เอกสารอ้างอิง

นันทกร บุญเกิด, เย็นใจ วสุวัต และ ประพนธ์ วิไลรัตน์. 2536. การตรวจและปรับปรุงสายพันธุ์ไรโซเบียมโดยวิธีพันธุวิศวกรรม เพื่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและการผลิตเชื้อ รายงานการวิจัยเสนอต่อศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 52 หน้า

Adams, M.W.W., Mortenson, L.E. and Chen, J. 1981. Hydrogenase. Biochim. Biophys. Acta. 594:105-176.

Albrecht, S.L., Maier, R.J., Hanus, F.J., Russell, S.A., Emerich, D.W. and Evans, H.J. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases, nitrogen fixation by nodulated soybeans. Science. 203:1255-1257.

Arp, D.J. 1985. *Rhizobium japonicum* hydrogenase : purification to homogeneity from soybean nodules and molecular characterization. Arch. of Biochem. and Biophys. 237(2):504-512.

Basit, H.A., Angel, J.S., Salem, S., Gewaily, E.M., Kotob, S.I. and van Berkum, P. 1991. Phenotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. Appl. Environ. Microbiol. 57(5):1570-1572.

Barbara,D.J.and Clark, M.F.1982. A simple indirect ELISA using $F(ab')_2$ fragments of immunoglobulin. J.Gen.Virol. 58:315-322.

Berger, J.A., May, S.N., Berger, L.R. and Bohlool, B.B. 1979. Colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of strains of *Rhizobium* in culture and in the nodules of lentils. Appl. Environ. Microbiol. 39(3):642-646.

Brill, W.J. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiol. rev. 44(3):449-467.

Brown, C.M. and Dilworth, M.J. 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86:39-48.

Burns, R.C. and Hardy, R.W.F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. pp. 8-30. In Kleinzeller, A., Springer, G.F. and Wittmann, H.G.(eds.), New York : Spring-Verlag.

Burris, R.H. and Wilson, P.W. 1957.Methods for measurement of nitrogen fixation.Methods in Enzymology.4:355-366.

————, R.H. 1972. Nitrogen fixation assay methods and techniques. Methods in Enzymology. 24:415-452.

Chen, W.Y., Yan, G.H.and Li, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinohizobium* gen. nov. Int.J.Syst.Bacterriol. 38:392-397.

Cunningham, S.D., Kapulnik, Y., Brewin, N.J. and Phillips, D.A. 1985. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid pRL6J1 in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation.Appl. Environ. Microbiol. 50(4):791-794.

————, S.D., Kapulnik, Y. and Philips, D.A. 1986. Distribution of hydrogen-metabolizing bacteria in alfalfa field soil. Appl. Environ. Microbiol. 52(5):1091-1095.

Dixon, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Arch. Mikrobiol. 85:193-201.

Drevon,J.J.,Kalia,V.C.,Heckmann,M.O.and Salsac,L.1987. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. Appl.and Environ.Microbiol. 53(3):610-612.

Dudman, W.F. 1964. Immune diffusion analysis of the extracellular soluble antigens of two strains of *Rhizobium meliloti*. J.Bacteriol. 88(3):782-794.

Eisbrenner, G. and Evans, H.J. 1982. Carriers in electron transport from molecular hydrogen to oxygen in *Rhizobium japonicum* bacteroids. J. Bacteriol. 149(3):1005-1012.

————, G. and Evans, H.J. 1982. Spectral evidence for a component involved in hydrogen metabolism of soybean nodule bacteroids. Plant. Physiol. 70:1667-1672.

————, G. and Evans, H.J. 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. Ann. Rev. Plant. Physiol. 34:105-136.

Elkan, G.H. and Bunn, C.R. 1992. The rhizobia. In The procaryotes. 2nd. Edition. Balows, A., Trope, H., Dworkin, M. Harder, W., Schleifer,K-H.(eds) volume III Springer-Verlage. p.2196-2213.

Emerich, D.W., Ruiz-argueso, T., Ching, T.M. and Evans, H.J. 1979. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. J. Bacteriol. 137(1):153-160.

