บทที่ 1

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การตรึงก๊าซไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารที่มีความสำคัญของสิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไนโตรเจน จึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหาร ซึ่งเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ จะได้อาหารประเภทไนโตรเจนจากพืช และไนโตรเจนทั้งหมดสำหรับการเจริญเติบโตของพืชได้มาจากไนโตรเจนในอากาศ ดังนั้นการจัดหาไนโตรเจนที่อยู่ในสภาพที่พืชนำไปใช้ได้เช่น แอมโมเนียม ไนเตรท และยูเรีย จึงเป็นปัญหาสำคัญต่อการบรรเทาความอดอยากของมนุษยชาติ

ถึงแม้ว่าไนโตรเจนจะเป็นธาตุที่มีอยู่มากถึง 80 เปอร์เซนต์ของบรรยากาศ แต่ไนโตรเจนในบรรยากาศนี้อยู่ในสภาพของก๊าซเฉื่อย ซึ่งสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่นำไปใช้ไม่ได้ เราจึงพบความขาดแคลนอาหารประเภทไนโตรเจนอยู่เสมอ

แหล่งที่มาของสารประกอบไนโตรเจนในดินมี 3 แหล่งใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ

1. การตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (biological nitrogen fixation) คือการเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม, ไนเตรท โดยสิ่งมีชีวิตซึ่งมีการดำรงค์ชีวิตอยู่ทั้งแบบอิสระ (free living) เช่น บักเตรีสกุล Clostridium Azotobacter Rhodospiryllum และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-green algae) สกุล Anabaena Nostoc และแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) เช่นบักเตรีสกุล Rhizobium และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวสกุล Anabaena

2. การเกิดฟ้าผ่าหรือแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (U.V.) (spontaneous nitrogen fixation) โดยก๊าซไนโตรเจนในอากาศถูก oxidise ให้เป็น nitrous oxide (N_2O) และ nitric oxide (NO) ซึ่งจะละลายอยู่ในน้ำฝน และตกลงมายังพื้นดิน มีผู้คำนวณว่าในปีหนึ่ง ๆ ไนโตรเจนที่เกิดแบบวิธีนี้มีประมาณ 44×10^6 เมตริกตัน (Burns and Hardy, 1975)

3. ปุ๋ย (fertilizer) ได้แก่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยวิทยาศาสตร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical nitrogen fixation) โดยวิธีของ Harber-Bosch ตั้งแต่ปี 1931 (Marx, 1974) มีวิธีการดังนี้

$$N_2 + 3H_2 \xrightarrow[400^{\circ}C]{200\ atm} 2NH_3$$

ไฮโดรเจนได้จากถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ หรือน้ำมันปิโตรเลียม แต่ในปัจจุบันน้ำมันมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ รวมทั้งเหตุผลทางเศรษฐศาสตร์ และปัญหาทางสิ่งแวดล้อม จึงเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตปุ๋ยโดยวิธีนี้ (Shanmugan and Valentine, 1975) และทำให้ปุ๋ยมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ

ดังนั้นการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต เป็นการเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชโดยวิธีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงควรนำมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด โดยจะเสียค่าใช้จ่ายต่ำสุด

การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต Devlin (1969) รายงานว่าเริ่มต้นในปี 1862 Jodin ได้แสดงให้เห็นว่า ก๊าซไนโตรเจนและออกซิเจนหายไปจากภาชนะที่ปิดที่มีดินซึ่งไม่ได้ฆ่าเชื้อและต้นกำเนิดของคาร์บอนอยู่ และเขาได้รายงานต่อไปว่า ในปี 1885 Berthelot ได้ทดสอบทางเคมีแสดงให้เห็นถึงปริมาณไนโตรเจนที่ถูกตรึงในดินที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ และในปี 1894 Winogladsky สามารถแยกบักเตรีชนิด anaerobic ที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ซึ่งได้แก่ Clostridium pasteurianum และพบว่าเป็นบักเตรีที่สามารถใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นสารต้นกำเนิดที่ให้สารประกอบไนโตรเจนโดยลำพังได้ นอกจากนี้เขายังเสนอว่าผลที่ได้จากการตรึง

ก๊าซไนโตรเจน คือแอมโมเนีย ซึ่งก็เป็นเช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Dalton and Mortenson (1972) Lehninger (1975) และ Peters (1975)

ต่อมาในปี 1901 Beijerinck ได้แยกบักเตรีชนิด aerobic ที่อยู่แบบอิสระ และตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ 2 ชนิด คือ Azotobacter chroococcum และ A. agile ตั้งแต่นั้นมาก็มีผู้พบบักเตรี และสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ อีกมากมายหลายชนิด (Devlin, 1969)

การศึกษาเกี่ยวกับกลไก และวิธีการตรึงก๊าซไนโตรเจน พอสรุปได้ว่าสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้จะต้องมี nitrogen fixing gene (nif-gene) อยู่บนโครโมโซม nif gene จะคัดลอก (transcribe) ให้เอนไซน์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) (Shanmugam and Valentine, 1975) ซึ่ง Dalton and Mortenson (1972) Marx (1974) และ Lehninger(1975) รายงานว่าจากการแยกเอนไซน์นี้จากบักเตรีหลาย ๆ ชนิดแล้วพอจะกล่าวได้ว่า เอนไซน์นี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ

1. Molybdenum protein (Mo-Fe Protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 – 220,000

2. Iron protein (Fe Protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 – 60,000

เอนไซน์ไนโตรจีเนส มีหน้าที่ไปรีดิวซ์ (reduce) โมเลกุลของไนโตรเจนให้เปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียตามสมการที่ Lehninger (1975) เขียนไว้ดังนี้

$$N_2 + 6H^+ + 6\bar{e} + 12ATP + 12H_2O \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_3 + 12ADP + 12P_i$$

การตรึงก๊าซไนโตรเจนนอกจากจะใช้เอนไซน์ไนโตรจีเนสแล้ว ยังต้องการอีเลคตรอน และพลังงานจาก ATP อีกด้วย

วิธีวัดอัตราการตรึงก๊าซไนโตรเจน

1. วัดทางอ้อม โดยดูการเจริญเติบโต ขนาด และรูปร่าง เช่น น้ำหนักแห้ง และวัด O.D. ของสิ่งมีชีวิตที่เลี้ยงใน media ที่ปราศจากสารประกอบไนโตรเจน ในบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน

2. วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ซึ่งมีหลายวิธี เช่นหาปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี Kjeldahl หรือหา N^{15} หรือ N^{13} ที่พบในแอมโมเนีย เมื่อเลี้ยงในบรรยากาศที่มี N_2^{15} หรือ N_2^{13}

3. ตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ที่สามารถรีดิวซ์ substrate ได้หลายชนิดนอกเหนือจากก๊าซไนโตรเจน (Burns and Hardy, 1975) โดยทั่วไปมักจะดูจากปฏิกิริยาอะเซธีลีนรีดักชั่น ($C_2H_2 \xrightarrow{+ H_2} C_2H_4$)

<u>แหนแดง</u>

แหนแดง เป็นเฟิร์นน้ำชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Azollaceae สกุล <u>Azolla</u> ซึ่งมีทั้งหมด 6 ชนิดด้วยกัน (Lumpkin, 1977) ที่พบในไทยมีเพียงชนิดเดียว คือ <u>Azolla pinnata</u> R.Br. (Suvatabanthu, 1950) Moore (1969) รายงานว่า ในปี 1958 Royal พบว่า <u>Azolla pinnata</u> มีจำนวนโครโมโซม 2n = 44 แหนแดงเจริญงอกงามอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ โดยจะลอยอยู่บนผิวน้ำที่นิ่ง และมีแสงแดดส่องถึง พืชชนิดนี้มีการแตกกิ่งแบบ pinnately compound มีใบ (frond) 2 ส่วน คือ ใบบน (upper หรือ dorsal lobe) สังเคราะห์แสงได้ มีสีเขียว และบางทีก็มีสีแดง โดย Moore (1969) รายงานว่าแหนแดงที่ได้รับแสงแดดจัดหรืออยู่ในที่อุณหภูมิต่ำจะมีสีแดง และเมื่ออยู่ในที่ร่มจะมีสีเขียว ผิวบนใบไม่เรียบ จะมี papillae กลมและสั้น ๆ อยู่ทั่วไป อีกส่วนหนึ่งคือใบล่าง (lower หรือ ventral lobe) ใสไม่มีสี หรือมีสีแดงเรื่อ ๆ เมื่อแก่ ลำต้นแหนแดงมีขนาดเล็กบอบบาง มี vascular tissue น้อย แต่มีเซลพวก parenchyma อยู่มาก รากเป็น rhizoid ชนิดไม่แยกสาขาและมีรากขน (root hair) อยู่ตั้งแต่โคนจนถึงปลายราก ที่ปลายรากมีหมวกราก (root cap) ห่อหุ้มอยู่ รากยาวประมาณ 1.5 - 5 เซนติเมตร

เนื่องจากแหนแดงเป็นพันธุ์ไม้ประเภทเฟิร์น ฉะนั้นจึงมีการสร้างสปอร์อยู่ภายในอับสปอร์ (sporocarp) โดย megasporocarp มีขนาดเล็กกว่า microsporocarp และอยู่แยกจากกันใน 1 megasporocarp จะมีเพียง 1 megaspore เท่านั้น โดยทั่วไปในธรรมชาติ แหนแดงจะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้อย่างรวดเร็ว โดยการแตกกอหรือแบ่งตัวออกเป็นหน่อเล็ก ๆ ที่เหมือนต้นเดิม

ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของแหนแดงประกอบด้วย

1. สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

แหนแดงเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วมาก มีสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ได้แก่ Anabaena azollae อาศัยอยู่ที่ช่องว่างในใบบน (upper lobe) แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Moore, 1969) Peters and Mayne (1974) ได้อธิบายว่าการอยู่รวมกันของแหนแดงกับสาหร่ายนี้ คงจะเป็นเช่นเดียวกับบักเตรี (Rhizobium sp.) ที่อยู่ในปมรากถั่ว

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว มีความสำคัญมากในการช่วยเติมสารประกอบไนโตรเจนให้เพียงพอในนาข้าวของประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชีย โดย Moore (1969) ได้รายงานว่า ต้นข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่นาเดียวกันเป็นเวลาหลายปีโดยไม่ต้องปรับปรุงดิน หรือเติมปุ๋ยเลย ทั้งนี้เนื่องจากมีสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ได้แก่ ชนิดต่าง ๆ ในสกุล Anabaena Nostoc และ Oscillatoria ซึ่ง Dalton and Mortenson (1972) กล่าวว่าการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสาหร่ายนี้มีข้อได้เปรียบบักเตรีตรงที่สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงได้ และจะให้พลังงานกับอีเลคตรอนไปรีดิวซ์ไนโตรเจนได้อีกด้วย จึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่น่าให้ความสนใจเป็นพิเศษ

