บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

ในงานวิจัยนี้คัดเลือก *Bacillus* sp. MuH01-4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR โดยสามารถใช้สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ดี และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมชนิดกลูตาเมท ในการศึกษาผลของ *Bacillus* sp. MuH01-4 ต่อการเจริญของเมล็ดข้าวที่แช่สารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าเมล็ดข้าวที่เคลือบด้วยแบคทีเรียมีการเจริญดีในสภาวะดังกล่าวโดยมีค่าความยาวเฉลี่ยของปลายยอดและปลายรากสูงกว่าชุดทดลองเมล็ดข้าวที่แช่สารละลายไกลโฟเสทแต่ไม่เคลือบแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการจำลองรูปแบบการนำแบคทีเรียพีจีพีอาร์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้จริง

อภิปรายผล

ไกลโฟเสทเป็นสารกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้เนื่องจากสามารถทำลายวัชพืชได้หลายชนิด ใช้ได้สะดวก รวดเร็ว และมีราคาถูก โดยมีข้อมูลการนำเข้าในรูปไกลโฟเสท-แอมโมเนียม (glyphosate-ammonium) อย่างต่อเนื่องในช่วงปี 2558-2563 โดยสาเหตุหนึ่งที่ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากยังไม่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้ ส่วนใหญ่จึงเป็นการนำเข้ามาเพื่อบรรจุขายภายในประเทศหรือมีการผสมสารอื่น ๆ แล้วจึงบรรจุขาย จากข้อมูลการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปีพ.ศ. 2542-2561 พบว่าประเทศไทยนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากประเทศจีนมากที่สุด ตามด้วยอินเดีย สวิตเซอร์แลนด์ ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และเยอรมนี (ศูนย์ข้อมูลและข่าวสืบสวนเพื่อสิทธิพลเมือง., 2562) แต่การใช้งานอย่างไม่ถูกต้องก่อให้เกิดผลเสียต่อทั้งเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม แนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการแก้ปัญหานี้คือการใช้จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชซึ่งได้รับสารไกลโฟเสทที่เกษตรกรฉีดพ่นอย่างต่อเนื่องในการย่อยสลายไกลโฟเสท เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถปรับระบบเมแทบอลิซึมให้สามารถทนต่อสภาวะที่มีสารกำจัดวัชพืชและสามารถย่อยสลายสารพิษได้ (Kanissery et al., 2019 : 2) มีรายงานว่าแบคทีเรียหลายจีนัสในดินสามารถย่อยสลายสารไกลโฟเสทได้ (Abubacker, Visvanathan & Srinivasan, 2016 : 244) โดยไกลโฟเสทจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ฟอสฟอรัส หรือไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการสร้างพลังงานของแบคทีเรีย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบและเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรียพีจีพีอาร์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ growth curve และนำ culture supernatant มาวิเคราะห์สเปกตรัมของ FTIR ซึ่งมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของไกลโฟเสทโดยใช้ FTIR (Abubacker, Visvanathan & Srinivasan, 2016 : 246; Yael et al., 2014 : 9655) การใช้เทคนิค FTIR แสดงให้เห็นถึงปริมาณของสารไกลโฟเสทเริ่มต้น ปริมาณที่ลดลง และการเกิดสเปกตรัมของสารตัวกลางที่เป็นผลจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย ในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง (ค่า A) ของโมเลกุลไกลโฟเสทที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1090.19 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากพันธะ C-O stretching (1090 – 1049 cm^{-1}) ของหมู่คาร์บอกซิลิก (Benetoli et al., 2010) ค่าการดูดกลืนแสงนี้จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของไกลโฟเสท (จากทฤษฎีของ Beer-Lambert A=£bc เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ c คือ ความเข้มข้นของสารทดสอบ) ดังนั้นถ้าสเปกตรัม FTIR ของไกลโฟเสท มีค่า A สูง แสดงว่ามีความเข้มข้นของสารทดสอบสูง จากการเทียบค่า A ของไกลโฟเสทระหว่างชุดควบคุม (uninoculated control) และชุดทดลองที่เติมเชื้อแบคทีเรีย พบว่าชุดควบคุมมีค่า A สูงกว่าชุดทดลองที่เติมเชื้อ แสดงว่าปริมาณไกลโฟเสทที่ลดลงในชุดทดลองเป็นผลมาจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย ซึ่งแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท MuH01-4 และ RB5-3-3 มีค่า A ต่ำกว่า ชุดทดลองของไอโซเลท MaH02-3, SoB02-3 และ KlD02-6 แสดงว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไกลโฟเสทได้สูงกว่า สอดคล้องกับผลการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว โดยไอโซเลท MuH01-4 และ RB5-3-3 มีการเจริญสูงกว่า แสดงว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถนำไกลโฟเสทไปใช้เพื่อการเจริญได้ ทำให้เกิดการลดลงของสารทดสอบซึ่งยืนยันผลได้ชัดเจนจากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ FTIR สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharifi et al. (2015 : 33) ที่พบว่า *Salinicoccus* sp. SH5 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาวะที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสามารถย่อยสลายสารทดสอบได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ *Salinicoccus* spp. อีกจำนวน 9 ไอโซเลท

