ผลของ 2,4-D และพาราควอตต่อการเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจากดินนา

Effects of 2,4-D and Paraquat on Growth and N_2 - Fixation of Some Cyanobacteria from Paddy Soils

วัชรพงษ์ พิทักษ์ภากร,[1*] ธงชัย มาลา,[1] กนกกร สินมา[1] และพงศ์เทพ อันตะริกานนท์[2]

Watcharapong Pithukpakorn,[1*] Thongchai Mala,[1] Kanokkorn Sinma[1] and Pongtep Antarikanonda[2]

ABSTRACT

The purpose of this research is to study the effect of 2,4-D and paraquat on growth and N_2 - fixation of 8 heterocystous cyanobacteria strains isolated from paddy soil at central Thailand (*Trichormus* sp. NPT4, *Nostoc* sp. RBR3, *Anabaena* sp. NPT5, *Nostoc* sp. KRI8, *Anabaena siamensis* NPT2, *Calothrix* sp. KRI1, *Nostoc* sp. RBR6 and *Trichormus* sp. KRI12). Various cyanobacteria was cultured in BG_{11} medium with 3, 6 and 12 mg L^{-1} of 2,4-D. The results found that the specific growth rates and N_2 – fixation of almost cyanobacteria were increased at 3 and 6 mg L^{-1} 2,4-D concentration, while, those at the 12 mg L^{-1} 2,4-D were decreased as compared with that of control. NPT2 had the highest specific growth rates when cultured at 3, 6 mg L^{-1} 2,4-D and control. (0.193, 0.187 and 0.180 respectively) than other strains. The N_2 - fixation of NPT5 and KRI8 at 6 mg L^{-1} 2,4-D (402.30 and 394.23 µmol N L^{-1} hr^{-1} respectively) were higher than other strains. The effect of paraquat at various concentration (0.75, 1.50 and 3 mg L^{-1}) on 8 strains of cyanobacteria were also determined in BG_{11} liquid medium. The result showed that the paraquat concentrations had severe effect on growth and N_2 - fixation of various cyanobacteria and the tolerance of cyanobacterial strains were obvious. The survival of two cyanobacterial strains, NPT5 and RBR6 were found at 0.75 mg L^{-1} of paraquat concentration. However, NPT5 and RBR6 in that concentration had slow specific growth rates as compared to that of control. At higher concentration of paraquat (1.5 mg L^{-1}), only one cyanobacterial strain, NPT5, had a minimal growth where N_2-fixing rate in all concentration of paraquat was not found.

Keywords: 2,4-D, herbicide, heterocytous cyanobacteria, N_2 - fixation, paraquat

[1*]ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture KamphaengSaen, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom 73140, Thailand.

[2]บริษัท อินเตอร์ ไบโอกรีน จำกัด 20/1 ถนนสามัคคี บางตลาด อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120

INTER BIOGREEN CO.,LTD., 20/1, Samakki Rd., Bang Ta-lad, Pekkred, Nonthaburi 11120, Thailand.

[*]Corresponding author: Tel.08-7792-2384, E-mail address: b51263267@gmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D และพาราควอตต่อการเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากดินนาในภาคกลาง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichormus* sp. NPT4, *Nostoc* sp. RBR3, *Anabaena* sp. NPT5, *Nostoc* sp. KRI8, *Anabaena siamensis* NPT2, *Calothrix* sp. KRI1, *Nostoc* sp. RBR6 และ *Trichormus* sp. KRI12 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว BG_{11} ที่ผสม 2,4-D ในอัตรา 3, 6 และ 12 mg L^{-1} พบว่าอัตราการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นเมื่อเจริญใน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 และ 6 mg L^{-1} ขณะที่ความเข้มข้น 12 mg L^{-1} ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการเจริญและการตรึงไนโตรเจนลดลงเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม โดยพบว่าสายพันธุ์ NPT2 มีอัตราการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งในระดับความเข้มข้น 3, 6 mg L^{-1} และตำรับควบคุม (0.193, 0.187 และ 0.180 ตามลำดับ) ส่วนการตรึงไนโตรเจนพบว่าสายพันธุ์ NPT5 และ KRI8 ที่เจริญใน 2, 4-D ความเข้มข้น 6 mg L^{-1} มีการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด (402.30 และ 394.23 µmol N L^{-1} hr^{-1} ตามลำดับ) การศึกษาไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ในอาหารเหลว BG_{11} ที่ผสมพาราควอตในอัตรา 0.75, 1.5 และ 3 mg L^{-1} พบว่า ความเข้มข้น 0.75 mg L^{-1} สายพันธุ์ที่สามารถเจริญต่อไปได้มีเพียง NPT5 และ RBR6 โดยมีอัตราการเจริญเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม และตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 1.5 mg L^{-1} ขึ้นไป เหลือเพียง NPT5 ที่สามารถเจริญต่อไปได้อย่างช้าๆ โดยทุกตำรับที่เลี้ยงในพาราควอตไม่พบการตรึงไนโตรเจนในทุกสายพันธุ์

คำสำคัญ: การตรึงไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรีย 2,4-D พาราควอต สารกำจัดวัชพืช

คำนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่เป็น prokaryote จัดอยู่ใน Division Cyanophyta (Oren, 2004) มีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยว (non filamentous form) เป็นกลุ่มก้อน (colonial form) และเป็นเส้นสาย (filamentous form) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ โดยเฉพาะกลุ่มที่สามารถสร้างเฮเทอโรซีสต์ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่สร้างขึ้นสำหรับตรึงไนโตรเจน เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Calothrix* sp. และ *Cylindrospermum* sp. (Singleton and Sainbury, 1987) ในประเทศไทยมีการผลิตไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวเพื่อใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจน (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2554) แต่เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชที่ปนเปื้อนในดินและน้ำส่งผลกระทบต่อไซยาโนแบคทีเรียทั้งในด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) และความอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและสร้างออร์กาเนลต่างๆ (Irisarri *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2002) ยับยั้งการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Leganes and Fernandez, 1992) ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโน (Steinrucken and Arnheim, 1980) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Singh *et al.*, 1979) หรือแม้แต่การกำจัดออกไปจากระบบนิเวศ (Khan and Vaishya, 1995) จากการทดสอบไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนากับสารกำจัดวัชพืช 4 ชนิด ได้แก่ arozin, alachlor, butachlor และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0-100 mg L^{-1} พบว่า *Anabaena variabilis* มีความทนทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้มากที่สุดเมื่อพิจารณาจากการสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจน กล่าวคือมีแนวโน้มที่จะผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพที่มีศักยภาพสูงได้ (Singh and Datta, 2005) ส่วน Aslim and Ozturk (2009) ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีทางการเกษตร 3 ชนิด ได้แก่ 2,4-D, triflulalin และ linuron ต่อไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. H6, *Chroococcus* sp. S27, *Microsystis* sp. S17

และ *Synechococcus* sp. S24 โดยใช้ค่า EC_{50} (50 % Effective Concentration) เป็นดัชนีในการเปรียบเทียบ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวทนทานต่อ 2,4-D, triflulalin และ linuron โดยมีค่า EC_{50} อยู่ระหว่าง 122-747, 136-882 และ 0.002-0.714 mg L^{-1} ตามลำดับ ซึ่ง *Synechocystis* sp. H6 มีความทนทานต่อสารเคมีดังกล่าวมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนทานต่อสารเคมีแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสาร (พงศ์เทพ และ นวรัตน์, 2531) ดังนั้นจุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลของสาร 2,4-D และพาราควอตต่อการเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการตัดสินใจและทราบถึงผลกระทบที่เกิดขึ้น เมื่อเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียเพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจนให้แก่พืช

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แผนการทดลอง

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยสาร 2,4-D ได้จากสารผลิตภัณฑ์ (KEYSTONE®) ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ คือ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 84% WP ทำการเจือจางด้วยน้ำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 3, 6 และ 12 mg L^{-1} ส่วนสารพาราควอตนั้นได้จากผลิตภัณฑ์ (GRAMOXONE®) ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ คือ 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride 27.6% WP เจือจางด้วยน้ำให้ได้สารออกฤทธิ์ของพาราควอตใน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.75, 1.50 และ 3.00 mg L^{-1} แล้วนำสารกำจัดวัชพืชความเข้มข้นต่างๆ นี้ใส่ลงในอาหารเพื่อเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินนา ได้แก่ *Trichormus* sp. NPT4, *Nostoc* sp. RBR3, *Anabaena* sp. NPT5, *Nostoc* sp. KRI8, *Anabaena siamensis* NPT2, *Calothrix* sp. KRI1, *Nostoc* sp. RBR6 และ *Trichormus* sp. KRI12

2. แหล่งที่มาของไซยาโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียโดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินนาใน จ.นครปฐม จ.ราชบุรี และจ.กาญจนบุรี เก็บที่ผิวดิน ความลึก 5-10 เซนติเมตร และตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างดินและน้ำมาแยกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว (unialgal) ด้วยวิธี dilution plating (ธงชัย และคณะ, 2551) คัดเลือกเฉพาะไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เป็นเส้นสายและมีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ (heterocytous cyanobacteria) จำแนกสายพันธุ์ของไซยาโน-แบคทีเรียตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามวิธีของ Komarek *et al.* (2003)

3. การเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและการใส่สารกำจัดวัชพืช

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว BG_{11} ที่ปราศจากสารประกอบไนโตรเจน ปริมาณ 70 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อโดยผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ใส่สารกำจัดวัชพืชในระดับความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารภายในตู้ปลอดเชื้อชั่งกล้าเชื้อและใส่ลงในอาหารในอัตรา 300 mg L^{-1} โดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียดสูง (METTLER TOLEDO AB204) ที่เช็ดฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 75 % (ชั่งโดยเทคนิคปลอดเชื้อ) จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28°C ± 2°C) บนเครื่องเขย่าแบบแกว่งความเร็ว 100 รอบ/นาที ให้แสงสว่าง 50 µmol quanta m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน (Andersen *et al.*, 2005)

4. การติดตามการเจริญของเชื้อ

บันทึกข้อมูลที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ หลังการเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร ซึ่งประกอบด้วย

