อิทธิพลของฟอสฟอรัส คาร์บอน และไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ของเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากของสมุนไพรหางไหลแดง

Phosphorus, Carbon and Nitrogen Affecting Growth and Phosphatase Activity of *Rhizobium* sp. Isolated from Root Nodule of *Derris elliptica* Benth.

ชณชนก ลีฬหาวงศ์[1] และนีลวรรณ พงศ์ศิลป์[1]

Chonchanok Leelahawong[1] and Neelawan Pongsilp[1]

บทคัดย่อ

เชื้อไรโซเบียม เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับพืชแบบซิมไบโอซิสมีประโยชน์ต่อการเจริญของพืช บางสายพันธุ์มีความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์ฟอสฟาเทสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนฟอสเฟตในรูปสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์หรือให้อยู่ในรูปสารที่ละลายน้ำ ทำให้พืชสามารถดูดไปใช้ได้ง่ายขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชหรือสารเมแทบอไลซ์ที่คล้ายฮอร์โมนพืช เช่น Indole-3-acetic acid (IAA) จึงทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากของสมุนไพรหางไหลแดง จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาศึกษาการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya' s broth (pH 7) เชื้อมีการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงที่สุด ส่งผลทำให้ค่า pH ในอาหารลดลงต่ำที่สุด ส่วนการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปัจจัยฟอสฟอรัส คาร์บอน และไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 พบว่า ปัจจัยแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน โดยแต่ละปัจจัยมีผลทั้งเพิ่มและลดการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสได้ นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ผลของปัจจัยฟอสฟอรัส คาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสขึ้นอยู่กับสารอาหารจากปัจจัยต่างๆ ที่ถูกเมแทบอไลซ์ และการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสในสภาวะต่าง ๆ ที่ปลดปล่อยออกมา

คำสำคัญ : แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช ไรโซเบียม เอนไซม์ฟอสฟาเทส

ABSTRACT

Rhizobium, a nitrogen-fixing bacterium that co-exists with plants in symbiotic manner, also assists plant growth. Some species can release phosphatase enzyme that converts organic phosphate into inorganic or water-soluble form, making more effective in absorbing of plants. Moreover, they can synthesize plant-hormones or hormone-like metabolize such as Indole-3-acetic acid (IAA) that have crop yield-improvement applications. Thus, this research focuses on 8 isolates of *Rhizobium* found in the root nodule of *Derris elliptica* Benth, relating to growth and phosphatase-enzyme activities. It was found that

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม 73000

Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Sanamchan Palace Campus, Nakhon Pathom 73000

the *Rhizobium*-isolate DASA 68066, cultured in Pikovskaya's broth (pH7), provided the maximum growth and enzyme-activities, both acid and alkaline phosphatase, resulted in the lowest pH-value in the medium. Other factors such as phosphorus, carbon and nitrogen factors influenced growth and phosphatase enzyme activities of *Rhizobium*-isolate DASA 68066 were studied. The results showed that each factor affected both increase and decrease growth and phosphatase enzyme activities. Moreover, this experiment also indicate that the influences of phosphorus, carbon and nitrogen on growth and phosphatase enzyme activities depended on metabolizing nutrients in the medium and the functions of phosphatase enzyme, in metabolizing phosphate compounds.

Keywords : Plant growth-promoting rhizobacteria, *Rhizobium*, phosphatase enzyme.

