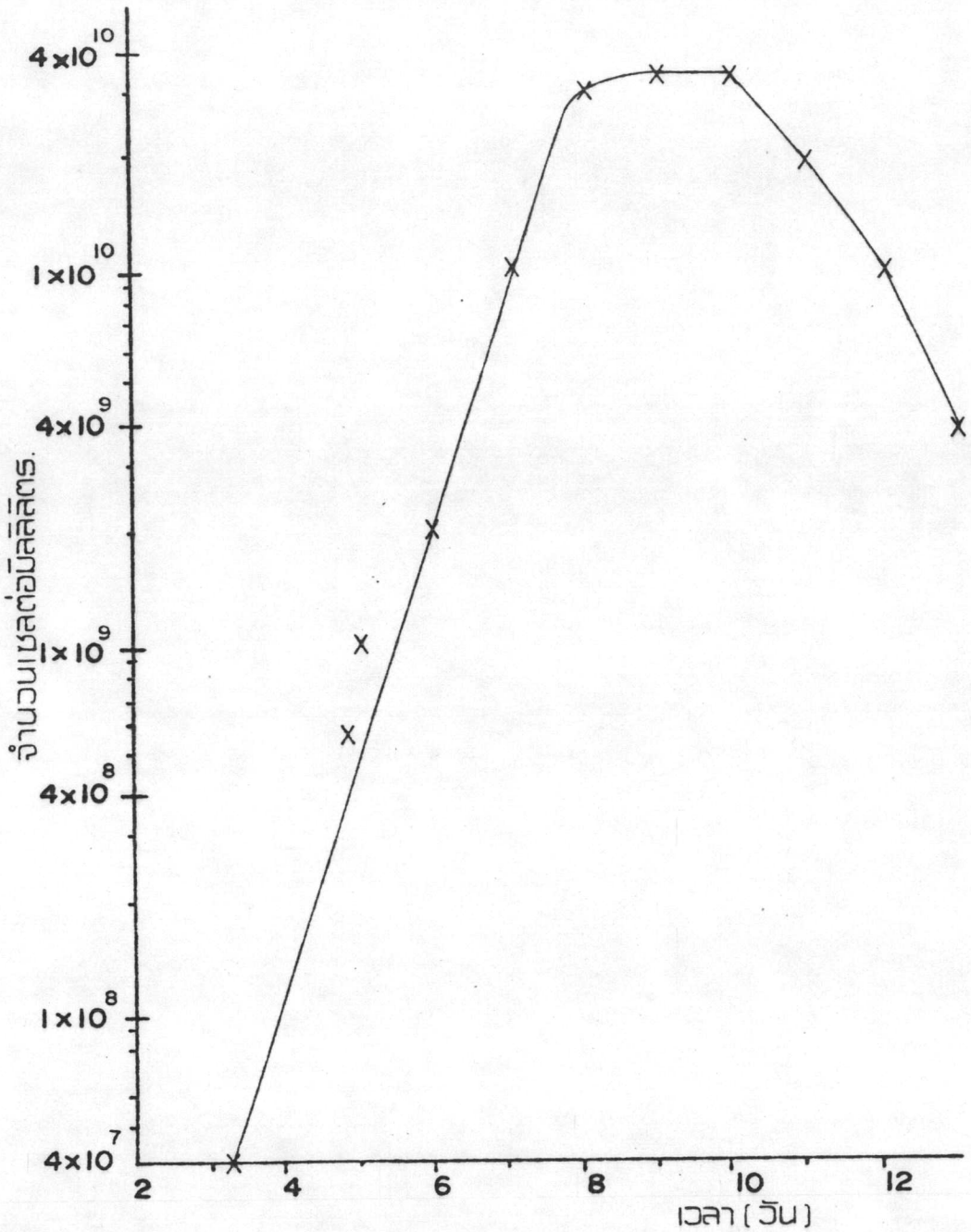
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

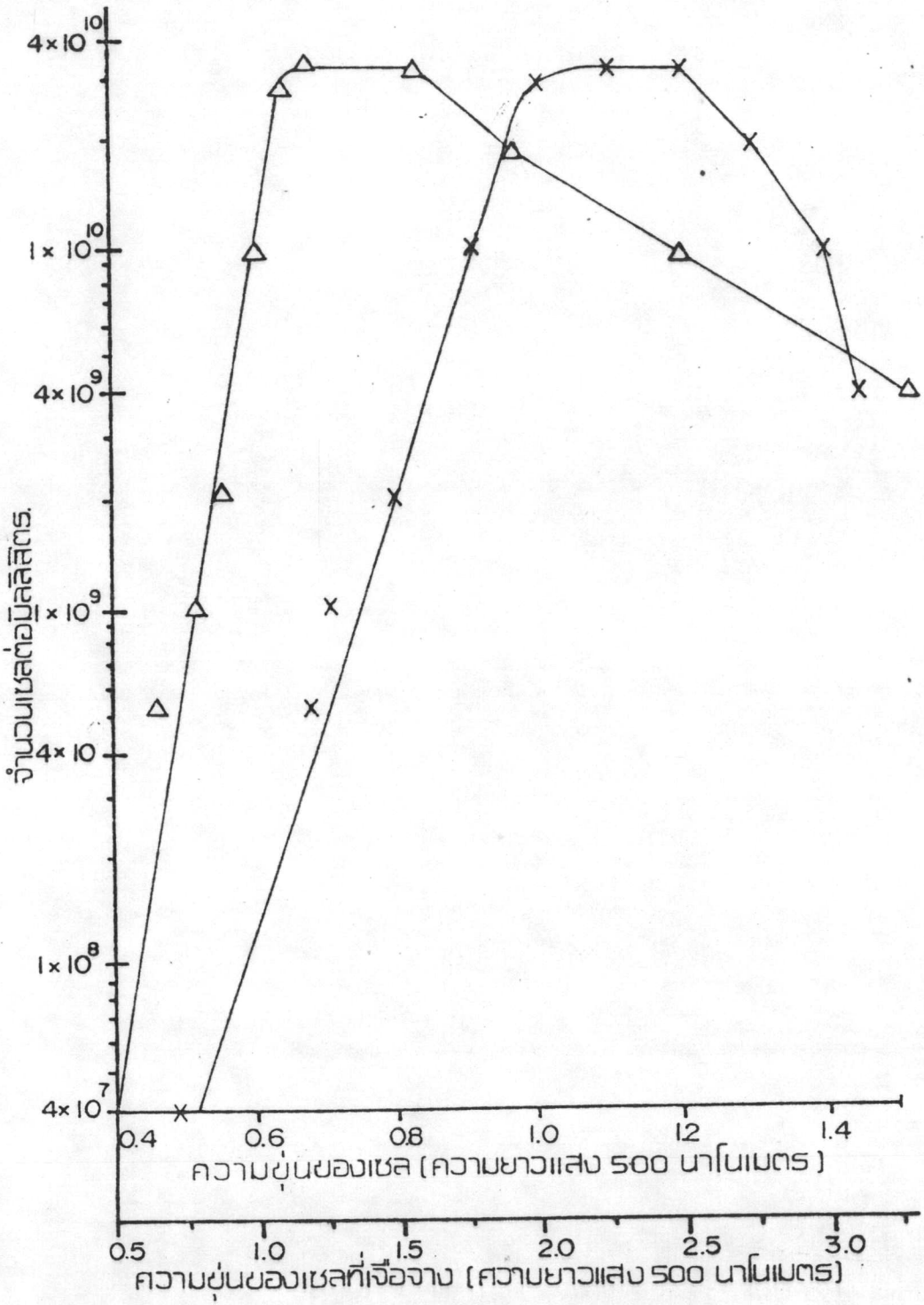
1. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับค่าความเข้มของการดูดแสง

โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอาจวัดได้โดยอาศัยการนับจำนวนเซลที่มีชีวิต (viable cell count) หรือสังเกตจากค่าความเข้มของการดูดแสงที่ระยะเวลาแตกต่างกัน สำหรับไรโซเบียม ถ้าต้องการติดตามการเจริญเติบโตด้วยการวัดการดูดแสงแล้ว ค่าความเข้มของการดูดแสงที่สังเกตได้อาจถูกกระทบจากเมือกที่ขับออกมาในระหว่างการเจริญเติบโตได้ หนทางหนึ่งที่จะศึกษาถึงผลกระทบอันนี้จึงได้ทดลองเปรียบเทียบจำนวนเซลที่มีชีวิตกับค่าการดูดแสงตลอดช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลที่นับได้กับเวลา พบว่าในสภาวะที่กำหนดให้นี้การแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 อยู่ในคาบเวลา 3 - 8 วัน ระยะเวลาในการแบ่งตัวสองเท่ามีค่าประมาณ 16 ชั่วโมง รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลที่มีชีวิตกับค่าความเข้มการดูดแสงที่ความยาวแสง 500 นาโนเมตร พบว่าความสัมพันธ์นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อกันในช่วงเวลา 8 วัน (เหมือนกันกับการเปรียบเทียบที่แสดงในรูปที่ 1 เช่นกัน) หลังจากนั้นจำนวนเซลจะลดลงถึงแม้ว่าความขุ่นของเซลจะเพิ่มขึ้นก็ตาม และเมื่อนำเซลในแต่ละช่วงเวลามาทำให้เจือจางแล้ววัดการดูดแสงก็จะพบว่ามีรูปแบบเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 2 แต่ที่ความเข้มของการดูดแสงซึ่งมีค่าสูงกว่า 0.70 นั้น จะพบว่าค่าที่วัดได้จากเซลซึ่งเจือจางจะให้ค่าการดูดแสงสูงกว่าที่ไม่เจือจาง (แสดงไว้ในตารางที่ 1) แต่ลักษณะการโค้งของเส้นจะเป็นรูปแบบเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถ้าระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตไม่เกิน 8 วัน ในการทดลองต่อไปนี้จึงได้ใช้การวัดความเข้มของการดูดแสงโดยไม่เจือจางเซลเป็นดรรชนีแสดงถึงการเจริญเติบโตของไรโซเบียม



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลและระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรีย

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลและการเจริญของแบคทีเรียที่ความยาวแสง 500 นาโนเมตร

X——X——X หมายถึง ความขุ่นของเซลที่ไม่เจือจาง

△——△——△ หมายถึง ความขุ่นของเซลที่เจือจาง

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลที่มีชีวิตกับค่าความเข้มของการดูดแสงที่ไม่เจือจางและเจือจาง[1]