Evans, H.J., Harker, A.R., Papen, H., Russell, S.A., Hanus, F.J. and Zuber, M. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. Ann. Rev. Microbiol.41:335-361.

FAO.1994. Legume inoculants and their use. FAO (Italy), p.19.

Fu, C., Maier, R.J. 1993. A genetic region downstream of the hydrogenase structural genes of *Bradyrhizobium japonicum* that is required for hydrogenase processing. J. Bacteriol. 175 (1):295-298.

Fuhrmann, J. and Wollum, A.G. 1985. Simplified enzyme-linked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. Appl. Environ. Microbiol.49(4):1010-1013.

————, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean *Bradyrhizobium* as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. Appl.Environ. Microbiol. 56(1):224-229.

Halliday, J. and Somasegaran, P. 1984. Catalogue:*Rhizobium* Germplasm Resource. First Edition. University of Hawaii NifTAL project and MIRCEN. p.A-5,C-2.

Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. and Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation:laboratory and field evaluation. Plant. Physiol.43:1185-1207.

Hashen, F.M. and Angle, J.S. 1988. Rhizobiophage effects on *Bradyrhizobium japonicum*, nodulation and soybean growth. Soil. Biol. Biochem. 20 (1):67-73.

Hidalgo, E., Palacios, J.M., Murillo, J. and Ruiz-argueso, T. 1992. Nucleotide sequence and characterization of four additional genes of the hydrogenase structural operon from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. J. Bacteriol. 174(12):4130-4139.

Hugland, R.A., Cantrell, M.A., Beaty, J.S., Hanus, F.J., Russell, S.A. and Evans, H.J. 1984. Characterization of *Rhizobium japonicum* hydrogen uptake genes.J. Bacteriol.159:1006-1012.

Johnson, H.S. and Hume, D.J. 1973. Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content and acetylene reduction. Can. J. Microbiol.19:1165-1168.

Jordan,D.C.1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int.J. of Syst.Bacteriol. 32(1):138-139.

————, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae IN Krieg,N.R., Holt,J.G. (eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.I. Section 4. Gram-negative aerobic rods and cocci. p.234-256.

Kang,U.G.,Somasegaran,P.,Hoben, H.J.and Bohlool ,B.B.1991. Symbiotic potential , competitiveness, and serological properties of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to Korean soils. Appl. Environ. Microbiol. 57(4):1038-1045.

Keister, D.L. 1975. Acetylene reduction by pure culture of Rhizobia. J. Bacteriol.123(3):1265-1268.

————, D.L. and Evans, W.R. 1976. Oxygen requirement for acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. J. Bacteriol.129(1): 149-153.

Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu,T.S. and Weber,D.F. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. Science.215: 1631-1632.

————, H.H., Weber, D.F. and Uratsu, S.L. 1984. *Rhizobium japonicum* serogroup and hydrogenase phenotype distribution in 12 states. Appl. Environ. Microbiol.47(4):613-615.

Kim, H., Yu, C. and Maier, R.J. 1991. Common *cis*-acting region responsible for transcriptional regulation of *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase by nickel, oxygen and hydrogen. J. Bacteriol.173(3):3993-3999.

Kishinevsky, B. and Bar-Joseph, M. 1978. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogeae* nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Can. J. Microbiol.24:1537-1543.

————, B. and Gurfel, D. 1980. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological identification of different *Rhizobium* strains. J. Appl. Bacteriol.49:517-526.

Koch, B. and Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant. Physiol.41:1748-1750.

Kurz, W.G.W. and LaRue, T.A. 1975. Nitrogenase activity in Rhizobia in absence of plant host. Nature.256:407-409.

La Favre, J.S.and Focht,D.D.1983. Comparison of N_2 fixation and yields in *Cajanus cajan* between hydrogenase-positive and hydrogenase - negative rhizobia by *in situ* acetylene reduction assays and direct ^{15}N partitioning. Plant Physiol. 72:971-977.