Anabaena มีลักษณะ trichome เป็น filament ค่อนข้างตรงหรือคดงอเล็กน้อย ไม่มีการแยกสาขา มี Sheath ใสหุ้ม trichome แต่ละ cell ของมันมีรูปร่างเหมือนถังเบียร์ มี heterocyst อยู่ทั้งแบบ intercalary และ terminal ซึ่ง heterocyst นี้มีบทบาทต่อการตรึงก๊าซไนโตรเจน โดย A. azollae จะสร้าง heterocyst เมื่ออยู่ภายในใบแหนแดง (Moore, 1969)

Gorkom and Donze (1971) รายงานว่า heterocyst เป็นแหล่งที่มีการตรึงก๊าซไนโตรเจน และเซลที่เป็น non-heterocyst ก็ตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ถ้าเจริญเติบโตอยู่ในที่ ๆ มีออกซิเจนต่ำ และ Wolk (1973) กล่าวว่าการมี heterocyst นี้เป็นการป้องกันไม่ให้มีออกซิเจนมากเกินพอในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว แต่ Ohmori and Hattori (1971) ได้ทำการทดลองโดยใช้ Anabaena cylindrica พบว่า vegetative cell สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ในอัตราเดียวกับ heterocyst และไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการตรึงก๊าซไนโตรเจนกับ heterocyst

งานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (Anabaena azollae) ที่อยู่ในแหนแดง (Azolla sp.) ได้มีผู้ศึกษาค้นคว้ามานาน และได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางสืบเนื่องมาจากปุ๋ยที่ใช้มีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้น ถ้ามีความเข้าใจเกี่ยวกับการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยสาหร่ายที่อยู่ร่วมกับแหนแดงนี้ดีพอ อาจลดปริมาณการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงได้

การนำแหนแดงมาใช้ให้เป็นประโยชน์ เริ่มจากประเทศเวียตนามเหนือก่อนปี 1955 โดยชาวนาได้เลี้ยงแหนแดงไว้ในนาข้าว และพบว่ามันช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวให้สูงขึ้น (Thuyet and Tuan, 1973) จากนั้นมาก็มีการนำไปใช้ในประเทศจีน และประเทศอื่น ๆ ในเขต tropical ได้ให้ความสนใจกันอย่างกว้างขวาง

Moore (1969) รายงานว่า ในปี 1873 Strasberger ได้พิมพ์ภาพแหนแดง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวอยู่ที่ช่องว่างในใบ และให้ชื่อว่า Anabaena azollae เช่นเดียวกันนี้ Peters and Mayne (1974) ได้ถ่ายรูปใบแหนแดง (A. carolinianа) ที่ตัดตามขวาง เพื่อแสดงให้เห็นว่ามีสาหร่าย (A. azollae) อยู่ภายในช่องว่างในใบและบริเวณนี้จะมีสารเมือก (mucellagenous substance) ที่ปล่อยออกมาจาก secretory cell หรือ glandular hair ที่ epidermis ของใบแหนแดง จากนั้นเขาได้แยกแหนแดงให้อยู่เป็นอิสระปราศจากสาหร่ายที่อยู่ในใบ โดยการใช้ antibiotic ชนิดต่าง ๆ ได้สำเร็จ แล้วเลี้ยงแหนแดงที่ได้นี้ไว้ใน media ที่มีสารประกอบไนโตรเจน และเมื่อนำไปทดสอบการรีดิวซ์

อะเซซีลีน ปรากฏว่าแหนแดงดังกล่าวนี้ไม่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับรายงานของ Moore (1969) ที่กล่าวว่าแหนแดงที่ไม่มีสาหร่าย Anabaena อยู่ในใบจะตายเมื่อเลี้ยงไว้ใน media ที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน แต่เมื่อ Peters and Mayne (1974) แยกเอาสาหร่าย A. azollae ออกมาจากช่องว่างในใบของแหนแดงโดยการทำ fractionation และ gradients แล้วทดสอบเช่นกันนี้ ปรากฏว่าสาหร่ายนี้สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย A. azollae เป็นผู้ตรึงก๊าซไนโตรเจน และเขาเสนอแนะว่าน่าจะมีการส่งผ่าน metabolite ระหว่างแหนแดงกับสาหร่ายที่อยู่รวมกัน ต่อมา Newton and Cavins (1976) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแหนแดงที่ไม่มีสาหร่ายอยู่จะต่ำกว่าแหนแดงที่มีสาหร่ายอยู่ในใบ

Peters (1975) ได้ทดลองต่อไปพบว่า การตรึงก๊าซไนโตรเจนของสาหร่ายที่แยกมาจากใบแหนแดงจะต่างกันไปเมื่ออยู่ในสภาพที่ต่างกัน โดยพบว่าอัตราการตรึงก๊าซไนโตรเจนจะสูงสุดเมื่ออยู่ในสภาพ anaerobic (microaerophilic) - light และจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาพ aerobic-light และ aerobic-dark โดยมีอัตราการตรึงก๊าซไนโตรเจนเพียง 60 – 70 % และ 24 – 28 % ของสภาพ anaerobic-light ตามลำดับ และจะไม่มีการตรึงก๊าซไนโตรเจนเลยเมื่ออยู่ในสภาพ anaerobic-dark