ระยะเวลา (วัน)	ความขุ่นของเซล (ความยาวแสง 500 นาโนเมตร)	ความขุ่นของเซลที่เจือจาง (ความยาวแสง 500 นาโนเมตร)	จำนวนเซลที่มีชีวิต (จำนวนเซลต่อมิลลิลิตร)
3.3	0.49	0.49	4.0×10^{7}
4.8	0.65	0.65	5.8×10^{8}
5.0	0.70	0.80	1.0×10^{9}
6.0	0.80	0.90	2.0×10^{9}
7.0	0.90	1.02	1.0×10^{10}
8.0	1.00	1.16	3.0×10^{10}
9.0	1.10	1.28	3.3×10^{10}
10.0	1.20	1.62	3.3×10^{10}
11.0	1.30	1.92	2.0×10^{10}
12.0	1.40	2.56	1.0×10^{10}
13.0	1.45	3.30	3.9×10^{9}

1. รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 1 ข้อ 6.1)

2. ลักษณะการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

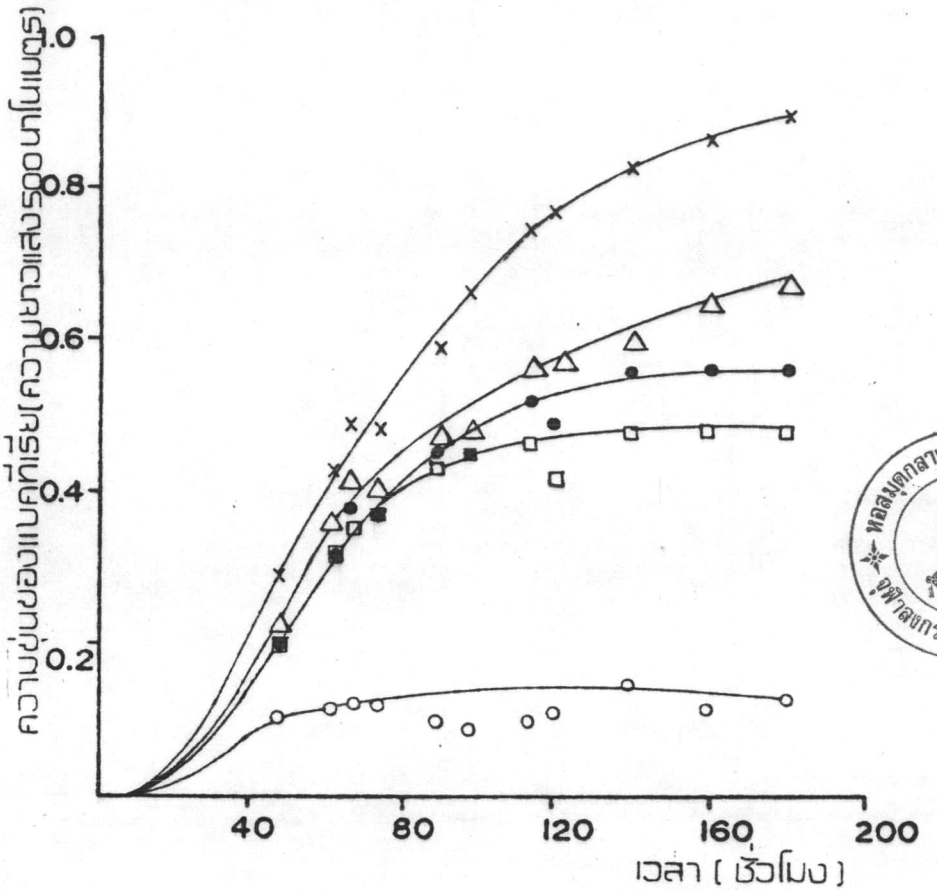
เพื่อเปรียบเทียบลักษณะการใช้สารต้นตอคาร์บอนของไรโซเบียม จึงศึกษาการเจริญเติบโตของมันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมยีสต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) และอาหารสูตรปรับต่ำของเบอร์เกอเส่น (สูตรอาหารที่ 3.5) โดยมีกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และซัคซีเนท เป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับแมนนิทอล จากการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มตัวของมันในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง พบว่าเชื้อไรโซเบียมนี้สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลกลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม โดยให้ค่าระยะเพิ่มตัวเป็นสองเท่าเร็วกว่าประมาณ 2 เท่าผลแสดงในตารางที่ 2 ส่วนฟรุคโตสพบว่ามันสามารถเจริญเติบโตได้ดีพัดเทียมกันในสารอาหารทั้งสอง สำหรับซัคซีเนทนั้นมีการเจริญเติบโตน้อยมากในสารอาหารทั้งสองนี้ อย่างไรก็ตามก็พบว่ายังคงเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้ดีกว่าในอาหารสูตรอุดม ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4

3. สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ในสภาพอิสระ

ปกติไรโซเบียมที่มีการเจริญเติบโตในสภาพอิสระจะไม่พบว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์อะเซทีลีน ยกเว้นการเจริญเติบโตจะอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ปัจจัยที่กำหนดความเหมาะสมมีอยู่หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ชนิดสารต้นตอคาร์บอน ไนโตรเจน การปรับบรรยากาศออกซิเจน เป็นต้น การทดลองนี้ได้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ อันอาจมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้มีการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส เพื่อใช้เป็นรากฐานในการศึกษาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียมและคอนจูแกนท์ของมันต่อไป

3.1 ผลของการปรับบรรยากาศออกซิเจน

ทราบกันดีแล้วว่าแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกทำลายได้โดยกาซออกซิเจน ดังนั้นการควบคุมบรรยากาศของกาซออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยแรกที่ได้ทดลอง จากการปรับบรรยากาศของกาซออกซิเจนในขณะที่มันเจริญเติบโตโดยวิธีการหลาย ๆ แบบ พบว่าการ



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.1 รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 6.2)

× — × — × หมายถึง ฟรุคโตส เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

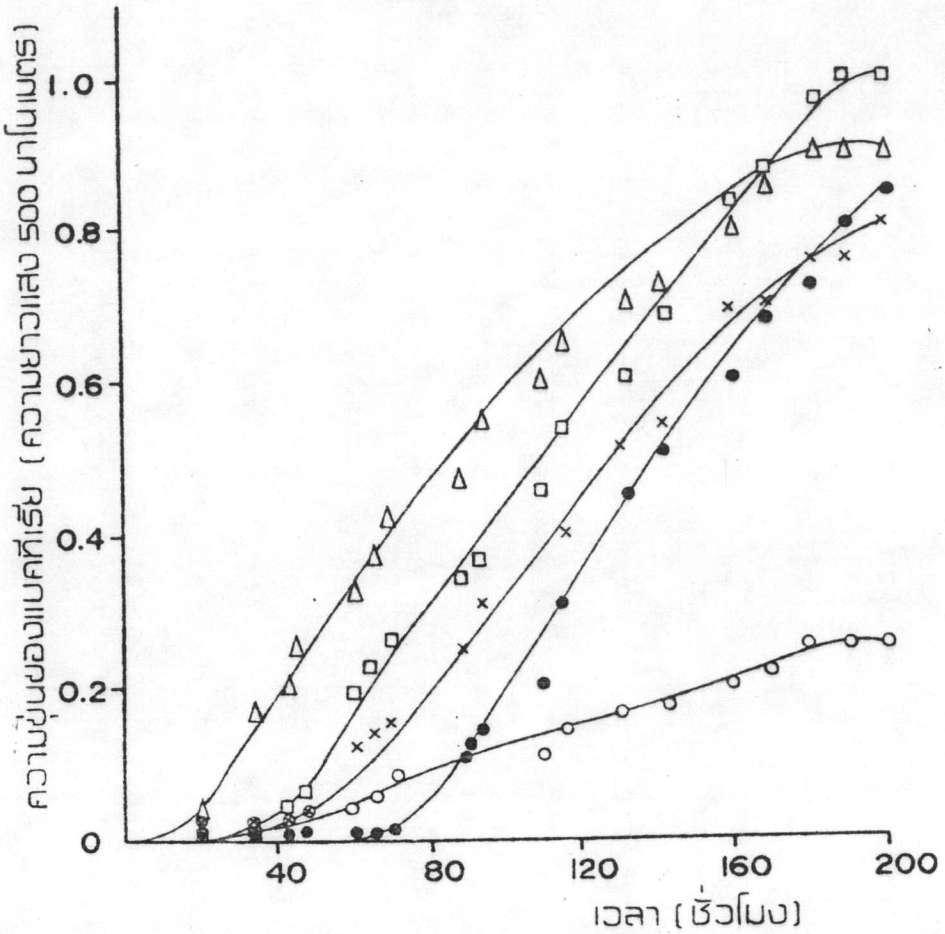
△ — △ — △ หมายถึง แมนนิทอล เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

● — ● — ● หมายถึง กลูโคส เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

□ — □ — □ หมายถึง ซูโครส เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

○ — ○ — ○ หมายถึง ซัคซิเนท เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.5 รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ6.2)

×—×—×	หมายถึง	ฟรุคโตส	เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน
△—△—△	หมายถึง	แมนนิทอล	เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน
●—●—●	หมายถึง	กลูโคส	เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน
□—□—□	หมายถึง	ซูโครส	เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน
○—○—○	หมายถึง	ซัคซิเนท	เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การใช้สารต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122[1]

สารต้นตอคาร์บอน	ระยะเพิ่มตัวเป็นสองเท่าในอาหารสูตรอุตม บีสต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1)[2]	ระยะเพิ่มตัวเป็นสองเท่าในอาหารสูตรปรับ ต่ำเบอร์เกอเสน (สูตรอาหารที่ 3.5)[2]
แมนนิทอล	24	12
กลูโคส	28	16
ฟรุคโตส	16	17
ซูโครส	28	14
ซัคซิเนท	ช้ามาก	ช้ามาก

1. รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 6.2)

2. ค่าที่แสดงเป็นค่าการเพิ่มตัวสองเท่าในระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณเป็นชั่วโมง