LaRue, T.A. and Kurz, W.G.W. 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. Plant. Physiol. 51:1074-1075.

Ljones, T. and Burris, R.H. 1972. Continuous spectrophotometric assay for nitrogenase. Anal. Biochem.45:448-452.

Maier, R.J., Campbell,N.E.R., Hanus, F.J., Simpson,F.B., Russell,S.A., and Evans, H.J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. Prac. Natl. Acad. Sci. USA. 75(7):3258-3262.

————, R.J. 1986. Biochemistry,regulation and genetics of hydrogen oxidation in *Rhizobium*. CRC Crit. Rev. Biotech. 3(1):17-38.

Masterson, R.V., Prakash, R.K. and Atherly, A.G. 1985. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 163(1):21-26.

Mc Dermott,T.R.and Graham,P.H.1990. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum* . Appl. Environ.Microbiol. 47(4):607-612.

Minamisawa,K.1990. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen -uptake positive strains of *Bradyrhizibium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. Plant Cell Physiol. 31(1):81-89.

————,K.,Seki,T.,Onodera,S.,Kubota,M.and Asami, T.1992.Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequence and various other characteristics. Appl. Environ.Microbiol. 58(9):2832-2839.

Moawad,H.A.,Ellis,W.R.and Schmidt,E.L.1984. Rhizophere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. Appl. Environ.Microbiol. 47(4):607-612.

Morley, S.L. and Jones, D.G. 1980. A note on a highly sensitive modified ELISA technique for *Rhizobium* strain identification. J. Appl. Bacteriol. 49:103-109.

Nambiar, P.T.C. and Anjaiah ICRISAT.V. 1985. Enumeration of Rhizobia by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Appl. Bacteriol. 58:187-193.

Narula, N. and Tauro, P. 1988. Recent trends in biological nitrogen fixation. IN Advances in frontier areas of plant biochemistry. Edited by Singh, R. and Sawhney, S.K.p.253-280.

Noel,K.D.and Brill,W.J.1980.Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* population. Appl. Environ.Microbiol. 40(5):931-938.

Nutman, P.S.,F.R.S.1969. Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes. Proc. Roy. Soc. 172:417-437.

Pahwa, K. and Dogra, R.C. 1983. Uptake hydrogenase system in urd bean *(Vigna mungo) Rhizobium* in relation to nitrogen fixation. J. Appl. Bacteriol. 54:405-408.

Roberts, G.P., Leps, W.T, Silver, L.E. and Brill, W.J. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol.39(2):414-422.

Ruiz-argueso, T., Maier, R.J. and Evans, H.J. 1979. Hydrogen evolution from alfafa and clover nodules and hydrogen uptake by free-living *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 37:582-587.

Sayavedra-Soto, L.A., Powell, G.K., Evans, H.J. and Morris R.O. 1988. Nucleotide sequence of the genetic loci encoding subunits of *Bradyrhizobium japonicum* uptake hydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .85:8395-8399.

Schmidt, E.L., Bankole, R.O. and Bohlool, B.B. 1968. Fluorescent-antibody approach to study of rhizobia in soil. J. Bacteriol. 95(6):1987-1992.

Schubert, K.R. and Evans, H.J. 1976. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(4):1207-1211.

————, K.R., Jennings, N.T. and Evans, H.J. 1978. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. Plant. Physiol. 61:398-401.

Singleton, P.W., Bohlool, B.B. and Nakao, P.L. 1992. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. Soil Science of America and American Society of Agronomy.29:135-155.

Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii. Niftal project and MIRCEN. 367 pp.

————, P., Kang, U.G., Hoben H.J. and Bohlool, B.B. 1991. Symbiotic potential, competitiveness and serological properties of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to Korean soils. Appl. Environ. Microbiol.57(4):1038-1045.

Tjepkema, J. and Evans, H.J. 1975. Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium.65(2):625-628.

Van Soom, C., Rumjanek, N., Vanderleyden, J. and Neves, M.C.P. 1993. Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum* : genetics, regulation and effect on plant growth. World J. Microbiol. Biotech. 9:615-624.

