บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. สภาพของแปลงนาข้าว

ข้าวที่ใช้ในการทดลองคือ พันธุ์ กข1 (Oryza sativa L. RD 1) ปลูกโดยเจ้าหน้าที่สถานีทดลองข้าวกลองหลวง โดยใช้เมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ ตกกล้าในแปลงตกกล้าขนาด 4 ตารางเมตร (เนื้อที่แปลงกล้าทั่วๆ ไปใช้เพียง 1 ส่วนต่อพื้นที่ปักดำ 20 ส่วน) ใช้เมล็ดพันธุ์ 50 กรัมต่อตารางเมตร แปลงตกกล้าใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0(N-P-K) 30 กก.ต่อไร่ ในวันตกกล้า เมื่อต้นกล้าอายุได้ 22 วัน ถอนไปปักดำในแปลงนาที่เตรียมไว้สำหรับปักดำขนาด 6.5 X 8.75 ม. โดยปักดำจำนวน 3 ต้นต่อกอ ระยะห่างระหว่างกอเป็น 25 X 25 ซม.

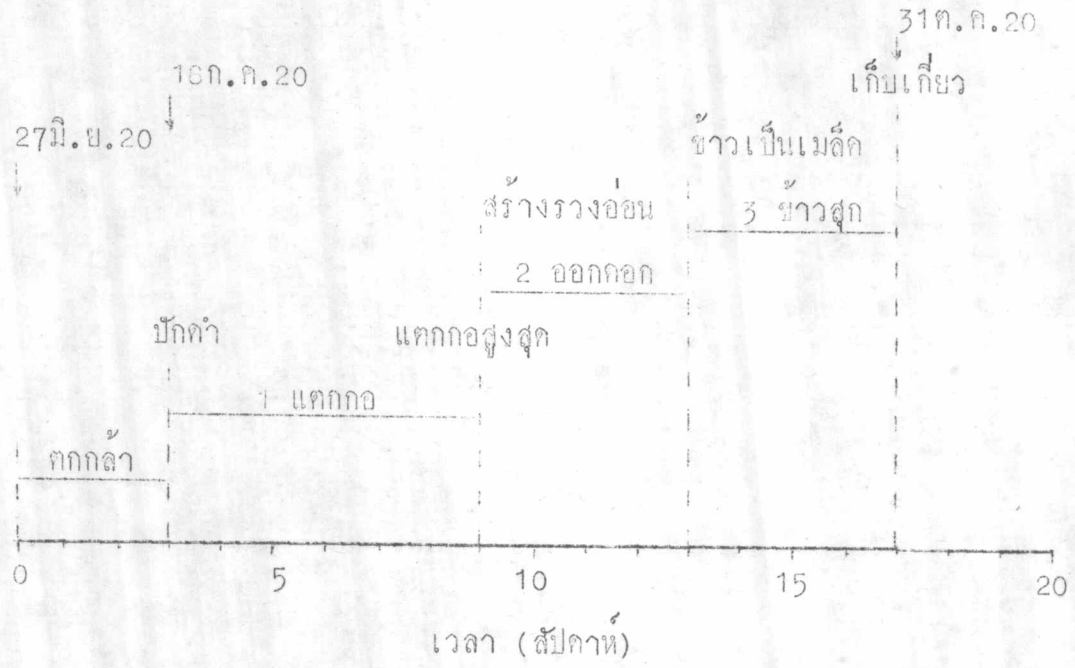
แปลงนาสำหรับปักดำแบ่งเป็น 4 แปลงซึ่งใส่ปุ๋ยปริมาณต่างๆ กันคือ

1. แปลง 0-0-0 ไม่ใส่ปุ๋ย
2. แปลง 0-12-0 ใส่ปุ๋ย Double super phosphate 12 กก. P_2O_5 ต่อไร่ (75 Kg P_2O_5/ ha)
3. แปลง 12-0-0 ใส่ปุ๋ย Ammonium sulphate 12 กก. N ต่อไร่ (75 Kg N / ha)
4. แปลง 12-12-0 ใส่ปุ๋ย Ammonium sulphate 12 กก. N ต่อไร่ (75 Kg N / ha) และปุ๋ย Double super phosphate 12 กก. P_2O_5 ต่อไร่ (75 Kg P_2O_5/ ha)