4.1 ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรีย

นำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมาจำนวน 10 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C นำไปอบให้แห้งที่ 80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาผลต่างระหว่างน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังการกรอง (มาริษา, 2547)

4.2 อัตราการเจริญ (specific growth rate, μ)

เลือกชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียในช่วง exponential growth phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในแต่ละตำรับการทดลองตามสมการ (Vonshak, 1986)

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / t_2 - t_1$$

เมื่อ X_1 = ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียจุดแรกที่เลือกของการเจริญเติบโต exponential phase (mg L^{-1})

X_2 = ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียที่ระยะเวลา t (mg L^{-1})

t_1 = ระยะเวลาศึกษาเริ่มต้น (สัปดาห์)

t_2 = ระยะเวลาศึกษาที่เวลา t (สัปดาห์)

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธีอะเซทิลีนรีดักชัน

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในระยะ exponential phase ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ดึงอากาศภายในขวดออก 10% ฉีดแก๊สอะเซทิลีนลงไปปริมาณเท่ากับที่ดึงอากาศออก นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 136 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ที่มีความเข้มแสง 50 μmole quanta m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างแก๊สที่ได้ในแต่ละขวดไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลีน (μmole) ด้วยเทคนิค GC-MS โดยเปรียบเทียบปริมาณกับปริมาณสารมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ (μmole) ดังนี้ (Hardy *et al.*, 1973)

$$\mu mole\ N = (\mu mole\ C_2H_4 \times MWN_2) / c$$

เมื่อ μmole N = จำนวนไมโครโมลไนโตรเจนที่ตรึงได้

μmole C_2H_4 = จำนวนไมโครโมลเอทีลีนที่วัดได้จากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

MWN_2 = มวลโมเลกุลของแก๊สไนโตรเจน (28)

c = ค่าที่ใช้ในการเปลี่ยนจำนวนโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสไปเป็นจำนวนโมลของไนโตรเจนที่ตรึงได้ตามทฤษฎี (3)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลต่างๆในทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตำรับวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (p = 0.05)

ผลการทดลองและวิจารณ์

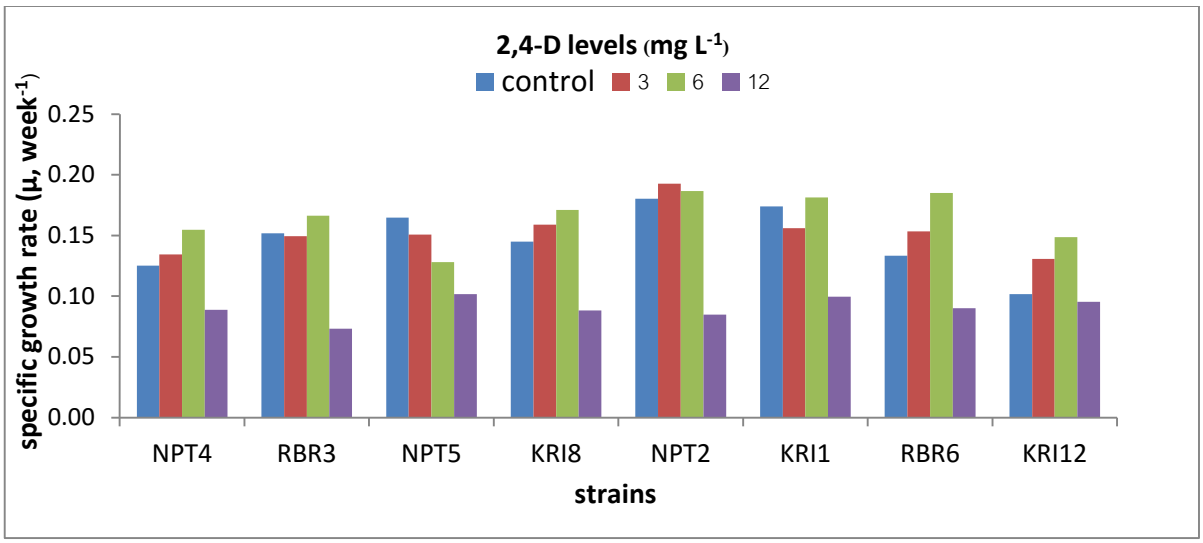
1. การศึกษาผลของ 2,4-D ต่ออัตราการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

ผลของ 2,4-D ต่ออัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของ 2,4-D ต่ออัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียพบว่า 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6 และ 12 mg L^{-1} ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.000) กล่าวคือ 2,4-D ความเข้มข้น 3 และ 6 mg L^{-1} ทำให้อัตราการเจริญของไซยา-โนแบคทีเรียส่วนใหญ่เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 6 mg L^{-1} ทำให้ไซยาโน

แบคทีเรียมีแนวโน้มของอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นสูงกว่า 3 mg L^{-1} (Figure 1) ขณะที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 12 mg L^{-1} ไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีอัตราการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม (ไม่ใส่ 2, 4-D)

ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ต่างๆ กัน (p = 0.000) โดยพบว่าสายพันธุ์ NPT2 มีอัตราการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งในระดับความเข้มข้น 3, 6 mg L^{-1} และตำรับควบคุม ซึ่งมีอัตราการเจริญ 0.193, 0.187 และ 0.180 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2, 4-D ทั้ง 3 ระดับ พบว่า ที่ความเข้มข้น 3 mg L^{-1} ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมีอัตราการเจริญสูงที่สุด ขณะที่สายพันธุ์ RBR6 เมื่อเจริญในตำรับควบคุมมีอัตราการเจริญเพียง 0.133 แต่มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเป็น 0.185 เมื่อเจริญใน 2, 4-D ระดับความเข้มข้น 6 mg L^{-1} ซึ่งพบว่าความเข้มข้นดังกล่าวทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนสายพันธุ์ NPT5 แม้ว่าจะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อเจริญใน 2, 4-D ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 mg L^{-1} แต่ยังคงมีอัตราการเจริญ 0.102 ที่ระดับความเข้มข้น 12 mg L^{-1} ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

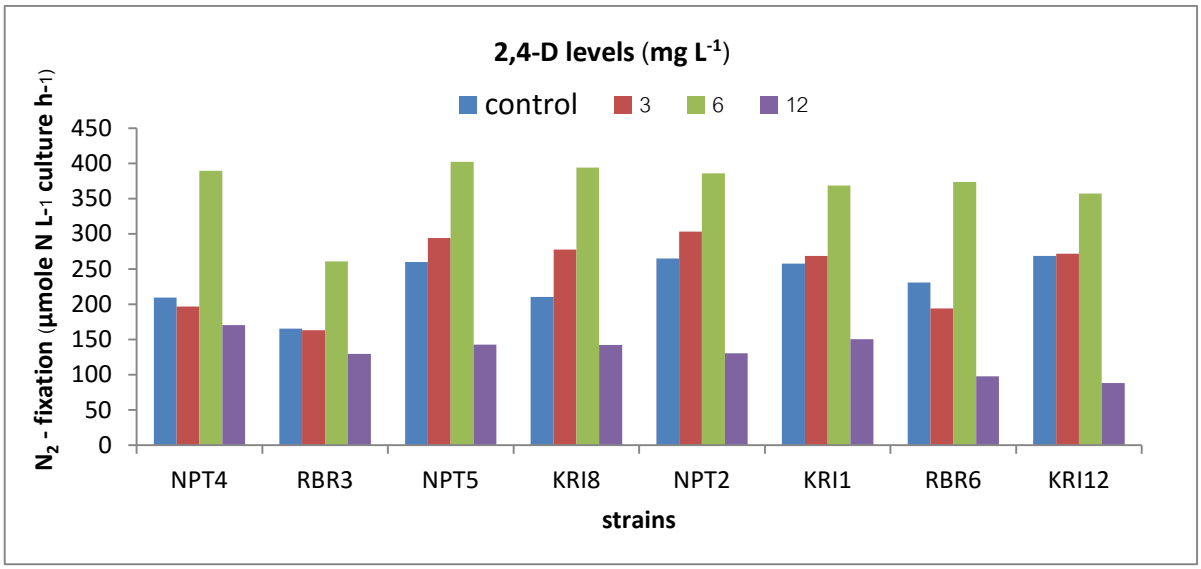


1/ NPT5 = *Anabaena* sp.; RBR3, RBR6, KRI8 = *Nostoc* sp.; NPT4, KRI12 = *Trichormus* sp.; KRI1 = *Calothrix* sp.; NPT2 = *Anabaena siamensis.*

Figure 1 The effect of 2,4-D levels on the cyanobacterial specific growth rates (μ, week^{-1}) in liquid medium.

ผลของ 2,4-D ต่อการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

จากผลการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.000) (Figure 2) โดยไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญใน 2,4-D ระดับความเข้มข้น 3 mg L^{-1} และเพิ่มขึ้นสูงที่ระดับความเข้มข้น 6 mg L^{-1} แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นเป็น 12 mg L^{-1} พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีการตรึงไนโตรเจนลดลงเช่นเดียวกับอัตราการเจริญ (Figure 1)



[1/] NPT5 = *Anabaena* sp.; RBR3, RBR6, KRI8 = *Nostoc* sp.; NPT4, KRI12 = *Trichormus* sp.; KRI1 = *Calothrix* sp.; NPT2 = *Anabaena siamensis.*

Figure 2 The effect of 2,4-D levels on the cyanobacterial N_2 - fixation (µmole N L^{-1} culture h^{-1}) in liquid medium.