Woomer,P., Singleton,P.W.and Bohlool,B..1988. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soil. Appl. Environ.Microbiol. 54(5):1112-1116.

Wynne, J.C., Elkan, G.H., Meisner, C.M., Schneweis, T.J. and Ligon, J.M. 1980. Greenhouse evaluations of strains of *Rhizobium* for peanuts. Agronomy J.72:645-649.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

(Somasegaran and Hoben, 1985)

1. YEAST MANNITOL BROTH

Mannitol	10.0 กรัม
KH_2PO_4	0.5 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
NaCl	0.1 กรัม
Yeast Extract	0.4 กรัม
น้ำกรอง	1.0 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. YEAST MANNITOL AGAR

Yeast Mannitol Broth	1.0 ลิตร
Agar	12.0 กรัม

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. YEAST MANNITOL AGAR-BROMTHYMOL BLUE

Bromthymol Blue Stock Solution

Bromthymol Blue	0.5 กรัม
Ethanol	100.0 มิลลิลิตร

เติม Bromthymol Blue Stock Solution 5 มิลลิลิตร ผสมกับ Yeast Mannitol Agar 1 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. YEAST MANNITOL AGAR-CONGO RED

Congo Red Stock Solution

Congo Red	0.25 กรัม
น้ำกรอง	100.0 มิลลิลิตร

เติม Congo Red Stock Solution 10 มิลลิลิตร ผสมกับ Yeast Mannitol Agar 1 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. WATER AGAR

Agar	7.5 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. N-FREE NUTRIENT SOLUTION

สารละลาย ก.(ต่อ 100 มิลลิลิตร)

$CaCl_2.2H_2O$	29.41 กรัม

สารละลาย ข.(ต่อ 100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	13.61 กรัม

สารละลาย ค.(ต่อ 100 มิลลิลิตร)

Fe-Citrate	0.61 กรัม
$MgSo_4.7H_2O$	12.33 กรัม
K_2SO_4	8.70 กรัม
$MnSo_4 \cdot H_2O$	0.0338 กรัม

สารละลาย ง.(ต่อ 100 มิลลิลิตร)

H_3BO_3	0.0247 กรัม
$ZnSo_4 \cdot 7H_2O$	0.0288 กรัม
$CuSo_4 \cdot 7H_2O$	0.0100 กรัม
$CoSo_4 \cdot 7H_2O$	0.0056 กรัม
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0048 กรัม

เจือจางสารละลาย ก. ถึง ง. อย่างละ 1 มิลลิลิตร ในน้ำกรองปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 เติมน้ำกรองให้ปริมาตรครบ 2 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหาร เติม KNO_3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 เปอร์เซนต์

7. อาหารสูตรดัดแปลงของ Maier และคณะ(1978)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250.0	มิลลิกรัม
iron EDTA	28.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
H_3BO_3	3.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	มิลลิกรัม
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	มิลลิกรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.04	มิลลิกรัม
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
KI	0.78	มิลลิกรัม
Inositol	100.0	มิลลิกรัม
Thiamine hydrochloride	10.0	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	1.0	มิลลิกรัม
Pyridoxal HCl	1.0	มิลลิกรัม
Sucrose	0.5	กรัม
L-Arabinose	1.0	กรัม
Sodium gluconate	0.5	กรัม
Sodium glutamate	0.5	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้มีค่า 5.5 เติมวุ้น Noble agar (Digco) 15.0 กรัมต่อลิตร ต้มให้วุ้นละลายตั้งทิ้งให้เย็นลงเล็กน้อยแล้วรีบเติม $Ni(NO_3)_2.6H_2O$ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุหลอดทดลองละ 8 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

(หมายเหตุ $Ni(NO_3)_2.6H_2O$ เป็นสารที่คาดว่าอาจทำให้เกิดโรคมะเร็งในปอด ถึงแม้ว่าจะใช้สารเคมีนี้ในปริมาณน้อย (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เวลาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จำเป็นต้องเพิ่มความระมัดระวัง และเตรียมอาหารในตู้ดูดควัน)

ภาคผนวก ช.