สำหรับปุ๋ยไนโตรเจนแบ่งใส่เป็น 2 ครั้งๆ ละเท่าๆ กัน ครั้งแรกวันที่ปักดำ และครั้งที่ 2 ระยะที่ข้าวแตกกอสูงสุด ส่วนปุ๋ยฟอสฟอรัสนั้นใส่เพียงครั้งเดียววันที่ปักดำ

2. ระยะการเจริญเติบโตของข้าว กข1

การเจริญเติบโตของข้าว กข 1 หลังการเพาะเมล็ด (รูปที่ 2) แบ่งออกได้เป็น 3 ระยะคือ



รูปที่ 2 แสดงระยะการเจริญเติบโตของข้าว กข 1

1 ระยะแตกกอ (Active Vegetative phase) นับตั้งแต่ปักดำ Transplanting) จนถึงแตกกอสูงสุด (Maximum Tillering) หลังจากปักดำได้ประมาณ 2 สัปดาห์ ต้นข้าวจะฟื้นตัวและเริ่มแตกกอ การแตกกอของข้าว กข 1 จะขึ้นกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน เมื่อต้นข้าวอายุได้ 6 สัปดาห์ จะเป็นระยะที่แตกกอเต็มที่

2 ระยะออกดอก (Reproductive phase) หลังจากต้นข้าวหยุดการแตกกอก็จะเริ่มสร้างรวงอ่อน (Panicle initiation) ขึ้นภายใน แล้วเจริญต่อมาเป็นระยะออกดอก (Flowering) ระยะนี้ลำต้นของข้าวจะอ้วนและเมื่อข้าวออกดอกแล้วจะมีการผสมเกษรเกิดขึ้น รวมทั้งสิ้นกินเวลาประมาณ 4 สัปดาห์

3 ระยะข้าวสุก (Ripening phase) หลังจากระยะที่ 2 ดอกข้าวจะเริ่มกลายเป็นเมล็ด (Heading) เติบโตเต็มที่และสุก (Ripening) พร้อมสำหรับการเก็บเกี่ยว (Harvesting) ซึ่งกินเวลาประมาณ 4 สัปดาห์

3. การเก็บตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา จากแปลงนาทดลอง

การเก็บตัวอย่างจากแปลงนาทดลอง ทำทุก ๆ 2 สัปดาห์ นับตั้งแต่ปักดำถึงเก็บเกี่ยวโดยเริ่มในตอนเช้าประมาณ 10.00 น.-12.00 น. รวบรวมตัวอย่างน้ำแปลงละ 1 ลิตร จากการสุ่มตัวอย่างหลาย ๆ จุด บรรจุในขวดพลาสติก ตัวอย่างรากข้าวประมาณ 6 กอต่อแปลง ในตำแหน่งต่าง ๆ กันของแต่ละแปลง ใส่ถุงพลาสติกแยกแต่ละแปลง สำหรับตัวอย่างดินใช้ดินที่ติดมากับรากข้าว เมื่อเก็บตัวอย่างได้แล้วนำมาวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนในห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกันนั้นโดยวิธี ARA

4. การวัดก๊าซอะเซธีลีน และเอธีลีนโดยเครื่อง Gas chromatography (GC)

ในการแยกวัดปริมาณก๊าซอะเซธีลีน และเอธีลีน ทำโดยใช้เครื่อง GC และ Flame ionization detector

4.1 การเตรียมคอลัมน์

ใช้คอลัมน์แก้วแบบขดกลมยาว 40 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.16 นิ้วต่อปลายข้างหนึ่งของคอลัมน์ด้านที่มี glass wool เข้ากับเครื่องดูดอากาศ แล้วค่อย ๆ เติม Porapak N bead ที่ปลายอีกข้างหนึ่งสลับการสั่นคอลัมน์ให้การบรรจุแน่นสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุคอลัมน์ถึงประมาณ 1 นิ้ว จากขอบ แล้วอัด glass wool ที่สะอาดตอนปลายบน

