. Y19 จะทำให้ความเป็นกรดด่างในอาหารลดลง โดยสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสที่ลดลงไปด้วย ในขณะที่ Illmer และ Schinner (1995) ได้รายงานว่า การลดลงของความเป็นกรดด่างอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารบริเวณผิวของเซลล์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) ทำให้มีไฮโดรเจนในอาหารเพิ่มมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม ความเป็นกรดด่างในดินจะมีผลต่อการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัส กล่าวคือ ความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต และกิจกรรมของสารที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้น เช่น เอนไซม์ต่างๆ โดยเอนไซม์จะเข้าไปทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนกับฟอสฟอรัสในออร์แกนโนฟอสโฟเนตส์ (organophosphonates) ทำให้ฟอสฟอรัสหลุดออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ (Rodriguez and Fraga, 1999) เอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ เอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส เป็นต้น

ซึ่ง Cottrill และคณะ (2002) ได้รายงานว่า ระดับความเป็นกรดด่างมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะมีกิจกรรมได้ดีที่ความเป็นกรดด่างประมาณ 2.5 ถึง 6.5 และจากการศึกษาของสายใจ (2548) ได้รายงานว่า เชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 ซึ่งคัดแยกจากบริเวณรากข้าวที่ปลูกในดินกรดจัด จะมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟา-เทสได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.5-4.5

4.2.2 ทดสอบการละลายของอินทรีย์ฟอสฟอรัสโดยเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษา พบว่า เชื้อ *Ustilago* sp. PM103 สามารถละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตออกมาสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟา-เทส (รูปที่ 3.2) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้ อีกทั้งเกลือของโซเดียม เป็นการจับตัวกันในพันธะที่อ่อน อย่างไรก็ตาม พบว่า ไม่มีเชื้อชนิดใดที่สามารถละลายฟอสฟอรัสในรูปไอรอนและอะลูมินัมไฟเทตได้ สอดคล้องกับ สายใจ (2006) ได้รายงานว่า ยีสต์ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง สามารถละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตออกมาได้สูง แต่ละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตและอะลูมินัมไฟเทตได้น้อยมาก ซึ่ง Anderson (1980) ได้รายงานว่า หากอินทรีย์ฟอสฟอรัสรวมตัวกับธาตุพวกโลหะหนัก จะเกิดพันธะที่แข็งแรง ยากต่อการสลายตัว เช่น เกลือของเหล็ก และอะลูมินัม

นอกจากนี้ การลดลงของความเป็นกรดด่างเนื่องจากการเลี้ยงเชื้อ โดยค่าความเป็นกรดด่างลดลงเหลือประมาณ 2.5-3.0 (ตารางที่ 3.2) แต่ความเป็นกรดด่างที่ลดต่ำลงนี้ ไม่มีผลต่อการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต (รูปที่ 3.15)

4.2.3 ทดสอบการละลายของอนินทรีย์ฟอสฟอรัสโดยเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสฟอรัสไปใช้ได้ แต่ปริมาณค่อนข้างน้อยมาก อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ไม่มีการผลิตกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งโดย

ทั่วไปแล้ว จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตกรดอินทรีย์ออกมาเพื่อช่วยละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในดิน มีรายงานว่า กรดอินทรีย์สามารถที่จะไปลดความเป็นพิษของธาตุประจุบวกบางชนิด และป้องกันไม่ให้ธาตุประจุบวกเข้าไปตกตะกอนกับฟอสฟอรัสได้ เช่น อะลูมินัม เหล็ก และแมงกานีส เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์เหล่านี้จะเป็นคีเลต (chelate) กับธาตุประจุบวกดังกล่าว ทำให้ธาตุเหล่านี้ไม่สามารถไปตกตะกอนกับฟอสฟอรัสได้ (Kpomblekou-A and Tabatabai, 2003; Shahandeh *et al*., 2003; Dakora and Phillips 2002; Rodriguez and Fraga, 1999; Whitelaw *et al*., 1999)

อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้ จะทำให้ความเป็นกรดด่างในอาหารลดลง (รูปที่ 3.2) และการลดลงของความเป็นกรดด่าง จะช่วยละลายฟอสฟอรัสจากอนินทรีย์ฟอสฟอรัสออกมาได้ (รูปที่ 3.16) ดังนั้น เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจมีศักยภาพในการช่วยละลายฟอสฟอรัสบางส่วนออกมาได้ แม้ว่าจะไม่มีการผลิตกรดอินทรีย์ออกมา โดย Illmer และ Schinner (1992) ได้รายงานว่า จุลินทรีย์สามารถละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัสได้โดยไม่ผลิตกรดอินทรีย์ อาจเป็นเพราะการปลดปล่อยไฮโดรเจนประกอบกับการดูดใช้แอมโมเนียมของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในกระบวนการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสจากอะลูมินัมฟอสเฟตโดยเชื้อ *Penicillium simplicissimum* และ *Pseudomonas* sp.