สารเคมีและบัฟเฟอร์

1. 95เปอร์เซนต์ เอทานอล

เอทานอล	95.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.0	มิลลิลิตร

2. 5เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

35เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

3. 0.85เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

4. สารละลาย Crystal violet

Crystal violet	10.0	กรัม
Ammonium oxalate	4.0	กรัม
Ethanol	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร

5. สารละลาย Iodine

Iodine	1.0	กรัม
Potassium	2.0	กรัม
Ethanol	25.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

6. สารละลาย Counterstain

2.5เปอร์เซนต์ Safranin in ethanol	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

7. สารละลายแบเรียมซัลเฟตมาตรฐานของ McFarland

Somasegaran & Hoben (1985) รายงานว่าความขุ่นของสารละลายแบเรียมซัลเฟตมาตรฐานของ McFarland ซึ่งมีความขุ่นในระดับต่าง ๆ จะมีจำนวนเซลของแบคทีเรียต่าง ๆ ดังแสดงในตารางต่อไปนี้ ดังนั้นในการทดลองใช้เบรดิไรโซเบียมเป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA ต้องการใช้ปริมาณเซลประมาณ $1x10^9$ เซลต่อมิลลิลิตร จึงปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร เท่ากับ 0.48

หลอดทดลอง	แบเรียมคลอไรด์ 1% (มิลลิลิตร)	กรดซัลฟูริค 1% (มิลลิลิตร)	ปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ ($x10^9$ เซลต่อมิลลิลิตร)	OD_{680}
1	0.1	9.9	0.3	0.157
2	0.2	9.8	0.6	0.306
3	0.3	9.7	0.9	0.436
4	0.4	9.6	1.2	0.575
5	0.5	9.5	1.5	0.691
6	0.6	9.4	1.8	0.819
7	0.7	9.3	2.1	0.911
8	0.8	9.2	2.4	1.009
9	0.9	9.1	2.7	1.113
10	1.0	9.0	3.0	1.216

สารเคมีสำหรับทำ ELISA

8. Coating buffer : Carbonate buffer 0.05 โมลาร์

Na_2CO_3	1.59 กรัม
$NaHCO_3$	2.93 กรัม
NaN_3	0.20 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ปรับค่าพีเอชที่ 9.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Phosphate Buffered Saline (PBS) 0.15 โมลาร์

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.9 กรัม
NaN_3	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ปรับค่าพีเอชที่ 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Washing solution : PBST

PBS	1.0 ลิตร
Tween-20	0.5 มิลลิลิตร

11. Enzyme Substrate preparation

Diethanolamine	97.0	มิลลิลิตร
NaN_3	0.2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับพีเอช 9.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

P-nitrophenyl phosphate 0.75 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร สารละลาย Diethanolamine (เตรียมเท่าที่ต้องการใช้ ไม่ควรเก็บไว้)

12. Stop reaction solution : 3 โมลาร์ NaOH

NaOH	120.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. Blocking reagent : 3% skim milk in PBS

