บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ การคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสเพื่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และนำเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาความสามารถในการควบคุมตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งสรุปผลการวิจัยดังนี้

1. การศึกษาการคัดแยกไรโซแบคทีเรีย

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรีย PGPR โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังที่ปลูกในพื้นที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตพื้นที่อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร (ภาพที่ 4.1) โดยการเก็บตัวอย่างจากดินรอบรากมันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ phosphate solubilization assay, siderophore production และ protease activity ผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลท

2. การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

การศึกษาคุณสมบัติ phosphate solubilizer ของแบคทีเรียรอบรากมันสำปะหลัง โดยการนำตัวอย่างบริเวณรอบรากมันสำปะหลังมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามี halo zone ทางโคโลนี ทั้งหมด 60 ไอโซเลท

ส่วนการศึกษา siderophone production โดยการนำแบคทีเรียที่แยกได้จากรอบรากมันสำปะหลังมาเพาะเลี้ยงเชื้อ ใน CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลังทั้งหมด 60 ไอโซเลท สามารถสร้าง siderophone ให้โคโลนีมีสีเหลืองส้ม

สุดท้ายการศึกษา protease activity โดยการเลือกโคโลนีให้โซนใสรอบๆ โคโลนีจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลังทั้งหมด 60 ไอโซเลท มีเพียง 17 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

แบคทีเรียทั้ง 17 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช และมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ มาย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของเซลล์ พบลักษณะเซลล์ของแต่ละไอโซเลท แล้วจำแนกแบคทีเรียที่ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ได้ PCR Product ขนาด 750 bp นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสในระดับสปีชีส์ โดยเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทกับลำดับเบสอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank

4. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส การโคลนยีนและและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

ไอโซเลทของแบคทีเรีย PGPR ที่มีสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด ได้แก่ ไอโซเลท DK4 และ DK36 นำแต่ละไอโซเลทมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนโปรตีเอส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนยีนโปรตีเอสได้ PCR Product ขนาด 1,577 bp

5. ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน *E. coli*

การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน *E. coli* พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบน SDS- PAGE โดยเมื่อย้อมสีด้วย Comassies brilliant blue R-250 มีขนาดโมเลกุล 37 kDa

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีน โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจากไอโซเลทที่ DK4 และ DK36 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ 151.83 และ 155.41 Uml^{-1} ตามลำดับ

7. ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

การศึกษาประสิทธิภาพรีคอมบิแนท์โปรตีเอสต่อการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* รีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจากไอโซเลทที่ DK4 และ DK36 สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึงร้อยละ 74 และ 76 ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมไม่พบการทำลายตัวอ่อน

การอภิปรายผล

จากวิจัยครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรีย PGPR จากดินรอบรากมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติเป็นโรครากปม ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ 17 ไอโซเลท ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรีย PGPR จำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดประกอบด้วยไอโซเลท DK4 และ DK37 เมื่อนำ PCR Product ส่วนยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย PGPR ทั้ง 2 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain V26 และ *B. subtilis* strain DL5-1 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ J. K. Yang และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* และทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้งานในการย่อยของเสียจำพวกเปลือกหอย เปลือกกุ้ง ปูจากอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากอุตสาหกรรมการบำบัดของเสียแล้วยังพบว่า *B. subtilis* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมัก (Chantawannakul, P., 1995), (Ogbadu, L. J., 1990) ซึ่ง US FDA ให้การยอมรับว่า *B. subtilis* สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย โดยจัด *B. subtilis* เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ GRAS (Generally Recognized As Safe) การศึกษาของมัทนา วานิชย์ และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 พบว่าแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชไอโซเลตที่ 9 สามารถลดการเกิดปมจากไส้เดือนฝอยมากที่สุด โดยพบว่ามีดัชนีการเข้าทำลาย ร้อยละ 25 สอดคล้องกับ สืบศักดิ์ สนธิรัตน์ ในปี พ.ศ. 2549 ซึ่งพบว่า ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ถูกทำลายได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เป็นพิษค่อนข้างสูง นอกจากนี้จากการศึกษา Lian และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 พบว่า กลไกของเอนไซม์ protease จาก *Bacillus* sp. ซึ่งเป็น PGPR ในการควบคุม nematode โดยแยก *Bacillus* sp. strain RH 219 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ Protease Apr 219 ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ มีคุณสมบัติในการทำลาย cuticle ของ Nematode โดย (Protease activity unit 930 Uml^{-1} ที่ 37 °C pH 7) สามารถทำลายไส้เดือนฝอยได้ร้อยละ 73 ภายใน 24 ชั่วโมงและหลังจากเป็น 48 ชั่วโมง สามารถทำลายไส้เดือนฝอยได้ ร้อยละ 97 ขณะที่การศึกษาในนี้ แบคทีเรีย PGPR ไอโซลทที่ DK4 และ DK36 มี Protease activity unit 151.83 และ 155.41 Uml^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสามารถทำลายไส้เดือนฝอยรากปมได้ร้อยละ 74 และ 75 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบในแปลงมันสำปะหลังที่นำเอนไซม์โปรตีเอสมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำมาทดสอบประสิทธิภาพ ซึ่งในที่นี้ไม่ได้แสดงผลการทดลอง พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมเพียงร้อยละ 27.4 ซึ่งเหตุที่ประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมลดลงจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ก็อาจเกิดจากสภาพแวดล้อมรอบบริเวณแปลงมันสำปะหลังไปลดความสามารถในการทำลายไส้เดือนฝอยของเอนไซม์โปรตีเอสลง ทั้งความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิของดินในแปลง แร่ธาตุที่อยู่ในบริเวณแปลงปลูก นอกจากนี้สภาพพื้นที่ของแปลงมันสำปะหลังมีความลาดเอียงซึ่งมีระดับเฉลี่ย 1 - 2 ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของชีวภัณฑ์ ซึ่งพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์และคณะ ในปี พ.ศ. 2544 ได้อธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวว่าได้ทดสอบการควบคุมทางชีววิธีในไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* บริเวณราก

ต้นมะเขือเทศ พบว่า ประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมลดลง ร้อยละ 20 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ramamoorthy และคณะ ใน ปี ค.ศ. 2001 และ Sullivan, T. ในปี ค.ศ. 2004 ซึ่งพบว่าการนำเอนไซม์ไปทำลายไส้เดือยฝอยรากปมในพื้นที่แปลงทดลองจะทำให้ประสิทธิภาพในการทดลองไส้เดือนฝอยรากปมลดลง ร้อยละ 10 – 30 ซึ่งเกิดจากปัจจัยทางด้านชีว-กายภาพในแปลงปลูกมันสำปะหลัง

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในสภาวะจำลองในแปลงปลูกพืช เพื่อศึกษาความสามารถและศักยภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปม

2. ควรศึกษาผลของเอนไซม์ต่อสรีรวิทยาของมันสำปะหลัง โดยเฉพาะการเกิดหัว เพื่อศึกษารูปแบบการใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม

3. ควรปรับปรุงวิธีการรักษาสภาพเอนไซม์ในรูปแบบที่ง่ายต่อการใช้งานของเกษตรกร รวมทั้งวิธีการบำรุงรักษา