E-mail : **ingaree90@hotmail.com, a_roseapple@yahoo.com**

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรรมมีการพัฒนาการเกษตรอย่างยั่งยืนโดยการนำเกษตรอินทรีย์เข้ามาช่วยในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร การปรับปรุงบำรุงดิน และนิเวศทางการเกษตร โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่างๆ เช่น ปุ๋ยเคมีและสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ฯลฯ การนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มธาตุอาหารฟอสฟอรัสหรือการใช้จุลินทรีย์เพื่อละลายฟอสเฟตที่ถูกตรึงอยู่ในดินจึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเร่งการเจริญและการพัฒนาราก ดอก และผลของพืช ลดต้นทุนการนำเข้าสารเคมี รวมถึงอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและระบบนิเวศทางการเกษตร ซึ่งจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant-Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) ได้แก่ *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Serratia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter* และ *Flavobacterium* โดยส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้เนื่องจากสามารถเปลี่ยนฟอสเฟตในรูปสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์หรือให้อยู่ในรูปสารที่ละลายน้ำได้ (Rodríguez and Fraga, 1999) โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ไฟเทส ฟอสฟาเทส นิวคลีโอติเดส และ กลีเซอโรฟอสฟาเทส และสามารถผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดแลกติก กรดกลูโคนิก กรดฟูมาริก กรดออกซาลิก กรดซิตริก และกรดซัคซินิค ให้ค่า pH ลดลงอยู่ในช่วง pH 5.5-7.0 หรือ ต่ำกว่า 5.5 ส่งผลให้ฟอสเฟตละลายออกมาทำให้พืชสามารถดูดไปใช้ได้ง่ายขึ้น ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษาในเชื้อไรโซเบียมเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปมรากของสมุนไพรหางไหลแดงที่ศึกษาโดยส่วนใหญ่ระบุเป็นเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) ได้ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากของสมุนไพรหางไหลแดง จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาศึกษาการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสรวมทั้งศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสของเชื้อไรโซเบียม

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไรโซเบียมที่ใช้ศึกษา เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปมรากของสมุนไพรหางไหลแดงจากพื้นที่จังหวัดลำปางและจังหวัดสระบุรี จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ DASA 68006, DASA 68020, DASA 68025, DASA 68053, DASA 68061, DASA 68066, DASA 68069 และ DASA 68070 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หลังจากนั้นนำมาระบุ

และจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีและวิเคราะห์บางส่วนของ ยีน 16s rRNA แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม เตรียมเชื้อไรโซเบียมทั้ง 8 ไอโซเลท ให้มี log cell number เท่ากับ 6.70 ต่อมาทำการเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's broth, pH 7.0 (Pikovskaya, 1948) เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 4 วัน วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธี standard plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Mannitol Agar (Vincent, 1970) ที่เติม congo red ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสของเชื้อไรโซเบียม วัดกิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการของ Garrahan และคณะ (1969) ซึ่งในแต่ละ reaction buffer จะประกอบด้วย Citric acid / sodium citrate buffer, pH 5.0 และ Tris buffer, pH 9.0 โดยนำ supernatant 3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา reaction buffer 1 มิลลิลิตร และ p-nitrophenyl phosphate 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 20 นาที เติม 3M NaOH 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น CE1011 1000 SERIES (Cecle,Cambridge, UK) จำนวน 3 ซ้ำหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปเทียบเป็นความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ p-nitrophynol (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) และค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรและวัด pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคำนวณกิจกรรมเอนไซม์โดย 1 ยูนิต (unit) เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้น p-nitrophenyl phosphate เป็นผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol 1 ไมโคลโมลต่อ 1 นาที

การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ทำการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสสูงสุด นำมาศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's broth, pH 7.0 (Pikovskaya, 1948) ซึ่งทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ประกอบด้วย ปัจจัยฟอสฟอรัส ได้แก่ ไม่มีฟอสฟอรัส แคลเซียมฟอสเฟต และ อลูมิเนียมฟอสเฟต ปัจจัยคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส มอลโทส ฟรุกโทส ไซโลส ซูโครส และแมนนิทอล ปัจจัยไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรต ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ อะลานีน และ ไลซีน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลอง มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้โปรแกรม SPSS โดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA)