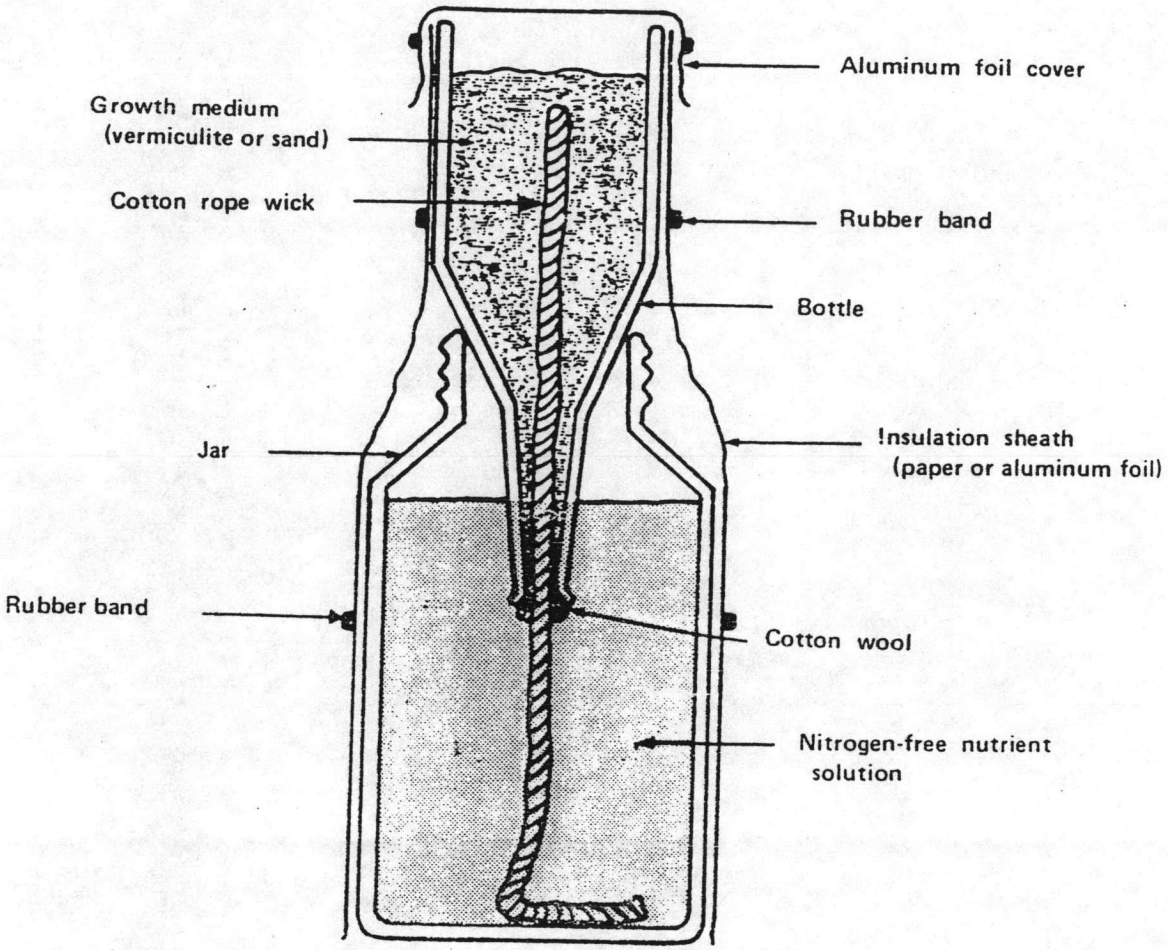
skim milk	3.0	กรัม
PBS	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค.

วิธีเตรียม Leonard jars(Somasegaran & Hoben,1985)

นำขวดเบียร์มาตัดบริเวณก้นขวดออกให้เหลือปริมาตรขวด 700 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหงายลงในขวดเนสกาแฟขนาดใหญ่ ปากขวดเบียร์จะอยู่ห่างจากก้นขวดกาแฟ 2-3 เซนติเมตร ใช้สำลีอุดปากขวดเบียร์ โดยมี cotton rope wick ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ยาว 45-50 เซนติเมตร เป็นแกนกลางอยู่ภายในขวด ความยาววัดจากปากขวดประมาณ 10 เซนติเมตร (ก่อนใช้ควรต้ม cotton rope wick เพื่อไล่ฟองอากาศออก นำไปอบให้แห้งจึงนำมาประกอบ)

ร่อนทรายผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่องว่าง (mesh size) น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ล้างทรายจนสะอาด นำไปอบให้แห้ง นำไปใส่ขวดเบียร์ โดยให้ cotton rope wick อยู่ตรงกลาง จนทรายเต็มขวด เติมอาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนตามสูตรอาหารในภาคผนวก ก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทรายจะอิ่มตัว สารละลายส่วนที่เหลือจะไหลไปรวมกันในขวดเนสกาแฟ หุ้มชุด Leonard jar ด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5-2.0 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น รูปที่ 18 แสดงไดอะแกรมของ Leonard jar