Becking (1975) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการตรึงก๊าซไนโตรเจนของสาหร่ายที่แยกออกมาจากใบแหนแดงกับสาหร่ายที่ยังอยู่ในใบของแหนแดง พบว่าในที่มืด แอคติวิตี้ (activity) ในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของสาหร่ายที่แยกมาจากใบแหนแดง (A. pinnata) จะเกิดขึ้นเพียง 12 % ของสาหร่ายที่ยังอยู่ในใบแหนแดง และถ้าอยู่ในที่มีแสงสว่างจะเพิ่มขึ้นมาเป็น 20 % ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Peters and Mayne (1974) ที่ทำการทดลองกับแหนแดง (A. caroliniana) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย (A. azollae) จะตรึงก๊าซไนโตรเจนได้มากที่สุดเมื่ออยู่ภายในช่องว่างในใบของแหนแดง และแสงมีผลต่อการตรึงก๊าซไนโตรเจนด้วย

Becking (1975) เสนอแนะว่าคงมีการแลกเปลี่ยนสารต่าง ๆ (cross-feeding) ระหว่างแหนแดงกับสาหร่ายที่อยู่ในใบ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อดูอีเลคตรอนไมโครกราฟ จะเห็นเซลของแหนแดงที่อยู่บริเวณช่องว่างในใบมียื่นยื่นเข้าไปในช่องว่าง และพบว่า cell เหล่านี้มี organelles อยู่มาก ซึ่งแสดงว่าเซลเหล่านี้มีกิจกรรมในการปล่อยสารและยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านได้ และเนื่องจากผลการทดลองที่ปรากฏว่าสาหร่ายจะตรึงก๊าซไนโตรเจนได้สูงสุดเมื่ออยู่ที่ช่องว่างในใบแหนแดง

จากรายงานของ Peters (1975) กล่าวว่ามีผู้ทดลองเลี้ยงสาหร่ายที่แยกจากใบแหนแดง พบว่าสาหร่าย (A. azollae) นี้จะปล่อยสารประกอบไนโตรเจนออกมา Peters จึงทำการทดลองต่อไปโดยใช้สาหร่ายที่แยกมาจากใบแหนแดง (A. caroliniana) ในสภาพ anaerobic-light พบว่ามี NH_4^+ (N) เกิดขึ้น โดยผลรวมของปริมาณ NH_4^+ (N) ที่ได้จากเซลสาหร่าย และจาก media มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จาก media ที่เอาเซลสาหร่ายออก แสดงว่าแอมโมเนียส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมาสู่ media

ต่อมา Newton and cavins (1976) ได้ทำการทดลองกับแหนแดง (A. caroliniana) เพื่อหากรดอะมิโนที่อยู่เป็นอิสระ (free amino acid) และแอมโมเนียที่ช่องว่างในใบแหนแดง โดยใช้ column chromatography พบว่าแหนแดงที่มีสาหร่ายอยู่ในใบและเจริญอยู่ใน media ที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน จะมีแอมโมเนียอยู่ในระดับที่สูงขึ้น สูงกว่าแหนแดงที่มี และไม่มีสาหร่ายอยู่ในใบที่เจริญอยู่ใน media ที่มีไนเตรทถึง 5 – 10 เท่า และแอมโมเนียที่พบนี้มีปริมาณมากถึงครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนทั้งหมดในช่องว่างในใบ (pool) และเขาได้ตรวจพบ free glutamine และ glutamate ในระดับที่สูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ตามข้อเสนอของ Streicher และผู้ร่วมงาน (1974) ที่ว่า glutamine synthethase เป็นตัวควบคุมธาตุต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรึงก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้เขายังพบ Serine และ Cystathionine เป็นกรดอะมิโนที่อยู่อย่างอิสระในใบแหนแดงอีกด้วย

มีการศึกษาถึงผลของ DCMU ที่มีต่อกิจกรรมการตรึงก๊าซไนโตรเจน เพื่อยืนยันการเกิด cross-feeding ระหว่างแหนแดงกับสาหร่ายที่อยู่ในใบ DCMU คือ 3 (3', 4' - dichlorophenyl - 1, 1 - dimethyl urea) ซึ่งโดยปกติจะมีผลในการยับยั้งการเกิดออกซิเจน (O_2 evolution) เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.1 uM (Goodwin and Mercer, 1972 และ Newton and Cavins, 1976) Peters and Mayne (1974) ได้ศึกษาผลของ DCMU 12 uM ที่มีต่อการรีดิวซ์อะเซธีลีน โดยใช้แหนแดง (A. caroliniana) ที่มีสาหร่ายอยู่ที่ช่องว่างในใบภายใต้สภาพ microaerophilic ปรากฏว่า DCMU มีผลทำให้อัตราการรีดิวซ์อะเซธีลีนลดต่ำลง และจะลดต่ำลงมากยิ่งขึ้นเมื่อให้แหนแดงอยู่ในที่มืดก่อนนำมาทดลอง ซึ่งเขาทั้งสองรายงานว่าได้ผลเช่นเดียวกับ Cox and Fay (1969), Bothe and Loos (1972) และ Lex and Stewart (1973) ที่รายงานผลการทดลองโดยใช้สาหร่าย Anabaena cylindrica นอกจากนี้ยังเหมือนกับที่ Becking (1975) ได้ทำการทดลองโดยให้ 10^{-4}M DCMU กับแหนแดง (A. pinnata) พบว่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลงเหลือ 85 - 90 % ของที่ไม่มี DCMU แสดงว่า DCMU มีผลต่อการตรึงก๊าซไนโตรเจน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าผลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงซึ่งได้แก่สารประกอบคาร์บอน (C-skeleton) และ ATP จะเป็นแหล่งสำคัญสำหรับแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ฉะนั้นสาหร่ายที่อยู่รวมกับแหนแดงก็จะมีแหล่งสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น ทำให้ช่วงเวลาที่ DCMU ใช้ในการยับยั้งแอคติวิตี้ของไนโตรจีเนสนานยิ่งขึ้น ซึ่ง Peters กล่าวว่าน่าจะมี cross-feeding ของสารประกอบคาร์บอนที่เก็บไว้ในแหนแดงไปสู่สาหร่าย

