หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. <u>การแยกและหาปริมาณก๊าซอะเซทิลีนและเอทิลีนด้วยเครื่อง GC เมื่อใช้คอลัมน์ Porapak N</u>

การแยกก๊าซอะเซทิลีนและเอทิลีนด้วยเครื่อง GC ตามวิธีการทดลองข้อ 4 ปรากฏว่า retention time ของก๊าซเอทิลีน 32 วินาที และก๊าซอะเซทิลีนตามออกมาที่หลังที่ retention time 48 วินาที ความไวของวิธีวัดหรือปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบก๊าซทั้ง 2 ชนิดคือ 0.020 nmole และจากการทำกราฟมาตรฐานที่ปริมาณต่าง ๆ พบว่าช่วงปริมาณก๊าซทั้ง 2 ซึ่งอยู่ในกราฟเส้นตรงตั้งแต่ 0.020- 400.00 nmole หรือ 10^4 fold และค่า slope ของกราฟมาตรฐานสำหรับก๊าซเอทิลีน 0.0425 nmole / peak height (ซม.) (รูปที่ 4)

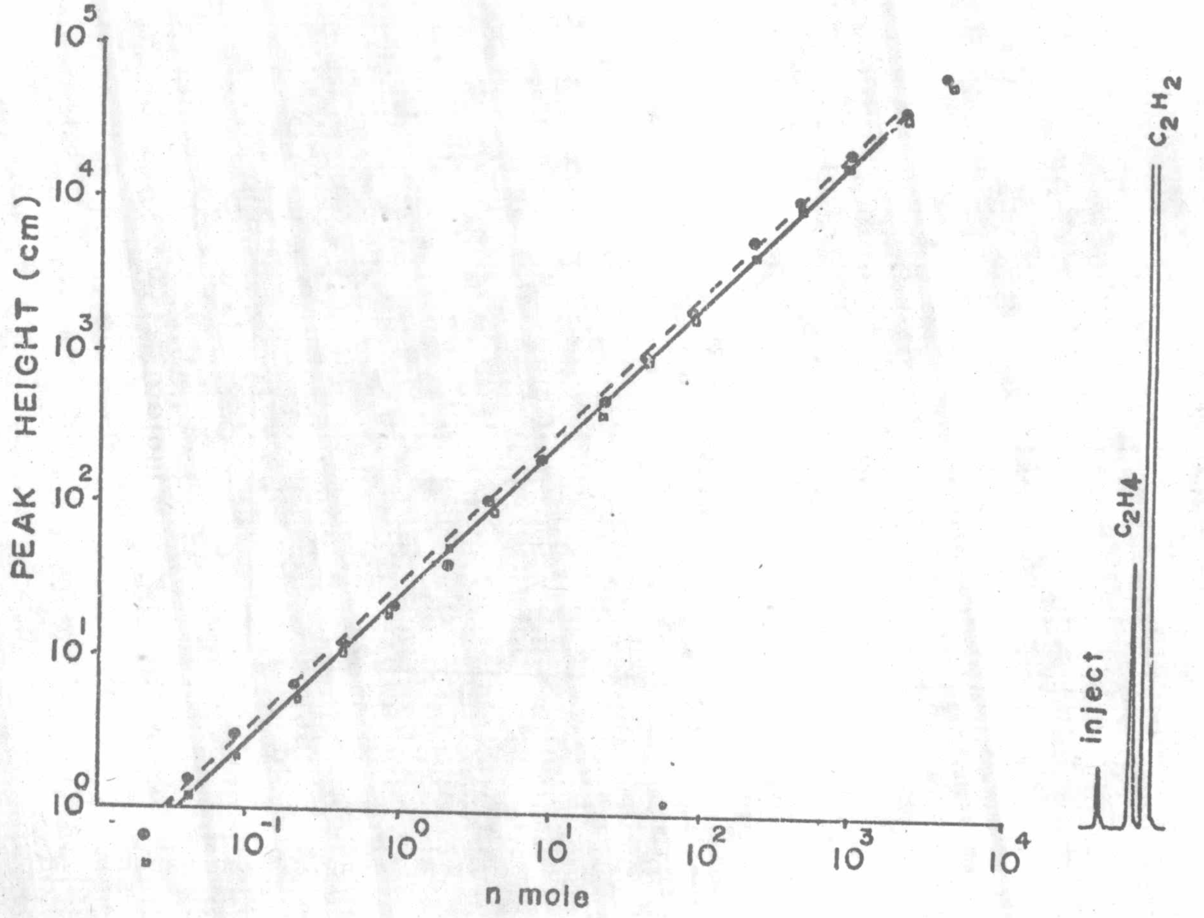
2. <u>สภาพที่เหมาะสมในการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA</u>

2.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทต่อ ARA ในรากข้าว

เมื่ออินคิวเบทตัวอย่างรากข้าวในขวดทดลองซึ่งบรรจุก๊าซอะเซทิลีน 0.2 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดเอทิลีนที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ผลการทดลองในรูปที่ 5 แสดงว่ามี lag phase ประมาณ 5 ชม. แรกของการอินคิวเบทคือ ไม่มีแอคติวิตี้ ต่อจากนั้น ARA จะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเมื่อเทียบกับเวลาที่ใช้อินคิวเบทจนถึง 48 ชม. ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงทำการวัด ARA หลังจากอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม.

2.2 ผลของการเปลี่ยน Partial pressure C_2H_2 ($P_{C_2H_2}$) ใน gas phase ของขวดทดลองต่อ ARA ในรากข้าว

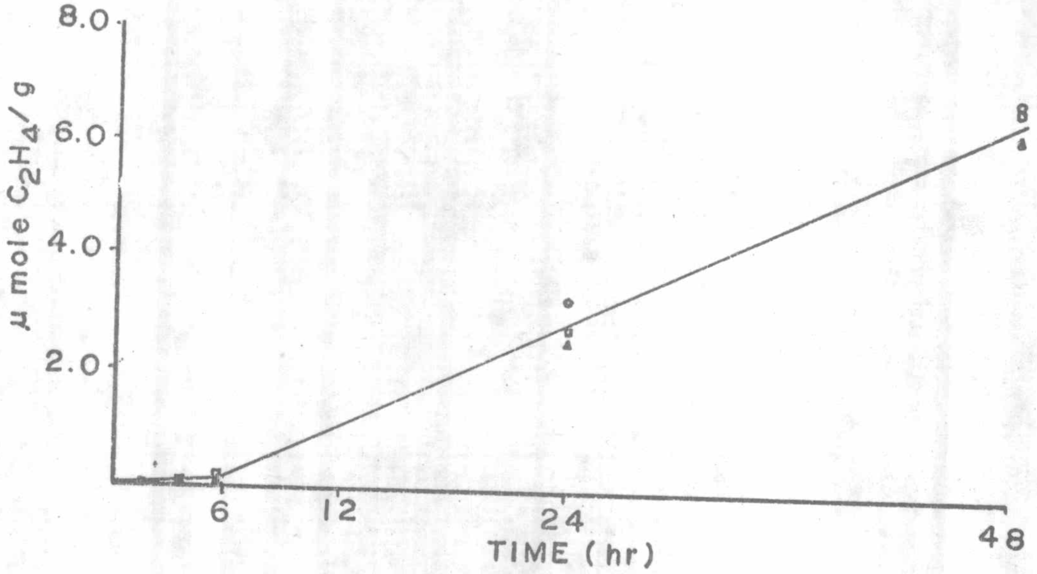
ใช้ตัวอย่างรากข้าวอินคิวเบทในขวดทดลองที่บรรจุอะเซทิลีนให้มี $P_{C_2H_2}$ ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.001-0.40 บรรยากาศ แล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ผลการวัด ARA



<u>รูปที่ 4</u> กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณก๊าซอะเซธีลีนและเอธีลีนโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟ ทำโดยใช้เครื่อง Pye Unicam Series 104 ติดคอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.16 นิ้ว ยาว 40 นิ้ว บรรจุด้วย Porapak N ปรับอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 50 มล.ต่อนาที ไฮโดรเจน 30 มล.ต่อนาที อากาศ 300 มล.ต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของเครื่องตรวจ (Flame ionization detector) 130 องศาเซลเซียส retention time ของก๊าซเอธีลีน 32 วินาที อะเซธีลีน 48 วินาที และ generation time 70 วินาที

ก๊าซอะเซธีลีน --------

ก๊าซเอธีลีน ————



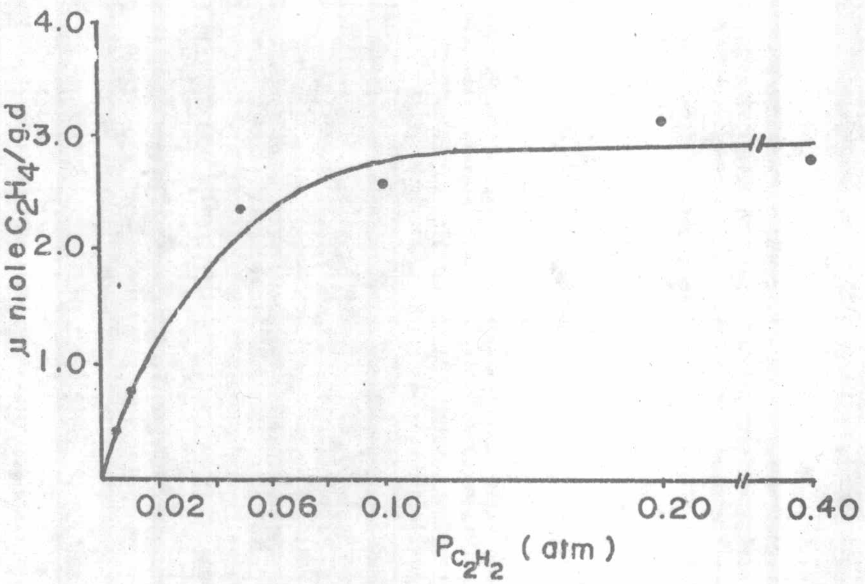
รูปที่ 5 ผลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทต่อ ARA ของรากข้าว