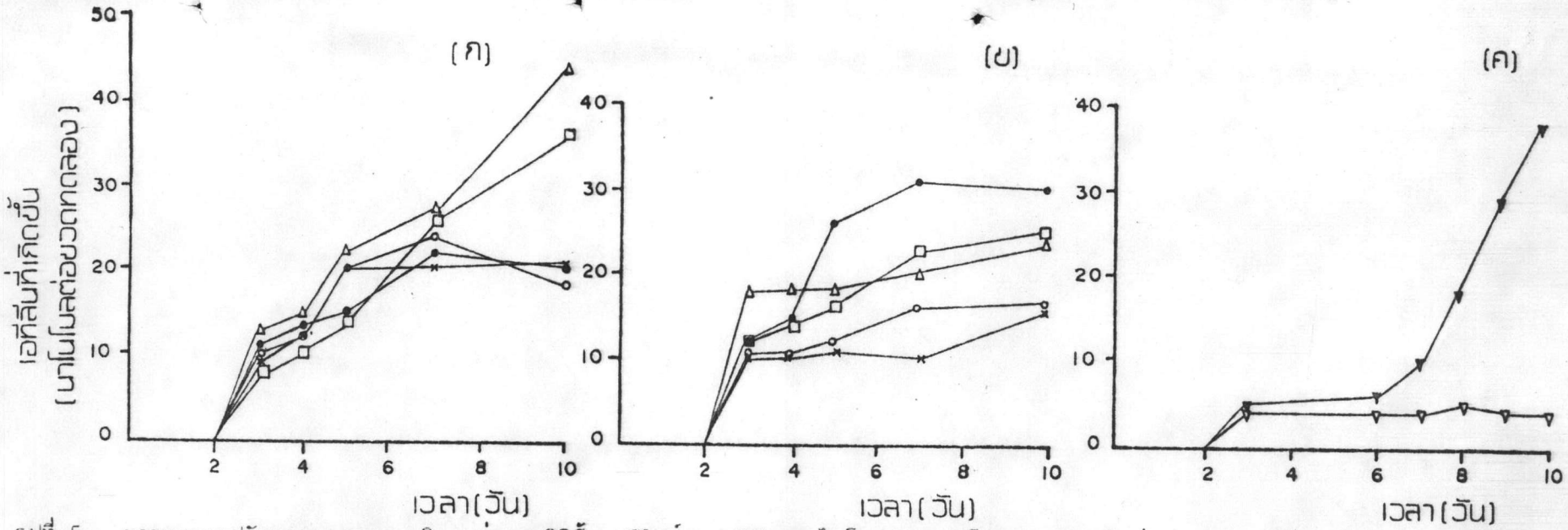
เจริญเติบโตของไรโซเบียมเมื่อมีความดันบรรยากาศของกาซออกซิเจนเท่ากับ 0.76 มิลลิเมตรปรอท จะให้แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดคือ 44 นาโนโมลต่อขวดทดลอง การทดลองนี้จะต้องปรับบรรยากาศของกาซออกซิเจนโดยการฉีดกาซออกซิเจนทุกวัน คือปรับปลังจากบ่มไปได้สองวัน แต่ถ้าปรับบรรยากาศของกาซออกซิเจนเพียงครั้งเดียวหลังจากบ่มไปได้สองวัน ผลจะกลับเป็นว่าการปรับบรรยากาศออกซิเจนที่ 1.6 มิลลิเมตรปรอทนั้นจะให้ค่าแอคติวิตี้สูงสุดเพียง 31 นาโนโมลต่อขวดทดลอง เนื่องจากแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนค่อนข้างต่ำ จำนวนกาซที่ต้องใช้ทดสอบมีปริมาณสูงมากถึง 0.5 มิลลิเมตร ด้วยเหตุนี้จึงได้ทดลองปรับบรรยากาศรวมของขวดทดลองให้คงที่โดยใส่อาร์กอนลงไปแทน จากการทดลองปรับบรรยากาศให้คงที่นี้ พบว่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนจะค่อนข้างต่ำตลอดการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5

เมื่อนำค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนกับความดันบรรยากาศออกซิเจนมาเปรียบเทียบจากรูปที่ 6 (ก) พบว่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนจะสูงสุดที่ 0.76 มิลลิเมตรปรอทเท่ากับ 44 นาโนโมลต่อขวดทดลอง โดยปรับความดันทุกวันในขณะที่วิธีการปรับความดันบรรยากาศของออกซิเจนแบบวิธีที่สองให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดเพียง 31 นาโนโมลต่อขวดทดลอง ดังแสดงในรูป 6 (ข)

จากผลการทดลองนี้พอสรุปได้ว่าความดันบรรยากาศของออกซิเจนที่เหมาะสมในการทดลองหาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนควรเป็น 0.76 มิลลิเมตรปรอทและความดันนี้จำเป็นต้องปรับระดับทุกวัน

3.2 <u>ผลของแหล่งต้นตอไนโตรเจน</u>

โดยทั่วไปยีนไนโตรจีเนสจะถูกถอดแบบเป็นเอ็นไซม์ได้ จะต้องมีสารต้นตอไนโตรเจน เช่น อนุมูลแอมโมเนียมหรือกลูตาเมทไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Parejko, R.A., and Wilson, P.W. 1970, O' Gara, F., and Shanmugum, K.T. 1977) และเอ็นไซม์จะตื่นตัวเมื่อความดันบรรยากาศออกซิเจนต่ำมากหรือเป็นศูนย์ (Drozd, J., and Postgate, J.R. 1970, Klucus, R. 1972, Keister, D.L. and Evans, W.R. 1976)

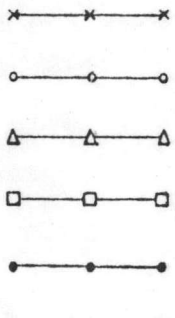


รูปที่ 5 ผลของการปรับบรรยากาศออกซิเจนต่อแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน การทดลองได้ทำในขวดรูปกรวยขนาด 50 มิลลิลิตร ดังนี้

ก. ปรับบรรยากาศออกซิเจนหลังจากวันที่สองทุกวันโดยใช้ขวดทดลองวันละชุด

ข. ปรับบรรยากาศออกซิเจนเพียงครั้งเดียวหลังจากวันที่สองโดยใช้ขวดทดลองวันละชุด

ค. ปรับความดันรวมให้มีค่าคงที่โดยใช้กาซอาร์กอนทดแทนกาซที่ดูดออกมาทดสอบ



หมายถึง ความดันออกซิเจนเท่ากับ 0 มิลลิเมตรปรอท

หมายถึง ความดันออกซิเจนเท่ากับ 0.40 มิลลิเมตรปรอท

หมายถึง ความดันออกซิเจนเท่ากับ 0.76 มิลลิเมตรปรอท

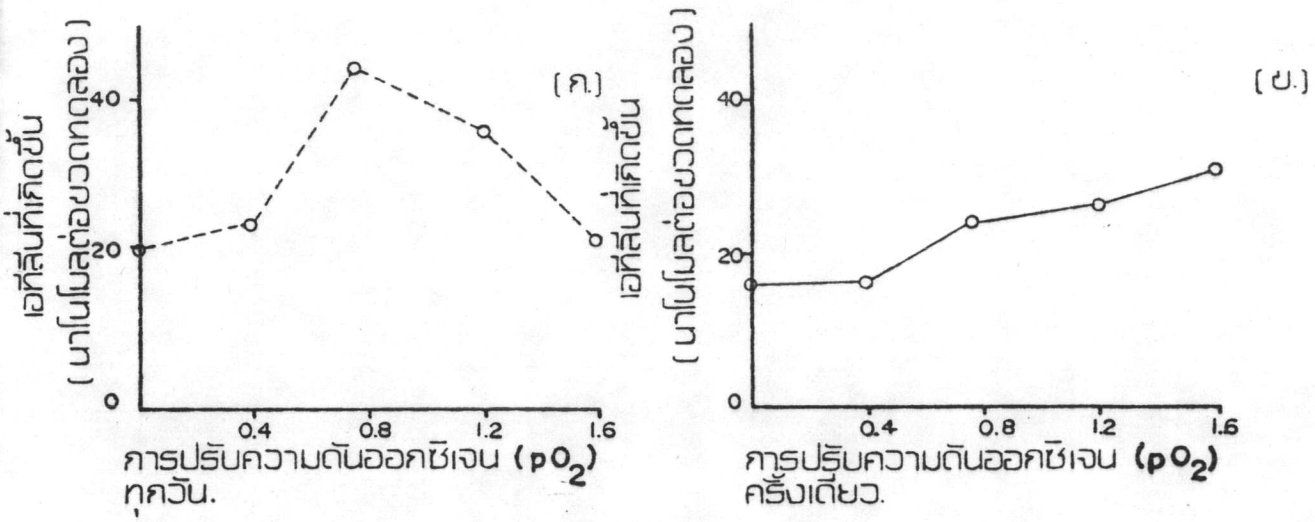
หมายถึง ความดันออกซิเจนเท่ากับ 1.20 มิลลิเมตรปรอท

หมายถึง ความดันออกซิเจนเท่ากับ 1.60 มิลลิเมตรปรอท

หมายถึง ไม่ได้ปรับความดันรวม

หมายถึง ปรับความดันรวมให้คงที่โดยการทดแทนกาซที่ดูดออกมาด้วยอาร์กอน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



รูปที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตี้ของการรีดิวซ์อะเซทีลีน กับความดันบรรยากาศของออกซิเจน ค่าที่รายงานเป็นผลจากการสังเกต เมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

ก. ปรับความดันบรรยากาศออกซิเจนทุกวันหลังจากบ่มไปได้สองวัน

ข. ปรับความดันบรรยากาศออกซิเจนครั้งเดียวหลังจากบ่มไปได้สองวัน

(ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ)

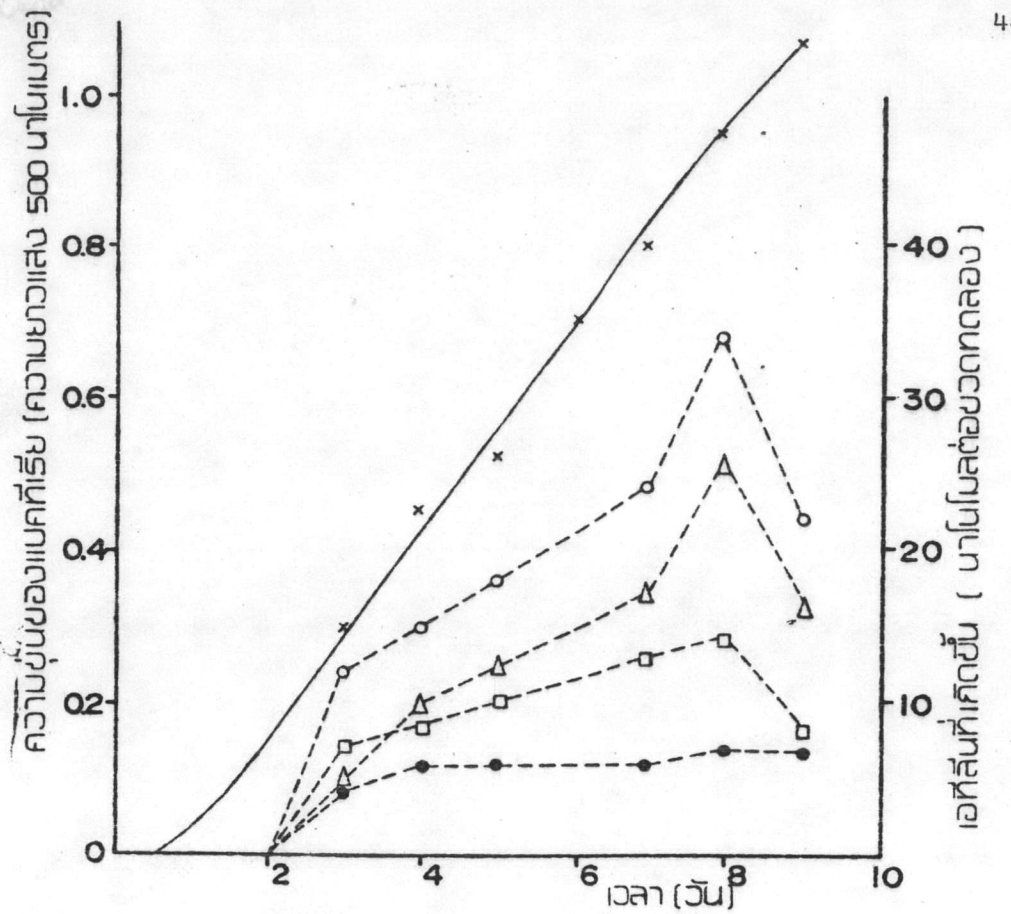
ในที่นี้เมื่อทดลองนำไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 มาเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนโตรจีเนสอินดักชันสูตรอาหารที่ 3.4 ที่มีกลูตาเมท 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกลูตาเมท + แอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกลูตาเมท + แอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือแอมโมเนียมซัลเฟต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจะมีค่าหัตเทียมกัน ส่วนแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนพบว่าจะให้ค่าสูงสุดเมื่อใช้กลูตาเมทเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวคือประมาณ 35 นาโนโมลต่อขวดทดลอง และค่านี้จะต่ำลงมาเรื่อย ๆ เมื่อเสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงขึ้น และค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนแทบไม่ปรากฏถ้าหากเสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 7