Peters (1975) ได้ทำการทดลองต่อไปโดยวัดอัตราการรีดิวซ์อะเซธีลีนในสภาพ anaerobic-light ภายหลังจากให้ DCMU และใช้สาหร่ายที่แตกต่างกัน 4 แบบคือ 1. สาหร่ายที่แยกจากแหนแดง (A. caroliniana) โดยแหนแดงอยู่ในที่มีแสงก่อนทดลอง 2. สาหร่ายที่แยกจากแหนแดงโดยแหนแดงอยู่ในที่มืดก่อนทดลอง 3. สาหร่ายที่อยู่รวมกับแหนแดงโดยแหนแดงอยู่ในที่มีแสงก่อนทดลอง และ 4. สาหร่ายที่อยู่รวมกับแหนแดงโดย แหนแดงอยู่ในที่มืดก่อนทดลอง ผลปรากฏว่า อัตราการตรึง

ก๊าซไนโตรเจน โดยวิธีอะเซธีลีนรีดักชั่น ของสาหร่ายที่แยกจากแหนแดง และสาหร่ายที่อยู่รวมกับแหนแดง โดยแหนแดงอยู่ในที่มีแสงก่อนทดลองสูงกว่าแหนแดงที่อยู่ในที่มืดก่อนทดลอง แสดงว่าน่าจะมีสารที่เป็น reductant และ/หรือ ATP ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงมาใช้ในแอคติวิตี้ของไนโตรจีเนส และยังพบว่าอัตราการตรึงก๊าซไนโตรเจน ของสาหร่ายที่อยู่รวมกับแหนแดงที่อยู่ในที่มีแสงก่อนทดลองสูงกว่า สาหร่ายที่แยกจากแหนแดงที่อยู่ในที่มีแสงก่อนทดลอง แสดงให้เห็นว่าควรมี cross-feeding ของสารประกอบคาร์บอน และ ATP จากแหนแดงไปยังสาหร่าย ซึ่งก็เป็นในทำนองเดียวกันกับที่ Marx (1974) ได้รายงานว่าในปี 1972 Hardy and Havelka ได้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณการตรึงก๊าซไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วที่เจริญเติบโตในไร่จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์แสงเป็นแหล่งของพลังงานที่ต้องการสำหรับการตรึงก๊าซไนโตรเจนซึ่งได้แก่ ATP และ reducing power ที่จะเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย และยังได้สารประกอบคาร์บอนที่จะรวมกับแอมโมเนียเพื่อสร้างเป็นกรดอะมิโนอีกด้วย

2. <u>สารประกอบไนโตรเจน</u> (Combined nitrogen sources)

Peters and Mayne (1974) ได้ทำการทดลองเลี้ยงแหนแดง (<u>A. caroliniana</u>) ใน media ที่มีไนเตรท ยูเรีย หรือแอมโมเนียม ประมาณ 35 วัน แล้วย้ายสู่ media ใหม่เพื่อทดสอบการรีดิวซ์อะเซธีลีนต่อไป พบว่า ไนเตรทและยูเรียมีผลทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์อะเซธีลีน ลดลงเหลือ 70 % ของที่เลี้ยงไว้ใน media ที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน ส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ นอกจากจะยับยั้งการรีดิวซ์อะเซธีลีนแล้ว มันยังไม่ช่วยในการเจริญเติบโตของแหนแดงอีกด้วย และเมื่อเลี้ยงแหนแดงนี้ไว้ใน media ที่มีไนเตรท และยูเรียเป็นเวลานานถึง 6 - 7 เดือน ปรากฏว่าอัตราการรีดิวซ์อะเซธีลีนยิ่งลดต่ำลงมาก ซึ่งผลของสารประกอบไนโตรเจนนี้อาจจะยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส หรืออาจจะลดปริมาณสาหร่าย (<u>A. azollae</u>) ลงก็เป็นได้

3. ออกซิเจน (O_2)

Peters and Mayne (1974) ได้ทำการทดลองโดยเก็บ (incubate) แหนแดง (A. caroliniana) ไว้ในที่มีแสง ในสภาพที่มี O_2 20 % โดยปริมาตร ปรากฏว่าอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีน จะต่ำกว่าในสภาพ microaerophilic 30 – 40 % แสดงว่าออกซิเจนมีผลทำให้อัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนลดต่ำลง และเมื่อเติม DCMU 12 µM ลงใน media แล้วเก็บแหนแดงไว้ในที่มีแสง พบว่าการรีดิวซ์อะเซทีลีนในสภาพที่เป็น aerobic จะถูกยับยั้งได้รวดเร็วกว่าเมื่ออยู่ในสภาพ anaerobic และเมื่อให้แหนแดงได้รับแสงติดต่อกัน 12 ชั่วโมงก่อนนำไปวัดอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนในสภาพ aerobic-dark พบว่าจะเกิดขึ้นเพียง 10 – 30 % ของอัตราในสภาพ aerobic-light แต่เมื่อให้แหนแดงอยู่ในที่มืด 12 ชั่วโมงก่อนนำมาไว้ในสภาพ aerobic-dark พบว่าอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะลดลงอย่างมาก ภายในเวลา 2 ชั่วโมง เขาจึงเสนอแนะว่าการรีดิวซ์อะเซทีลีนในที่มืดขึ้นกับปริมาณออกซิเจนและปริมาณสารประกอบคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์แสง และเก็บไว้ภายในแหนแดง

4. ความเข้มข้นของสารอาหาร

Lumpkin (1977) . รายงานว่าในปี 1974 Haller ได้แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของแหนแดงที่ pH 7 จะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ (salinity) เพิ่มขึ้นและความเข้มข้นที่เหมาะสมของธาตุอาหารจะอยู่ในช่วง 90 – 150 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วน Moore (1969) รายงานว่าถ้าความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น Knop solution มีความเข้มข้นของธาตุอาหาร 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร จะทำให้แหนแดง (A. filiculoides) ตายภายใน 3 สัปดาห์ แสดงว่าความเข้มข้นของสารอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนแดง

5. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

pH ของ media มีผลต่อการละลายของเกลือแร่และการดูดเกลือแร่ของพืช ซึ่งมีผลทำให้พืชเจริญเติบโตได้ไม่เท่ากัน แต่พืชส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วง

pH 4 – 8 (Meyer and Anderson, 1952) ส่วน pH ของ media ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแหนแดงนั้น Thuyet and Tuan (1973) กล่าวว่าใน media ที่เลี้ยงแหนแดงควรมี pH อยู่ในช่วง 5 – 8 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดที่เหมาะต่อการละลายของฟอสฟอรัสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนแดง ส่วนในสภาพธรรมชาติ pH ของน้ำมักจะเป็นด่าง เนื่องจากมีสาหร่ายและผลจากการสังเคราะห์แสงของพืชที่อยู่ในแหล่งน้ำนั้น ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับที่ทางกรมวิชาการเกษตรได้สำรวจแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีแหนแดงอยู่พบว่าจะมี pH ประมาณ 7.1 – 7.8 (บรรหาร, 2520) Moore (1969) รายงานว่าแหนแดง (A. pinnata) เจริญได้ดีในที่มี pH 4 – 6.5 และ Espinas and Watanabe (1976) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแหนแดงคือ 5.5 และในปี 1977 Lumpkin ได้รายงานว่าแหนแดงมีชีวิตอยู่ได้ในช่วง pH 3.5 – 10 แต่จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อ pH อยู่ระหว่าง 4.5 – 6 ซึ่งเขากล่าวว่า pH มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มแสง คือถ้าความเข้มแสงสูง (60,000 ลักซ์) จะต้องมี pH สูง (9 – 10) และถ้าความเข้มแสงต่ำ (15,000 ลักซ์) จะต้องมี pH ต่ำ (5 – 6) ในสภาพดังกล่าวนี้แหนแดงจึงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

6. แสง (Light)

Newton (1976) กล่าวว่าแสงมีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในทำนองเดียวกัน Becking (1975) พบว่าในที่มีแสงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะสูงกว่าในที่มืดประมาณ 3 – 5 เท่า และ Peters and Mayne (1974) ได้ทำการทดลองโดยใช้แหนแดง (A. caroliniana) พบว่าในที่มืดอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีน จะเกิดขึ้นเพียง 10 – 30 % ของที่มีแสง และเขายังได้ทดลองต่อไปอีกพบว่าในสภาพ aerobic หรือ microaerophilic นั้น การตรึงก๊าซไนโตรเจนจะขึ้นกับความเข้มแสง โดยแหนแดงจะตรึงก๊าซไนโตรเจนได้สูงสุดเมื่อมีความเข้มแสง 450 ft.-candle

ในปี 1977 Lumpkin รายงานว่า ในธรรมชาติแหนแดงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในที่มีความเข้มแสง 3,500 - 120,000 ลักซ์ และปริมาณไนโตรเจนจะสูงสุดเมื่อได้รับความเข้มแสง 20,000 - 40,000 ลักซ์ แต่ในห้องทดลองเขาพบว่า ความเข้มแสง 450 ft.-candle เหมาะสมต่อการตรึงก๊าซไนโตรเจนเช่นเดียวกับที่ Peters and Mayne ได้รายงานไว้

7. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยพืชแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่าง ๆ กันไป สำหรับแหนแดง Thuyet and Tuan (1973) รายงานว่า แหนแดงไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 20 - 28 องศาเซลเซียส แต่ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในขณะที่มีอุณหภูมิระหว่าง 15 - 38 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 43 องศาเซลเซียส แหนแดงจะตาย

ในปี 1977 Lumpkin ได้กล่าวว่าแหนแดงมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิ 5 - 40 องศาเซลเซียส แต่ที่เหมาะสมคือ 20 - 30 องศาเซลเซียส ถ้าต่ำหรือสูงกว่านี้ การตรึงก๊าซไนโตรเจน และการเจริญเติบโตของแหนแดงจะลดต่ำลง โดยถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส จะไม่มีการตรึงก๊าซไนโตรเจน ฉะนั้นจึงต้องการปุ๋ยไนโตรเจนในการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมินี้ นอกจากนี้ Lumpkin ยังรายงานต่อไปว่า ความสัมพันธ์ผกผัน ระหว่าง pH กับอุณหภูมิมีผลต่อการรีดิวซ์ไนเตรท และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง โดยเขาพบว่าการรีดิวซ์ไนเตรทจะสูงสุดเมื่อ pH 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่การตรึงก๊าซไนโตรเจนสูงสุดเมื่อ pH 6 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วน Espinas and Watanabe (1976) รายงานว่าแหนแดงเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 18 - 26 องศาเซลเซียส

8. ธาตุต่าง ๆ

โมลิบดีนั่ม (Mo) เป็นธาตุรอง (micronutrient) ที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืช ส่วนโคบอลท์ (Co) พืชหลายชนิดต้องการในการเจริญเติบโต แต่ยังไม่จัดเป็นธาตุรอง

Salisbury and Ross (1969) กล่าวว่าขบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนต้องการสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เหมือนกับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ยกเว้นธาตุบางอย่าง ได้แก่ Mo Fe และ Ca ที่ต้องการใช้ในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ในปริมาณที่สูงกว่าการเจริญเติบโตตามปกติของพืช ในทำนองเดียวกัน Dalton and Mortenson (1972) กล่าวว่าสิ่งมีชีวิตที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ต้องการ Mo Fe และ Ca เพิ่มมากขึ้นในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ Espinas and Watanabe (1976) รายงานว่า P Ca และ Fe เป็นธาตุที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง และ Lumpkin (1977) กล่าวว่า P เป็นธาตุที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงขยายแหนแดง

สำหรับ Mo และ Co เป็นธาตุที่ต้องการใช้ในการตรึงก๊าซไนโตรเจน โดย Co เป็นส่วนสำคัญของวิตามิน B_{12} และวิตามิน B_{12} นี้ใช้ในการสร้าง Leghemoglobin ที่พบในปมรากถั่ว ซึ่ง Leghemoglobin นี้เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการตรึงก๊าซไนโตรเจน (Salisbury and Ross, 1969) และเนื่องจาก Co ไม่จำเป็นสำหรับพืชตระกูลถั่วที่มีไนเตรท และแอมโมเนียมเป็นปุ๋ย แสดงว่า Co เป็นธาตุที่จำเป็นในการตรึงก๊าซไนโตรเจน เช่นเดียวกับที่ Johnson และผู้ร่วมงาน (1966) พบว่า Co จำเป็นในการอยู่ร่วมกันของแหนแดง (A. filiculoides) กับสาหร่าย (A. azollae) ในขณะที่มีการตรึงก๊าซไนโตรเจน และไม่มีสารประกอบไนโตรเจนอยู่ โดยพบว่าเมื่อเติม Co 0.1 ไมโครกรัม/ลิตร ลงไป มีผลทำให้ผลผลิตปริมาณคลอโรฟิลล์ และการตรึงก๊าซไนโตรเจนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเซลของสาหร่าย (A. azollae) ในใบแหนแดงจะลดลงเมื่อไม่มี Co และเสนอแนะว่าความต้องการ Co จะเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย (A. azollae)

ส่วน Mo นั้น Eady and Postgate (1974) กล่าวว่าเป็นส่วนประกอบของ Mo-Fe Protein ที่เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เช่นเดียวกับที่ Salisbury and Ross (1969) ได้รายงานไว้ นอกจากนี้ Mo อาจเป็น co-enzyme หรือเป็นตัวนำอีเลคตรอนจาก donor มายังไนโตรเจนก็ได้ จาก Moore (1969) รายงานว่าในปี 1940 Bortel ได้แสดงให้เห็นว่าถ้าให้ Mo ≤ 0.1 ppm. จะทำให้ไนโตรเจนทั้งหมดของแหนแดง (A. pinnata) เพิ่มขึ้น และในบางการทดลองพบว่าใช้ Vanadium และ Wolfram แทน Mo ได้ และเขาได้รายงานต่อไปอีกว่าในปี 1963 Le Van and Sobachkin ทดลองเติม Mo ให้กับแหนแดง (A. pinnata) ในไร่ พบว่าจะทำให้ปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่เพิ่มน้ำหนักแห้ง ฉะนั้นในพืชที่มีการตรึงก๊าซไนโตรเจนจะต้องการ Mo ในการตรึงก๊าซไนโตรเจนด้วย (Davies, 1956)

เนื่องจากแหนแดงมีสาหร่าย (A. azollae) อาศัยอยู่ที่ช่องว่างในใบและเป็นผู้ตรึงก๊าซไนโตรเจน เราจึงสนใจถึงปริมาณโปรตีน และเปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการตรึงก๊าซไนโตรเจน