อินคิวเบทรากข้าวในขวดทดลองซึ่งบรรจุก๊าซอะเซธีลีน 0.2 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการแล้ววัดปริมาณเอธีลีนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 1½, 3½, 5½, 24 และ 48 ชม. ด้วยเครื่อง GC

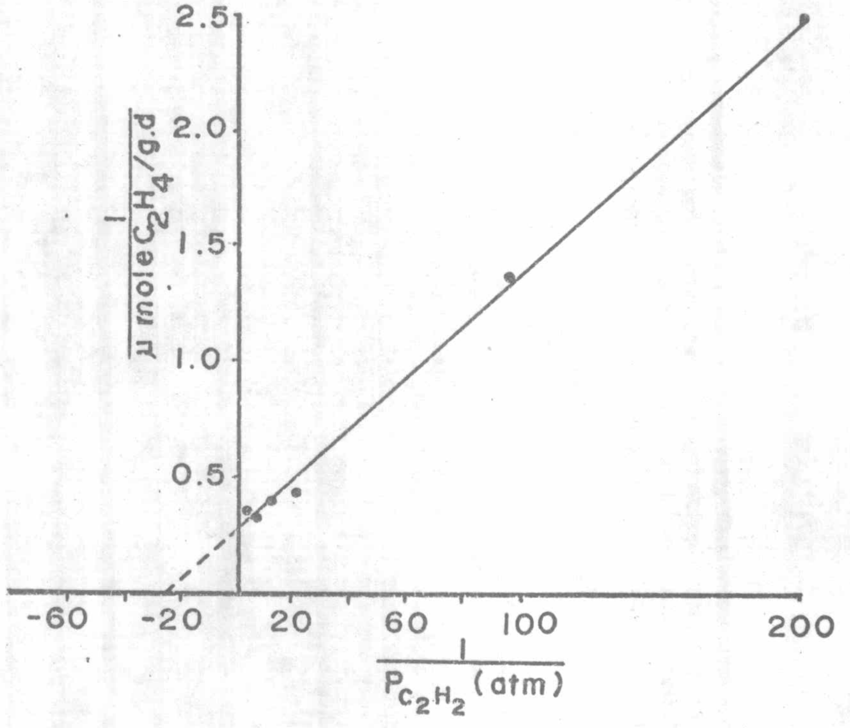
ในตัวอย่างรากข้าวดังรูปที่ 6 แสดงว่า แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นตาม $P_{C_2H_2}$ ในช่วง 0.001-0.05 บรรยากาศ และเมื่อขึ้นสูงสุดที่ $P_{C_2H_2}$ 0.1 บรรยากาศ แล้วจะคงที่ต่อไปจนถึง 0.40 บรรยากาศ โดยมีแอคติวิตีประมาณ 2.6 µmoleC_2H_4/g.d และเมื่อทำ Lineweaver-Burk Plot (รูปที่ 7) คือการพลอตระหว่างส่วนกลับของ $P_{C_2H_2}$ และ $\frac{1}{V}$ คือส่วนกลับของแอคติวิตี พบว่ามีค่า Km 0.04 บรรยากาศ แสดงว่ารากข้าวที่ใช้ทดลองนี้มี affinity ต่อก๊าซอะเซธีลีนสูง จากผลที่ได้นี้จึงใช้ค่า $P_{C_2H_2}$ 0.20 บรรยากาศ ซึ่งมากเกินพอจะทำให้เกิดแอคติวิตีได้สูงสุด ในการอินคิวเบทตัวอย่างเพื่อวัด ARA ครั้งต่อ ๆ ไป

2.3 C_2H_4 consumption โดยรากข้าว และดินบริเวณราก

เนื่องจากการวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA เป็นการวัดปริมาณก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้น ถ้ารากข้าวหรือดินมีความสามารถดูดซับก๊าซเอธีลีนไว้ได้บ้าง ผลที่วัดได้จะน้อยลงกว่าที่เป็นจริง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบว่าในสภาพของการทดลองนี้ ก๊าซเอธีลีนจะถูกดูดซับไปได้หรือไม่ โดยการอินคิวเบทตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากในขวดทดลองที่บรรจุอากาศและก๊าซเอธีลีนที่ทราบจำนวนแน่นอนในสภาพการอินคิวเบทเช่นเดียวกับการวัด ARA ปกติ แล้ววัดปริมาณเอธีลีนที่หายไปในช่วงเวลาต่าง ๆ เทียบกับขวดทดลองที่ใช้น้ำประปาเป็น Blank แทนตัวอย่างรากข้าวหรือดิน ผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงว่าปริมาณก๊าซเอธีลีนลดลงเล็กน้อย ในขวดที่มีตัวอย่างรากข้าว มีก๊าซเอธีลีนเริ่มต้น 428.80 nmole ต่อขวดทดลอง หลังจากอินคิวเบท 24 ชม. ก๊าซเอธีลีนลดลงเหลือ 357.33 nmole ต่อขวดทดลอง ในตัวอย่างดินบริเวณรากมีก๊าซเอธีลีนที่เวลาเริ่มต้น 442.03 nmole ต่อขวดทดลอง หลังอินคิวเบท 24 ชม. เหลือ 426.18 nmole ต่อขวดทดลอง แต่ปริมาณก๊าซเอธีลีนที่ลดลงนี้เหมือนกับ Blank ที่บรรจุน้ำประปาซึ่งมีก๊าซเอธีลีนเริ่มต้น 428.80 nmole ต่อขวดทดลอง และลดลงเหลือ 357.33 nmole ใน 24 ชม. แสดงว่าวิธีที่ใช้ในการวัด ARA นี้มีการสูญเสียก๊าซเอธีลีนบ้างเล็กน้อย แต่การหายไปของก๊าซเอธีลีนนี้ไม่ได้เนื่องมาจากตัวอย่างรากข้าวหรือดินบริเวณราก ทั้งนี้เพราะขวดที่บรรจุรากข้าวหรือดินมีการสูญหายของก๊าซเอธีลีนเท่ากับขวด Blank ปริมาณเอธีลีนที่หายไปนี้อาจเนื่องมาจากก๊าซเอธีลีนละลายในน้ำได้หรืออาจซึมออกจากขวดทดลองได้เล็กน้อย



รูปที่ 6 ผลของ $P_{C_2H_2}$ ใน gas phase ของขวดทดลองต่อ ARA ของรากข้าว อินคิวเบทรากข้าวในขวดทดลองซึ่งบรรจุก๊าซอะเซธีลีนให้มี $P_{C_2H_2}$ 0.001, 0.005 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.40 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. วัดก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)



รูปที่ 7 Lineweaver-Burk Plot ($\frac{1}{ARA}$ Vs $\frac{1}{P_{C_2H_2}}$)

จากผลการทดลองในรูปที่ 6 คำนวณหา $\frac{1}{V}$ ของปฏิกิริยาจาก $\frac{1}{ARA}$ และ $\frac{1}{S}$ จาก $\frac{1}{P_{C_2H_2}}$ แล้วหาค่า Km จากการพลอต Lineweaver-Burk Plot ระหว่าง $\frac{1}{V}$ และ $\frac{1}{S}$ ได้ค่า Km ของอะเซธิลีนรีดักชั่นของรากข้าวในสภาพการทดลองนี้คือ 0.04 บรรยากาศ

ตารางที่ 1 การทดสอบ C_2H_4 consumption โดยรากข้าวและดินบริเวณราก ในสภาพของการทดลอง

ใช้ตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากใส่ในขวดทดลองที่บรรจุอากาศและก๊าซเอธีลีนที่ทราบจำนวนแน่นอน อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจหาปริมาณก๊าซเอธีลีนในขวดทดลองด้วยเครื่อง GC ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ขวด Blank ใช้น้ำประปาแทนรากข้าวหรือดิน

เวลาที่อินคิวเบท	µmole C_2H_4/flask		
(ชม.)	Blank	รากข้าว	ดินบริเวณราก
0.00	428.80	428.80	442.03
3.30	389.09	397.03	436.73
24.00	357.33	357.33	426.15

2.4 ความสามารถในการผลิตก๊าซเอธิลีนโดยรากข้าวและดินบริเวณราก

นอกจากความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นจากการที่ตัวอย่างรากข้าวหรือดินสามารถดูดซึมก๊าซเอธิลีนแล้ว ถ้าตัวอย่างรากข้าวหรือดินมีความสามารถที่จะผลิตก๊าซเอธิลีนในขณะที่ทำการทดลองโดยขบวนการอื่นที่ไม่ใช่อะเซธิลีนรีดักชั่น จะทำให้ผลการวัด ARA สูงกว่าที่เป็นจริง ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซเอธิลีนในรากข้าวและดินในสภาพการทดลอง โดยอินคิวเบทตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก ในขวดทดลองที่บรรจุก๊าซอะเซธิลีน 0.2 บรรยากาศ และในขวดคอนโทรล บรรจุอากาศอย่างเดียว เมื่ออินคิวเบทที่อุณหภูมิห้องครบ 24 ชม. ใช้ syringe ดูดก๊าซ 0.5 มล. ฉีดเครื่อง GC ผลการทดลองตารางที่ 2 พบว่าในขวดที่บรรจุก๊าซอะเซธิลีน 0.2 บรรยากาศ มีเอธิลีนเกิดขึ้นได้ในตัวอย่างรากข้าว 2.7-3.6 µmole/g.d และตัวอย่างดิน 0.01 ± 0.009 µmole/g.d เมื่ออินคิวเบทตัวอย่างในขวดทดลองที่บรรจุอากาศอย่างเดียว ไม่พบว่ามีก๊าซเอธิลีนเกิดขึ้นเลยแสดงว่า ก๊าซเอธิลีนที่ตรวจพบในตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรากเกิดจากอะเซธิลีนรีดักชั่นอย่างเดียว