เมื่อเปรียบเทียบการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่เจริญใน 2,4-D ความเข้มข้น 6 mg L^{-1} ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ไซยาโนแบคทีเรียมีการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ พบว่า สายพันธุ์ NPT5 และ KRI8 มีการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด โดยมีปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ 402.30 และ 394.23 µmol N L^{-1} hr^{-1} ตามลำดับ รองลงมาคือ สายพันธุ์ NPT4 และ NPT2 (389.46 และ 386.01 µmol N L^{-1} hr^{-1} ตามลำดับ) ส่วน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 12 mg L^{-1} แม้ว่าทุกสายพันธุ์จะมีการตรึงไนโตรเจนลดลง แต่พบว่าสายพันธุ์ NPT4 มีการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ 170.57 µmol N L^{-1} hr^{-1} รองลงมาคือสายพันธุ์ KRI1, NPT5 และ KRI8 (150.68, 142.84 และ 142.51 µmol N L^{-1} hr^{-1} ตามลำดับ) ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ อยู่ในช่วง 88.35-130.62 µmol N L^{-1} hr^{-1}

จากการศึกษาอิทธิพลของ 2,4-D ต่ออัตราการเจริญและตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าสาร 2,4-D ทุกความเข้มข้นส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียไม่แตกต่างกับตำรับควบคุม (Figure 4a) โดยอัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สอดคล้องกับปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้หรือแปรผันตามกัน (Figure 1 and 2) เนื่องจากเมื่อเซลล์ปกติเพิ่มขึ้นจะสามารถส่งคาร์บอนที่ตรึงได้จากการสังเคราะห์แสงให้เฮเทอโรซีสต์ได้มากขึ้น ทำให้เกิดการตรึงไนโตรเจนได้มาก ในทางกลับกันสารประกอบไนโตรเจนที่ตรึงได้จากเฮเทอโรซีสต์ก็สามารถส่งให้เซลล์ปกติเพื่อใช้ในกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ได้ (Lopez-Igual *et al*., 2010) ส่วนที่ความเข้มข้น 6 mg L^{-1} ทำให้อัตราการเจริญและปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้เพิ่มขึ้น (Figure 1 and 2) เป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นของสารต่ำ 2,4-D อาจเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหรือจุลินทรีย์ได้ (plant/microorganisms growth promoting) ซึ่งจะไปกระตุ้นกระบวนการ metabolism ต่างๆ ในกรณีที่คล้ายกันนี้ Senthilkumar (2006) พบว่าการใส่ *Azorhizobium caulinodans* ORS571 และ *Methylobacterium* sp. NPFM-SB3 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 mg L^{-1} กระตุ้นให้เกิดโครงสร้างคล้ายปม (ORS571=4.66

และ NPFM. SB3=4.00 ปม/ต้น) และการตรึงไนโตรเจน (ORS571=34.79 และ NPFM. SB3=23.62 C_2H_4 g^{-1} dry root h^{-1}) หลังหว่านข้าว 7 วัน ส่วน Mishra และ Pandey (1989) รายงานว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำจะช่วยกระตุ้นการสร้าง growth hormone และเฮเทอโรซีสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งช่วงความเข้มข้นนี้อาจเป็นความเข้มข้นที่ไซยาโนแบคทีเรียสามารถย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) โดยแตกสลายพันธะอีเทอร์ด้วยการ hydrolysis จน benzene ring แตกออก เป็น dichloromuconic acid และถูกย่อยสลายต่อจนเป็นสารประกอบที่มีอะตอมคาร์บอน 2-3 อะตอม ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Lee *et al*., 2003) ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น 12 mg L^{-1} ส่งผลให้อัตราการเจริญและปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ลดลง (Figure 1 and 2) เนื่องจากมีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้มีการสังเคราะห์ RNA มากขึ้น และกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย H^+- ATPase ออกมานอกเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) จึงเกิดการเพิ่มสภาพกรดในผนังเซลล์ (cell wall acidification) ทำให้ไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตให้เป็นไปตามปกติได้ (Weller, 1993) ทั้งนี้ช่วงความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เป็นประโยชน์ต่อไซยาโนแบคทีเรียจะแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

2 การศึกษาผลของพาราควอตต่ออัตราการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

ผลของพาราควอตต่ออัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

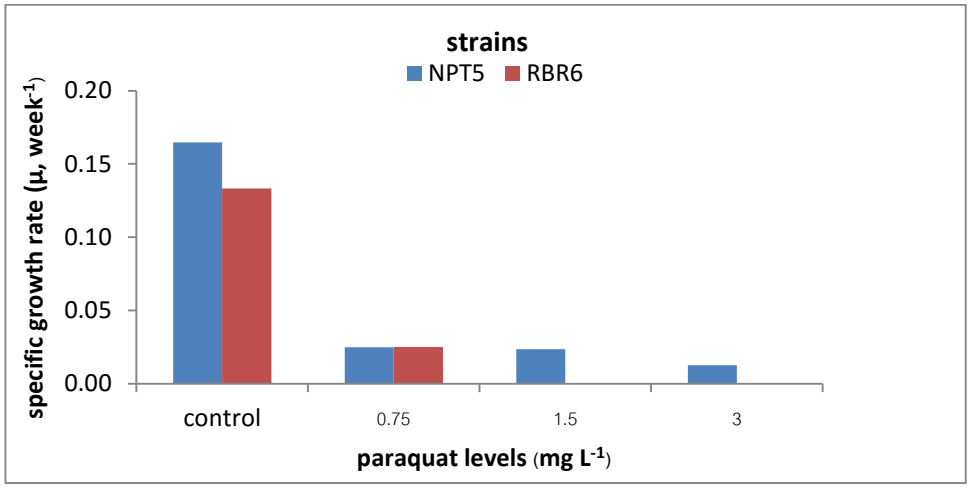
จากการศึกษาผลของพาราควอตต่ออัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าที่ความเข้มข้น 0.75 mg L^{-1} สายพันธุ์ที่สามารถเจริญต่อไปได้คือ NPT5 และ RBR6 (Figure 3) โดยมีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันทางสถิติ (0.025) เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นดังกล่าวพบว่าทำให้ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม (0.165 และ 0.133 ตามลำดับ) โดยสายพันธุ์ NPT5 มีอัตราการเจริญลดลงมากกว่าสายพันธุ์ RBR6 แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.50 mg L^{-1} ขึ้นไปมีเพียง NPT5 ที่สามารถเจริญต่อไปได้อย่างช้าๆ โดยมีอัตราการเจริญ 0.023 ที่ความเข้มข้น 1.50 mg L^{-1} และ 0.013 ที่ความเข้มข้น 3.00 mg L^{-1} ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ RBR6 เจริญได้เฉพาะที่ความเข้มข้นของพาราควอต 0.75 mg L^{-1} ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ไม่พบอัตราการเจริญเติบโต