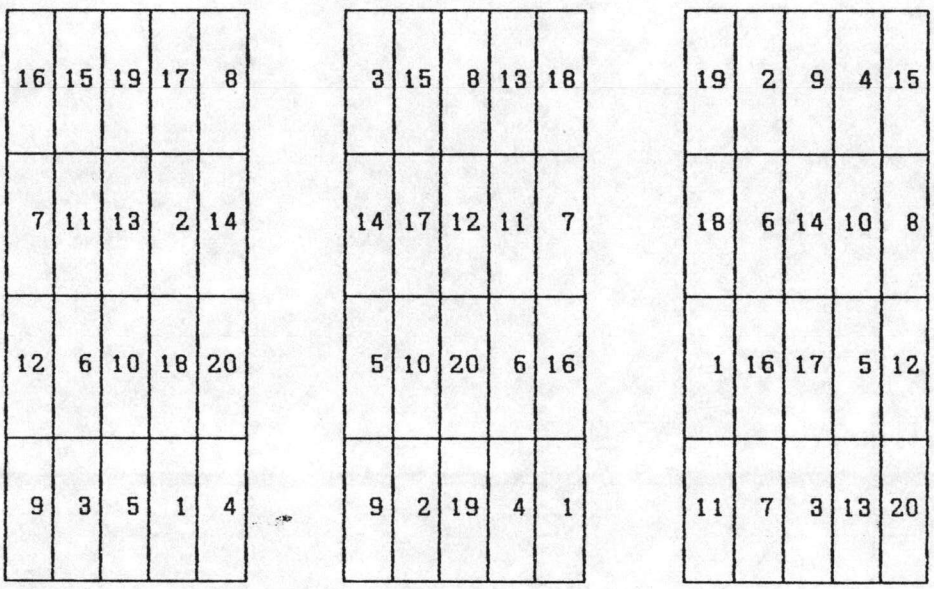
รูปที่ 20 ไดอะแกรมของ Leonard jar (Somasegaran and Hoben, 1985)

วิธีการปลูกถั่วเหลืองลงในขวด Leonard jar

ขุดหลุมทรายโดยใช้วัสดุที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 3 หลุมต่อ 1 Leonard jar ความลึก 2 เซนติเมตร ใช้คีมที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบเมล็ดถั่วที่เพาะเตรียมไว้มีขนาดความยาวของราก 0.5-1.0 เซนติเมตร ใส่ลงไปในหลุม โดยให้รากอยู่ก้นหลุม ควรให้เมล็ดถั่วเหลืองอยู่ต่ำกว่าปากหลุมประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นกลบทรายไว้ด้านบนหลุม (อย่ากดทรายจนแน่น เพราะจะทำให้เมล็ดถั่วเหลืองเน่าตายได้)

ภาคผนวก ง.

การออกแบบการทดลองแบบ randomized complete block



รูปที่ 21 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ randomized complete block design ในการทดลองนี้ใช้ทั้งหมด 3 บล๊อค 20 treatments จะทำซ้ำในแต่ละบล็อค

1 หมายเลข คือจำนวน treatment(*B. japonicum*) 1 treatment ใน 1 บล๊อค มี 20 treatments จัดวางแต่ละตำแหน่งๆละ 1 treatment โดยใช้วิธี randomized complete block design คือทุกบล๊อค แต่ละตำแหน่งจะถูกสุ่มด้วยโอกาสที่เท่าๆกัน

หมายเลข 1 เป็นสภาวะควบคุม ไม่ใส่ *B. japonicum* แต่เติม KNO_3 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

หมายเลข 2 เป็นสภาวะควบคุม ไม่ใส่ *B. japonicum* ใช้สารละลายอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

หมายเลข 3 ถึง 20 ใส่ *B. japonicum* แต่ละสายพันธุ์ ใช้สารละลายอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

1. วิธีคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตโดย *Bredyrhizobium japonicum*