2.5 ผลการเก็บรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียสต่อ ARA

ในการทดลองเก็บตัวอย่างรากข้าวบางส่วนไว้ในห้องเย็นซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 7 วัน แล้วนำมาหา ARA เปรียบเทียบกับตัวอย่างส่วนที่วัดทันทีในวันเก็บตัวอย่าง ผลการทดลองดังตารางที่ 3 แสดงว่าการเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถรักษาสภาพของตัวอย่างได้นานพอสมควร คือยังคงมีแอคติวิตี้เหลือประมาณ 74% ของการวัดในวันแรก ถึงแม้จะเก็บตัวอย่างเป็นเวลานานถึง 7 วัน และถ้าเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แอคติวิตี้ (2.9 ± 0.4 µmoleC_2H_4/g.d ใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้ในวันที่เก็บตัวอย่างมากคือ มีแอคติวิตี้ประมาณ 96% ของที่วัดได้ในวันแรก

ตารางที่ 2 ความสามารถในการผลิตก๊าซเอธีลีนโดยรากข้าวและดินบริเวณรากในสภาพของการทดลอง

อินคิวเบทตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณรากในขวดทดลองที่บรรจุก๊าซอะเซธีลีน 0.2 บรรยากาศ และในขวดทดลองคอนโทรลบรรจุอากาศอย่างเดียว โดยอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ตรวจหาปริมาณก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้นภายหลังอินคิวเบทด้วยเครื่อง GC

ตัวอย่าง	ปริมาณเอธีลีนที่เกิดขึ้น umole / g.d	
	อินคิวเบทใน อะเซธีลีน (0.2บรรยากาศ)	อินคิวเบทใน อากาศ (1.0 บรรยากาศ)
รากข้าว 7 ตัวอย่าง	3.17 ± 1.07	none
รากข้าว 6 ตัวอย่าง	2.76 ± 0.74	none
รากข้าว 6 ตัวอย่าง	3.02 ± 2.32	none
รากข้าว 7 ตัวอย่าง	3.64 ± 1.46	none
ดินบริเวณราก 8 ตัวอย่าง	0.01 ± 0.009	none

ตารางที่ 3 ผลการเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ 4 องศาเซลเซียสต่อ ARA

เก็บตัวอย่างรากข้าวไว้ในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 4 องศาเซลเซียส เวลา 0, 2 และ 7 วัน นำรากข้าวมาหา ARA โดยอินคิวเบทตัวอย่างในขวดทดลองที่บรรจุก๊าซอะเซทีลีน 0.2 บรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. หาปริมาณเอธิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (วัน)	จำนวนตัวอย่าง	ARA µmoleC_2H_4 /g.d (Mean ± S.D)	% แอคติวิตี้ เทียบกับวัน 0
0	2	2.575 - 3.668	100
2	3	2.953 ± 0.383	95
7	3	2.318 ± 0.305	74

3. ARA ในรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำห้องนา ตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว

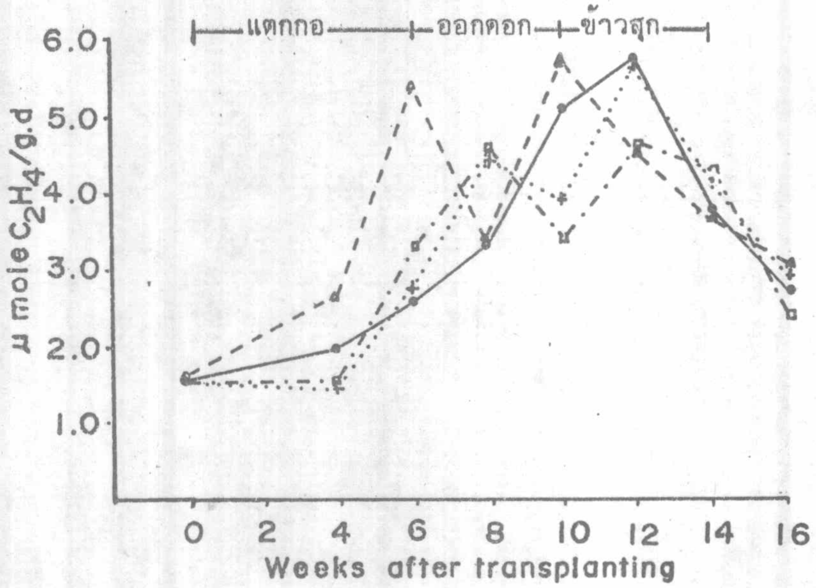
หลังจากได้ทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA แล้ว จึงใช้วิธีนี้ติดตามการตรึงไนโตรเจนในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำห้องนา ตลอดระยะของการเพาะปลูก เพื่อศึกษารูปแบบการตรึงไนโตรเจนส่วนเฉพาะที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิด ในภาวะที่ไม่ใส่ปุ๋ยและที่ใส่ปุ๋ยชนิดต่าง ๆ กัน

3.1 ARA ในรากข้าวตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ใช้ตัวอย่างรากข้าวซึ่งเก็บจากแปลงทดลองในระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ปักดำจนถึงเก็บเกี่ยวมาหา ARA ผลการทดลองในรูปที่ 8 แสดงว่า ARA ในรากข้าวของแต่ละแปลงจะมีแบบอย่างที่คล้ายกัน คือระยะแรกหลังปักดำ ARA ในรากข้าวยังต่ำอยู่ (ประมาณ 1.5 µmole C_2H_4/g.d) แต่จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อถึงระยะแตกกอ และสูงสุดประมาณ 10 สัปดาห์หลังปักดำคือในช่วงสร้างรวงอ่อนและออกดอก (3.5-5.5 µmoleC_2H_4/g.d) ต่อจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงเรื่อย ๆ ในช่วงข้าวสุกและเก็บเกี่ยว แสดงว่าในระยะปักดำและเริ่มแตกกอรากข้าวมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนต่ำมากและจะค่อย ๆ เพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนขึ้นเป็นลำดับจนสูงสุดในระยะออกดอก ความสามารถนี้จะกลับลดต่ำลงอีกในระยะข้าวสุกและเก็บเกี่ยว

สำหรับการใส่ปุ๋ยมีผลต่อ ARA ในรากข้าว (รูปที่ 9 ก,ข,ค และ ง) สังเกตจากการเปรียบเทียบกับแปลง 0-0-0 (รูปที่ 9 ก), พบว่าแปลงที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 12-0-0 (รูปที่ 9 ค), แปลงที่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส 0-12-0 (รูปที่ 9 ข) และแปลงที่ใส่ปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด 12-12-0 (รูปที่ 9 ง) จะมีพีคของ ARA เกิดเร็วขึ้น คือในระยะแตกกอสูงสุดและเริ่มสร้างรวงอ่อนจะมี ARA อีกหนึ่งพีค เพิ่มขึ้นจากรูปแบบที่พบในแปลง 0-0-0 ดังนั้นการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสน่าจะมีผลต่อ ARA ในรากข้าวโดยไปเร่งการเจริญเติบโตของต้นข้าวทำให้ ARA เกิดได้เร็วขึ้น แต่จากการทดลองนี้การใส่ปุ๋ยต่างชนิดหรือทั้ง 2 ชนิด ให้รูปแบบการตรึงไนโตรเจนคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 9 ข,ค และ ง)

I 15A98335



<u>รูปที่ 8</u> ARA ของรากข้าวในระยะต่าง ๆ ของอายุข้าว

อินคิวเบทรากข้าวซึ่งเก็บจากแปลงทดลองในระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ปักดำจนถึงเก็บเกี่ยว ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ในขวดทดลองที่บรรจุก๊าซอะเซธีลีน 0.2 บรรยากาศ และวัดปริมาณก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง GC