3.3 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนที่พบในแบคทีเรียอิสระมีค่าประมาณ 15 - 30 ° ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 25 ° ซ (Sprent, J.I. 1979) ดังนั้นจึงได้ทดลองโดยนัยเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของไรโซเบียมมิได้มีความแตกต่างกันเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 , 30 และ 32 ° ซ แต่จะลดลงเล็กน้อยที่ 23 ° ซ และลดลงมากที่ 37 ° ซ จะไม่พบการเจริญเติบโตที่ 4 และ 45 ° ซ สำหรับแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนนั้น จะพบสูงสุด ถ้าบ่มที่ 28 ° ซ คือสูงถึง 44 นาโนโมลต่อขวดทดลอง และลดหลั่นกันลงมาถ้าอุณหภูมิที่บ่มผิดแผกไป และจะไม่พบแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนเลย ที่ 4 และ 45 ° ซ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตี้สูงสุดของการรีดิวซ์อะเซทีลีนกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอาจเปรียบเทียบกันได้ชัดเจนยิ่งขึ้นโดยการใช้ Arrhenius's plot ปรากฏในรูปที่ 9 จากรูปนี้จะพบว่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสสูงสุดจะเท่ากับ 20 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อวันที่อุณหภูมิ 28 ° ซ

3.4 ผลของพีเอช

ได้ทดลองศึกษาผลของพีเอชเช่นเดียวกับผลของอุณหภูมิ พบว่าที่พีเอช 6.8 มีการเจริญของเชื้อสูงสุด รองลงมาคือ 5 และ 9 สำหรับพีเอช 10 มีการเจริญของเชื้อปานกลาง ส่วนที่พีเอช 4 ไม่พบการเจริญของเชื้อเลย สำหรับแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนนั้นจะมีค่าสูงสุดที่



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจนต่างกัน การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.1) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือสูตรที่ 3.4

หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

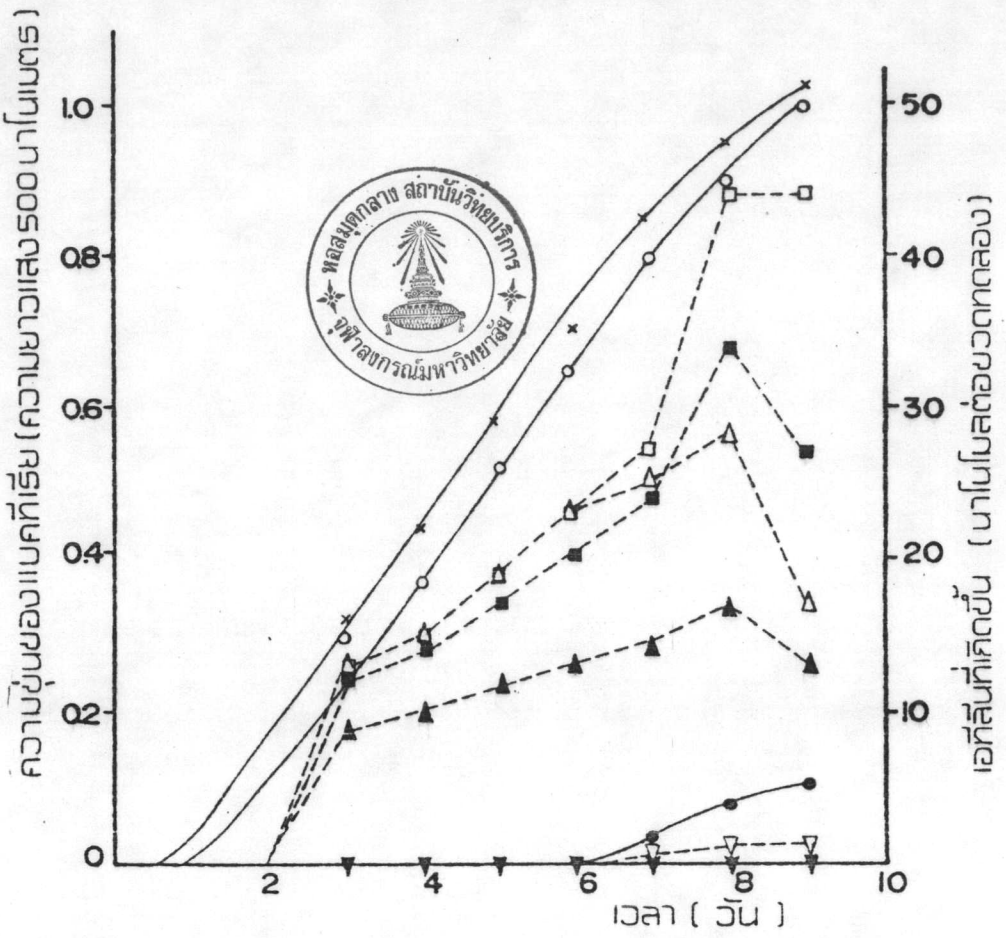
หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่มีกลูตาเมท 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่มีกลูตาเมท +แอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่มีกลูตาเมท + แอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับอุณหภูมิ การทดลองนี้ทำตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.1) อาหารเลี้ยงเชื้อคืออาหารสูตรที่ 3.4

หมายถึง การเจริญเติบโตที่ 28, 30 และ 32° ซ

หมายถึง การเจริญเติบโตที่ 23° ซ

หมายถึง การเจริญเติบโตที่ 37° ซ

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 28° ซ

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 23° ซ

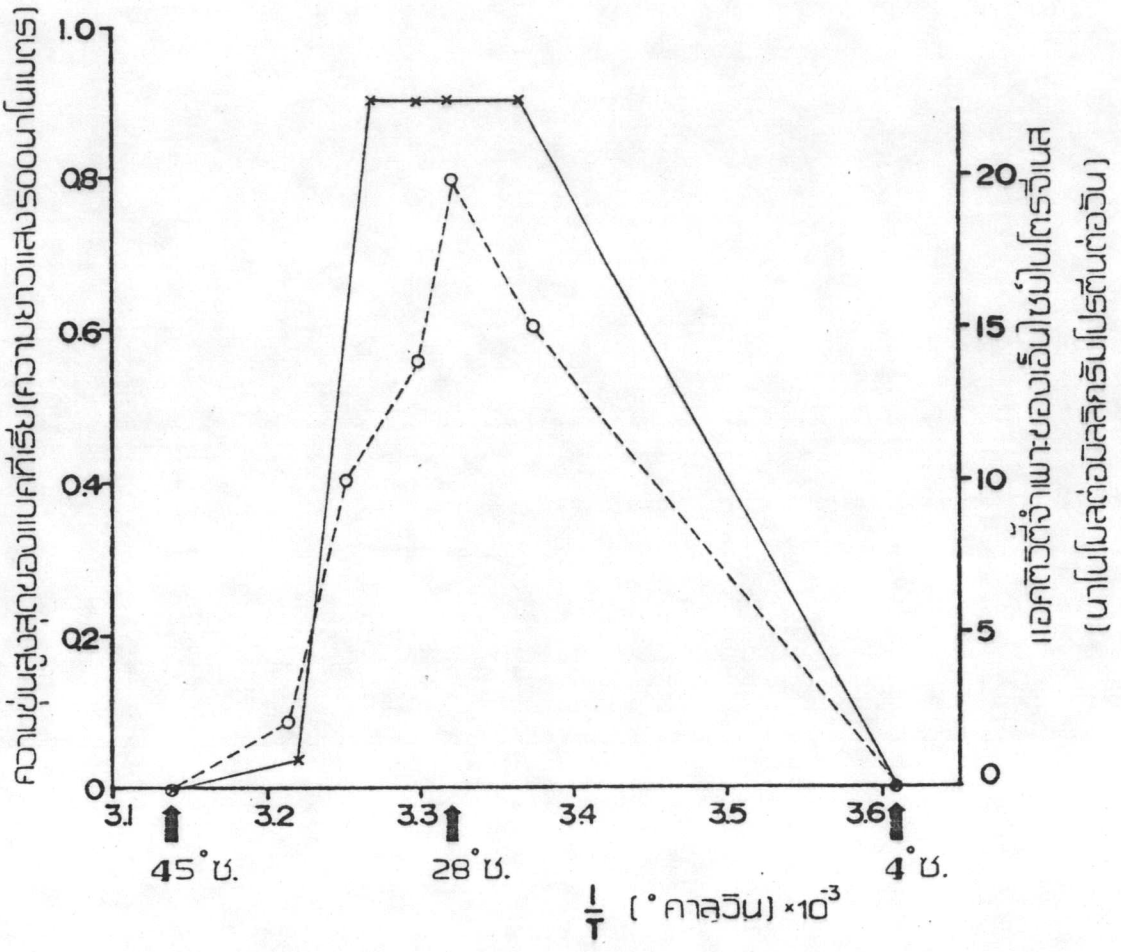
หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 30° ซ

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 32° ซ

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 37° ซ

หมายถึง การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ 4 และ 45° ซ

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง ความขุ่นสูงสุดของเซลและแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส กับ $\frac{1}{T}$ (Arrhenius's plot)

——×——×—— หมายถึง ความขุ่นสูงสุดของเซล

o- - - - -o- - - - -o หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

พีเอช 6.8 คือสูงถึง 43 นาโนโมลต่อขวดทดลอง และลดหลั่นกันลงมาที่พีเอช 9, 10 และ 5 ตามลำดับ สำหรับที่พีเอช 4 จะไม่พบแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนเลย (ดังรูปที่ 10)