ทำการทดลองหาไฮโดรเจนที่ระดับน้ำทะเล ซึ่งมีความดัน 743 มิลลิเมตรปรอท และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส(301 องศาเคลวิน)(Hanus et al.,1980)

ฉีดกาซไฮโดรเจน 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เข้าเครื่อง GC คิดเป็นปริมาตรไฮโดรเจน

= (10 x 0.5)/100

= 0.05 มิลลิลิตร

= 50 ไมโครลิตร

คิดเป็นปริมาตรไฮโดรเจนที่อุณหภูมิและความดันปกติ(STP) โดยใช้กฎความสัมพันธ์ระหว่างกาซดังนี้

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2}$$

โดย P_1 = 760 มิลลิเมตรปรอท ; V_1 = X ; T_1 = 273 องศาเคลวิน

P_2 = 743 มิลลิเมตรปรอท ; V_2 = 50 ไมโครลิตร ; T_2 =(273+28°ซ) = 301°K

ดังนั้นปริมาตรไฮโดรเจนที่อุณหภูมิและความดันปกติ

$$= \frac{743}{760} \times 50 \times \frac{273}{301}$$

= 44.3 ไมโครลิตร

เนื่องจากกาซ 22.4 ไมโครลิตรที่ STP = 1 ไมโครโมล

ดังนั้นจำนวนไมโครของกาซไฮโดรเจนที่ฉีดเข้าเครื่อ GC

$$= \frac{44.3}{22.4}$$

= 2.0 ไมโครโมล

จำนวนไมโครโมลของไฮโดรเจนต่อ 19.5 มิลลิลิตร = $\frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของตัวอย่าง} \times 2.0 \times 19.5}{\text{ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคของไฮโดรเจน} \times 0.5}$

2. วิธีคำนวณหาแอคติวิตี้ของการรีดิวซ์อะเซทิลีน

การหาจำนวนไมโครโมลของเอทิลีนมาตรฐาน

เจือจางเอทิลีน 1 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ซึ่งบรรจุอากาศ 2,200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นฉีดตัวอย่างกาซเอทิลีนที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตรเข้าเครื่องจีซีคิดเป็นปริมาตรของเอทิลีน

$= \frac{1}{2,200} \times 10^3 = 0.45$ ไมโครลิตร คิดเป็นปริมาตรของเอทิลีนที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (STP) โดยใช้กฎความสัมพันธ์ระหว่างกาซดังนี้

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2}$$

$P_1 = 760$ มิลลิเมตรปรอท ; $V_1 = x$; $T_1 = 273\ ^\circ K$

$P_2 = 743$ มิลลิเมตรปรอท ; $V_2 = 0.45$ ไมโครลิตร ; $T_2 = 301\ ^\circ K$

ดังนั้น $V_1 = \frac{743 \times 0.45 \times 273}{301 \times 760} = 0.40$ ไมโครลิตร

กาซ 22.4 ไมโครลิตรที่ STP มีจำนวน 1 ไมโครโมล

กาซ 0.4 ไมโครลิตรที่ STP มีจำนวน $\frac{0.4}{22.4} = 0.02$ ไมโครโมล

ดังนั้นจำนวนไมโครโมลในตัวอย่างกาซ $= \frac{0.02 \times \text{พื้นที่ใต้พีคของตัวอย่าง}}{\text{ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคของเอทิลีน}}$

สมมุติให้ปริมาตรฟลาสค์ 250 มิลลิลิตรที่บรรจุปมรากต้นถั่วเหลืองเท่ากับ 250 มิลลิลิตร โดยไม่คิดปริมาตรของปมรากถั่วเหลือง

จะได้จำนวนไมโครโมลเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อต้นถั่วต่อเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ

$= \frac{0.02 \times \text{พื้นที่ใต้พีคของตัวอย่าง} \times 250 \text{ มิลลิลิตร}}{\text{ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคของเอทิลีน} \times 2 \text{ ต้น}}$

595

ประวัติผู้เขียน

นางสาว จิรพรรณ ทวีสุขสมบัติ เกิดเมื่อวันที่ 2 มกราคม 2511 ที่อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2532