ARA ของรากข้าวจากแปลง 0-0-0 ————————

ARA ของรากข้าวจากแปลง 0-12-0 --------

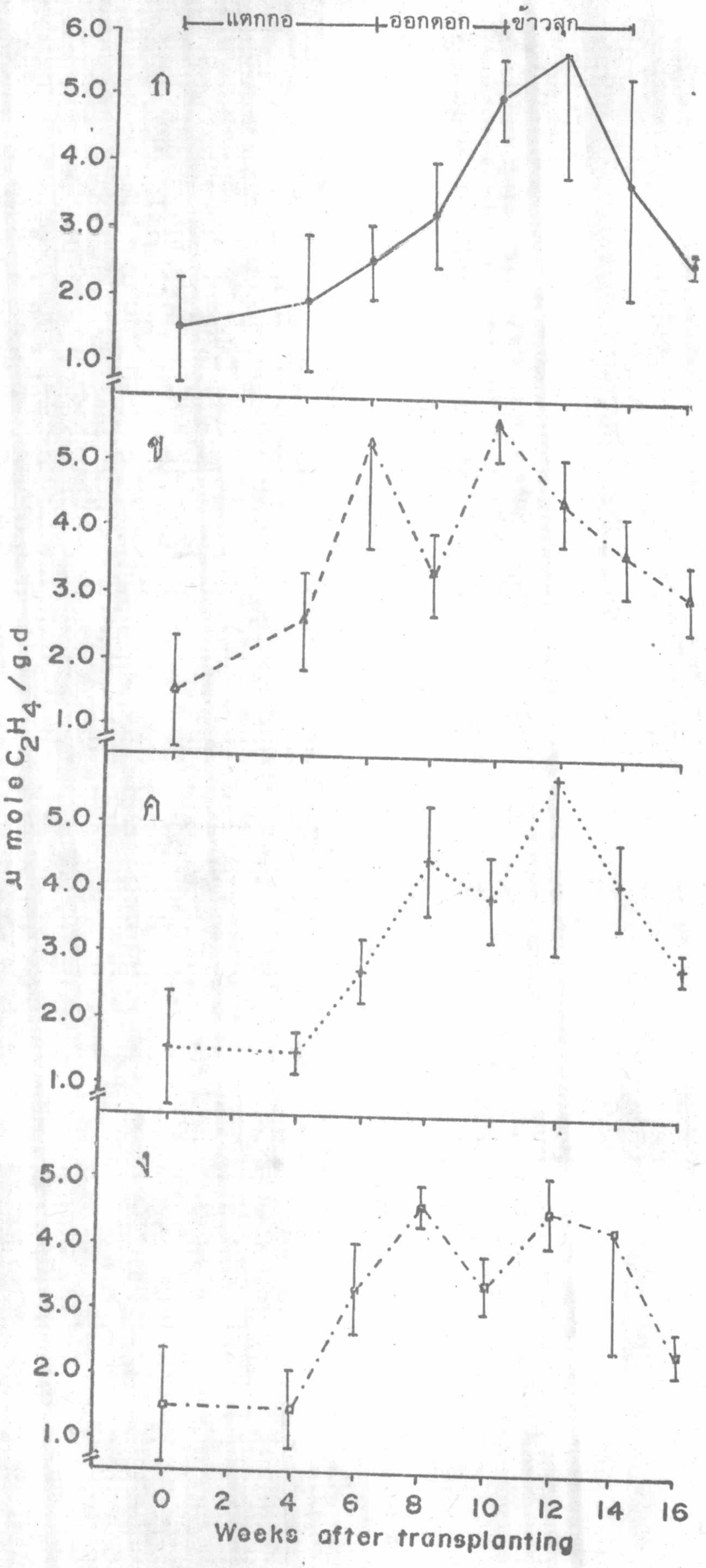
ARA ของรากข้าวจากแปลง 12-0-0 ....

ARA ของรากข้าวจากแปลง 12-12-0 -·-·-·-·-

แต่ละจุดทำ 3 ซ้ำ

<u>รูปที่ ๙</u> ผลของการใส่ปุ๋ยต่อ ARA ของรากข้าวในระยะต่าง ๆ ของอายุข้าว

ก. แปลงไม่ใส่ปุ๋ย (0-0-0), ข. แปลงใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (0-12-0)
ค. แปลงใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (12-0-0), และ ง. แปลงใส่ปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด
(12-12-0) ตามปริมาณที่กล่าวไว้ในวิธีทดลอง
แต่ละจุดแสดง Moan ± S.D. ทำ 3 ซ้ำ



แตกกอ
ออกดอก
ข้าวสุก
ก
ข
ค
ง
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
μ mole C_2H_4 / g.d
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Weeks after transplanting

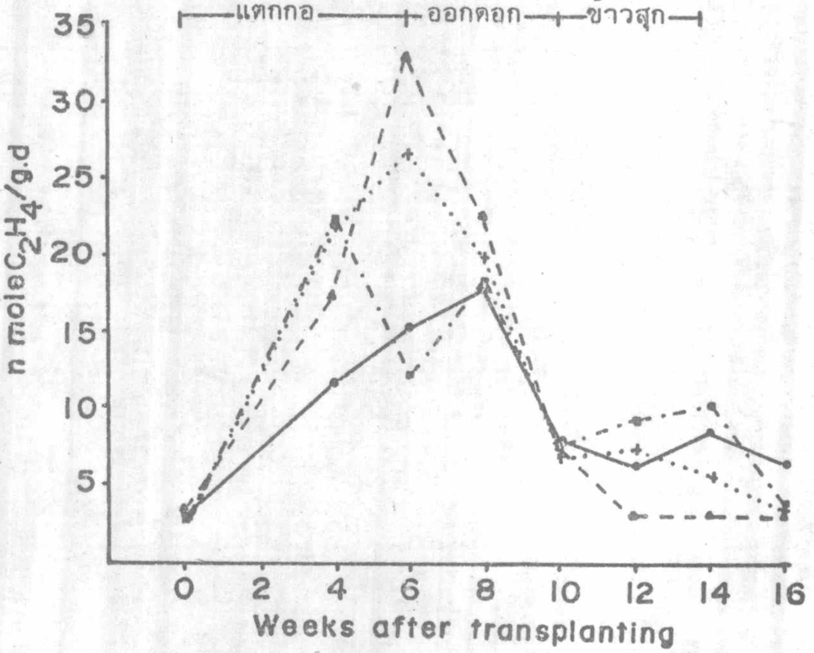
3.2 ARA ในดินบริเวณรากตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ใช้ตัวอย่างดินบริเวณรากซึ่งเก็บจากแปลงทดลองในระยะเวลาต่าง ๆ มาหาARA ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 พบว่า ARA ของดินบริเวณรากในระยะปักดำมีค่าต่ำ ประมาณ 2.0-3.0 nmoleC_2H_4/g.d แอคติวิตีนี้เพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในระยะแตกกอ และสร้างรวงอ่อน (ประมาณ 30 nmoleC_2H_4/g.d) แต่เมื่อเมล็ดข้าวเริ่มสุก ARA ในดินบริเวณรากจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 2-10 nmoleC_2H_4/g.d และคงค่าต่ำนี้ไปตลอดถึงระยะเก็บเกี่ยว

ผลของการใส่ปุ๋ยต่อ ARA ของดินบริเวณราก (รูปที่ 10) ไม่ปรากฏเด่นชัดกล่าวคือ แปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ยหรือใส่ปุ๋ยไนโตรเจนหรือปุ๋ยฟอสฟอรัสหรือใส่ปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด จะมีรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนคล้ายกันมาก ยกเว้นในระยะที่ข้าวแตกกอสูงสุดและเริ่มสร้างรวงอ่อน (6 สัปดาห์หลังปักดำ) แปลงที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย (0-0-0) และแปลงที่ใส่ปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด (12-12-0) มี ARA ใกล้เคียงกันคือ 15.0 และ12.0 nmoleC_2H_4/g.d ซึ่งต่ำกว่าแปลงที่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (0-12-0) หรือแปลงที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (12-0 -0) อย่างเดียวซึ่งแสดงค่า ARA ถึง 32.5 และ 26.5 nmoleC_2H_4/g.d ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความไม่เหมือนกันของดินที่ได้จากการสุ่มตัวอย่าง

3.3 ARA ในน้ำท้องนาตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ใช้ตัวอย่างน้ำท้องนาที่เก็บจากแปลงนาทดลองในระยะเวลาต่าง ๆ มาหา ARA ผลการทดลองดังรูปที่ 11 แสดงว่า ARAในน้ำท้องนามีค่าสูงสุดในระยะปักดำคือประมาณ 1.2 nmoleC_2H_4/ml.d หลังจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงระยะแตกกอสูงสุดจะไม่พบแอคติวิตีเลย แต่จะกลับพบ ARA ในน้ำท้องนาอีกครั้งหนึ่งในระยะข้าวสุกและเก็บเกี่ยว ซึ่งมีแอคติวิตีประมาณ 1.0 nmoleC_2H_4/ml.d



รูปที่10 ARA ของดินบริเวณรากข้าวตามระยะเวลาต่าง ๆ ของอายุข้าว

อินคิวเบทตัวอย่างดินบริเวณรากซึ่งเก็บจากแปลงทดลองในระยะเวลาต่าง ๆ ของอายุข้าว ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ในขวดทดลองที่บรรจุก๊าซอะเซธีลีน 0.2 บรรยากาศ และวัดปริมาณก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง

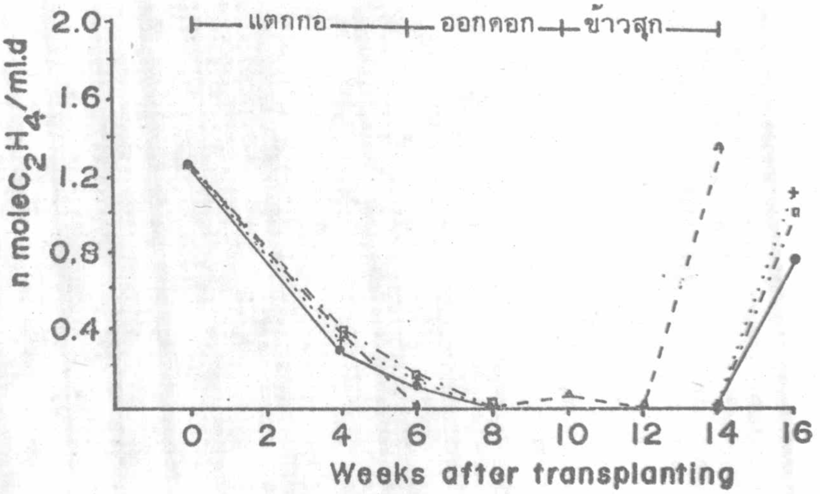
ARA ของดินบริเวณรากจากแปลง 0-0-0 ————————

ARA ของดินบริเวณรากจากแปลง 0-12-0 ---------

ARA ของดินบริเวณรากจากแปลง 12-0-0 ....