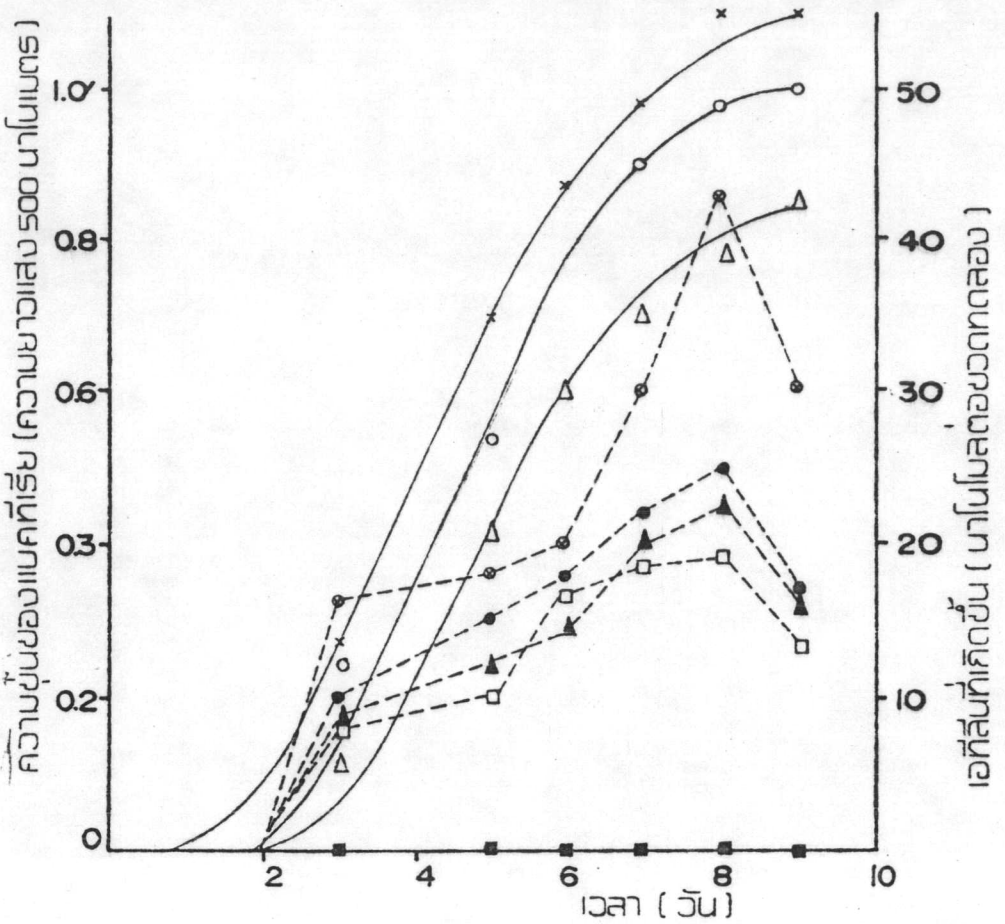
3.5 ผลของแหล่งต้นตอคาร์บอน

การตรึงไนโตรเจนเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการพลังงานในรูปของเอทีพีสูงมาก ซึ่งไรโซเบียมจะผลิตเอทีพีส่วนใหญ่จากขบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (Applely, C.A. 1969). ดังนั้นการใช้สารต้นตอคาร์บอนซึ่งเป็นต้นแหล่งของพลังงานจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาอีกอย่างหนึ่ง ในที่นี้ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนในวันที่ 8 ของการเจริญเติบโตโดยใช้ซูโครส แมนนิทอล กลูโคส ฟรุคโตส อะราบิโนส ซัคซีเนท กลีเซอรอล และกลูโคเนท เป็นสารต้นตอคาร์บอน ทั้งนี้โดยให้ความเข้มข้นรวมเท่ากับ 6.6 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองใช้สารต้นตอคาร์บอนเพียงชนิดเดียวแสดงในตารางที่ 3 พบว่าแมนนิทอลให้แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดคือ 36 นาโนโมลต่อขวดทดลอง ส่วนการเจริญเติบโตพบว่า กลีเซอรอลให้การเจริญเติบโตต่ำสุด สารต้นตอคาร์บอนที่เหลือจะให้ค่าการเจริญเติบโตประมาณกัน

เมื่อพิจารณาในทำนองเดียวกันนี้ จากตารางที่ 4 โดยเติมกลูโคเนทลงไปผสมกับสารต้นตอคาร์บอนดังกล่าวทุกตัว พบว่าแมนนิทอล + กลูโคเนทให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดคือ 46 นาโนโมลต่อขวดทดลอง ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้แมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในขณะที่การเจริญเติบโตให้ค่าใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองทั้งหมดดังที่กล่าวมาข้างต้น สามารถให้ข้อสรุปถึงสภาวะที่เหมาะสมของแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ

1. ปรับความดันบรรยากาศของออกซิเจนให้เป็น 0.76 มิลลิเมตรปรอททุกวัน
2. ใช้กลูตาเมทที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28 °ซ
4. พีเอชที่เหมาะสมคือ 6.8
5. แมนนิทอลกับกลูโคเนทเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ดีที่สุด



รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับพีเอช การทดลองนี้ทำตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.1) อาหารเลี้ยงเชื้อคืออาหารสูตรที่ 3.4

×——×——× หมายถึง การเจริญเติบโตที่ พีเอช 6.8

○——○——○ หมายถึง การเจริญเติบโตที่พีเอช 5, 9

△——△——△ หมายถึง การเจริญเติบโตที่พีเอช 10

●- - - -●- - - -● หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พีเอช 6.8

●- - - -●- - - -● หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พีเอช 9

△- - - -△- - - -△ หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พีเอช 10

□- - - -□- - - -□ หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พีเอช 5

■——■——■ หมายถึง การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พีเอช 4

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 เมื่อมีสารต้นตอคาร์บอนต่างกัน

สารต้นตอคาร์บอน	ความขุ่นสูงสุดของเชื้อ [1]	แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีน [2] (นาโนโมลต่อขวดทดลอง)
ซูโครส	1.00	25
แมนนิทอล	1.20	36
กลูโคส	1.10	28
ฟรุคโตส	1.00	21
อะราบิโนส	1.20	15
ซัคซิเนท	1.20	16
กลีเซอรอล	0.85	16
กลูโคเนท	1.20	12

1. เป็นค่าที่อ่านได้ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 8 วัน
2. เป็นค่าที่วัดได้จากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 8 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.4 ที่ 28° ซ

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตและแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทิลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 เมื่อมีสารผสมต้นตอคาร์บอนต่างกัน

สารผสมต้นตอคาร์บอน	ความขุ่นสูงสุดของเชื้อ[1]	แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทิลีน[2] (นาโนโมลต่อขวดทดลอง)
ซูโครส + กลูโคเนท	1.20	21
แมนนิทอล + กลูโคเนท	1.25	46
กลูโคส + กลูโคเนท	1.20	28
ฟรุคโตส + กลูโคเนท	1.10	21
อะราบิโนส + กลูโคเนท	1.25	24
ซัคซิเนท + กลูโคเนท	1.15	14
กลีเซอรอล + กลูโคเนท	1.10	16

1. เป็นค่าที่อ่านได้ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 8 วัน
2. เป็นค่าที่วัดได้จากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 8 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.4 ที่ 28° ซ

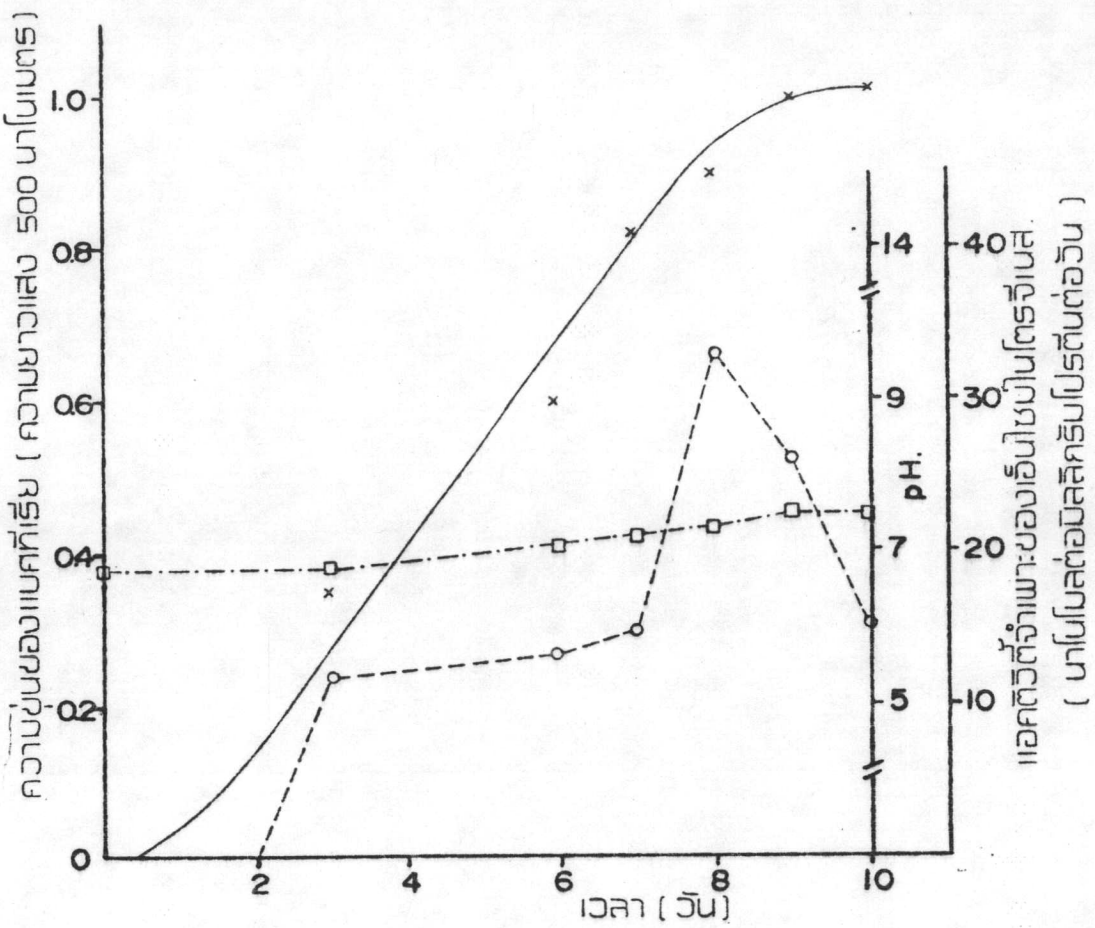
จากสภาวะที่เหมาะสมนี้ เมื่อนำมาใช้ร่วมกันแล้ว จะปรากฏความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตามโครงรูปที่แสดงไว้ในรูปที่ 11 มีข้อสังเกตว่าในระหว่างการเจริญเติบโตนี้มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ภายหลังการแบ่งตัวทวีคูณเล็กน้อย พีเอชตรวจสอบได้ที่การแบ่งตัวสูงสุด สูงจากเดิมคือ 6.8 เป็น 7.5 และการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนนี้เปลี่ยนแปลงรวดเร็วมากในช่วงระยะวันที่ 7 - 10

4. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเมื่อคลุกและมิได้คลุกด้วยไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

โดยทั่วไปการตรึงไนโตรเจนในไรโซเบียมอาจทดสอบได้โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นถั่วที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อ การทดลองนี้ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดน้ำหนักแห้ง จำนวนปม น้ำหนักปม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน ตลอดระยะการเจริญเติบโตของต้นถั่ว 12 สัปดาห์ในห้องทดลอง ตามวิธีการสร้างปมที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 11)

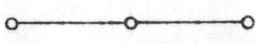
4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไปของต้นถั่วเหลืองที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อ

จากการติดตามการเจริญเติบโตของต้นถั่วที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกลักษณะทั่ว ๆ ไปของการเจริญเติบโตของต้นถั่ว ซึ่งแสดงในตารางที่ 5 พบว่าในสองสัปดาห์แรกก็เริ่มพบความแตกต่างระหว่างต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อ กล่าวคือในต้นที่คลุกเชื้อจะพบปมเล็ก ๆ ที่ราก และขนาดของปมก็จะใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จำนวนปมที่นับได้ก็เพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 7 ดอกจะออกในสัปดาห์ที่ 5 และจะเกิดฝักในสัปดาห์ที่ 6 ในช่วงสัปดาห์ที่ 8 - 12 เป็นการเจริญเติบโตของดอกและฝักและการเสื่อมสลายของปม ส่วนในต้นที่มิได้คลุกเชื้อนั้น วัฏจักรของการเจริญเติบโตเป็นไปตามขั้นตอนเช่นเดียวกับต้นที่คลุกเชื้อ เพียงแต่ว่าไม่พบปม และการเจริญเติบโตของต้นถั่วแสดงอาการไม่สมบูรณ์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นมา การเสื่อมสลายเริ่มปรากฏในสัปดาห์ที่ 9 ผลผลิตในรูปของฝักถั่วไม่สมบูรณ์

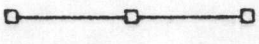


รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต พีเอช และแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนสของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 การทดลองนี้ทำตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.1) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือสูตรที่ 3.4

หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ



หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส



หมายถึง การเปลี่ยนของพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญเติบโต

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไปของถั่วเหลืองที่ไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ลักษณะการเจริญของถั่วเหลืองที่ไม่ได้คลุกเชื้อ	ลักษณะการเจริญของถั่วเหลืองที่คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122
2	บริเวณรากไม่มีปม มีใบแท้ชนิด trifoliate แล้ว	บริเวณโคนรากแก้วมีปมขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร มีใบแท้ชนิด trifoliate เช่นกัน การเจริญเติบโตเท่ากับต้นที่ไม่ได้คลุกเชื้อ
4	ใบเลี้ยงร่วงไปแล้ว ใบแท้มีขนาดไม่ใหญ่นัก แต่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น	ขนาดของปมใหญ่ขึ้น และมีกระจัดกระจายทั้งรากแก้วและรากแขนง ใบเลี้ยงร่วงไปแล้ว ใบแท้มีจำนวนมากขึ้น มีขนาดใหญ่และอวบ
5	เริ่มมีช่อดอกเล็ก ๆ ตามซอกกิ่งและมีกิ่งแขนงเล็ก ๆ แตกออกไปด้วย ใบบริเวณโคนต้นจะเห็นเป็นสีเหลืองจ้ำ ๆ	ปมมีขนาดใหญ่ขึ้นเพิ่มจำนวนมากขึ้น มีช่อดอกเล็ก ๆ ตามซอกกิ่ง แต่ละช่อมีประมาณ 4 ดอก ดอกที่บานแล้วเป็นสีม่วง ใบแท้ยังคงมีมากขึ้น ขนาดใหญ่และอวบ
6	ดอกเริ่มบานและเป็นสีม่วง กิ่งแขนงมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย ใบบริเวณโคนต้นร่วงไปแล้ว และบริเวณถัดมาเห็นเป็นสีเหลืองจ้ำ ๆ	ขนาดและจำนวนปมมีเพิ่มขึ้นอีก ช่อดอกมีมาก กิ่งแขนงมีมากขึ้นและขนาดใหญ่ขึ้น ใบยังคงเขียวและอวบอยู่ ดอกที่ร่วงโรยไปจะปรากฏฝักถั่วเล็ก ๆ ขึ้น
7	ใบเริ่มเป็นสีเหลืองมากขึ้น และมีการร่วงของใบเพิ่มขึ้น ยังคงมีการออกดอกอยู่ และเริ่มมีฝักอ่อน ๆ แล้ว	ขนาดและจำนวนปมมีเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย ใบที่บริเวณโคนต้นเริ่มเป็นสีเหลืองที่ขอบใบ การแตกแขนงของกิ่งมีมากขึ้น ดอกยังคงออกอยู่เรื่อย ๆ ฝักมีขนาดใหญ่ขึ้น
8	ใบเริ่มเป็นจ้ำสีเหลืองเกือบตลอดต้น การแตกใบอ่อนมีน้อย ฝักมีประมาณ 2 – 3 ฝัก ภายในมี 1 – 2 เมล็ด	ปมมีจำนวนน้อยลง ใบบริเวณโคนต้นเป็นสีเหลืองมากขึ้น ดอกยังคงออกอยู่ ฝักมีขนาดใหญ่และอวบ มีประมาณ 7 – 8 ฝัก ภายในมี 2 – 4 เมล็ด
9	ใบหลุดร่วงมากขึ้น ไม่ออกดอกแล้ว ฝักมีขนาดใหญ่ขึ้น และบางฝักเมล็ดลีบ	ขนาดปมคงที่ ใบบริเวณโคนต้นร่วงไปแล้ว ดอกออกบ้างประปราย ฝักมีขนาดใหญ่และอวบ
10	ใบหลุดร่วงมากขึ้นอีก ฝักมีจำนวนเท่าเดิมและมีขนาดใหญ่ขึ้น	มีการสลายของปมเพิ่มขึ้น ดอกออกบ้างเล็กน้อย มีฝักประมาณ 8 – 9 ฝัก ลักษณะอวบและเมล็ดใหญ่
11	ไม่มีการแตกของใบอ่อนอีกแล้ว และฝักเริ่มเป็นสีเหลืองอ่อนเรียกว่า ถั่วแระ	ไม่มีการแตกใบอ่อนเช่นกัน ใบร่วงโรยมากขึ้น มีฝักประมาณ 10 – 12 ฝัก และฝักเริ่มเป็นสีเหลืองอ่อนเช่นกัน
12	ใบเป็นสีเหลืองเกือบตลอดต้น บางฝักเป็นสีน้ำตาลแก่และไม่แตก เมล็ดภายในมักลีบ	ใบร่วงโรยและเป็นสีเหลืองมากขึ้น บางฝักเป็นสีน้ำตาลแก่และไม่แตก เมล็ดภายในอวบ ปมมีการสลายมากขึ้น

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งกับการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อไรโซเบียม ฉาโปนิคัม 122

เมื่อนำต้นถั่วที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 6 และ 7 พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของทั้งต้นและรากของถั่วที่คลุกเชื้อจะมีความแตกต่างจากต้นและรากของถั่วที่มิได้คลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักต้นและรากของต้นที่คลุกเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 11 (ซึ่งระยะนี้ฝักถั่วเริ่มแก่แล้ว) ในขณะที่ต้นมิได้คลุกเชื้อจะเพิ่มน้ำหนักช้า ๆ และพอถึงสัปดาห์ที่ 9 ก็คงที่ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งสูงสุดของต้น และน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งสูงสุดของราก ระหว่างต้นที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อ พบว่าจะให้ความแตกต่างประมาณ 2 เท่าเหมือนกันหมด

4.3 สภาวะที่เหมาะสมของการรีดิวซ์อะเซทีลีนในปมรากถั่ว

ก่อนที่จะนำรากซึ่งมีปมติดอยู่มาทดสอบการรีดิวซ์อะเซทีลีนนั้นจำเป็นจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมเสียก่อน ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 12 ก, ข, และ ค พบว่าจากการอินคิวเบทรากถั่วเหลืองที่มีปมติดอยู่ในบรรยากาศของอะเซทีลีนที่แตกต่างกัน จะพบแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนเพิ่มเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเพิ่มปริมาณอะเซทีลีน และถึงค่าสูงสุดเมื่อมีอะเซทีลีนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มบรรยากาศของอะเซทีลีนสูงกว่านี้จะทำให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนที่พบในปมรากเพิ่มขึ้นน้อยมาก

ในทำนองเดียวกันอินคิวเบทรากถั่วเหลืองในบรรยากาศออกซิเจน 0 - 30 เปอร์เซ็นต์พบว่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นและถึงค่าสูงสุดเมื่อมีออกซิเจนเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่อปริมาณของออกซิเจนเพิ่มขึ้น

เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่มีประสิทธิภาพการรีดิวซ์อะเซทีลีนโดยอินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ ปมอย่างเดียวและรากอย่างเดียว พบว่ารากที่มีปมติดอยู่ให้แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนได้สูงกว่าปมอย่างเดียว ส่วนรากที่ไม่มีปมติดอยู่จะไม่พบแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนเลย ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาที่อินคิวเบทในช่วง 3 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา หลังจากนั้น

ตารางที่ 6 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ไม่คลุกเชื้อ		คลุกเชื้อ		ความแตกต่างทางสถิติ[3]	
	น้ำหนักสด[1] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักแห้ง[2] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักสด (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อต้น)	t-value	การแปรผล
2	1.52 ± 0.48	0.28 ± 0.04	1.74 ± 0.46	0.25 ± 0.02	0.84	-
4	2.32 ± 0.43	0.72 ± 0.02	4.81 ± 0.55	1.24 ± 0.07	8,73	+
5	3.00 ± 1.10	0.92 ± 0.14	6.34 ± 0.56	1.33 ± 0.26	6.61	+
6	3.81 ± 0.32	1.30 ± 0.18	7,19 ± 2.08	1.74 ± 0.68	3.93	+
7	3.64 ± 0.23	1.20 ± 0.09	8.61 ± 2.82	2.08 ± 0.50	4.30	+
8	6.78 ± 2.35	1.85 ± 0.83	11.74 ± 1.62	3.41 ± 0.69	3.21	+
9	7.96 ± 4.16	2.51 ± 1.03	12.62 ± 3.78	3.43 ± 1.28	2.98	+
10	8.12 ± 0.50	2.50 ± 0.12	13.58 ± 1.60	3.52 ± 0.46	7.96	+
11	9.17 ± 2.63	2.35 ± 0.56	18.08 ± 4.98	5.17 ± 1.12	3.87	+
12	3.32 ± 1.08	2.24 ± 1.02	8.91 ± 2.30	3.14 ± 0.67	5.39	+