ผลของพาราควอตต่อการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่ระดับความเข้มข้นของพาราควอต 0.75, 1.50, และ 3.00 mg L^{-1} พบว่าไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีเพียงตำรับควบคุมเท่านั้น (0 mg L^{-1}) ที่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนซึ่งไม่แตกต่างจากตำรับควบคุมของการศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (Figure 2)

จากการศึกษาผลของของพาราควอตที่มีต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโน-แบคทีเรียพบว่ามีเพียง NPT5 และ RBR6 ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างช้าๆ และไม่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน เนื่องจากพาราควอตเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อสภาพรีดอกซ์ (redox active compound) ที่มีสมบัติในการรับอิเล็กตรอนในระบบแสง I (photosystem I) โดยสารพาราควอตจะไปรบกวนการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย และเพิ่มอนุมูลอิสระซึ่งมีพลังงานสูง โดยถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับ O_2 ทำให้เกิดปฏิกิริยา autooxidation (Ashton and Crafts, 1981; Ashton and Monaco, 1991) เกิดเป็น H_2O_2 (hydrogen peroxide),O_2^- (superoxide radical),$^{\cdot}OH$ (hydroxyl radical) และ $^1O_2$ (singlet oxygen) ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิดพิษ หรือมีความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Hance and Holly, 1990) จึงเป็นไปได้ว่าไซยาโนแบคทีเรียเมื่อถูกรบกวนการ

สังเคราะห์แสงจึงขาดแคลนแหล่งคาร์บอนที่จะส่งให้เซลล์เฮเทอโรซีสต์ ทำให้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ซึ่งสอดคล้องกับ Padhy (1985) และ Ahluwalia (1988) ที่รายงานว่า สารเคมีกลุ่มพาราควอต พาราไธออน และไธโอเบนคาร์ป จะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโต การสังเคราะห์ทางชีวเคมีต่างๆ เช่น รงควัตถุ คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน รวมไปถึงการสร้างเฮเทอโรซีสต์และตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของพาราควอตสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่า ตำรับที่สามารถเจริญได้เซลล์ปกติมีลักษณะซีดใส (chlorosis) เมื่อเทียบกับตำรับควบคุม (Figure 1c) โดยสีเขียวที่หายไปจากเซลล์แสดงลักษณะการถูกยับยั้งการสังเคราะห์แสงอย่างชัดเจน ในขณะที่ตำรับที่ไม่สามารถเจริญได้มีลักษณะของเหลวภายในเซลล์กระจายออก เหลือเพียงเฮเทอโรซีสต์ (Figure 1b) ทั้งนี้การเจริญอย่างช้าๆ ของ NPT5 และ RBR6 ที่ความเข้มข้น 3.00 และ 0.75 mg L^{-1} ตามลำดับ สอดคล้องกับ Dragolova *et al*. (2001) ที่พบว่า *Anabaena variabilis* และ *Plectonema boryanum* สามารถเจริญได้ในพาราควอตที่ความเข้มข้นไม่เกิน 5 และ 0.5 mg L^{-1} ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความรุนแรงของพาราควอตนั้นขึ้นอยู่กับชนิด โครงสร้าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวการมีการสร้างโพรลีน (proline) เพิ่มขึ้น โดยมีคุณสมบัติเป็นสารปกป้องสภาพออสโมซิส (osmoprotectant) ซึ่งช่วยในการลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากพาราควอตอีกด้วย



1/ NPT5 = *Anabaena* sp.; RBR6 = *Nostoc* sp.

Figure 3 The effect of paraquat levels on the cyanobacterial specific growth rates (μ, week^{-1}) in liquid medium.