4.3 ผลของไนโตรเจนและแคตไอออนบางชนิดต่อการเจริญของจุลินทรีย์

4.3.1 รูปของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

จากการศึกษารูปของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้อาหารที่มีไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้อาหารที่มีไนโตรเจนในรูปโซเดียมไนเทรต (รูปที่ 3.9) อาจเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์สามารถดูดใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียได้ดีกว่าไนเทรต หากเชื้อดูดไนโตรเจนในรูปไนเทรต จะต้องผ่านการรีดิวส์ไนเทรตมาเป็นแอมโมเนียมก่อน โดยอาศัยเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) ซึ่งสอดคล้องกับ Whitelaw และคณะ (1999) ที่ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium radicum* ในอาหารที่ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมเปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้ไนโตรเจนในรูปไนเทรต พบว่า เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่ใช้ไนเทรต

จากการทดลองพบว่า การลดลงของแอมโมเนียม มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับการลดลงของความเป็นกรดด่าง (รูปที่ 3.11) ซึ่งสอดคล้องกับ Whitelaw และคณะ (1999) ได้รายงานว่า

ในอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium radicum* ที่ใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม ทำให้ความเป็นกรดด่างในอาหารต่ำว่าอาหารที่ใช้ไนเทรต ทั้งนี้เนื่องจากการดูดใช้แอมโมเนียมของจุลินทรีย์อาจมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมา

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ในการเลี้ยงเชื้อ *Ustilago* sp. ควรใช้อาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม ซึ่งทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้เร็วกว่าอาหารที่ใช้แหล่งของไนโตรเจนในรูปไนเทรต

4.3.2 ผลของของอะลูมินัม เหล็ก และแมงกานีสต่อการเจริญเติบโต และกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์

จากการศึกษา พบว่า แมงกานีสในความเข้มข้นที่สูงขึ้น จะทำให้เชื้อ *Ustilago* sp. PM103 เจริญเติบโต และมีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง (รูปที่ 3.13) ซึ่งในพืชมีรายงานว่า แมงกานีสความเข้มข้น 22.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากรากของถั่ว lupin และมะเขือเทศเกิดได้รวดเร็วขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ (Minggang, 1997) และ Bozzo และคณะ (2004) พบว่าเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่อยู่ในเซลล์ของมะเขือเทศสามารถทำงานได้รวดเร็วขึ้น 130 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) 54.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในจุลินทรีย์ Marhuenda-Egea และคณะ (2001) ได้รายงานว่า การที่แบคทีเรีย *Halobacterium salinarum* ได้รับแมงกานีสเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงขึ้น แต่หากความเข้มข้นของแมงกานีส
สูงกว่า 2.5 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง แต่ในการทดลองนี้ แม้ว่าเพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ยังทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูงขึ้น ซึ่งในสภาพดินกรดหรือดินกรดจัดโดยทั่วไปแล้ว จะส่งเสริมให้แมงกานีสละลายออกมาในสารละลายดินสูงอยู่แล้ว อาจเป็นการช่วยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อ *Ustilago* sp. PM103 ในดินได้

เมื่อพิจารณาอะลูมินัม พบว่า การใส่อะลูมินัมทำให้กิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง (รูปที่ 3.13) ทั้งนี้เนื่องจากอะลูมินัมเป็นธาตุที่เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยส่วนใหญ่ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อได้รับอะลูมินัมเพิ่มขึ้น โดยอะลูมินัมความเข้มข้นมากกว่า 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ *Pseudomonas* sp. มีการเจริญเติบโตลดลง (lllmer and Schinner, 1999) สอดคล้องกับ Wood และ Cooper (1984) ได้รายงานว่า แบคทีเรีย *Rhizobium trifolii* ที่เลี้ยงในอะลูมินัมที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวที่เลี้ยงในอาหารประเภท defined medium ความเป็นกรดด่าง 5.5 ตั้งแต่ระยะ log phase นอกจากนี้พบว่าอะลูมินัมความเข้มข้นสูงกว่า 8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ *Pseudomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. (lllmer and Schinner, 1997) เช่นเดียวกับรายงานของ Minggang (1997) พบว่า อะลูมินัมความเข้มข้น 22.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสที่ปลดปล่อยจากรากของถั่ว lupin และมะเขือเทศ และสายใจ (2548) ได้ทดสอบผลของอะลูมินัม 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อกิจกรรมเอนไซม์แอ-ซิดฟอสฟาเทสของเชื้อ *Ustilago* sp. AR101 และ AR102 พบว่า อะลูมินัมลดกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ลง

ส่วนเหล็กจะยับยั้งการเจริญเติบโต และกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อ *Ustilago* sp. PM103 ซึ่งอาจเป็นเพราะเหล็กที่ละลายออกมามาก สามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับ Giotta และคณะ (2006) ได้รายงานว่า หากเลี้ยงแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* ในอาหารที่มีเหล็กมากกว่า 0.5 มิลลิโมลาร์ ทำให้ระยะ lag phase ใช้เวลาสั้นลงและทำให้การเจริญเติบโตต่ำลงด้วย อย่างไรก็ตาม สายใจ (2548) ได้รายงานว่าปริมาณเหล็กที่เพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของ *Acidocella* sp. AM101 เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเหล็กอาจมีบทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สายพันธุ์ดังกล่าว โดยเหล็กอาจเป็นองค์ประกอบสำคัญในโครงสร้างของเอนไซม์ แอซิดฟอสฟาเทส เช่นเดียวกับเอนไซม์เพอร์เพิล แอซิดฟอสฟาเทส ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีโมเลกุลของ Fe^{3+}-Fe^{2+} เป็นองค์ประกอบอยู่ (Schenk *et al*. 1999)

4.4 การใช้เชื้อ *Ustilago* sp. PM103 ในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสให้กับพืช

จากการศึกษาพบว่า ในตำรับการทดลองที่ใช้ฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมฟอสเฟต และไอ-รอนฟอสเฟต และไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ จะทำให้รากต้นข้าวยาวกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ สาเหตุที่รากพืชที่ไม่ใส่เชื้อยาวกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากต้นพืชที่เจริญในบริเวณที่มีฟอส-ฟอรัสน้อย พืชมีการปรับตัวโดยการเพิ่มความยาวของราก ซึ่งเป็นการเพิ่มความสามารถในการหาธาตุอาหารที่ขาดแคลนเพิ่มเติม (Marschner, 1991; Poirier and Bucher, 2002; Smith *et al*., 1990) แต่ทุกตำรับการทดลอง ความสูงและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวทุกตำรับการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี เป็นพันธุ์ข้าวที่กรม-ส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกในพื้นที่ดินกรดจัด (จิระศักดิ์ และคณะ, 2542) เนื่องจากทนสภาพความเป็นกรดได้ดี และอาจมีความสามารถในการดูดและใช้ฟอสฟอรัสได้ดี ทำให้สามารถเจริญได้แม้ใน

สภาพที่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์น้อย และในตำรับการทดลองที่ใช้ฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายยากร่วมกับการใช้เชื้อ *Ustilago* sp. PM103 ไม่ช่วยให้การดูดฟอสฟอรัสของข้าวสูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ใช้เชื้อ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีการผลิตกรด-อินทรีย์ ทำให้การละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสออกมาได้น้อย นอกจากนี้ การลดลงของความเป็นกรดด่างขณะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยการที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำมากๆ อนินทรีย์ฟอสฟอรัสจะละลายออกมา (รูปที่ 3.16) ซึ่งอาจเป็นอีกกลไกในการช่วยละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัส อย่างไร-ก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้ ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารอาจลดลงไม่มากนัก ทำให้การละลาย อนินทรีย์ฟอสฟอรัสเกิดขึ้นได้น้อย และอีกประการหนึ่งคือ ปริมาณกล้าเชื้อที่ใส่ลงไปน้อย (5 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งหากใส่มากกว่านี้อาจทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อสูงกว่านี้ได้

การใส่เชื้อ *Ustilago* sp. PM103 กับพืชทดสอบอาจมีประสิทธิภาพสูงขึ้น หากให้อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีฟอสฟอรัสในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสค่อนข้างสูง โดยสายใจ (2548) ได้ทดสอบปลูกข้าวในอาหารวุ้นที่ใส่ฟอสฟอรัสในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัส 3 ชนิด คือ โซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต เปรียบเทียบกับการใช้ร่วมกับเชื้อ *Ustilago* sp. AR 101 พบว่า ในตำรับการทดลองที่ใช้ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ จะทำให้ต้นข้าวดูดฟอสฟอรัสได้ดีกว่า และมีน้ำหนักแห้งสูงกว่าต้นที่ไม่ใช้เชื้อจุลินทรีย์