ARA ของดินบริเวณรากจากแปลง 12-12-0 -·-·-·-·-

แต่ละจุดทำ 2 ซ้ำ



<u>รูปที่ 11</u> ARA ในน้ำท้องนาตามระยะเวลาต่างๆของอายุข้าว

ใช้น้ำท้องนาซึ่งเก็บจากแปลงทดลองในระยะเวลาต่างๆ อินคิวเบทในขวดทดลองซึ่งบรรจุก๊าซอะเซธีลีน0.2บรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ตรวจหาปริมาณก๊าซเอธีลีนที่เกิดขึ้นภายหลังอินคิวเบทด้วยเครื่อง

ARA ของน้ำท้องนาจากแปลง 0-0-0 ————————

ARA ของน้ำท้องนาจากแปลง 0-12-0 - - - - - - - -

ARA ของน้ำท้องนาจากแปลง 12-0-0 . . . .

ARA ของน้ำท้องนาจากแปลง 12-12-0 -.-.-.-.-.-

แต่ละจุดทำ 1 ตัวอย่าง

รูปที่ 11 แสดงว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนหรือปุ๋ยฟอสฟอรัสหรือทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อ ARA ในน้ำท้องนา เนื่องจากแปลงทดลองทั้ง 4 แสดงรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนในน้ำเหมือนกันหมด

จากการติดตามวัด ARA ในรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนาตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว สรุปได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรึงไนโตรเจนในส่วนต่าง ๆ ของนาข้าวได้แก่ รากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา ปรากฏว่ารากข้าวเป็นส่วนที่มีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นสูงสุดคือ 1.5-5.5 µmoleC_2H_4/g.d รองลงมาได้แก่ดินบริเวณราก (2.5-30 nmoleC_2H_4/g.d และน้ำท้องนา (ประมาณ 1.0 nmoleC_2H_4/ml.d) แต่ละส่วนให้รูปแบบของการตรึงไนโตรเจนต่างกันกล่าวคือ ส่วนรากข้าวจะมีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในช่วงสร้างรวงอ่อนและออกดอก ดินบริเวณรากจะมีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในระยะที่ข้าวแตกกอสูงสุด แต่สำหรับน้ำท้องนาจะมีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดใน 2 ระยะคือ ระยะเริ่มปักดำและระยะเริ่มเก็บเกี่ยว การใส่ปุ๋ยในนาทดลองมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนเฉพาะในส่วนรากข้าว โดยเร่งการตรึงไนโตรเจนในรากข้าวให้เร็วขึ้น แต่ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนที่เกิดในดินบริเวณรากและน้ำท้องนา

4. <u>ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนา</u>

นอกจากติดตามการตรึงไนโตรเจนในรากข้าว ดินบริเวณรากและน้ำท้องนาตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวแล้ว การหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่างดังกล่าวจะช่วยให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ ในระยะต่าง ๆ ที่ข้าวเติบโต ทำโดยย่อยไนโตรเจนอินทรีย์ตามวิธี Kjedahl ให้เปลี่ยนเป็นรูปของอนุมูลแอมโมเนียมแล้วหาปริมาณแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นด้วย nessler reagent ดังรายละเอียดที่กล่าวแล้วในวิธีการทดลองข้อ 6

4.1 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของรากข้าวระยะต่าง ๆ

ใช้รากข้าวที่เก็บในระยะต่าง ๆ และอบแห้งแล้วประมาณ 0.1-0.2 กรัม ในการหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ ปรากฏว่า ในระยะแรกที่ต้นข้าวยังอ่อนอยู่ (ระยะปักดำ) รากข้าวจะมีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ต่อน้ำหนักสูงประมาณ 15.3 มก. ต่อ กรัม (ตารางที่ 4) และลดลงเรื่อย ๆ จนคงที่เมื่อข้าวโตเต็มที่และสร้างรวงอ่อนจนถึงระยะเก็บเกี่ยว มีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ประมาณ 7.5 มก. ต่อ กรัม

4.2 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของดินบริเวณราก

ใช้ดินบริเวณรากซึ่งอบแห้งประมาณ 0.1-0.2 กรัม มาหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งผลการทดลองในตารางที่ 5 แสดงว่าปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในดินค่อนข้างคงที่คือประมาณ 1.695 ± 0.522 มก. ต่อ กรัม ตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว

4.3 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของน้ำท้องนา

ใช้น้ำท้องนาประมาณ 100 มล. มาหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ ผลการทดลองดังตารางที่ 6 แสดงว่าปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในน้ำท้องนามีจำนวนน้อยมากประมาณ 0.2 มก. ต่อ 100 มล. และค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากการหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดนี้พบว่า ตัวอย่างรากข้าวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ ส่วนตัวอย่างดินบริเวณรากและน้ำท้องนามีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

5. <u>การแยกตัวการที่สามารถตรึงไนโตรเจนจาก รากข้าว ดิน และน้ำ ในแปลงนาทดลอง</u>

เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมานี้พบว่า มีการตรึงไนโตรเจนในรากข้าวสูงสุด รองลงมาได้แก่ ดินบริเวณราก และต่ำสุดในน้ำท้องนา ดังนั้นจึงได้ทำการแยกหาตัวการที่สามารถตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในตัวอย่างเหล่านี้ โดยการอินคิวเบทตัวอย่างในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน จากนั้นทดสอบ ARA คัดเลือก

ตารางที่ 4 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของรากข้าวระยะต่าง ๆ

ใช้รากข้าวที่อบแห้งประมาณ 0.1-0.2 กรัม เติม Se 0.01 กรัม K_2SO_4 0.5 กรัม H_2SO_4 เข้มข้น 1.5 มล. ย่อยจนตัวอย่างใส เจือจางตัวอย่างเป็น 10 มล. ใช้สารละลายนี้ 1.0 มล. เติมน้ำยา ressler 3.0 มล. เขย่า วัดการดูดแสงที่ 420nm

จำนวนตัวอย่าง	ระยะข้าว	ระยะเวลาหลังปักดำ	มก. ไนโตรเจนอินทรีย์ / กรัม (นน.แห้ง)
3	ปักดำ	0 สัปดาห์	15.313 ± 0.492
15	แตกกอ	4 "	13.764 ± 4.115
12	แตกกอสูงสุด	6 "	11.268 ± 3.291
12	สร้างรวงอ่อน	8 "	7.392 ± 0.639
12	เริ่มออกดอก	10 "	7.682 ± 1.980
12	ออกดอก	12 "	7.722 ± 1.377
12	ข้าวสุก	14 "	7.586 ± 0.746
12	เก็บเกี่ยว	16 "	6.693 ± 1.105

ตารางที่ 5 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของดินบริเวณรากข้าว

ใช้ตัวอย่างดินที่อบแห้งประมาณ 0.1-0.2 กรัม เติม Se 0.01 กรัม K_2SO_4 0.5 กรัม H_2SO_4 เข้มข้น 1.5 มล. ย่อยจนตัวอย่างใส เจือจางตัวอย่างเป็น 10 มล. ใช้สารละลายนี้ 1.0 มล. เติมน้ำยา nessler 3.0 มล. เขย่า วัดการดูดแสงที่ 420 nm

จำนวนตัวอย่าง	ระยะเวลาหลังปักดำ	มก.ไนโตรเจนอินทรีย์ กรัม (นน.แหง)
4	0 สัปดาห์	1.378 ± 0.249
4	4 "	2.674 ± 0.425
8	6 "	1.453 ± 0.536
8	8 "	1.297 ± 0.217
8	10 "	2.288 ± 0.313
8	12 "	1.297 ± 0.217
8	14 "	1.811 ± 0.371
8	16 "	1.364 ± 0.243
คาเฉลี่ย		1.695 ± 0.522

ตารางที่ 6 ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของน้ำท้องนา

ใช้ตัวอย่างน้ำท้องนา 100 มล. เติม Se 0.02 กรัม K_2SO_4 1.0 กรัม H_2SO_4 เข้มข้น 3.0 มล. ย่อยจนตัวอย่างใส นำตัวอย่างไปเจือจางเป็น 30 มล. ใช้สารละลายนี้ 1.0 มล. เติมน้ำยา nessler 3.0 มล. เขย่าแล้ววัดการดูดแสงที่ 420 nm

จำนวนตัวอย่าง	ระยะเวลาหลังปักดำ	มก.ไนโตรเจนอินทรีย์ / กรัม (นน.แห้ง)
4	6 สัปดาห์	0.254 ± 0.087
1	10 "	0.142
1	14 "	0.327
4	16 "	0.206 ± 0.032
ค่าเฉลี่ย		0.232 ± 0.078

ตัวอย่างที่มีแอคติวิตีสูงมาทำการ subculture ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนอีกหลายครั้ง พร้อมทั้งทดสอบ ARA เพื่อเจือจางสิ่งตกค้างที่มากับตัวอย่างไปพร้อมกับการเพิ่มแบคทีเรีย เป็นการทำให้แน่ใจว่า แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจริงและสามารถมีแอคติวิตีในน้ำเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ซึ่งปราศจากอาหารเสริม หลังจากนั้นจึงทำการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นอีกครั้ง

5.1 ARA ของตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนาที่อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และน้ำเลี้ยงเชื้อบวกอาหารเสริม

ใช้ตัวอย่างรากข้าว non sterile รากข้าว sterile ผิว และรากข้าว sterile ผิวพร้อมทั้งบด อย่างละประมาณ 0.5 กรัม หรือดินบริเวณราก 0.1 กรัม หรือน้ำท้องนา 0.1 มล. ใส่ขวดทดลองซึ่งบรรจุน้ำเลี้ยงเชื้อ 5.0 มล. อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน จากนั้นหา ARA ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 7 ตามวิธีการคัดเลือกดังกล่าว ไม่พบ ARA จากตัวอย่างน้ำท้องนาในน้ำเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด (NF medium, NF medium + 10% root extract และ NF medium + 0.002% yeast extract) สำหรับตัวอย่างดินพบ ARA หลายตัวอย่าง บางตัวอย่างพบแอคติวิตีสูงมาก (995.90 nmoleC_2H_4/ml.hr) ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน จากตัวอย่างดินทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีแอคติวิตี 14 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่พบแอคติวิตีส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่เก็บในวันที่ 26 ก.ย 20 ซึ่งเป็นระยะออกดอก และ 7 พ.ย 20 ซึ่งเป็นระยะเก็บเกี่ยว) สำหรับรากข้าวพบแอคติวิตีทุกตัวอย่างทั้งรากข้าว non sterile, รากข้าว sterile ผิว รวมทั้งรากข้าว sterile ผิวและบดละเอียด โดยมีแอคติวิตีในน้ำเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด แอคติวิตีที่พบอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 2-100 nmole C_2H_4/ml.hr

5.2 ARA ของ subculture ที่อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน

จากการทดลองข้อ 5.1 ตัวอย่างที่พบ ARA สูงในกลุ่มของตัวอย่างที่เก็บพร้อมกันถูก subculture ต่อ โดยใช้ culture ประมาณ 1.0 มล. ปั่นแยกตะกอนแบคทีเรีย เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนแล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. จากนั้นวัด ARA

<u>ตารางที่ 7</u> ARA ของตัวอย่างรากข้าว ดินบริเวณราก และน้ำท้องนา ที่อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และน้ำเลี้ยงเชื้อบวกอาหารเสริม

ใช้ตัวอย่างน้ำท้องนา 0.1 มล. หรือดินบริเวณราก 0.1 กรัม หรือรากข้าว non sterile รากข้าว sterile ผิว และรากข้าว sterile ผิวพร้อมทั้งบด 0.5 กรัม อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อ 5 มล. (medium 1 คือ NF medium, medium 2 คือ NF medium + 10% root extract, medium3 คือ NF medium + 0.002% yeast extract) ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน แล้วหา ARA

ชนิดตัวอย่าง	แปลง	ARA (nmole C_2H_4/ml.hr)					
		26 ก.ย 20	10 ต.ค 20			24 ต.ค 20	7 พ.ย 20
		medium					
		2	1	2	3	1	1
น้ำ	0-0-0	ND	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
น้ำ	0-12-0	ND	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
น้ำ	12-0-0	ND	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
น้ำ	12-12-0	ND	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
ดิน	0-0-0	182.00	-ve	53.12	70.94	-ve	13.24 7.08
ดิน	0-12-0	169.61	-ve	-ve	-ve	-ve	995.90 23.03
ดิน	12-0-0	192.18	-ve	-ve	-ve	-ve	3.34 0.47
ดิน	12-12-0	224.57	-ve	-ve	-ve	-ve	1.58 9.87
รากข้าว non sterile		8.20 102.94	298.38	60.48	84.31	104.87 16.29	21.97 20.47
รากข้าว sterile ผิว		10.69 77.85	87.96	108.64	123.53	12.43 79.60	3.11 6.54
รากข้าว sterile ผิว พร้อมทั้งบด		6.94 6.89	29.70	43.93	28.13	27.19 -ve	3.09 2.01

ND = not determined -ve = negative

พร้อมทั้งวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 500 nm แล้วทำการ subculture ซ้ำเรื่อย ๆ ไป ประมาณ 5-10 ครั้ง ผลการทดลองดังตารางที่ 8 ตัวอย่างที่ 1 มีแอคติวิตีต่ำเมื่อทำการ transfer ถึง 7 ครั้ง พบแอคติวิตีเพียง 12.6 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr ตัวอย่างที่ 2 มีแอคติวิตีสูง ทำการ transfer ถึง 11 ครั้ง แอคติวิตียังอยู่ในช่วง 30 - 220 nmole C_2H_4/ml.OD_{500}.hr ตัวอย่างที่ 3 มีแอคติวิตีตั้งแต่ 8-200 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr และในบางครั้งของการ transfer (ครั้งที่ 8, 9) ไม่พบแอคติวิตี ตัวอย่างที่ 4 มีแอคติวิตีเฉลี่ยประมาณ 58.1 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr โดยมีแอคติวิตีจนถึงการ transfer ครั้งที่ 7 ตัวอย่างที่ 5 ทำการ transfer 11 ครั้ง มีแอคติวิตีส่วนใหญ่ต่ำ ซึ่งบางครั้ง (ครั้งที่ 8) ไม่พบแอคติวิตี เฉลี่ยประมาณ 37 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr สำหรับตัวอย่างสุดท้ายมีแอคติวิตีสูง 400-1000 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr ทำการ transfer เพียง 4 ครั้ง แต่การ transfer ครั้งที่ 2 กลับไม่พบแอคติวิตีเลย

เนื่องแอคติวิตีที่วัดได้ระหว่างการ subculture แต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอจึงใช้วิธีคัดเลือกเฉพาะ culture ที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนสูงในบางตัวอย่างมาแยกบนอาหารวุ้นแข็งเป็นโคโลนีบริสุทธิ์ ตามวิธีข้อ 7.2 ได้แบคทีเรีย 3 ชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ซึ่งจะเรียกเป็น NF 1, NF 2 และ NF 3

6. <u>ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้</u> (NF 1, NF 2, NF 3)

เชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดที่แยกได้ มีความสามารถตรึงไนโตรเจนแต่ระดับของแอคติวิตีต่างกัน จึงได้ศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสี และ ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกันแล้ว นำเชื้อ NF 3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณโปรตีนสูงสุด มาศึกษาผลของอุณหภูมิและ pH ต่อการเจริญเติบโตและ ARA นอกจากนั้น ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงเชื้อกับ ARA อีกด้วย

ตารางที่ 8 ARA ของ subculture ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน

ใช้ culture ที่มี ARA สูง 1.0 มล. ปั่นแยกตะกอนแบคทีเรียไปอินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน 5.0 มล. ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. จากนั้นนำไปวัด ARA พร้อมทั้งวัดความขุ่นของ culture ที่ 500 nm

Subculture ครั้งที่	ARA (nmole C_2H_4/ml.OD_{500}.hr)					
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6
1	-ve	107.41	9.25	30.28	3.22	437.31
2	16.23	112.18	46.96	59.71	61.03	-ve
3	8.85	31.63	63.15	6.07	5.55	1143.71
4	2.59	125.90	109.41	76.36	27.59	369.70
5	3.97	204.50	103.16	30.78	60.21	ND
6	9.30	162.26	95.46	81.98	62.13	ND
7	12.65	226.27	204.29	121.83	130.38	ND
8	ND	166.73	-ve	-ve	-ve	ND
9	ND	223.21	-ve	-ve	12.51	ND
10	ND	158.51	8.39	-ve	32.76	ND
11	ND	70.17	56.62	ND	11.87	ND

ND = not determined

-ve = negative

6.1 ลักษณะโคโลนี

โคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเลี้ยงบนวุ้นแข็ง NF medium + 2% Rich medium ที่ 31 องศาเซลเซียส 1-2 วัน มีลักษณะเฉพาะตัวคือ (รูปที่ 12)

NF 1 โคโลนีกลมผิวเรียบสีขาว

NF 2 โคโลนีกลมผิวเรียบสีขาว โคโลนีที่เลี้ยงนานเกิน 1 สัปดาห์ จะผลิต mucous ออกมา

NF 3 โคโลนีกลมผิวเรียบสีเหลืองอ่อน

6.2 การติดสี Gram stain

แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เมื่อย้อมสีแบบ Gram stain แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 (รูปที่ 13) ปรากฏว่าทั้ง 3 ตัวเป็น Gram negative และมีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันคือ NF 1 และ NF 2 เป็น short rod ขนาดเล็ก ส่วน NF 3 เป็น short rod ขนาดใหญ่