ผลและวิจารณ์

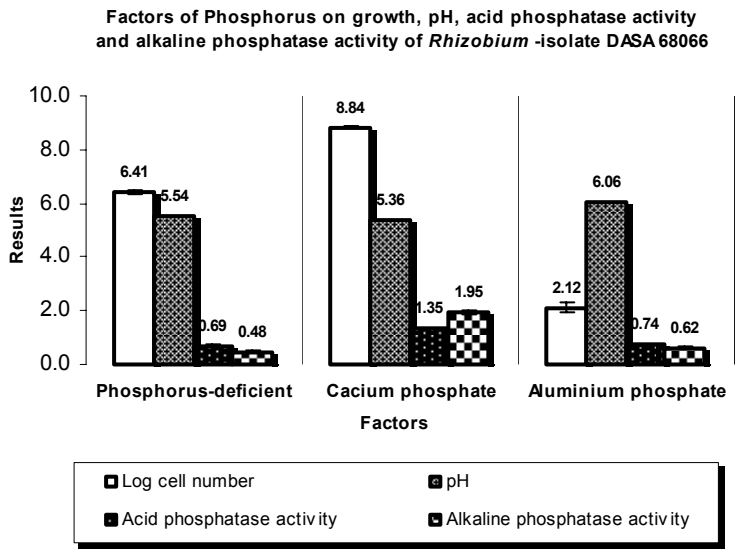
ผลการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส พบว่า เชื้อไรโซเบียมทุกไอโซเลทมีการเจริญและมีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสมีผลทำให้ค่า pH ในอาหารลดลงแตกต่างกัน โดยเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 มีการเจริญสูงสุด ซึ่งมีปริมาณ log cell number เท่ากับ 8.84 ± 0.03 และมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงสุด เท่ากับ 1.35 ± 0.01 ยูนิตต่อลิตร และ 1.95 ± 0.10 ยูนิตต่อลิตร มีผลทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุด เท่ากับ 5.36 (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie (2008) พบว่า จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสจะไฮโดรไลส์ฟอสเฟตอินทรีย์ให้เป็นฟอสเฟตอนินทรีย์หรืออยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้อาจมี

การผลิตกรดอินทรีย์ร่วมด้วยหรือปลดปล่อยประจุบวกของฟอสเฟตอินทรีย์ โดยการแทนที่ของโปรตอนหรือการรวมเป็นสารเชิงซ้อนกับ Ca^{2+} จึงส่งผลทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

ตารางที่ 1 ผลการเจริญ ค่า pH และกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสของเชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลท

			Phosphatase enzyme activities	
			pH 5	pH 9
Isolates	Log cell number on PVK Mean ± SD	Final pH of medium Mean ± SD	Acid phosphatase (Units/L) Mean ± SD	Alkaline phosphatase (Units/L) Mean ± SD
DASA 68006	6.00 ± 0.00	5.83 ± 0.00	0.89 ± 0.02	0.82 ± 0.01
DASA 68020	8.20 ± 0.00	5.40 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.52 ± 0.05
DASA 68025	4.90 ± 0.00	5.90 ± 0.01	1.20 ± 0.07	1.19 ± 0.04
DASA 68053	5.00 ± 0.00	5.61 ± 0.01	0.81 ± 0.02	1.10 ± 0.08
DASA 68061	7.08 ± 0.02	5.46 ± 0.00	1.00 ± 0.01	1.03 ± 0.03
DASA 68066	8.84 ± 0.03	5.36 ± 0.00	1.35 ± 0.01	1.95 ± 0.10
DASA 68069	6.00 ± 0.00	5.73 ± 0.00	0.94 ± 0.01	0.89 ± 0.08
DASA 68070	8.29 ± 0.05	4.90 ± 0.00	0.57 ± 0.00	0.56 ± 0.03

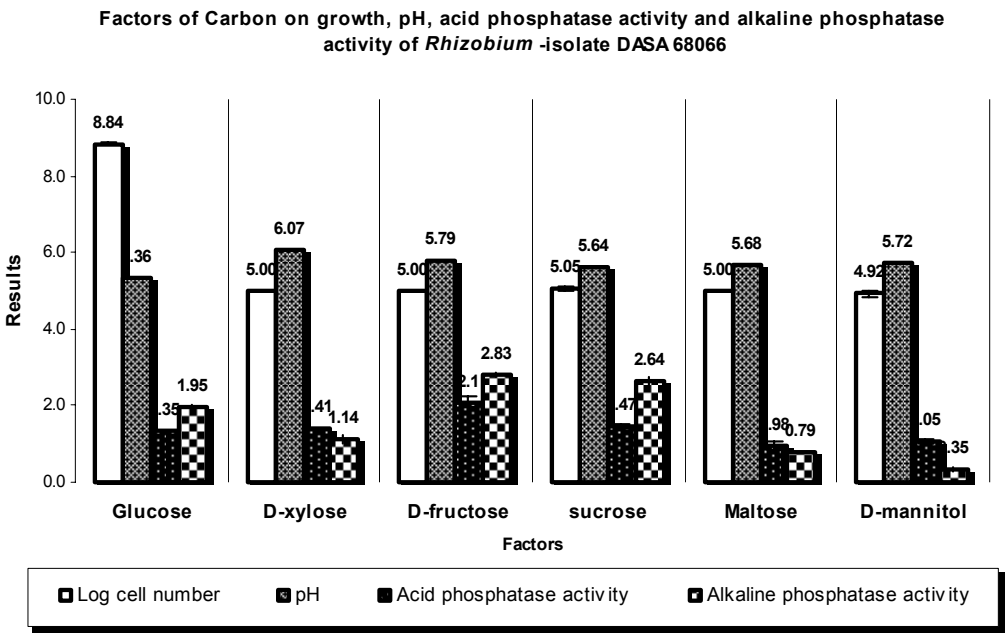
ผลของปัจจัยฟอสฟอรัสต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066



ภาพที่ 1 ผลของปัจจัยฟอสฟอรัสต่อการเจริญ ค่า pH และกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส (ยูนิตต่อลิตร) ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066

จากภาพที่ 1 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่มีแคลเซียมฟอสเฟต ส่งผลให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 เจริญและมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงสุด ทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำที่สุด ซึ่งตรงข้ามกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฟอสฟอรัส มีผลทำให้เชื้อดังกล่าวไม่เจริญและไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodríguez and Fraga (1999) พบว่า จุลินทรีย์ดินที่อยู่บริเวณรอบๆรากพืชที่มีความสามารถในการย่อยฟอสเฟตมักมีการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเทส เพื่อไฮโดรไลส์ หมู่ phosphate esters ทำให้เกิดการละลายฟอสเฟตและปลดปล่อยฟอสฟอรัสอิสระออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยสภาวะ pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสอยู่ในช่วง 3 – 6 และ แอลคาไลน์ฟอสฟาเทสประมาณ 10 (Freitas *et al*., 1997) ซึ่งในขณะที่มีการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ในดินจะปลดปล่อยประจุบวกออกมาจึงส่งผลทำให้ค่า pH ลดลง ส่วนในกรณีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอลูมิเนียมฟอสเฟต พบว่า อลูมิเนียมมีผลยับยั้งต่อการเจริญมากและทำให้กิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Onthong *et al*. (2007) ที่ศึกษาผลกระทบของแคตไอออนบางชนิดต่อกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อยีสต์ *Ustilago* sp. ที่คัดแยกมาจากบริเวณรอบรากข้าวที่ปลูกในดินกรดจัดที่มีอลูมิเนียม เหล็ก และแมงกานีสไอออนละลายอยู่มาก พบว่า อลูมิเนียม แมงกานีส เหล็ก และแคลเซียมไอออนในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium ซึ่งมีฟอสฟอรัสอินทรีย์รูปโซเดียมไฟเทส pH 4 ไม่ได้มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ดังกล่าว แต่อะลูมิเนียมและแคลเซียมไอออนมีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส นอกจากนั้น อลูมิเนียม และ เหล็ก ไอออน จะทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสที่ถูกปลดปล่อยออกมาส่งผลให้ฟอสฟอรัสตกตะกอนอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ

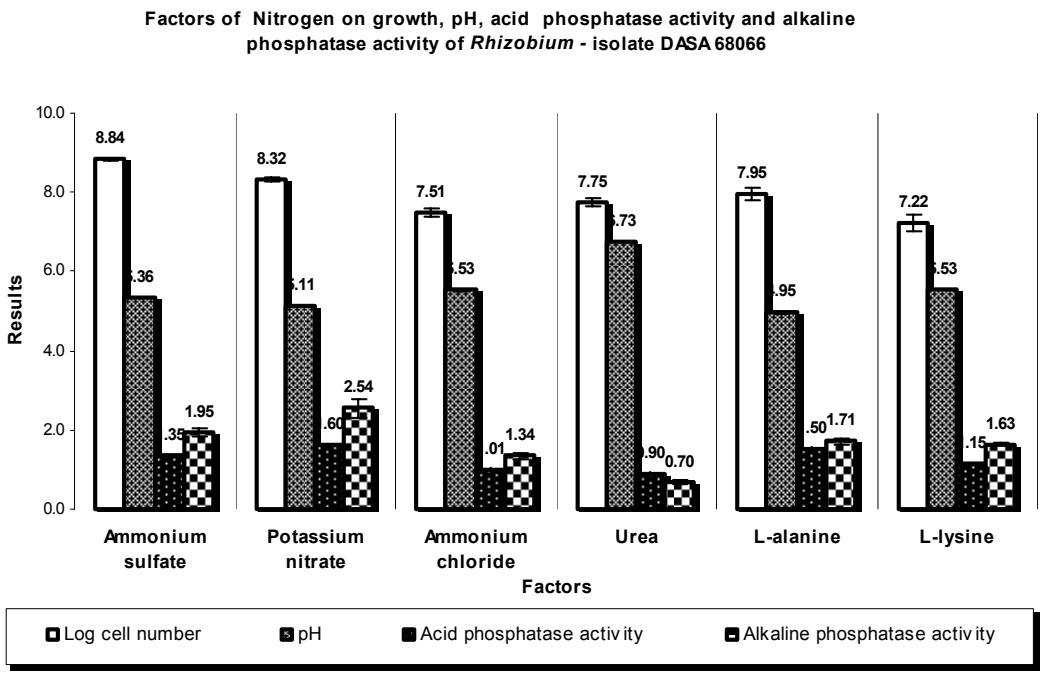
ผลของปัจจัยคาร์บอนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066



ภาพที่ 2 ผลของปัจจัยคาร์บอนต่อการเจริญ ค่า pH และกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส (ยูนิตต่อลิตร) ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066

จากภาพที่ 2 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่มีกลูโคส เชื้อไรโซเบียมดังกล่าวมีการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสมากที่สุด ส่งผลให้ค่า pH ต่ำที่สุด เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ใช้ได้ง่ายที่สุด จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสทำให้สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Neddermannl and Nausch (2004) ที่ศึกษาผลกระทบของสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์ต่อการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสของแบคทีเรีย โดยวิธี fluorogenic substrate analogues 4-methylumbelliferyl phosphate พบว่า กลูโคส เป็นปัจจัยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ phosphatase สูงขึ้น ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี มอลโทส และ แมนนิทอล พบว่า ปัจจัยทั้งสองยับยั้งการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ส่วน ไซโลส ฟรุกโทส และ ซูโครส ยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อ แต่ ไซโลส สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และ ฟรุกโทส และ ซูโครส สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงขึ้นจึงทำให้ pH ลดลง ซึ่งผลการเจริญอาจเนื่องจากเชื้อในกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญได้เร็ว จะสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ได้โดยต้องผ่านกลไกการเคลื่อนย้ายอย่างน้อย 2 ปฏิกิริยา และน้ำตาลประเภทแอลกอฮอล์จะถูกเมแทบอไลซ์โดยต้องผ่านปฏิกิริยาของเอนไซม์ dehydrogenases จำเพาะ (Stowers,1985) ส่วนผลกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sridevi *et al*. (2007) ที่ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนต่อการละลายฟอสเฟตของเชื้อไรโซเบียม โดยการทดสอบการละลายแคลเซียมฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya พบว่าความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการละลายฟอสเฟต ขึ้นอยู่กับกรดอินทรีย์ที่ถูกผลิตจากเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์

ผลของปัจจัยไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066



ภาพที่ 3 ผลของปัจจัยไนโตรเจนต่อการเจริญ ค่า pH และกิจกรรมเอนไซม์ phosphatase (ยูนิตต่อลิตร) ของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066

จากภาพที่ 3 พบว่า ปัจจัยไนโตรเจนทุกชนิดสามารถเพิ่มการเจริญได้ดีกว่าปัจจัยอื่น ๆ โดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมดังกล่าว เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต มีการเจริญสูงสุดและมีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสสูงทำให้ค่า pH ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Neddermannl and Nausch (2004) พบว่า ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโพแทสเซียมไนเตรต พบว่า เชื้อมีการเจริญน้อยกว่า แอมโมเนียมซัลเฟต แต่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงสุด เท่ากับ 1.60 ± 0.04 ยูนิตต่อลิตร และ 2.54 ± 0.23 ยูนิตต่อลิตร ทำให้ค่า pH ต่ำที่สุด เท่ากับ 5.11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียคลอไรด์ พบว่า มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสลดลง ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรีย อะลานีน และไลซีน พบว่า เชื้อไรโซเบียมมีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งอะลานีน และ ไลซีน มีผลทำให้ pH ลดลง ยกเว้น ยูเรีย ทำให้ pH เพิ่มขึ้น อาจส่งผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสต่ำที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sridevi *et al*. (2007) พบว่า แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์โดยส่วนใหญ่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสเกิดได้มากกว่าไนโตรเจนอินทรีย์ เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมจะสามารถกระตุ้นกลไกการแลกเปลี่ยนประจุบวกทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นจึงส่งผลทำให้เชื้อไรโซเบียมมีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสละลายฟอสเฟตได้สูงขึ้น

สรุป

จากผลการศึกษาการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส พบว่า เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 มีการเจริญและมีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสและแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสสูงสุด ทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำที่สุด และผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 68066 พบว่า แคลเซียมฟอสเฟต เป็นปัจจัยฟอสฟอรัสที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทส กลูโคส เป็นปัจจัยคาร์บอนที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญ และ ฟรุกโทส เป็นปัจจัยคาร์บอนที่ดีที่สุดในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสสูงสุด แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นปัจจัยไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญ และ โพแทสเซียมไนเตรต เป็นปัจจัยไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสสูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

Freitas, J.R.., M.R. Banerjee and J.J. Germida.1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Ferti Soils*. 24 : 358–364.

Garrahan, P.J., M.I. Pouchan and A.F. Rega. 1969. Potassium activated phosphatase from human red blood cells: the mechanism of potassium activation. *J. Physiol*. 202 : 305-327.

Neddermannl, K. and M. Nausch. 2004. Effects of organic and inorganic nitrogen compounds on the activity of bacterial alkaline phosphatase. *Aquatic Ecol.* 38 : 475–484.

Onthong, J., S. Gimsanguan., A. Pengnoo., C. Nilnond and M. Osaki. 2007. Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago* sp. isolated from acid sulphate soil. *Songklanakarin J Sci Technol*. 29(2) : 275-286.

Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17 : 362–370.

Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their roles in plant growth promotion. *Biotech. Adv*. 17: 319–359.

Sridevi, M., K. V. Mallaiah and N.C.S. Yadav. 2007. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *J Plant Sci*. 2(6) : 635-639.

Stowers, M. D. 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39 : 89-108.

Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook no. 15. *Blackwell scientific publications*, Oxford.

Xie, J. 2008. Screening for calcium phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum.* Master ‘s thesis. Department of soil science. University of Saskatchewan.Saskatoon, SK.