4.2 การหาสภาพเหมาะสมของเครื่อง GC ที่ใช้ในการทดลอง

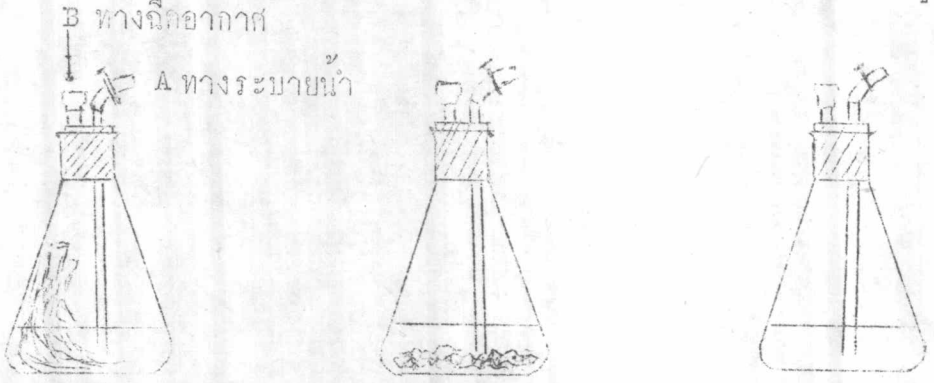
นำคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วต่อเข้ากับเครื่อง GC เปิดก๊าซไนโตรเจนให้มีอัตราการไหล 50 มล. ต่อนาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิของตู้อบที่ใช้อบคอลัมน์อย่างช้า ๆ จนถึง 180 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อขับไล่สิ่งสกปรกที่ตกค้างในคอลัมน์ รวมทั้งไล่ความชื้นด้วย จากนั้นตั้งอุณหภูมิและปรับอัตราการไหลของก๊าซที่ผ่านคอลัมน์ดังต่อไปนี้

อุณหภูมิของคอลัมน์	90	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของเครื่องตรวจ	130	องศาเซลเซียส

อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน	50	มล. ต่อนาที
อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน	30	มล. ต่อนาที
อัตราการไหลของอากาศ	300	มล. ต่อนาที
ความเร็วของกระดาษ	20	ซม. ต่อ ซม.

5. การวัด ARA ของตัวอย่าง รากข้าว ดินบริเวณราก น้ำท้องนาในสภาพห้องปฏิบัติการ

ดัดแปลงจาก Yoshida และ Ancajas (1973 a และ b) ใช้รากข้าวสดซึ่งล้างดินออกหมดด้วยน้ำประปาประมาณ 10 กรัม ดินที่ติดมากับรากข้าว (ดินบริเวณราก) ประมาณ 10-20 กรัม หรือน้ำท้องนาประมาณ 100 มล. ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มล. ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะขวดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง

ตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณราก เติมน้ำประปาให้เต็มขวด สำหรับน้ำท้องนาใช้น้ำท้องนาเติมให้เต็มขวด แล้วอุดจุกยางซึ่งทางหนึ่ง (A) ใช้สำหรับระบายน้ำออก อีกทางหนึ่ง (B) สำหรับฉีดอากาศเข้า เมื่อฉีดอากาศที่ผสมกับก๊าซอะเซทิลีนในอัตราส่วน อะเซทิลีนต่ออากาศ 1 ต่อ 4 จำนวน 150 มล. ($P_{C_2H_2}$ 0.2 บรรยากาศ) เข้าทาง B จะไปแทนที่น้ำซึ่งจะล้นออกทาง A หลังจากนั้นอินคิวเบทตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 24 ชม. ใช้ plastic syringe ขนาด 1.0 มล. ดูดก๊าซจากขวดทดลองทางจุกยางด้าน B 0.5 มล. ฉีดเครื่อง GC

000630

ตัวอย่างการคำนวณหา ARA

ตัวอย่างก๊าซ 0.5 มล. ที่นำมาจากขวดทดลองที่อินคิวเบทรากข้าว 1 วัน ซึ่งมี gas phase 150 มล. เมื่อฉีด GC ที่ใช้ attenuator 50 X 10^2 ให้ความสูงของพีค 10.3 ซม. นน. รากข้าวนี้เมื่ออบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส 24-48 ชม. หนัก 1.230 กรัม

nmole C_2H_4 ที่เกิดขึ้น $= \frac{\text{peak height X attenuator X slope}}{1 \text{ X } 10^2}$

slope ของกราฟมาตรฐานสำหรับก๊าซเอธิลีน = 0.0425

กำหนดให้ที่ attenuator 1 X 10^2 ความสูงของพีค 1 ซม. มี attenuator factor = 1

ความสูงของพีคที่ attenuator 50X10^2 = 10.3 ซม.

$= \frac{10.3 \text{ X } 50X10^2 X \text{ } 0.0425}{1X10^2}$ nmoleC_2H_4

ตัวอย่างก๊าซ 0.5 มล. มีก๊าซเอธิลีน = 21.887 nmoleC_2H_4

gas phase 150 มล. จะมีก๊าซเอธิลีน $= \frac{150 \text{ X } 21.887}{0.5}$ nmoleC_2H_4

รากข้าว 1.230 กรัมทำให้เกิดก๊าซเอธิลีน = 6.566 umoleC_2H_4

ARA ในรากข้าว $= \frac{6.566}{1.230}$ umoleC_2H_4/g.d

= 5.338 umoleC_2H_4/g.d

6. การหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างต่าง ๆ โดยวิธี Kjeldahl ตามรายงานของ Bremer (1960) กล่าวคือ เปลี่ยนไนโตรเจนอินทรีย์เป็นรูปของอนุมูลแอมโมเนียมก่อนแล้วจึงหาปริมาณแอมโมเนีย ที่ได้นี้โดยเติมน้ำยา nessler ลงในตัวอย่างที่ได้จากการย่อยตามวิธีของ Minari และ Zilversmite (1963) วัดความเข้มของสีด้วย spectrophotometer ที่ 420 nm ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

6.1 การย่อยตัวอย่างโดยวิธี Kjeldahl

นำตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากซึ่งอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชม. จนน้ำหนักคงที่มาบดให้ละเอียด สุ่มตัวอย่างละประมาณ 0.1-0.2 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 20 มล. เติม Se 0.01 กรัม K_2SO_4 0.5 กรัม และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1.5 มล. นำไปทำให้ร้อนด้วยเตาไฟฟ้าประมาณ 300 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะเป็นสีดำ แล้วค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนกระทั่งใส แล้วย่อยต่ออีก 1-2 ชม. หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างที่ได้นี้มาเติมน้ำจนได้ปริมาณ 10 มล. เขย่าอย่างแรงหาปริมาณแอมโมเนีย ที่ได้โดยวิธี nesslerization

6.2 การหาปริมาณแอมโมเนียมโดยวิธี nesslerization

น้ำยา nessler ที่ใช้เตรียมตามวิธีของ Minari (1963) โดยละลายไอโอดีน 56.5 กรัม ในน้ำ 50 มล. ซึ่งมี KI ละลายอยู่ 75 กรัม จากนั้นเติมปรอทบริสุทธิ์ 75 กรัม เขย่าอย่างแรงจนเปลี่ยนสีเป็นเหลืองอ่อนใส เก็บน้ำยาส่วนใสทั้งหมดแล้วเติมน้ำให้เป็น 500 มล. ใช้น้ำยานี้ 200 มล. เติมลงใน 10% NaOH จำนวน 975 มล. น้ำยาที่ได้เรียกว่า nessler reagent หลังจากนั้นเติม KCN 976.7 มก. ลงในน้ำยา nessler 1 ลิตร เป็นตัวป้องกันการเกิดตะกอน เก็บไว้ในที่มืดและป้องกันการ์บอนไดออกไซด์จากอากาศ สารละลายมาตรฐานใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (100 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อ มล.)

ตัวอย่างที่จะหาปริมาณแอมโมเนียมจะต้อง มีปริมาณแอมโมเนียมอยู่ระหว่าง 1-20 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อ มล. เติมน้ำยา nessler จำนวน 3.0 มล. เขย่าอย่างแรง วัดการดูดแสงที่ 420 nm

สำหรับวิธีที่ใช้นี้ได้ทดสอบเปอร์เซนต์ recovery ในการหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ โดยนำสารละลายมาตรฐาน $(NH_4)_2SO_4$ และ BSA มาย่อยและหาแอมโมเนียมตามวิธีนี้ ปรากฏว่าเปอร์เซนต์ recovery อยู่ในช่วง 93-109% (ภาคผนวกหน้า 75)

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์

ตัวอย่างรากข้าวแห้งหนัก 0.1 กรัม นำมาย่อยโดยวิธี Kjeldahl แล้วเจือจางเป็น 10 มล. ปิเปตตัวอย่างนี้ 0.1 มล. เติมน้ำเป็น 1 มล. แล้วเติมน้ำยา nessler 3.0 มล. เขย่า วัดการดูดแสงที่ 420 nm ได้ OD = 0.3 เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานพบว่ามีค่าเท่ากับ 8.40 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อตัวอย่าง (0.1 มล.)

ตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มล. มีไนโตรเจนอินทรีย์ = 8.40 ไมโครกรัม

ดังนั้นตัวอย่าง 10 มล. มีไนโตรเจนอินทรีย์ = $\frac{8.4 \times 10}{0.1}$ ไมโครกรัม

= 840 ไมโครกรัม

ตัวอย่าง 0.1 กรัม มีไนโตรเจนอินทรีย์ = 0.84 มก.

ดังนั้นตัวอย่างรากข้าวนี้มีไนโตรเจนอินทรีย์ = $\frac{0.84}{0.1}$ มก.ต่อกรัม

= 8.40 มก.ต่อกรัม

7. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา

สูตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

สูตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน (ต่อลิตร) (NF medium)

น้ำตาลกลูโคส	5.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005	กรัม
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.005	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.015	กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01	กรัม
Potassium phosphate buffer 0.5M pH 6.2-6.4	20	มล.

น้ำตาลกลูโคสและ $MgSO_4$ autoclave แยกกัน แล้วจึงนำมาผสมรวมกันภายหลัง

สูตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน + 10% root extract

(NF medium + 10% root extract)

ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนปั่นกับรากข้าวที่ล้างสะอาดในอัตราส่วน รากข้าวต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ต่อ 10 แล้วเก็บเอาส่วนใสไปฆ่าเชื้อ

สูตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน + 0.002% yeast extract

(NF medium + 0.002% yeast extract)

เติม yeast extract 0.02 กรัม ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน 1 ลิตร

สูตร Rich medium (ต่อลิตร)

Yeast extract	5	กรัม
Tryticase Peptone Pancreatic Digest of Casein	10	กรัม
NaCl	10	กรัม

ในการทดลองนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน โดยทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

7.1 วัด ARA ของตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนาที่อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน

วิธีการวัด ARA ของตัวอย่างที่อินคิวเบทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน ดัดแปลงจากวิธีของ Dobereiner และคณะ (1976) โดยใช้ตัวอย่างรากข้าวที่เตรียม 3 แบบ
แบบที่ 1 รากข้าวที่ล้างสะอาดด้วยน้ำประปาอย่างเดียว
แบบที่ 2 รากข้าวที่ฆ่าเชื้อผิว โดยการจุ่มรากข้าวในแอลกอฮอล์ 95% แล้วแช่ในน้ำยา clorox 2% 20-30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้ออีก 3 ครั้ง
แบบที่ 3 รากข้าวเตรียมแบบที่ 2 แต่นำมาบดให้ละเอียด
ใช้ตัวอย่างรากข้าวทั้ง 3 แบบนี้อย่างละประมาณ 0.5 กรัม หรือดินบริเวณรากประมาณ 0.1 กรัม หรือน้ำท้องนาประมาณ 0.1 มล. ใส่ในขวดทดลองขนาด 25 มล. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อ

ที่ปราศจากไนโตรเจน 5.0 มล. เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญเติบโตโดยอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน จากนั้นวัด ARA โดยอุดจุกยางแล้วฉีดก๊าซอะเซทิลีน 2.5 มล. ($P_{C_2H_2}$ 0.1 บรรยากาศ) อินคิวเบทต่ออีก 1-2 ชม. ใช้ syringe ขนาด 1.0 มล. ดูดก๊าซ 0.1 มล. ฉีดเข้าเครื่อง GC

7.2 วัด ARA ของตัวอย่างที่ transfer culture จากตัวอย่าง 7.1 ที่มีแอคติวิตีสูง พร้อมทั้งแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากผลในข้อ 7.1 นำตัวอย่างที่พบ ARA สูง มา subculture ต่อในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนประมาณ 5-10 generation โดยนำ culture ที่คัดเลือกจากตัวอย่าง 7.1 จำนวน 1.0 มล. ไปปั่นให้แบคทีเรียตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที นำตะกอนแบคทีเรียไปเขย่ารวมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน 5.0 มล. นำตัวอย่างนี้ใส่ขวดทดลองขนาด 25 มล. อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. จากนั้นวัด ARA โดยอุดจุกยางฉีดก๊าซอะเซทิลีน 2.5 มล. อินคิวเบทต่ออีก 1-2 ชม. ใช้ syringe ดูดตัวอย่างก๊าซ 0.1 มล. ฉีดเข้าเครื่อง GC พร้อมทั้งวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 500nm จากนั้นนำ culture นี้จำนวนหนึ่งไป subculture ต่อ ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ทำซ้ำประมาณ 5-10 ครั้ง

จากนั้นนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดย streak ใช้ sterile loop จุ่มใน culture ที่แสดงแอคติวิตีสูงไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Rich medium อีก 1-2% (ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20-40 ppmN) นำโคโลนีเดียวที่ได้ไปขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เมื่อปรากฏโคโลนีชนิดเดียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้และการย้อมเซลล์แบคทีเรียของแต่ละโคโลนีปรากฏเซลล์ชนิดเดียวถือว่าแยกเชื้อได้บริสุทธิ์

<u>ตัวอย่างการคำนวณหา ARA</u>

หา ARA ของดินซึ่งอินคิวเบทตัวอย่างดินประมาณ 0.1 กรัม ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน 5.0 มล. ในขวดทดลองขนาด 25 มล. อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน หลังจากนั้นอุดจุกยางฉีดก๊าซอะเซทิลีน 2.5 มล. อินคิวเบทต่อ 2 ชม. ใช้ตัวอย่างก๊าซ 0.1 มล. จาก gas phase

ภายในขวดทดลอง 25 มล. ฉีด GC ที่ attenuator $2X10^2$ ได้ความสูงของพีค 6.3 ซม.

nmole C_2H_4 ที่เกิดขึ้น $= \frac{\text{peak height X attenuator X slope}}{1 \text{ X } 10^2}$

slope ของกราฟมาตรฐานสำหรับก๊าซเอธิลีน = 0.0425

ความสูงของพีค C_2H_4 ที่ attenuator $2X10^2$ = 6.3 ซม.

$= \frac{6.3 \text{ X } 2X10^2 X \text{ } 0.0425}{1X10^2}$ nmoleC_2H_4

ตัวอย่างก๊าซ 0.1 มล. มีก๊าซเอธิลีน = 0.534 nmoleC_2H_4

ดังนั้น gas phase 25 มล. จะมีก๊าซเอธิลีน= $\frac{25 \text{ X } 0.534}{0.1}$ nmoleC_2H_4

culture ของตัวอย่างดิน 5 มล. ทำให้เกิดก๊าซเอธิลีน 133.50 nmoleC_2H_4

ARA ของ culture ตัวอย่างดิน = $\frac{133.50}{2.00 \text{ X } 5}$ nmoleC_2H_4/ml.hr

= 13.35 nmoleC_2H_4/ml.hr

<u>การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียบริสุทธิ์</u>

8.1 การดูลักษณะโคโลนี

ใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40 เท่า ดูลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้พร้อมทั้งถ่ายรูปบันทึกผล

8.2 การย้อมสีแบคทีเรีย (Gram stain)

วิธีย้อมทำตาม Huckler modification (Jawetz และคณะ, 1962) โดยนำ pure culture มา smear บนสไลด์แล้วทำให้ติดบนสไลด์โดยอังไฟเล็กน้อย จากนั้นหยดน้ำยา Gram crystal violet ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา หยดน้ำยา Gram iodine ทับลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้อีก 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา นำสไลด์จุ่มลง

ในแอลกอฮอล 95% 10 วินาที ล้างด้วยน้ำหนึ่งครั้ง หยดน้ำยา Safranin O ทับลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า และถ่ายรูปบันทึกผล

8.3 การวัด ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์

นำแบคทีเรียที่แยกได้ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อ 10 มล. ซึ่งประกอบด้วย NF - medium 9 มล. และ Rich medium 1 มล. ในขวดทดลองขนาด 125 มล. อินคิวเบทที่อุณหภูมิประมาณ 30-32 องศาเซลเซียส 24 ชม. โดยไม่เขย่า จากนั้นนำ culture 1 หรือ 2 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 9.5 มล. นำไปปั่นให้แบคทีเรียตกตะกอน เทน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วเติมน้ำเลี้ยงเชื้อใหม่ (NF medium) จำนวน 2 มล. เขย่าหลอดทดลองอย่างแรงก่อนอินคิวเบทที่ 34 องศาเซลเซียส 4-5 ชม. โดยตะแคงหลอดทดลองให้อยู่ในแนวเกือบระนาบ จาก นั้นวัด ARA โดยอุดจุกยาง แล้วฉีดก๊าซอะเซทิลีน 0.75 มล. ($P_{C_2H_2}$ 0.1 บรรยากาศ) อินคิวเบทในลักษณะเดิมต่ออีก 1 ชม. ใช้ syringe ดูดตัวอย่างก๊าซ 0.1 มล. ฉีดเครื่อง GC วัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 500 nm พร้อมทั้งหาปริมาณโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย

8.4 การหาปริมาณโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย

การหาโปรตีนจะต้องทำลายผนังเซลล์ก่อนโดยเติม NaOH 0.1N และต้มที่ 90 องศาเซลเซียส 10-15 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาหาโปรตีนที่ละลายอยู่ใน NaOH 0.1N โดยวิธี Lowry (1951) วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 650 nm การทดลองนำดังนี้คือ นำ culture 2.0 มล. ปั่นให้เซลล์ตกตะกอน เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 0.5 มล. NaOH 0.1N เขย่าอย่างแรงต้มที่ 90 องศาเซลเซียส 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำสารละลายตัวอย่างนี้ไปหาโปรตีนตามวิธี Lowry โดยใช้ BSA (1 มก.ต่อ มล.) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และเตรียม Working solution โดยใช้ 1 มล. ของ 2% potassium sodium tartrate และ 1 มล. ของ 1% copper sulfate เติมใน 100 มล. ของ 2% sodium carbonate ผสมให้เข้ากัน

เป็น alkali copper solution พร้อมทั้งเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัม ต่อ 0.2 มล. เพื่อทำกราฟมาตรฐาน ตัวอย่างที่จะนำมาหาปริมาณโปรตีนจะต้องมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 5-100 ไมโครกรัม ต่อ 0.2 มล. เติม alkali copper solution 3 มล. เขย่าตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำยา Phenol เจือจาง (Phenol reagent ต่อ น้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ1) 0.3มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที วัดการดูดแสงที่ 650 nm เทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณหา ARA

ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ซึ่งเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน 2.0 มล. ในหลอดทดลองขนาด 9.5 มล. อินคิวเบทที่ 32 องศาเซลเซียส 4 ชม. หลังจากนั้นอุดจุกยางฉีดก๊าซอะเซทิลีน 0.75 มล. อินคิวเบทต่ออีก 1.30 ชม. นำตัวอย่างก๊าซ 0.1 มล. จาก gas phase 7.5 มล. ฉีด GC ที่ attenuator 20 X 10^2 ให้ความสูงของของพีค 3.3 ซม. ปริมาณโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย 300 ไมโครกรัม ต่อ มล. ความขุ่นของ culture ที่ 500 nm มีค่าเท่ากับ 0.85

nmole C_2H_4 ที่เกิดขึ้น $= \frac{\text{peak height X attenuator X slope}}{1 \text{ X } 10^2}$

slope ของกราฟมาตรฐานสำหรับก๊าซเอธิลีน = 0.0425

กำหนดให้ที่ attenuator 1 X 10^2 ความสูงของพีค 1 ซม. มี attenuator factor=1

ความสูงของพีคที่ attenuator 20X10^2 = 3.3 ซม.

$= \frac{3.3 \text{ X } 20X10^2 X \text{ } 0.0425}{1X10^2}$ nmoleC_2H_4

ตัวอย่างก๊าซ0.1 มล. มีก๊าซเอธิลีน = 2.805 nmoleC_2H_4

gas phase 7.5 มล. จะมีก๊าซเอธิลีน $= \frac{2.805 \text{ X } 7.5}{0.1}$ nmoleC_2H_4

= 210.375 nmoleC_2H_4

ARA ของแบคทีเรียต่อ มก. โปรตีน $= \frac{210.375}{1.30 \times 2 \times 300}$ $\mu mole C_2H_4/mg.hr$

$= 0.233$ $\mu mole C_2H_4/mg.hr$

ARA ของแบคทีเรียต่อ OD_{500} $= \frac{210.375}{1.30 \times 2 \times 0.85}$ $nmole C_2H_4/ml.OD_{500}.hr.$

$= 82.5$ $nmole C_2H_4/ml.OD_{500}.hr$