งานวิจัยในขั้นต่อมาเป็นการศึกษาความสามารถของ *Acetobacter* sp. RB5-3-3 และ *Bacillus* sp. MuH01-4 ในการใช้ไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนหรือฟอสฟอรัสเพื่อการเจริญ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถใช้ไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ดีกว่าเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Moneke, Okapala & Anyanwu (2010 : 4067) ที่รายงานว่าไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อการเจริญของ *Acetobacter* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งรายงานวิจัยอื่น ๆ ก็สรุปผลไปในทิศทางเดียวกันว่าไกลโฟเสทเป็น

แหล่งฟอสเฟตเพื่อการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไกลโฟเสทเป็นสารเคมีที่มีหมู่ฟอสฟอนิกอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล ($C_3H_8NO_5P$) แบคทีเรียสามารถใช้ไกลโฟเสทเป็นแหล่งฟอสฟอรัสได้เนื่องจากมีเอนไซม์ C-P lyase ที่สามารถทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนและฟอสฟอรัสในโครงสร้างของสารไกลโฟเสทได้ (Ballou, 2014) จึงเป็นไปได้ว่า ไอโซเลท RB5-3-3 และ MuH01-4 ไม่ได้ใช้กลไกดังกล่าวในการย่อยสลายไกลโฟเสท

เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่เติมไกลโฟเสทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในช่วง OD_{660} เท่ากับ 0.03 – 0.06 ซึ่งมีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่สมบูรณ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเติมแหล่งคาร์บอนร่วมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กลูตาเมท ยีสต์สกัด และกลีเซลรอล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไกลโฟเสทของแบคทีเรีย เพราะตามธรรมชาติแล้วไกลโฟเสทไม่ได้เป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว การมีแหล่งคาร์บอนร่วมทำให้กระบวนการย่อยสลายของแบคทีเรียดีขึ้น ผลการทดลองพบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมกับไกลโฟเสททำให้แบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมีการเจริญได้สูงขึ้น เนื่องจากเกิดภาวะ co-metabolism โดยแบคทีเรียจะใช้แหล่งคาร์บอนร่วมซึ่งมีโครงสร้างที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายก่อน เพื่อให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในระยะแรกแล้วจึงเกิดการย่อยสลายไกลโฟเสทในลำดับถัดมา เนื่องจากมีการเติมแหล่งคาร์บอนร่วมในปริมาณจำกัด นอกจากนี้ยังพบว่าแต่ละไอโซเลทใช้แหล่งคาร์บอนร่วมที่แตกต่างกัน โดย RB5-3-3 ใช้กลูตาเมท (0.1% w/v) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับยีสต์สกัดและกลีเซอรอล เนื่องจากกลูตาเมทมีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งคล้ายคลึงกับสูตรโครงสร้างของไกลโฟเสท ทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายกลูทาเมทได้ง่าย โดยสอดคล้องกับรายงานของ Benslama & Boulahrouf (2013 : 5588) ที่มีการพบว่า *Pseudomonas putida* มีการเจริญโดยใช้กลูตาเมทเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมได้ดีที่สุด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เติมไกลโฟเสท ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติมยีสต์สกัด (0.1% w/v) ร่วมกับไกลโฟเสท ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ไอโซเลท MuH01-4 เจริญได้ดีที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมีวิถีเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน โดย MuH01-4 อาจจำเป็นต้องได้รับวิตามินในการเจริญเติบโต เนื่องจากยีสต์สกัดประกอบไปด้วยวิตามิน และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) จึงสามารถทำให้ MuH01-4 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนร่วมเป็นกลูตาเมทและกลีเซอรอล ซึ่งจากรายงานวิจัยของต้องตา สายทอง และจิรภัทร จันทมาลี (2560) จัดจำแนกจีนัสของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้ได้เป็น *Acetobacter* sp. RB5-3-3 และ *Bacillus* sp. MuH01-4

ขั้นสุดท้ายของงานวิจัยนี้ทดสอบผลของสารละลายไกลโฟเสทต่อการเจริญและการงอกของเมล็ดข้าวเพื่อจำลองสภาวะการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชชนิดดังกล่าวในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีวัชพืชแพร่กระจาย โดยการใช้ *Bacillus* sp. MuH01-4 เคลือบเมล็ดข้าว ที่ผ่านการแช่ในสารละลายไกลโฟเสท จากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 พบว่าการเคลือบแบคทีเรียย่อยสลายไกลโฟเสทบนเมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่ไกลโฟเสท (ชุดการทดลองที่ 3) ทำให้เมล็ดข้าวมีการเจริญเติบโตดีกว่าเมล็ดข้าวที่เคลือบแบคทีเรีย แต่แช่ไกลโฟเสท (ชุดการทดลองที่ 2) โดยมีความยาวเฉลี่ยของปลายยอดและปลายรากสูงกว่า เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถลดความเป็นพิษของไกลโฟเสทต่อเมล็ดข้าวได้ โดยการย่อยสลายสารดังกล่าวไปเป็นสารตัวกลางสำหรับการเจริญของเชื้อ ซึ่งจากรายงานของจิราพร ทำเนียบ, ปิยมาศ คงศรี และศุภรัตน์ สมตระกูล (2558 : 18) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MuH01-4 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้นสูงถึง 3 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อนี้มีค่าความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ (cellular hydrophobicity) สูงถึงร้อยละ 90.18 ± 1.78 ซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เซลล์ของเชื้อ MuH01-4 เข้าถึงสารไกลโฟเสทได้โดยง่าย สอดคล้องกับ Shdhid & Khan (2018 : 131) ที่รายงานว่า *Burkholderia cepacia* PSBB1 สามารถลดความเป็นพิษของไกลโฟเสทต่อถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) โดยมีผลเพิ่มขนาด น้ำหนักแห้ง คุณสมบัติของเมล็ดและคุณค่าทางโภชนาการของถั่ว โดยเชื้อ PSBB สามารถทนต่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทได้สูงถึง 3,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสามารถสร้าง IAA เอนไซม์ ACC deaminase ละลายฟอสเฟต และผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ โดยเชื้อนี้สามารถหลั่งสารเร่งการเจริญของพืชในสภาวะเครียดเนื่องจากมีการปนเปื้อนของสารพิษ (herbicide stress) สอดคล้องกับรายงานของ Myresiotis et al. (2015 : 1260) ซึ่งศึกษาผลของแบคทีเรียพีจีพีอาร์บาซิลลัส 2 สูตร Companion® (*B. subtilis* GB03) และ FZB24® (*B. subtilis* FZB24) ต่อการเจริญและการดูดซับสารกำจัดแมลงไทอะมีทอกแซม (thiamethoxam) ของต้นกล้าข้าวโพด ซึ่งพบว่าทุกชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรียมีผลเพิ่มมวลชีวภาพของรากได้ 38-65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย และยังเพิ่มการดูดซับสารกำจัดแมลงของต้นกล้า ดังนั้นการใช้แบคทีเรียพีจีพีอาร์ควบคู่กับสารสารกำจัดแมลงไทอะมีทอกแซมจึงช่วยลดอัตราการใช้งานสารเคมีลงได้ นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าการใช้แบคทีเรียพีจีพีอาร์เคลือบเมล็ดก่อนปลูกช่วยเพิ่มการเจริญของต้นพืชได้ เช่น จากรายงานของ Sengupta et al. (2015) ซึ่งศึกษาผลของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ต่อการงอกและการเจริญของข้าวโพด (*Zea mays*) โดยการนำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวมาเคลือบด้วยขุยมะพร้าวอัดก้อน (coco peat) เพื่อใช้เป็นวัสดุให้แบคทีเรียเกาะติด จากนั้นนำเมล็ดจำนวน 5 เมล็ด ไปเพาะในถาด เมื่อเมล็ดงอกนำไปปลูกในดินปลอดเชื้อ (1.5 กิโลกรัม/กระถาง) เปรียบเทียบผลการเจริญของต้นข้าวโพดกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เคลือบแบคทีเรีย ผลดทอสอบพบว่าชุดทดลองเมล็ดที่คลือบด้วยแบคทีเรียพีจีพีอาร์ *Azotobacter* มีค่าเฉลี่ยของความยาวปลายยอด 120 มิลลิเมตร ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยของความยาวปลาย

ยอด 60 มิลลิเมตร โดย *Azotobacter* สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความสามารถในการสร้าง IAA แอมโมเนีย ไซเดอโรฟอร์ และละลายฟอสเฟต ซึ่งเป็นคุณสมบัติของพีจีพีอาร์ที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. MuH01-4 อาจมีศักยภาพในการใช้งานในรูปของชีวภัณฑ์ทางการเกษตรสำหรับพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนด้วยไกลโฟเสทหรือสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ โดยอาจช่วยลดภาวะเครียดและส่งเสริมการเจริญของพืชปลูกได้

ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตอาจมีการต่อยอดผลวิจัยนี้โดยมีการทดสอบซ้ำในขั้นตอนที่จำลองการนำเชื้อที่ได้ไปประยุกต์ใช้จริงโดยอาจเพิ่มจำนวนเมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดสอบให้มากขึ้นเพื่อลดปัจจัยรบกวนผลการทดลองเนื่องจากความแตกต่างในด้านความสมบูรณ์ของเมล็ด เพิ่มจำนวนครั้งในการทดสอบเพื่อศึกษาผลของสภาพความชื้น อุณหภูมิ และแสงแดดซึ่งมีผลต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้า นอกจากนี้อาจเพิ่มการทดสอบในสภาวะไม่มีอากาศ (anaerobe) เพื่อให้ใกล้เคียงกับการนำไปใช้จริงในการทำนาข้าวในช่วงที่มีน้ำขังเต็ม ในด้านของการประยุกต์ใช้เพื่อกำจัดวัชพืชในสวนผลไม้ อาจทดลองใช้เมล็ดวัหรือส่วนขยายพันธุ์ของวัชพืชที่มีการแพร่กระจายอยู่ในสวนผลไม้ โดยทดสอบทั้งในรูปแบบของการเคลือบเมล็ด การฉีดพ่น หรืออื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกับรูปแบบการนำไปใช้งานจริงมากที่สุด รวมถึงทดสอบเพิ่มเติมถึงอัตราการดูดซับไกลโฟเสทของวัชพืชในชุดทดลองที่ลงแบคทีเรียพีจีพีอาร์ ซึ่งอาจนำผลที่ได้ไปพัฒนาการใช้งานรูปหัวเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมของแบคทีเรียพีจีพีอาร์ เพื่อส่งเสริมการเจริญและลดสภาวะเครียด (stress) เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชของพืชปลูก รวมถึงลดอัตราการใช้สารกำจัดวัชพืชในพื้นที่เกษตรกรรม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี