บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

1. <u>การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน</u>

การทดลองวิจัยพบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดินไม่มีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน เนื่องจากสามารถพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้จากดินที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นปานกลาง และมีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดินปานกลางถึงต่ำ ทั้งที่มีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ควรพบได้มากในในดินที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดินสูง (สมศักดิ์ วังใน, 2524; Bitton, 1999) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน ยังไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุที่ดินจากบริเวณริมแม่น้ำแคว้นอยมีความชื้นต่ำที่สุด อาจเนื่องมาจากดินในบริเวณนี้โดนแสงแดดตลอดทั้งวันจึงสูญเสียความชื้นมากกว่าในป่าซึ่งมีร่มไม้ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินที่พบแบคทีเรียในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์นั้น พบว่าสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน คือ อยู่ในช่วงพีเอช 6.47 – 7.26 (Alexander, 1997) ดังนั้นปัจจัยในเรื่องความเป็นกรด-ด่างของดินจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญมากต่อชนิดและปริมาณของดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียมากกว่าปัจจัยอื่น

2. <u>การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์จากดิน</u>

การคัดเลือกโคโลนีทำโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ เช่น สีของโคโลนี รูปร่างของโคโลนี ลักษณะพื้นผิว เรียบ เยิ้ม แล้วสุ่มโคโลนีทั้งที่มีลักษณะเหมือนและต่างกันมาทำการศึกษา ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่คัดเลือกจากแต่ละตัวอย่างดินจะมากหรือน้อยขึ้นกับแต่ละความเจือจางว่ามีเชื้อลักษณะใดบ้าง รวมแล้วสามารถคัดเลือกได้ 211 ไอโซเลต

จากการทดสอบคุณสมบัติการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเบื้องต้น พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซได้ 16 ไอโซเลต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน สามารถรีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นก๊าซไนโตรเจนได้ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณริมแม่น้ำแคว้นอยจำนวน 14 ไอโซเลต มีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่แยกได้จากดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 5 และดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 3

เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 16 ไอโซเลตที่ได้ทดสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีคุณสมบัติในการเกิด

กระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มาเลี้ยงในอาหาร nitrate agar เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตในภาวะไร้ออกซิเจน พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนเพียง 7 ไอโซเลตที่เจริญได้ดี คือ B11-3 C22-5 C22-14 C22-18 C22-24 C23-15 และ A31-18 ส่วนที่เหลือจำนวน 9 ไอโซเลต คือ C11-5 C23-1 C23-5 C32-2 C32-5 C32-6 C32-7 C32-13 และ C33-1 ไม่สามารถเจริญได้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เจริญได้นั้นอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe และอาหารเลี้ยง nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในกลุ่มนี้ทั้งหมด ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในกลุ่มนี้บนอาหารแข็งจำเป็นต้องมีการศึกษาภาวะเหมาะสมต่างๆในอาหาร เช่น ปริมาณไนเทรต สารอินทรีย์ในอาหาร และค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่มนี้แต่ละชนิดให้มีการเจริญเติบโตสูงสุด

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียทางชีวเคมี โดยชุดทดสอบ API พบแบคทีเรียจาก 6 สกุล คือ *Pseudomonas Alcaligenes Burkholderia Agrobacterium Corynebacterium* และ *Micrococcus* โดยสกุลที่พบมากที่สุด คือ *Agrobacterium* ซึ่งมีจำนวนถึง 8 ไอโซเลต ความแตกต่างของสปีชีส์ในสกุลเดียวกัน ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีกับชุดทดสอบ API แตกต่างกันแต่ก็มีความแตกต่างน้อยกว่าแบคทีเรียในต่างสกุล ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันพบได้มากในบริเวณใกล้แหล่งน้ำ

เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเทรตในอาหาร nitrate broth พบว่าทุกแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถลดปริมาณไนเทรตได้ แต่ประสิทธิภาพแตกต่างกันไป แสดงว่าเกิดการรีดิวซ์ไนเทรตขึ้น โดยแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3) *Acaligenes xylosoxydans* (C11-5) *Corynebacterium propinquum* (A31-18) และ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2) สามารถลดปริมาณไนเทรตได้เร็วและไม่มีการสะสมไนไทรต์ แบคทีเรีย 1 ไอโซเลต คือ *Burkholderia cepacia* สามารถลดปริมาณไนเทรตได้ช้าและไม่มีการสะสมไนไทรต์ ส่วนอีก 11 ไอโซเลต สามารถลดปริมาณไนเทรตได้ช้าและมีการสะสมไนไทรต์ จึงเห็นได้ชัดว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีความหลากหลายในชนิดและประสิทธิภาพในการลดไนเทรตเป็นอย่างมาก นอกจากความหลากหลายทางชนิดพันธุ์แล้ว ความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับยีนก็ทำให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงไนเทรตได้อย่างชัดเจน