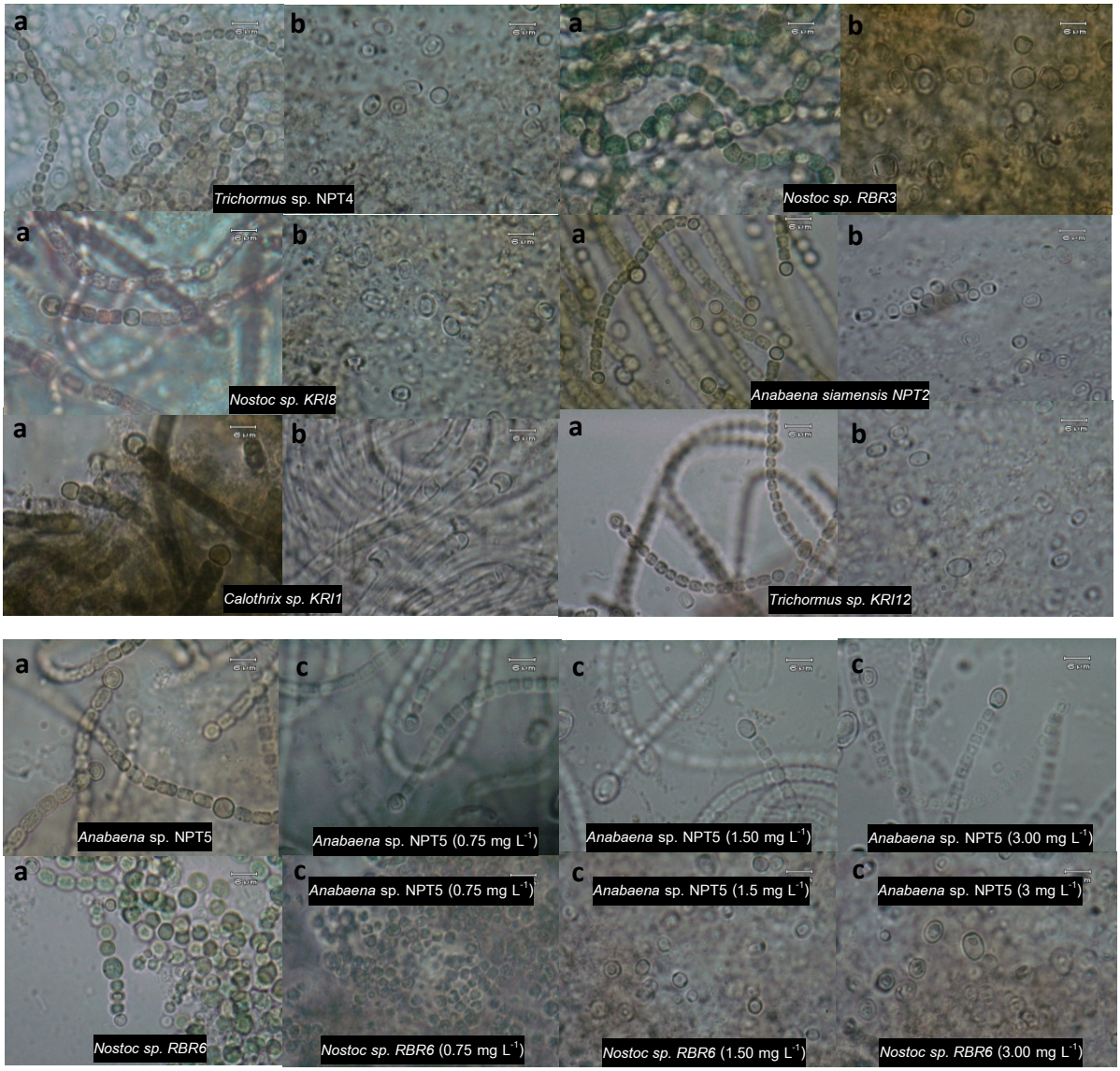


Figure 4 Micrographs of cyanobacteria under a light compound microscope (1 bar = 6 μm).

a : cells and filaments grown under 2,4-D exposure; in significant difference of morphological properties of cyanobacteria in all treatments.

b : cyanobacterial strains unable to survive exposure to 0.75 mg L^{-1} paraquat; vegetative cells were disintegrated.

c : Survived *Anabaena* sp. NPT5 under exposure to 0.75, 1.50 and 3.00 mg L^{-1} paraquat while *Nostoc* sp. RBR6 could survive only 0.75 mg L^{-1}. However in all paraquat treatments there were chlorosis of cells when compared to those in the control group.

สรุปผลการทดลอง

1) สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ความเข้มข้น 3 และ 6 mg L^{-1} ทำให้อัตราการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่เพิ่มขึ้น ขณะที่ระดับ 12 mg L^{-1} ไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมดังกล่าวลดลงเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม (ไม่ใส่ 2, 4-D)

2) สายพันธุ์ NPT2 มีอัตราการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งในระดับความเข้มข้น 3, 6 mg L^{-1} และตำรับควบคุม ส่วนสายพันธุ์ NPT5 และ

KRI8 ที่เจริญใน 2, 4-D ความเข้มข้น 6 mg L^{-1} มีการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด

3) พาราควอตมีความรุนแรงกว่า 2,4-D โดยที่ความเข้มข้นเพียง 0.75 mg L^{-1} ทำให้ไซยาโน-แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้ ยกเว้น NPT5 ที่เจริญได้อย่างช้าๆ ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.75-3.00 mg L^{-1} โดยไม่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย มาลา, สิรินภา ช่วงโอภาส, ชวลิต ฮงประยูร และ วันทนีย์ พึ่งแสง. 2551. ปฏิบัติการจุลินทรีย์ทางดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, จ.นครปฐม.

พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ และ นวรัตน์ เหล่าชวลิตกุล. 2531. อิทธิพลของ Propanil ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 26. (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 61-69.

มาริษา ภิรมย์แทน. 2547. การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). 2554.วิจัยและพัฒนาสาหร่ายอย่างครบวงจร. จดหมายข่าว วว. 14 (2): 6.

Ahluwalia, A.S. 1988. Influence of satum and knockweed on the growth and heterocyst formation in the nitrogen fixing blue green algae. Pest. 22: 43-94.

Andersen R A, J.A. Berges, P.J. Harrison and M.M. Watanabe. 2005. Appendix A-recipes for freshwater and seawater media,pp. 429-538. *In* R.A. Andersen., eds.Algal culturing techniques. Phycological Society of America. MA: Elsevier Academic Press, Burlington.

Ashton, F.M. and A.S. Crafts. 1981. Mode of Action of Herbicides. 2nd (ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Ashton, F.M. and J. Monaco.1991. Weed Science: Principles & Practices. 3nd (ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Aslim, B. and S. Ozturk. 2009. Toxicity of herbicide to cyanobacterial isolated. J. Environ. Biol. 30 (3): 381-384.

Dragolova, D., G. Chaneva, T.S. Gemishev and G. Vassilev. 2001. Physiological change in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Plectonema boryanum* caused by paraquat toxicity. Balgarian Academy of Science. 55 (5): 85-88.

Hance, R.J. and K. Holly. 1990. Weed Control Handbook: Principles. 8th (ed.) . Cambridge: Printed in Great Britain, The University Press.

Hardy, R.W.F., R.C. Burn and R.S. Holsten. 1973. Application of acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47-48.

Irrisari, P., S. Gonnet and J. Monza. 2001. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. J. Biotechnol. 91: 95–103.

Kaur, M., A.S. Ahluwalia and S. Dahuja. 2002. Toxicity of a rice field herbicide

in a nitrogen fixing alga *Cylindrospermum* sp. J. Environ. Biol. 23: 359–63.

Khan, A.H. and R.D. Vaishya. 1995. The sensitivity of blue green algae to paddy herbicides. Weed News 2: 28–30.

Komarek, J., J. Komarkova and H. Kling. 2003. Filamentous cyanobacteria, pp. 117-196.*In* D.W. John and G.S. Robert, ed. Freshwater Algae of North America. Elsevier Science, USA.

Lee, S.E., J.S. Kim, I.R. Kennedy, J. W. Park, G. S. Kwon, S. C. Koh and J. E. Kim. 2003.Biotransformation of an Organochlorine Insecticide, Endosulfan, by *Anabaena* Species. J. Agric. Food Chem. 24: 749-760.

Leganes, F. and E. Fernandez-valientl. 1992. Effect of phenoxy acetic herbicides on growth, photosynthesis and nitrogenase activities in cyanobacteria from rice field. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22: 130–134.

Lopez-Igual, R., E. Flores and A. Herrero. 2010. Inactivation of a heterocyst-specific invertase indicates a principal role of sucrose catabolism in heterocysts of *Anabaena* sp. J. Bacteriol. 192 (20): 5526–5533.

Mishra, A.K. and A.B. Pandey. 1989. Toxicity of three herbicides to some nitrogen-fixing cyanobacteria. Ectoxicol. Environ. *SAF*. 17 (2): 236-246.

Oren, A. 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1895-1902.

Padhy, R.N.1985.Cyanobacteria and pesticides. Res. Rev. 4: 941.

Senthilkumar, M., M. Madhaiyan, S.P. Sundaram and S. Kannaiyan. 2006. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. With plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. CvCO-43). Microbiol. 164: 92-104.

Singh, H.N., H.R. Singh and A. Vaishampayan. 1979. Toxic and mutagenic action of the herbicide Alachlor (Lasso) on various strains of the nitrogen fixing blue green alga *Nostoc muscorum* and characterization of the herbicide induced mutant resistant to methyl amine and L-methionine-DL-Sulfoximine. Environ. Exp. Bot. 19: 5–12.

Singh, S., P. Datta and R. Patel. 2005. Screening and selection of most potent diazotrophic cyanobacterial isolate exhibiting natural tolerance to rice field herbicides for exploitation as biofertilizer. Microbiol. 46 (3): 219- 225.

Singleton, P. and D. Sainbury. 1987. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.

Steinrucken, H.C. and N. Arnheim. 1980. The herbicides glyphosate is a potent inhibitor of 5-Enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 94: 1207–1212.

Vonshak, A. 1991. Microalgae: Laboratory growth techniques and the biotechnology of biomass production, pp. 337-355. *In* D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhar-nordenkampf, R.C. Leegood and S.P. Long, eds. Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and

Laboratory Manual. Chapman and Hall, London.

Weller, C.C. 1993. Herbicide Action No. 1. West Lafayette, IN. Purdue University.

Received 27 April 2015

Accepted 31 August 2015