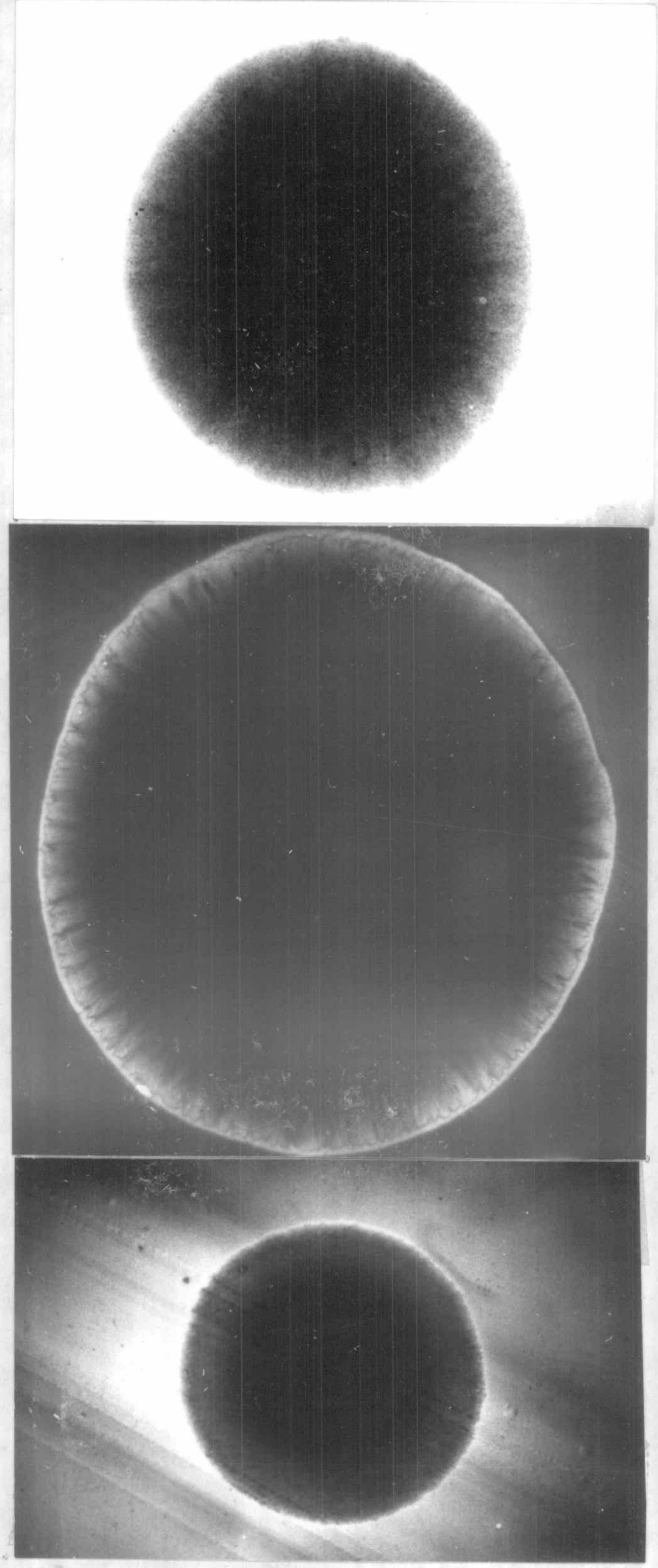
6.3 ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนที่เติม Rich medium 10% และอินคิวเบทใน aerobic condition ที่อุณหภูมิ 31-32 องศาเซลเซียส 24 ชม. ปิเปต culture 2 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อใหม่เป็น NF medium 2.0 มล. แล้วอินคิวเบทต่อ 4 ชม. จากนั้นหา ARA วัดความขุ่นของ culture ที่ 500 nm พร้อมทั้งหาปริมาณโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย จากตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบ ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ปรากฏว่า NF 3 มีแอคติวิตีสูงที่สุดคือ 0.892 umole C_2H_4/mg.hr หรือ 237.22 nmoleC_2H_4/ml.OD_{500}.hr ซึ่งประมาณ 30 เท่าของ NF 2 และประมาณ 4 เท่าของ NF 1

NF 1

NF 2

NF 3



<u>รูปที่ 12</u> ลักษณะโกโลนีของ NF 1, NF 2 และ NF 3 กำลังขยาย 160 เท่า

NF 1

NF 2

NF 3

รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์ของ NF 1, NF 2 และ NF 3 กำลังขยาย4000 เท่า

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบ ARA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์

เลี้ยงแบคทีเรีย NF 1, NF 2 และ NF 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (NF medium + 10% Rich medium) อินคิวเบทใน aerobic condition ที่ 31-32 องศาเซลเซียส 24 ชม. ปิเปต culture 2 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น NF medium 2.0 มล. อินคิวเบทต่อ 4 ชม. แล้วอุดจุกฉีดก๊าซอะเซทิลีน 0.75 มล. อินคิวเบทอีก 1 ชม. ตรวจหาก๊าซเอธิลีนที่เกิดขึ้นภายหลังอินคิวเบทด้วยเครื่อง GC วัดความขุ่นของ culture ที่ 500nm และหาโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียเพื่อคำนวณหา ARA ต่อปริมาณโปรตีน และ OD_{500}

แบคทีเรียบริสุทธิ์	ARA	
	$\frac{\mu mole\ C_2H_4}{mg\ Protien.hr}$	$\frac{nmole\ C_2H_4}{ml.OD_{500}.hr}$
NF 1	0.198	28.98
NF 2	0.033	5.07
NF 3	0.892	237.22

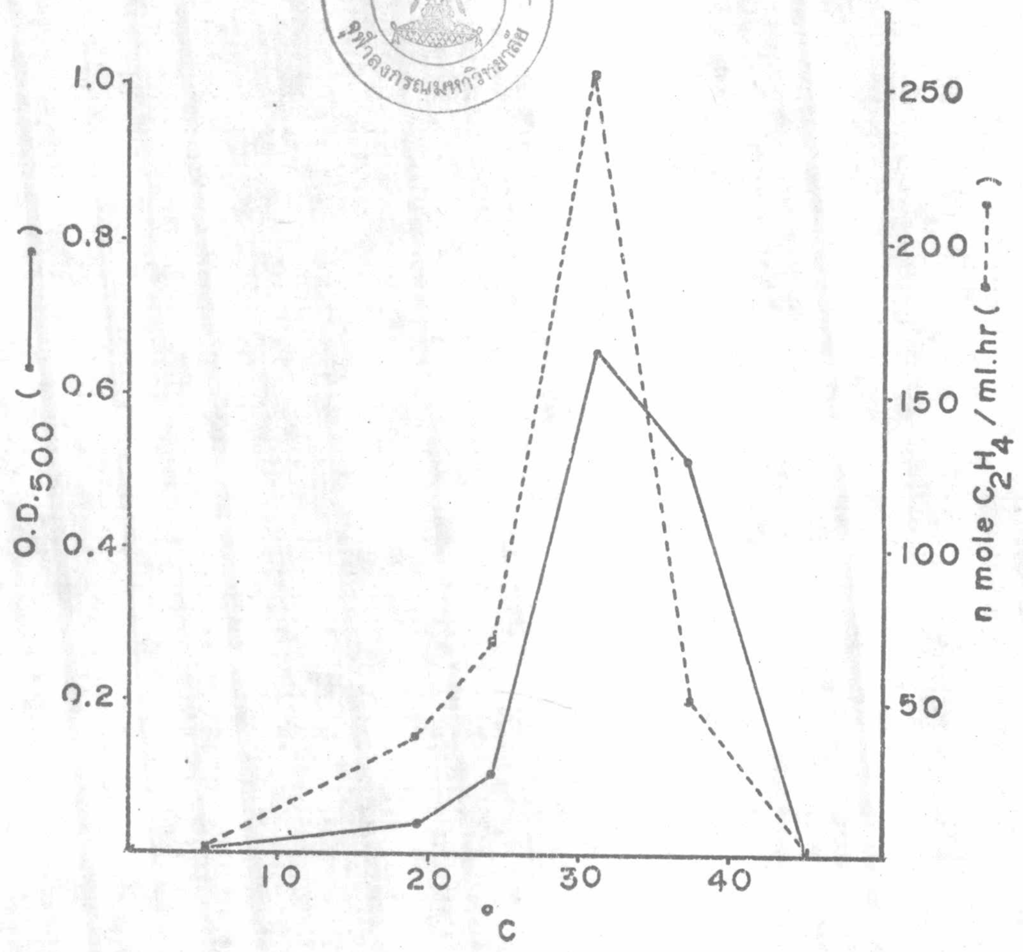
6.4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบ โตและ ARA ของแบคทีเรีย NF 3

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงเชื้อ (NF medium + 10% Rich medium) อินคิวเบทแบบ aerobic condition ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 5-45 องศาเซลเซียส 24 ชม. แล้ววัดความขุ่นของ culture ที่ 500nm ผลดังรูปที่ 14 แสดงว่า NF 3 โตได้ดีที่สุด เมื่ออินคิวเบทที่อุณหภูมิ 31-37 องศาเซลเซียส และวัด ARA ของ culture ซึ่งอินคิวเบทที่อุณหภูมิต่าง ๆ นี้ ในหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น NF medium อินคิวเบทที่อุณหภูมิเดิมอีก 4 ชม. แล้ววัด ARA ปรากฏว่า ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียสซึ่ง NF 3 เจริญได้ดีที่สุด มีแอกติวิตีสูงสุดด้วยถึง 250 nmoleC_2H_4/ml.hr

6.5 ผลของ pH น้ำเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและ ARA ของแบคทีเรีย NF 3