3. **<u>การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน</u>**

ยีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงไนเทรตมีหลายยีน, การวิจัยนี้สนใจการตรวจสอบยีน *nirK* และ *nirS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสที่สำคัญ 2 ชนิด เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญยิ่งต่อกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน จึงมีความสนใจในการตรวจสอบยีนทั้งสองและความหลากหลายของยีนทั้งสองนี้ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่พบในพื้นที่ วิธีการที่ใช้คือการศึกษา RFLP ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R พบแถบดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายของทั้ง 2 ยีน คือ 514 bp และ 890 bp ตามลำดับ ผลการศึกษาพบยีน *nirK* ในแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต คือ *Acaligenes xylosoxydans* (C11-5) และ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18, C23-1, C23-5, C23-15, C32-2, C32-7, C32-13 และ C33-1) และยีน *nirS* ในแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-4), *Corynebacterium propinquum* (A31-18) และ *Micrococcus lylae* (C32-5 และ C32-6) ส่วนอีก 3 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* (C22-5), *Burkholderia cepacia* (C22-14) และ *Pseudomonas stutzeri* (C22-24) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายได้ ซึ่งอาจเกิดจากการโค้งงอของดีเอ็นเอเป้าหมายกลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับได้ ซึ่งได้ตรงกับการทดลองวิจัยในเรื่องเดียวกับของเชื้อในกลุ่มนี้บางชนิดโดย Hallin และ Lindgren (1999) ดังนั้นเชื้อทั้งสามไอโซเลตจึงยังไม่มีข้อสรุปรายละเอียดแน่นอนว่ายีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเป็นยีน *nir* เดียวกันหรือไม่ จึงควรศึกษามากขึ้นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ต่อไป เพื่อศึกษาลึกลงไปถึงขนาดและความแตกต่างของลำดับเบสของยีนนี้ในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์ทั้งหมด

ในแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้พบว่ามียีน *nir* เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ไม่พบว่ามีทั้งสองยีนนี้อยู่พร้อมกัน อย่างไรก็ตาม Hallin และ Lindgren (1999) ได้รายงานการพบยีน *nirK* ใน *Paracoccus denitrificans* สายพันธุ์ PD1222 ซึ่ง de Boer และคณะ (1994) ได้เคยรายงานไว้ว่าพบยีน *nirS* ด้วย และไม่เคยมีการรายงานการพบยีน *nirK* ในสายพันธุ์นี้มาก่อน แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะพบยีนทั้งคู่อยู่ในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันได้เช่นกัน ในการวิจัยนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific band) เกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนทั้งคู่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสกุลหรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกัน การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้เพิ่มปริมาณยีน *nir* ของดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียได้ทุกตัวจึงเป็นไปไม่ได้ (Hallin และ Lindgren, 1999) การสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *nirS* ให้สามารถใช้ได้ในวงกว้าง (broad-range primer) ทำได้ยากกว่าการสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *nirK* (Ward et al., 1993)

ผลการวิเคราะห์ RFLP สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มียีน *nirK* ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Alcaligenes xylosoxidans* และ *Agrobacterium radiobacter* ในส่วนของ *Agrobacterium radiobacter* สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย แสดงให้เห็นว่ายีน *nirK* มีความแปรปรวนทั้งในระดับสกุล และสปีชีส์ (รูปที่ 19) ส่วนการจัดกลุ่มของแบคทีเรียที่มียีน *nirS* พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามสกุล (รูปที่ 20) และพบว่าในสปีชีส์เดียวกันก็มีความแปรปรวนของยีนนี้เช่นเดียวกับยีน *nirK* ซึ่งผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับที่ Braker และคณะได้ทำการศึกษายีน *nirK* และ *nirS* ในดีไนทริฟายอิ้งแบคทีเรียจากบริเวณนอกชายฝั่งมลรัฐวอชิงตันและพูเกตซาวด์ มลรัฐวอชิงตัน ในเรื่องความแปรปรวนของยีนทั้งคู่ภายในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ RFLP ของยีน *nirK* และ *nirS* ในแบคทีเรียกลุ่มนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมีในระดับสกุลด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย