บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ก๊าซที่ใช้

อะเซทีลีน	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
อากาศ	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ไฮโดรเจน	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ไนโตรเจน	ของ	โรงงานไทยอินดัสเตรียลแก๊ส
เอทีลีน	ของ	Scott Environment Technology, inc. USA

1.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 ของ Bosch & Lombและ Spectrophotometer Model 25 ของ Beckman

เครื่องเซนตริฟิวจ์ ของ Gallenkamp และ Superspeed 50 ของ MSE

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี่ Pye Unicam Series 104

เครื่องโฮโมจีไนซ์ Waring blendor ของ MSE

กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus Model ECE

1.3 เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น Analar grade

1.4 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

อาหารทุกชนิดที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้เป็นของบริษัท Difco

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 การเตรียมสารละลายไบยูเรท

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัมและโซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตท 6 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติม 10 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์(น้ำหนักต่อปริมาตร)ที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป 300 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมไอโอไดด์ 1 กรัมและน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายกรดบอริค – อินดิเคเตอร์ (Bremmer และ Edwards 1965)

ละลายกรดบอริค 40 กรัมในน้ำร้อน 1,400 มิลลิลิตรเทใส่ในขวดปริมาตรขนาด 2 ลิตร เติม 400 มิลลิลิตรของ 95 เปอร์เซนต์เอธานอล และ 40 มิลลิลิตรของอินดิเคเตอร์ผสม (ประกอบด้วย โบรโมครีซอลกรีน 0.66 กรัม และเมธิลเร็ด 0.33 กรัมใน 95 เปอร์เซนต์เอธานอล 1 ลิตร)ผสมให้เข้ากัน จากนั้นค่อย ๆ เติม 0.05 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปจนกระทั่งได้สารละลายซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นสีเขียวอ่อน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

2.3.1 Yeast Manitol Medium (Vincent 1970)

ประกอบด้วยไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม แมนิทอล 10 กรัม yeast extract 0.4 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2 Yeast Manitol Congo Red Medium (Vincent 1970)

เตรียมเช่นเดียวกับ yeast manitol medium และใส่สี congo red (1 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร)ลงไป 10 มิลลิลิตรด้วย เป็นอาหารสำหรับไรโซเบียมกล่าวคือ เชื้อไรโซ-เบียมจะดูดสีชมพูได้เล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จะดูดสีชมพูจัด ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเข้มกว่า

2.3.3 Peptone Glucose

ประกอบด้วย Bacto peptone 10 กรัม กลูโคส 2 กรัม Bacto agar15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.3.4 Defined Medium (Fergal และ Shanmugam 1976)

ประกอบด้วยแมนิทอล 1 กรัม กรดกลูตามิค 1 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.3 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม แคล-เซียมคลอไรด์ 0.05 กรัม และธาตุอื่น ๆ อีกเล็กน้อยได้แก่ กรดบอริค 10 มิลลิกรัม ซิงค์ซัลเฟต 10 มิลลิกรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิกรัม แมงกานีสคลอไรด์ 0.5 มิลลิกรัม โซเดียมโมลิบเดท 0.1 มิลลิกรัม เฟอร์ริคคลอไรด์ 1 มิลลิกรัม และไบโอติน 0.2 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8

2.3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน(William และStrobel1976)

ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.18 ไดโปตัส-เซียมฟอสเฟต 0.1 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัม และแร่ธาตุอื่น ๆ อีกเล็กน้อย ได้แก่ กรดบอริค 2.8 มิลลิกรัม แมงกานีสคลอไรด์ 1.8 มิลลิกรัม ซิงค์ซัลเฟต 0.2 มิลลิกรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.07 มิลลิกรัม โซเดียมโมลิบเดท 0.1 มิลลิกรัม เฟอร์ริคคลอไรด์ 100 มิลลิกรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3. การปลูกและการเก็บพืชตัวอย่าง

พืชตัวอย่างที่เลือกมาทดลองก็คือ ถั่วซีราโตร (Macroptilium atropurpureum) และหญ้าโรด (Chloris gayana) ปลูกพืชทั้งสองชนิดนี้ลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร ที่เรือนต้นไม้ ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยมีรายละเอียดการปลูกดังต่อไปนี้

การเตรียมดิน

ผสมดิน (จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม) กับทรายที่ร่อนแล้วในอัตราส่วน 1 : 1 บรรจุดินผสมทรายนี้ 5 กิโลกรัม ลงในถุงพลาสติกที่มีขนาดพอเหมาะใส่ในกระถางทดลองได้พอดี โรยปุ๋ยโซเดียมโมลิบเดท ซุปเปอร์ฟอสเฟต โปตัสเซียมคลอไรด์ 2.2, 49.1 และ 613.8 มิลลิกรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

การเพาะพืชตัวอย่าง

ถั่วซีราโตร เพาะเมล็ดถั่วซีราโตรที่ขัดผิวเล็กน้อยลงในกระถาง โดยการขุดหลุมตื้น ๆ ฝังเมล็ด

หญ้าโรด เพาะเมล็ดหญ้าโรดโดยโรยเมล็ดลงบนหน้าดิน

ถั่วซีราโตรผสมหญ้าโรด ขุดหลุมฝังเมล็ดถั่วแล้วโรยเมล็ดหญ้าลงบนหน้าดินในกระถางเดียวกัน

การบำรุงรักษาพืชตัวอย่าง

รดน้ำทุกวัน วันละ ๓๐๐ มิลลิลิตรต่อกระถาง เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นที่แข็งแรงจึงถอนต้นที่ไม่ต้องการออกรวมทั้งวัชพืชอื่น ๆ ด้วย เก็บพืชที่ถอนออกนี้ไว้ในกระถางนั้น สำหรับถั่วซีราโตรเมื่อมีขนาดโตพอสมควร ปักไม้ในกระถางให้ยอดเลื้อย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ลักษณะการปลูกพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ถั่วซีราโตร จำนวน 2 ต้นต่อ 1 กระถาง
หญ้าโรด จำนวน 3 ต้นต่อ 1 กระถาง
ถั่วซีราโตรผสมกับหญ้าโรด ปลูกถั่วซีราโตร 2 ต้น และหญ้าโรด 3 ต้นใน 1 กระถาง

การเก็บตัวอย่าง

ทั้งถั่วซีราโตรและหญ้าโรดจะถูกเก็บโดยกรรมวิธีเดียวกัน คือตัดส่วนยอดเหนือจากพื้นดินประมาณ 1 เซนติเมตร แยกไว้ใช้หาปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนทั้งหมด ส่วนรากนำไปชะดินออกให้หมด ซับให้แห้ง เพื่อนำไปหาอัตราการตรึงไนโตรเจนส่วนดิน เก็บตัวอย่างมาเพื่อไว้หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยเก็บสุ่มบริเวณผิวหน้าดินลึกไม่เกิน 3 เซนติเมตร

4. การหาปริมาณโปรตีน

ในการวิจัยนี้ใช้วิธีหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรทและลอรี่ สำหรับวิธีไบยูเรทใช้ในการหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากใบ เพื่อหาเป็นปริมาณโปรตีนที่แท้จริง ส่วนวิธีลอรี่ใช้หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกรณีที่ต้องการใช้คำนวณหาแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์

การสกัดโปรตีนจากใบพืช

ใช้ใบทั้งหมดของถั่วซีราโตรหรือหญ้าโรดประมาณ 1 – 2 กรัม นำไปบดในครก โดยมีน้ำผสมปริมาตรเป็นสองเท่าของน้ำหนักใบ กรองกากออกด้วยผ้ากอส ทำซ้ำอีกครั้งรวมน้ำใสเข้าด้วยกัน นำไปปั่นแยกเอาเศษใบออกที่ 3,000 รอบต่อนาที 10 นาที ตกตะกอนจากส่วนน้ำใสด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติค โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 เปอร์เซนต์ ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที 3 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติค 5 เปอร์เซนต์

นำตะกอนมาละลายใน 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตรประมาณ 5 เท่าของตะกอน อินคิวเบทที่ 50 องศาเซลเซียส ครึ่งชั่วโมง นำสารละลายที่ได้นี้มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Gornall, Bardawill และ David 1949)

ผสมสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร กับ สารละลายไบยูเรท 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดสีที่เกิดขึ้นที่ 540 มิลลิไมครอนโดยเครื่องวัดการดูดแสงSpectronic 20

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่ (Lowry และคนอื่น ๆ 1951)

ผสมสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีนอยู่ประมาณ 100 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ 3 มิลลิลิตรของสารละลายด่าง (ประกอบด้วย 2 เปอร์เซนต์โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์, 2 เปอร์เซนต์โปตัสเซียมตาร์เตท และ 1 เปอร์เซนต์คอปเปอร์–ซัลเฟตในอัตราส่วน 100 : 1 : 1) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมฟีนอลรีเอเยนต์ 0.3 มิลลิลิตร ผสมทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดสีที่เกิดขึ้นที่ 650 มิลลิไมครอนโดยเครื่องวัดการดูดแสงSpectronic 20

5. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ใช้วิธีย่อยสารตัวอย่างตามวิธีเกลดาล์คัดแปลงใหม่โดย Nelson และ Sommers (1973) อินทรีย์ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นรูปอนุมูลแอมโมเนีย หาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นนี้โดยการต้มกลั่นและไตเตรทกับกรดตามวิธีของ Bremmer และ Edwards (1965)

การย่อยและกลั่นสารตัวอย่าง

ผสมพืชตัวอย่างอบแห้ง 0.1 กรัม หรือดินตัวอย่างอบแห้ง 0.5 กรัม กับ 1.1 กรัมของเกลือผสมคาตาลิสต์ (ประกอบด้วย โปตัสเซียมซัลเฟต, คอปเปอร์ซัลเฟต และซีลีเนียม ในอัตราส่วน 100 : 10 : 1) ใส่ในหลอด Folin Wu ขนาด 80 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 4 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิประมาณ 300 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารตัวอย่างเปลี่ยนจากสีดำไปเป็นสารละลายใส ซึ่งจะกินเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นต้มย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วทำให้จืดจางด้วยน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร จึงนำไปหาปริมาณแอมโมเนียโดยใช้สารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วนี้ 10 มิลลิลิตร ผสมกับ 10 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอก–

ไซด์ 10 มิลลิลิตรไปต้มกลั่นโดยหลอดกลั่นเคลดาล์ รองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยขวดขนาด 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุ 5 มิลลิลิตรของสารละลายกรดบอริค–อินดิเคเตอร์ ไว้จนกระทั่งได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 30 มิลลิลิตร จึงหยุดการกลั่น

การไตเตรทหาปริมาณแอมโมเนียที่กลั่นออกมา

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาหาปริมาณแอมโมเนีย – ไนโตรเจนโดยไตเตรทกับกรดซัลฟูริคความเข้มข้นมาตราฐาน 0.005 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดสมมูลย์ โดยใช้สารละลายกรดบอริค – อินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับกรดซัลฟูริค 0.005 นอร์มอล เป็นตัวชี้นำ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพูอ่อน จดปริมาตรของกรดซัลฟูริคที่ใช้ นำไปคำนวณเป็นปริมาณแอมโมเนีย – ไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารละลายโดย

1 มิลลิลิตร ของกรดซัลฟูริคความเข้มข้นมาตราฐาน 0.005 นอร์มอล จะเท่ากับ 70 ไมโครกรัม ของแอมโมเนีย – ไนโตรเจน

6. การหาแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์ pyruvate , phosphate dikinase จากใบของพืช

การสกัดเอ็นไซม์จากใบ

ปั่นใบพืชตัวอย่าง 10 กรัมกับ 40 มิลลิลิตรของ 100 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ ทริส – ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.3 (ซึ่งประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของ 2 – เมอร์แคปโต เอธานอล 1 มิลลิโมลาร์ไดโซเดียมเอทีลีนไดอะมีนเตตราอะซีเตท และ 6 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต)ที่ 0 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 5 นาทีโดยใช้ Waring blendorที่ความเร็วสูงสุด กรองเศษใบทิ้งด้วยผ้ากอสแล้วนำส่วนน้ำใสไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 18 – 22 องศาเซลเซียสสำหรับหาโปรตีนโดยวิธีของลอรี่และแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์ pyruvate, phosphate dikinase ตามวิธีของ Andrews และ Hatch (1969)

การวัดแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์ pyruvate , phosphate dikinase โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงการดูดแสงของ NADH

หลักการก็คือ เอ็นไซม์ pyruvate , phosphate dikinase จะเปลี่ยนฟอสโฟอีนอลไพรูเวท ให้เป็น ไพรูเวท เมื่อมี AMP และ PPi อยู่ด้วย และไพรูเวท นี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นแลคเตท โดยเอ็นไซม์ Lactate dehydrogenase เมื่อมี NADH อยู่ด้วย ติดตามแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์ pyruvate , phosphate dikinase โดยการวัดการดูดแสงของ NADH ที่ลดลงที่ 340 มิลลิไมครอน เปรียบเทียบกับของเอ็นไซม์ที่ถูกทำให้เสื่อมแอ็คติวิตี้โดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที

ส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ในการหาแอ็คติวิตี้ของเอ็นไซม์นี้ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ทริส – ไฮโดรคลอไรด์pH 8.3, 6 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต, 10 มิลลิโมลาร์ไดไธโอทรีทอล, 0.15 มิลลิโมลาร์ NADH , 1 มิลลิโมลาร์ฟอสโฟอีนอลไพรูเวท, 1 มิลลิโมลาร์โซเดียมไพโรฟอสเฟต, ประมาณ 6.8 ยูนิท Lactate dehydrogenase (ที่ 25 องศาเซลเซียส)และเอ็นไซม์ที่สกัดจากใบของพืชตัวอย่างในปริมาตรทั้งหมด 0.8 มิลลิลิตร ปฏิกริยาทั้งหมดทำที่ 25 องศาเซลเซียส ติดตามการลดลงของการดูดแสงของ NADH ที่ 340 มิลลิไมครอนทุก ๆ 15 วินาทีเป็นเวลา 5 นาทีด้วยเครื่อง spectrophotometer model 25 ค่าแอ็คติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ pyruvate, phosphate dikinase นี้รายงานเป็นจำนวนไมโครโมลของ NADH ที่ถูกใช้ไปต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อ 1 นาที

005825

7. การหาการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทีลีนรีดักชั่น

จากการที่ Schöllhorn และ Burris (1966) และ Dilworth (1966) พบว่าเอ็นไซม์ไนโตรจิเนสสามารถรีดิวซ์อะเซทีลีนไปเป็นเอทีลีนได้ Koch และ Evans (1966)จึงได้นำเอาหลักการนี้มาดัดแปลงใช้วัดการตรึงไนโตรเจนซึ่งกลายเป็นวิธีที่นิยมที่สุดในการหาการตรึงไนโตรเจน หลักการก็คือ วัดปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นเมื่อเติมอะเซทีลีนลงไปในสารตัวอย่าง ติดตาม

i 1798668X

แอ็คติวิตี้ของการตรึงไนโตรเจนได้โดยการวัดปริมาณของก๊าซทั้งสองโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี่

7.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอะเซทีลีนรีดักชั่น

ได้ปรับปรุงวิธีการของ Hardy และคนอื่น ๆ (1968)มาใช้โดยได้ทำการทดลองหาสภาพที่เหมาะสมสำหรับทำการวิจัยนี้ เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี่ที่ใช้เป็นชนิด flame ionization detecter คอลัมน์เป็น porapak N ขนาด 40" X 1.6" ไนโตรเจนเป็นก๊าซพาด้วยอัตรา 50 มิลลิลิตรต่อนาที ไฮโดรเจน 12 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อากาศ 9 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detecter 130 องศาเซลเซียส ความเร็วของกระดาษบันทึก 20 เซนติเมตรต่อชั่วโมง

ตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง

เก็บตัวอย่างถั่วซีราโตรอายุ 32 วัน ตัดเฉพาะส่วนรากมาล้างให้สะอาด ซับให้แห้ง อินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ ปมอย่างเดียวและรากอย่างเดียวในขวดแก้วปิดสนิทภายใต้ 1 บรรยากาศ ของ อาร์กอน : ออกซิเจน เท่ากับ 80 : 20 และอะเซทีลีน 0.1 บรรยากาศที่ 30 องศาเซลเซียส วัดปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยใช้กระบอกฉีดยาดูดก๊าซจากขวดมา 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี่

ปริมาณอะเซทีลีนที่ใช้

เก็บตัวอย่างถั่วซีราโตรอายุ 32 วันเช่นเดียวกัน อินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ด้วยอยู่ในขวดแก้วปิดสนิท ภายใต้ 1 บรรยากาศของอาร์กอน : ออกซิเจนเท่ากับ 80 : 20 และอะเซทีลีน 0.02 หรือ 0.04 หรือ 0.05 หรือ 0.08 หรือ 0.10 หรือ 0.20 บรรยากาศที่ 30 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง วัดปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี่

ปริมาณออกซิเจนที่ใช้

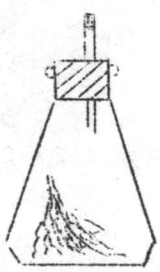
เก็บตัวอย่างถั่วซีราโตรอายุ 32 วันเช่นเดียวกัน อินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ในขวดแก้วปิดสนิท ภายใต้ 1 บรรยากาศของอาร์กอน : ออกซิเจน เท่ากับ 100 : 0 หรือ 95 : 5 หรือ 90 : 10 หรือ 80 : 20 หรือ 75 : 25 หรือ 70 : 30 และอะเซทีลีน 0.1 บรรยากาศ ที่ 30 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง วัดปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องโครมาโตรกราฟฟี่

7.2 การหาแอ็คติวิตี้ของการรีดิวซ์อะเซทีลีน

จากข้อมูลเบื้องต้นนี้นำมาสร้างเป็นสภาวะพื้นฐานสำหรับหาแอ็คติวิตี้ของการตรึงไนโตรเจนตลอดการวิจัยดังต่อไปนี้

นำตัวอย่างพืชส่วนที่เป็นรากที่ล้างน้ำสะอาด และซับแห้งแล้วใส่ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีจุกยางปิดอยู่ เสียบหลอดแก้วที่มีจุกยางปิดข้างหนึ่งเพื่อเป็นทางดูดก๊าซเข้าออก ตามรูปที่ 2 ยารอบ ๆ ปากขวดด้วยกาวลาเท็กซ์เพื่อป้องกันไม่ให้ก๊าซภายในขวดรั่วออกมาได้ ดูดอากาศภายในออกให้หมด แล้วบรรจุก๊าซอาร์กอนลงไปแทนที่เท่ากับ 1 บรรยากาศ ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง ดูดอาร์กอนออก 10 เปอร์เซนต์ของปริมาตร แล้วบรรจุอะเซทีลีนเข้าไปแทนที่ด้วยปริมาตรเท่ากัน อินคิวเบทไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) 1 ชั่วโมง ผสมก๊าซภายในขวดให้เข้ากันโดยใช้กระบอกฉีดยา ดูดก๊าซเข้าออก แล้วดูดก๊าซนี้มา 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี่ วัดความสูงของ peak ที่เกิดขึ้นบนกระดาษบันทึก แล้วไปอ่านปริมาณเอทีลีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน แยกปมออกจากราก ชั่งน้ำหนัก และนับจำนวนปม

แอ็คติวิตี้ของการรีดิวซ์อะเซทีลีน คือ จำนวนไมโครโมลของเอทีลีนทั้งหมดที่เกิดขึ้นใน 1 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ภาพอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจน

8. การแยกเชื้อจากปมรากถั่ว

แยกปมจากรากถั่วซีราโตรอายุ 4 สัปดาห์นำมาล้างให้สะอาด แช่ใน 1 เปอร์เซนต์ไฮโปคลอไรต์ 5 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ติดอยู่ที่ผิวนอก แล้วล้างในน้ำกลั่นที่ปลอดจากเชื้อ 5 ครั้ง นำมาบดในจานที่ปลอดเชื้อ แล้วใช้ห่วง (loop)แตะมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งyeast manitol อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นโคโลนีได้ชัดเจน

9. การทดสอบว่าเชื้อที่แยกได้จากปมรากถั่วเป็นไรโซเบียม

การทดสอบว่าเชื้อที่แยกได้จากปมถั่วเป็นไรโซเบียม และเป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ใดอาจทำได้โดยศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และ ความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดปมได้ในภาวะที่ควบคุม

การศึกษารูปร่างการเคลื่อนไหวและการติดสีของเชื้อ

นำเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง yeast manitol มาเกลี่ยตัวด้วยน้ำกลั่นบนสไลด์ แล้วนำไปปิดทับบนสไลด์หลุม นำไปส่องดูด้วยกล้อง phase contrast สังเกตรูปร่างและการเคลื่อนไหวของเชื้อ ส่วนการย้อมสีเชื้อทำได้โดยเกลี่ยเชื้อด้วยน้ำกลั่นบนสไลด์ทิ้งให้แห้ง ผ่านเปลวไฟ 1 – 2 ครั้ง แล้วนำไปย้อมสี gram stain และไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะและความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่าง ๆ

ทดลองเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง yeast manitol, yeast manitol congo red, peptone glucose อินคิวเบทที่ 28 – 30 องศาเซลเซียส สังเกตดูลักษณะของโคโลนีและการเจริญเติบโตของเชื้อเทียบกับเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ R. phaseoli (182) และ R. cowpea (201)

ระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มตัวเป็นสองเท่า

ใส่เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเชื้อเหลว yeast manitol ที่ 28 – 30 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีอากาศ 1 มิลลิลิตรลงในขวดปลอดเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ 25 มิลลิลิตร อินคิวเบทที่ 28 – 30 องศาเซลเซียสในภาวะที่มีอากาศ ติดตามปริมาณของเชื้อที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 4 ชั่วโมง โดยวัดการดูดแสงที่ 500 มิลลิไมครอนด้วยเครื่องดูดแสง Spectronic 20 เทียบกับเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ R. phaseoli (182) และ R. cowpea (201)

ความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นสารต้นตอคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี กลูโคส, ฟรุคโตส, ซูโครส และซัคซิเนท เป็นสารต้นตอคาร์บอนแทนแมนิทอล ที่ 28 – 30 องศาเซลเซียสในภาวะที่มีอากาศ ติดตามปริมาณของเชื้อที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 4 ชั่วโมง โดยการวัดการดูดแสงที่ 500 มิลลิไมครอน โดยใช้เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 เทียบกับเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ R. phaseoli (182) และ R. cowpea (201)

ความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดปม

แช่เมล็ดถั่วชีราโตรใน 5 เปอร์เซนต์ไฮโปคลอไรท์ 30 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 5 ครั้ง นำเมล็ดปลูกลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุทรายที่ปลอดเชื้อ 550 มิลลิลิตร และมีหลอดแก้วเปิดปลายที่ปลอดเชื้อเสียบอยู่ โดยฝังเมล็ดถั่ว 2 เมล็ดต่อบีกเกอร์ ห่างกันประมาณ 2.5 นิ้ว เติมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนลงไปจนชุ่มหยอด suspension ของเชื้อที่แยกได้(เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง yeast manitol แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นให้มีแบคทีเรียประมาณ 10^9 เซลต่อ 1 มิลลิลิตร) ลงบนบริเวณที่ฝังเมล็ดถั่วแห่งละ 1 มิลลิลิตร กลบหลุมแล้วเทก้อนหินก้อนเล็ก ๆ ที่ปลอดเชื้อแล้วลงไปบนผิวทรายให้สูงขึ้นมาประมาณ 1 – 2 เซนติเมตร เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายที่เติมลงไประเหยเร็วจนเกินไป ตั้งทิ้งไว้ในที่แจ้งและคอยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน ทางหลอดแก้วที่ปลอดเชื้อให้ทรายชุ่มอยู่เสมอ หลังจากเมล็ดถั่วงอก 4 สัปดาห์ใช้น้ำล้างชะทรายออก สังเกตดูการเจริญเติบโตและการเกิดปม