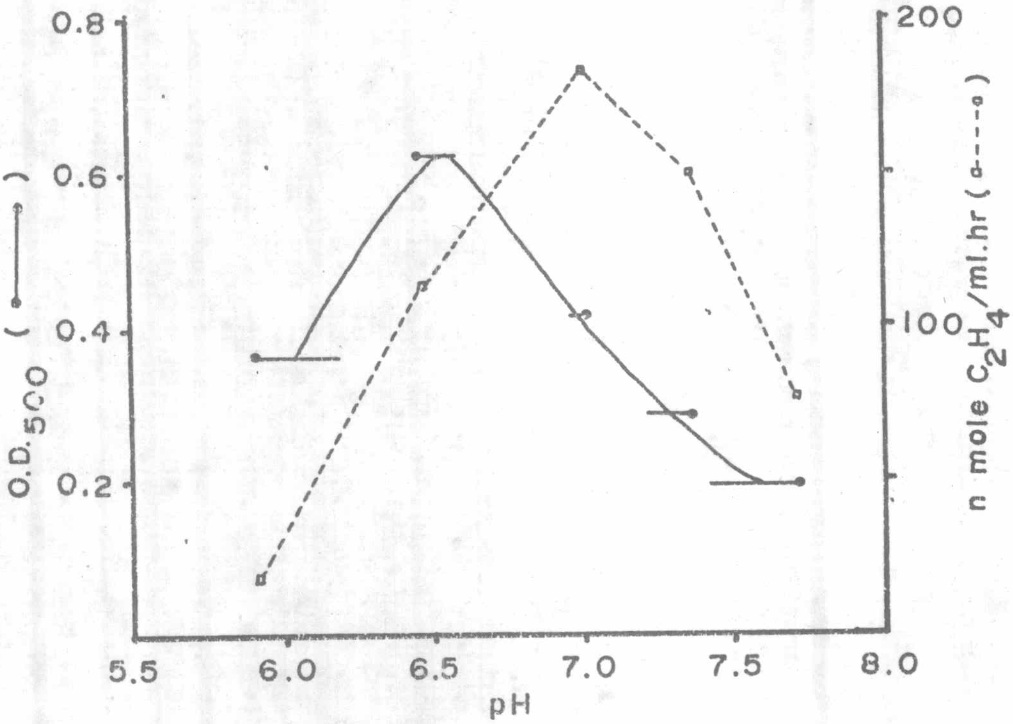
เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงเชื้อ (NF medium + 10% Rich medium) ซึ่งปรับให้มี pH ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5.9-7.7 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 M อินคิวเบทแบบ aerobic condition ที่ 31 องศาเซลเซียส 24 ชม. วัดความขุ่นของ culture ที่ 500 nm ผลดังรูปที่ 15 ปรากฏว่า NF 3 โตได้ดีที่สุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ประมาณ 6.5 น้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ค่อนข้างเป็นกรด เมื่อใช้เลี้ยงแบคทีเรีย 24 ชม. pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้น (pH 5.9 เพิ่มขึ้นเป็น 6.2) ตรงข้ามกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี pH ค่อนข้างเป็นด่าง เมื่อใช้เลี้ยงแบคทีเรีย 24 ชม. pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจะกลับลดลง (pH 7.7 เปลี่ยนเป็น 7.4) และเมื่อวัด ARA ของ culture ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน 24 ชม. นี้ ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำเลี้ยงเชื้อ NF medium ที่มี pH เช่นเดิม อินคิวเบทที่ 31 องศาเซลเซียส 4 ชม. แล้วหา ARA พบว่า ARA สูงสุดใน culture ที่มี pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 (180 nmoleC_2H_4/ml.hr)

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่ 14</u> ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและ ARA ของ NF 3

เลี้ยงแบคทีเรีย NF 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (N-F medium + 10% Rich medium) อินคิวเบทแบบ aerobic condition ที่อุณหภูมิ 5, 19, 24, 31,37 และ 45 องศาเซลเซียส 24ชม. วัดความขุ่นของ culture ที่ 500 nm ปิเปต culture 2 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น N-F medium ใช้ 2.0 มล. อินคิวเบทที่อุณหภูมิเดิมอีก 4 ชม. แล้วอุดจุก ฉีด C_2H_2 0.75 มล. ($^{P}C_2H_2$ 0.1 บรรยากาศ) อินคิวเบทอีก 1 ชม. ตรวจหาก๊าซเอธิลีนด้วยเครื่อง GC แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของ 4 ซ้ำ

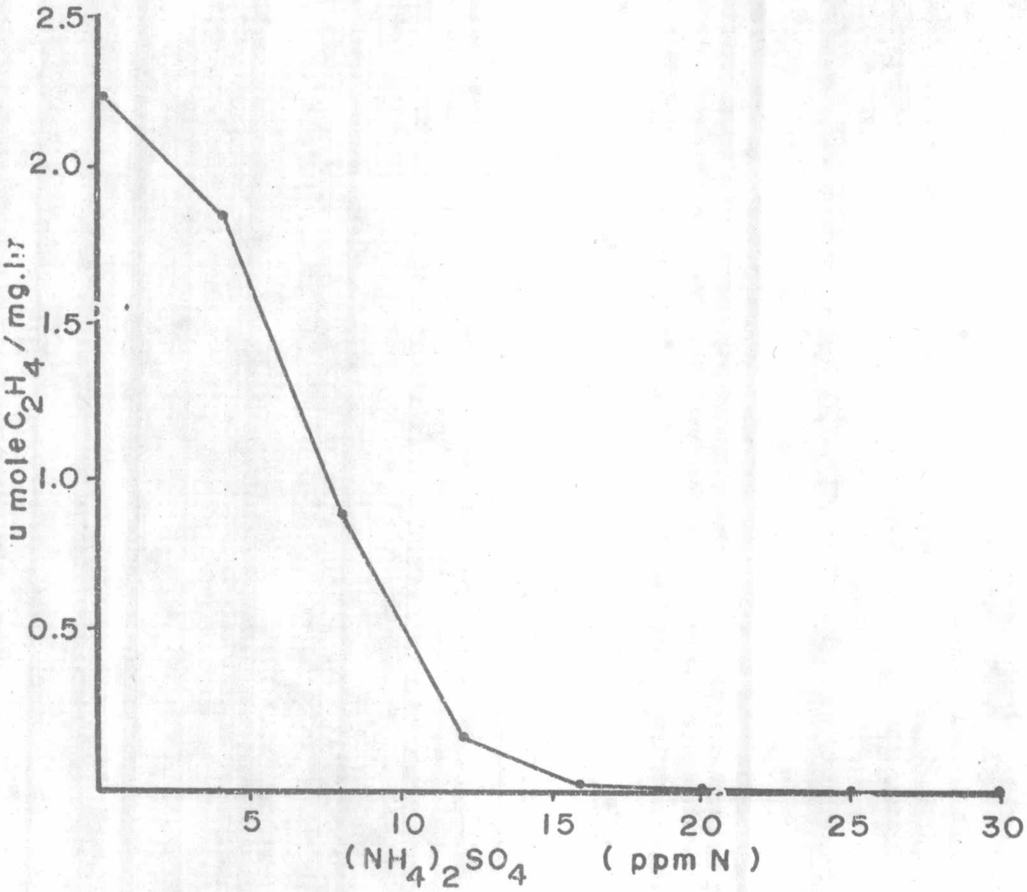


รูปที่ 15 อิทธิพลของ pHต่อการเจริญเติบโตและ ARA ของ NF 3

เลี้ยงแบคทีเรีย NF 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (N-F medium + 10% Rich medium) ซึ่งมี pH 5.90, 6.45, 7.00, 7;40 และ 7.7 (ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 M) อินคิวเบทแบบ aerobic conditionที่ 31 องศาเซลเซียส 24 ชม. วัดความขุ่นของ culture ที่ 500 nm ปิเปต culture 1.0 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น N-F medium ที่มี pH เท่าเดิม ใช้ 2.0 มล. อินคิวเบทที่ 31 องศาเซลเซียส 4 ชม. อุดจุก ฉีด C_2H_2 ให้ได้ 0.1 บรรยากาศ อินคิวเบทต่อ 1 ชม. ตรวจหาก๊าซเอธีลีนด้วยเครื่อง GC แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของ 4 ซ้ำ (•— pHเริ่มต้น)

6.6 ผลการเติมไนโตรเจน (Ammonium sulphate) ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนต่อ ARA ของแบคทีเรีย NF 3

จากการเลี้ยง NF 3 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (NF medium + 10% Rich medium) อินคิวเบทแบบ aerobic condition ที่ 31 องศาเซลเซียส 24 ชม. ใช้ culture 1.0 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อใหม่โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ NF medium ที่มี Ammonium sulphate จำนวนตั้งแต่ 0-30 ppm N อินคิวเบทที่ 31 องศาเซลเซียส 4 ชม. แล้วหา ARA ผลดังรูปที่ 16 แสดงว่า แบคทีเรียที่อินคิวเบทในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนจะมี ARA 2.3 umoleC_2H_4/mg.hr แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium sulphateในน้ำเลี้ยงเชื้อ ARA จะลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่าปริมาณ Ammonium sulphate ประมาณ 16 ppm N สามารถยับยั้ง ARA ได้อย่างสมบูรณ์



<u>รูปที่ 16</u> การเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนต่อ ARA ของ NF 3

เลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงเชื้อ (N-F medium + 10% Rich medium) อินคิวเบทแบบ aerobic condition ที่ 31 องศาเซลเซียส 24 ชม. ปิเปต culture 1.0 มล. ใส่หลอดทดลอง ปั่น เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเชื้อใหม่โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ N-F medium ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ จำนวน 0, 4, 8, 12, 16, 20, 25 และ 30 ppm N อินคิวเบทที่ 31 องศาเซลเซียส 4 ชม. อุดจุกฉีด C_2H_2 ให้ได้ 0.1 บรรยากาศ อินคิวเบทต่อ 1 ชม. ตรวจหาก๊าซเอธิลีนด้วยเครื่อง GC หาโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียโดยย่อยเซลล์ด้วย NaOH 0.1 N ที่ 90 องศาเซลเซียส 10-15 นาที หาโปรตีนที่ละลายอยู่ใน NaOH 0.1 N โดยวิธี Lowry