Thuyet and Tuan (1973) รายงานว่าแหนแดงมีไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 3 - 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณโปรตีน 13 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วน Lumpkin (1977) ก็ได้รายงานว่าแหนแดงมีไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 3.5 - 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งและมีปริมาณโปรตีน 13 - 20 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง

สำหรับการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยแหนแดงในประเทศไทยได้เริ่มมีการศึกษาโดย สุทธพรรณ (2509) ได้ทดลองเลี้ยงแหนแดง (A. pinnata R. Br.)ในสารอาหารสูตร Hoagland ปรากฏว่าแหนแดงเจริญเติบโตได้ดีในขณะที่มีและไม่มีสารประกอบไนโตรเจน และมี pH 4.5 - 5 น้ำหนักแห้งและปริมาณไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง Mo และ Co ช่วยในการเจริญเติบโต

000386

ของแหนแดง โดยถ้าไม่มี Mo แหนแดงจะเจริญเติบโตได้เพียงระยะหนึ่งก็จะตายไป และ Co 10 ไมโครกรัม/ลิตรทำให้แหนแดงเจริญเติบโตได้สูงสุด แต่ถ้าความเข้มข้นของ Co สูงถึง 10 มิลลิกรัม/ลิตร จะหยุดชะงักการเจริญเติบโตของแหนแดงและทำให้แหนแดงตายไป ต่อมา บรรหารและวิศิษฐ์ (2520) รายงานว่าแหนแดงที่สำรวจพบในไทยมีชนิดเดียวคือ A. pinnata และเขาได้ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำที่แหนแดงขึ้นอยู่ในธรรมชาติพบว่ามี pH 7.1 - 7.8 ค่าความนำไฟฟ้า 173 - 2,970 ไมโครโมล/ซ.ม. ที่ 25 องศาเซลเซียส และเก็บแหนแดงจากแหล่งน้ำต่าง ๆ มาตรวจสอบพบว่ามีน้ำหนักแห้ง 3.5 - 6.2 % ปริมาณน้ำ 93.8 - 96.5 % และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 2.06 - 5.05 % ของน้ำหนักแห้ง และในปีเดียวกันนี้ประยูรและผู้ร่วมงาน (2520) ได้ทำการทดลองพบว่าปุ๋ยฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเลี้ยงขยายแหนแดง การเลี้ยงขยายแหนแดงในนาแล้วไถกลบทำเป็นปุ๋ยพืชสดแก่ข้าว ก.ข. 1 ปรากฏว่าผลผลิตข้าวเปลือกสูงกว่าการใส่ปุ๋ยเคมีในอัตรา 6 ก.ก. ไนโตรเจน/ไร่ และพบว่าการเลี้ยงแหนแดงในนาแล้วไถกลบทำเป็นปุ๋ยพืชสดแก่ข้าวดีกว่าไม่ไถกลบ และได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีใส่ปุ๋ยฟอสเฟตให้กับแหนแดงพบว่าการใส่ทั้งหมดครั้งเดียวและแบ่งใส่หลาย ๆ ครั้งแล้วไถกลบแหนแดง ไม่ทำให้ผลผลิตข้าวเปลือกแตกต่างกัน ต่อมา ประยูรและคณะ (2522) ได้ทำการทดลองพบว่าการเลี้ยงขยายแหนแดงพร้อมกับการปักดำข้าวและปล่อยให้แหนแดงสลายตัวเป็นปุ๋ยพืชสดแก่ต้นข้าวโดยไม่ต้องมีการไถกลบ มีผลทำให้ผลผลิตข้าวเปลือกดีกว่าวิธีเลี้ยงขยายแหนแดงก่อนปักดำข้าวแล้วไถกลบเป็นปุ๋ยพืชสดแก่ต้นข้าวในระยะปักดำและดีกว่าการปลูกข้าวโดยใช้ปุ๋ยเคมี 6 ก.ก. ไนโตรเจน/ไร่ ที่สถานีทดลองข้าวอุบลราชธานี ส่วนที่สถานีทดลองข้าวสุพรรณบุรี และคลองหลวง ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองของนักวิทยาศาสตร์เหาที่กล่าวมาแล้ว พอจะสรุปได้ว่าสาหร่าย (A. azollae) ที่อาศัยอยู่ภายในช่องว่างในใบของแหนแดงเป็นผู้ตรึงก๊าซไนโตรเจน และจะเห็นว่าสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของธาตุอาหาร สภาพความเป็นกรด-ด่างของ media แสง และอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนแดง นอกจากนี้แหนแดงยังต้องการโคบอลท์ และโมลิบดีนัม ในการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนอีกด้วย

วิทยานิพนธ์นี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง (A. pinnata R.Br.) ชนิดที่มีสาหร่าย (A. azollae) อยู่ที่ช่องว่างในใบ ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ความเข้มข้นของธาตุอาหาร สภาพความเป็นกรด-ด่างของ media แสง อุณหภูมิ และประมาณธาตุโคบอลท์ และโมลิบดินัมที่ต้องการ โดยเลี้ยงแหนแดงในสารอาหารอนินทรีย์ที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจน เพื่อได้ทราบความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะทำให้ทราบถึงสภาพที่เหมาะสมที่จะทำให้แหนแดงมีการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนได้สูงซึ่งจะเป็นแนวทางในการใช้การตรึงก๊าซไนโตรเจนที่มีอยู่ในธรรมชาติให้เป็นประโยชน์ยิ่งขึ้น และอาจช่วยลดปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ในนาข้าว