1. เป็นค่าน้ำหนักทั้งต้นของพืชที่เหนือจากพื้นดินประมาณ 1 เซนติเมตร

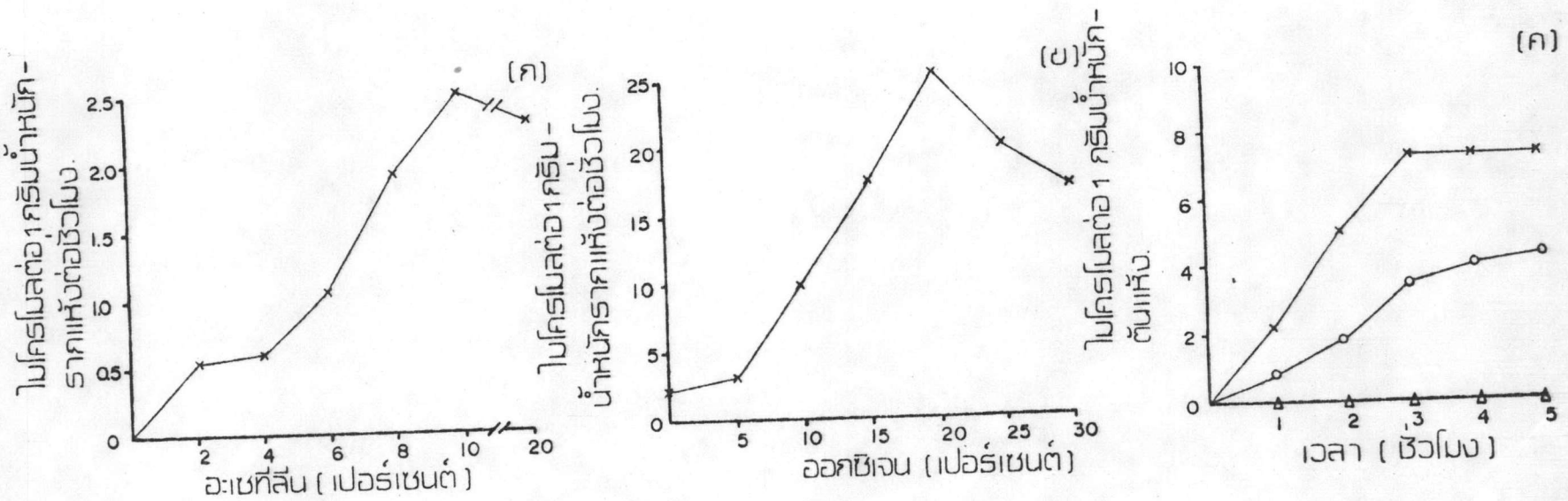
2. นำไปอบให้แห้งที่ 60° ซ 48 ชั่วโมง

3. ในการทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ซ้ำ ดังนั้นค่า degree of freedom รวมมีค่าเท่ากับ 10 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ค่า t ที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 2.23 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 2.23 แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (+) ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 2.23 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-)

ตารางที่ 7 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ไม่คลุกเชื้อ		คลุกเชื้อ		ความแตกต่างทางสถิติ[3]	
	น้ำหนักสด[1] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักแห้ง[2] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักสด[1] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักแห้ง[2] (กรัมต่อต้น)	t-value	การแปรผล
2	0.54 ± 0.13	0.04 ± 0.01	0.56 ± 0.17	0.04 ± 0.02	0.39	-
4	0.65 ± 0.61	0.12 ± 0.08	1.55 ± 0.32	0.19 ± 0.04	2.43	+
5	0.86 ± 0.44	0.16 ± 0.05	2.77 ± 0.59	0.31 ± 0.06	4.72	+
6	1.54 ± 0.38	0.20 ± 0.05	3.04 ± 1.02	0.42 ± 0.07	3.37	+
7	1.61 ± 0.40	0.22 ± 0.08	3.32 ± 0.28	0.64 ± 0.13	11.78	+
8	2.36 ± 0.73	0.32 ± 0.10	3.99 ± 0.19	0.71 ± 0.09	3.85	+
9	3.07 ± 1.37	0.48 ± 0.13	4.02 ± 0.76	0.79 ± 0.07	3.43	+
10	2.24 ± 0.54	0.40 ± 0.12	3.94 ± 0.44	0.68 ± 0.21	6.00	+
11	1.91 ± 0.56	0.39 ± 0.09	4.95 ± 2.27	1.11 ± 0.30	5.46	+
12	1.87 ± 0.83	0.43 ± 0.09	3.05 ± 1.06	0.59 ± 0.14	2.48	+

1. เป็นค่าน้ำหนักรากทั้งต้นของพืช
2. นำไปอบให้แห้งที่ 60° ซ 48 ชั่วโมง
3. ในการทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ซ้ำ ดังนั้นค่า degree of freedom รวมมีค่าเท่ากับ 10 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ค่า t ที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 2.23 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 2.23 แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (+) ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 2.23 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-)



รูปที่ 12 สภาวะที่เหมาะสมในการรีดิวซ์อะเซทีลีนของปมรากถั่วเหลือง

เก็บตัวอย่างถั่วเหลืองอายุ 27 วัน ตัดเฉพาะส่วนรากล้างให้สะอาดซับน้ำให้แห้งแล้วนำมาทำการทดลองดังนี้

(ก) วัดแอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีลีนเมื่ออินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ภายใต้บรรยากาศอาร์กอนและอะเซทีลีน 2 - 20 เปอร์เซนต์

(ข) วัดแอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีลีนเมื่ออินคิวเบทรากที่มีปมติดอยู่ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน : อะเซทีลีน = 90 : 10 และออกซิเจน 0 -30 เปอร์เซนต์

(ค) วัดปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นเมื่ออินคิวเบทราก + ปม ×——×, ปมอย่างเดียว o——o, รากอย่างเดียว Δ——Δ, ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน : อะเซทีลีน = 90 : 10 และออกซิเจน 20 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 1 - 5 ชั่วโมง

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

จะไม่เพิ่มขึ้นอีก

ผลการทดลองดังข้างต้นทำให้ได้ข้อสรุปว่า รากพืชทั้งหมดจะเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการหาการรีดิวซ์อะเซทีลีนโดยบรรยากาศของกาซที่เหมาะสมในการอินคิวเบท คือ อาร์กอน : อะเซทีลีนเท่ากับ 90 : 10 และออกซิเจนเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาไม่เกิน 3 ชั่วโมง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เวลาอินคิวเบท 1 ชั่วโมง

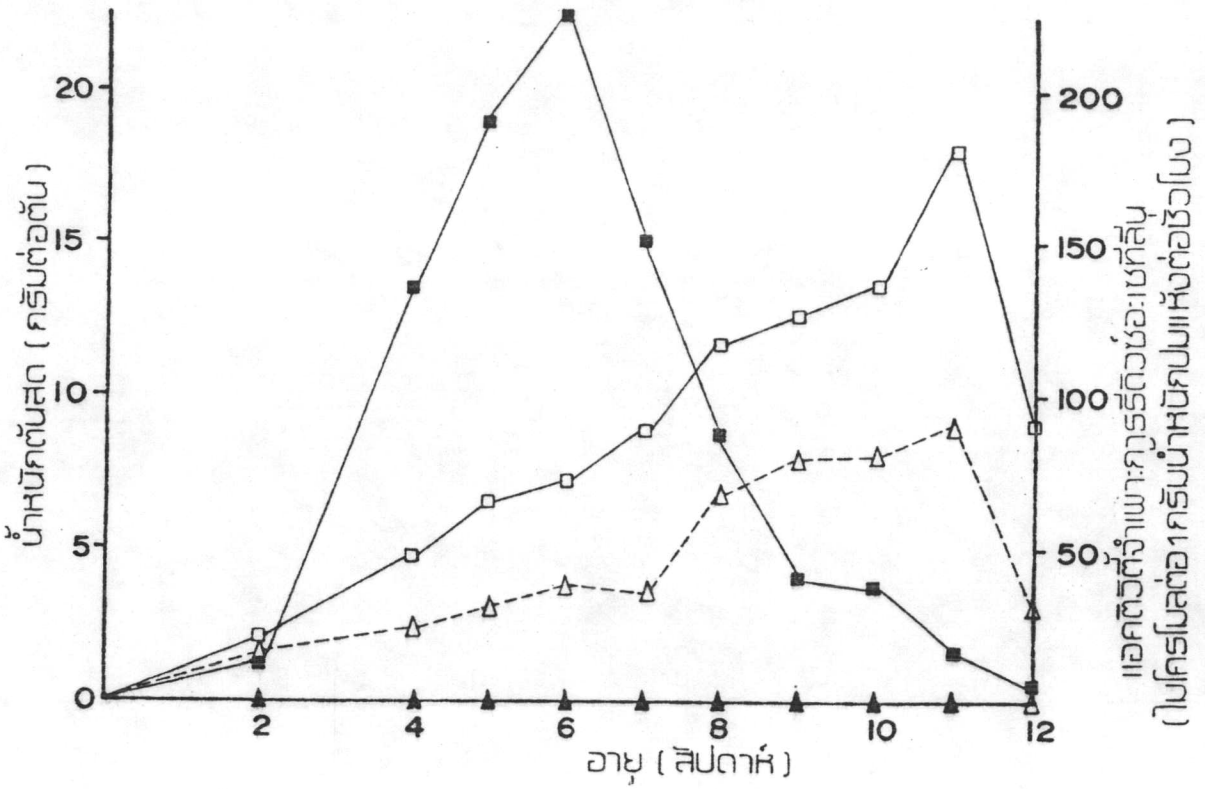
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสด จำนวนปม น้ำหนักปม กับ แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน

4.4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน

การรีดิวซ์อะเซทีลีนเป็นดรรชนีที่แสดงถึงการตรึงไนโตรเจนได้อย่างหนึ่ง ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสดของต้นที่คลุกเชื้อกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะช่วยในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนกับการเจริญเติบโตของต้นถั่วได้ รูปที่ 13 เปรียบเทียบโครงรูปของแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนกับน้ำหนักสดของต้นที่คลุกเชื้อ ส่วนน้ำหนักสดของต้นที่มิได้คลุกเชื้อนำมาเปรียบเทียบไว้เพื่อให้เห็นผลกระทบที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมต่อต้นถั่ว จากรูปจะเห็นได้ว่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะเพิ่มขึ้นในช่วง 2 - 6 สัปดาห์ จากนั้นจะลดลงในขณะที่น้ำหนักสดของต้นยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 11 ข้อที่น่าสังเกตอีกอย่างหนึ่งก็คือ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่พบในใบมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในน้ำหนักสด ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 และความแตกต่างระหว่างน้ำหนักสด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณโปรตีนทั้งหมดระหว่างต้นที่คลุกและมิได้คลุกเชื้อยังคงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป

4.4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปม น้ำหนักปมกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน

การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมหรือน้ำหนักปมกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน เป็นวิธีการหนึ่งที่จะประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมได้ รูปที่ 14 พบว่าใน 6 สัปดาห์แรกจำนวนปมหรือน้ำหนักปมสดจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน แต่ใน 6 สัปดาห์หลังพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากจำนวนปม



รูปที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักต้นสดกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนระหว่างต้นที่ไม่คลุกเชื้อและคลุกเชื้อไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122

หมายถึง น้ำหนักสดของต้นที่คลุกเชื้อ

หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นที่คลุกเชื้อ

หมายถึง น้ำหนักสดของต้นที่ไม่คลุกเชื้อ

หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นไม่คลุกเชื้อ

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ

ตารางที่ 8 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาล์ของต้นถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ไม่คลุกเชื้อ		คลุกเชื้อ		ความแตกต่างทางสถิติ[3]	
	ปริมาณไนโตรเจน[1] ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อต้น)	เปอร์เซนต์ไนโตรเจน[2] ทั้งหมด	ปริมาณไนโตรเจน ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อต้น)	เปอร์เซนต์ไนโตรเจน ทั้งหมด	t-value	การแปรผล
2	14.17 ± 2.84	5.09 ± 0.76	16.42 ± 1.85	6.26 ± 0.87	0.91	-
4	40.68 ± 4.36	5.65 ± 0.65	79.08 ± 5.04	6.35 ± 0.05	9.74	+
5	39.79 ± 2.58	3.83 ± 0.74	89.83 ± 13.39	5.46 ± 0.09	8.98	+
6	34.67 ± 5.38	3.35 ± 0.51	97.70 ± 46.99	5.40 ± 0.83	3.26	+
7	40.38 ± 6.16	3.23 ± 0.64	97.19 ± 31.48	4.68 ± 0.74	4.33	+
8	59.39 ± 28.42	3.20 ± 0.73	143.82 ± 57.01	4.27 ± 0.51	3.16	+
9	85.63 ± 48.32	3.09 ± 0.29	147.54 ± 20.85	3.58 ± 0.28	2.69	+
10	72.49 ± 5.60	2.95 ± 0.92	184.88 ± 38.06	4.41 ± 0.27	7.21	+
11	48.77 ± 12.76	2.22 ± 0.50	119.59 ± 14.77	3.24 ± 0.28	9.45	+
12	43.37 ± 16.61	1.74 ± 0.48	86.12 ± 13.73	2.76 ± 0.22	4.28	+

1. เก็บตัวอย่างถั่วเหลืองตามวันที่กำหนด นำไปอบให้แห้งที่ 60° ซ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 13) ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ

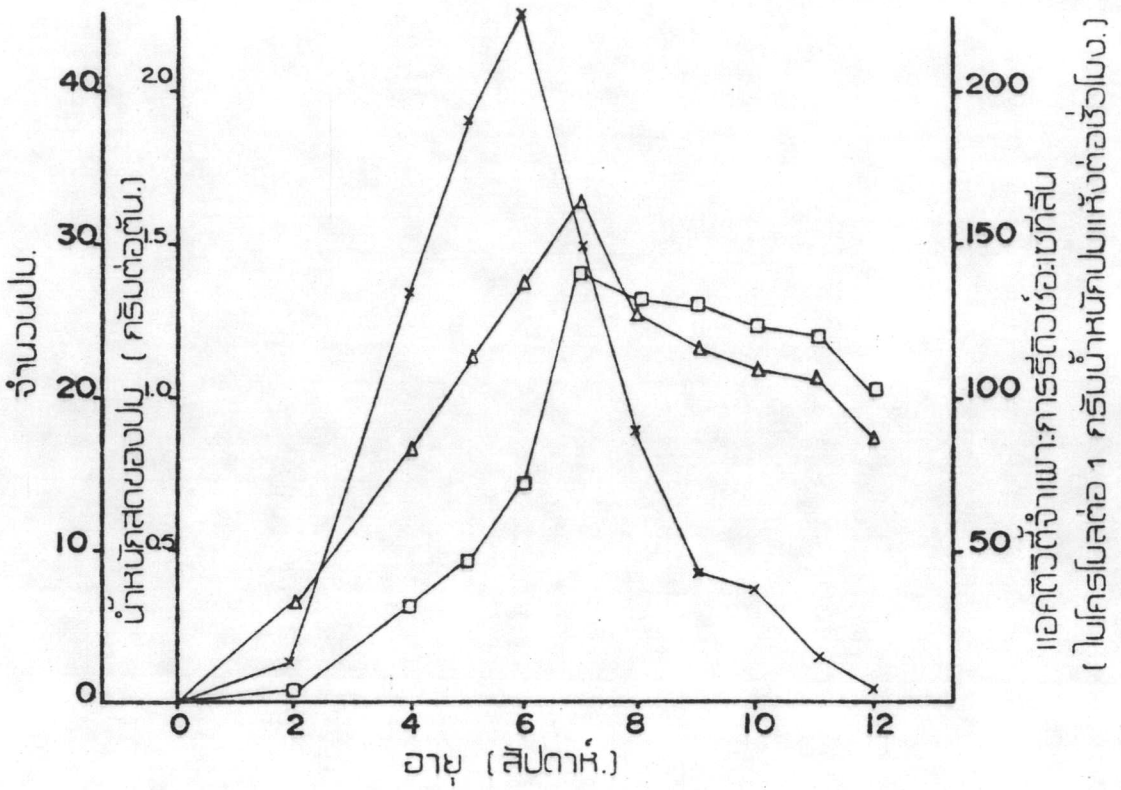
2. เปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมดจาก 1. ต่อน้ำหนักแห้ง

3. การแปรผลเช่นเดียวกับตารางที่ 6

ตารางที่ 9 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่หาโดยวิธี ไบยูเรท ของต้นถั่วเหลือง ระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม ฌาโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ไม่คลุกเชื้อ		คลุกเชื้อ		ความแตกต่างทางสถิติ[3]	
	ปริมาณโปรตีนในใบ[1] ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อต้น)	เปอร์เซ็นต์โปรตีน[2] ในใบทั้งหมด	ปริมาณโปรตีนในใบ ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อต้น)	เปอร์เซ็นต์โปรตีน ในใบทั้งหมด	t-Value	การแปรผล
2	17.50 ± 0.00	6.42 ± 0.71	27.58 ± 2.69	11.15 ± 1.46	9.17	+
4	29.62 ± 18.34	4.84 ± 1.78	98.73 ± 6.58	9.53 ± 0.41	3.19	+
5	39.33 ± 13.56	4.26 ± 1.36	110.66 ± 13.03	7.70 ± 0.25	4.85	+
6	55.67 ± 8.71	4.28 ± 1.96	125.00 ± 24.90	7.68 ± 1.10	6.43	+
7	55.83 ± 18.82	3.61 ± 0.37	123.33 ± 41.25	6.30 ± 2.88	3.64	+
8	47.83 ± 14.36	2.70 ± 0.88	147.33 ± 22.79	4.92 ± 0.64	9.04	+
9	41.66 ± 20.06	1.73 ± 0.96	171.00 ± 2.45	4.84 ± 0.92	13.78	+
10	40.08 ± 13.08	1.69 ± 0.51	189.00 ± 16.81	5.34 ± 0.25	24.08	+
11	37.75 ± 4.92	1.60 ± 0.52	119.17 ± 18.67	2.28 ± 0.18	10.32	+
12	11.17 ± 2.58	0.70 ± 0.04	57.83 ± 1.08	1.89 ± 0.36	40.84	+

1. เก็บตัวอย่างถั่วเหลืองตามวันที่กำหนด นำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 12) ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ
2. เปอร์เซ็นต์โปรตีนทั้งหมดจาก 1. ต่อน้ำหนักแห้ง
3. การแปรผลเปรียบเทียบกับตารางที่ 6



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปม น้ำหนักปมกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทิลีน ของปมถั่วเหลือง

การเก็บตัวอย่างเป็นไปตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 11.3)

△——△——△ หมายถึง จำนวนปม

□——□——□ หมายถึง น้ำหนักปม

×——×——× หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทิลีน

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 6 ซ้ำ

หรือน้ำหนักปมลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนลดลงอย่างมากมาย การลดลงของแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนในทราย จากตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายระหว่างต้นที่คลุกและไม่คลุกเชื้อพบว่า ปริมาณไนโตรเจนในทรายของต้นที่คลุกเชื้อสูงกว่าต้นที่ไม่คลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเทียบโครงรูปของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดกับแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน รูปที่ 15 พบว่าเส้นโครงรูปจะคล้อยตามกัน กล่าวคือปริมาณสูงสุดของแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจะพบในสัปดาห์ที่ 6 เหมือนกัน เส้นโครงรูปในการลดลงก็สอดคล้องกันจนถึงประมาณสัปดาห์ที่ 10 ในขณะที่แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนยังคงลดลงนั้น ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่พบในทรายกลับเพิ่มสูงขึ้น น่าสังเกตว่าหลังจากสัปดาห์ที่ 10 ไปแล้ว ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของต้นที่ไม่คลุกเชื้อก็สูงขึ้นจากเดิมแล้วเช่นกัน ซึ่งถ้านำไปสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นถั่ว (ตารางที่ 5) จะพบว่าสัปดาห์นี้จะเป็นสัปดาห์ที่มีการเสื่อมสลายของปมและใบถั่วมากขึ้น

5. <u>การเคลื่อนพลาสมิดพีอาร์ดี 1 จากเอสเคอริเคีย โคไล เข้าไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูแกชั่น</u>

นีฟพลาสมิดจากเอสเคอริเคีย โคไล มีต้นตอมาจากเคลบเซียลลา นิวโมนีอี ค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนที่ทดสอบจากการเจริญแบคทีเรียในสภาพที่มีการถอดรหัสเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ จะมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากไนโตรจีเนสของไรโซเบียมที่ถูกถอดรหัสในสภาพการเจริญเติบโตอิสระเช่นกัน การทดลองจึงเคลื่อนนีฟพลาสมิดจากเอสเคอริเคีย โคไล เข้าไรโซเบียม และดูผลการรีดิวซ์อะเซทีลีนกับอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วของคอนจูแกนท์ที่แยกได้

5.1 <u>สมบัติของนีฟพลาสมิดในเซลของเอสเคอริเคีย โคไล</u>

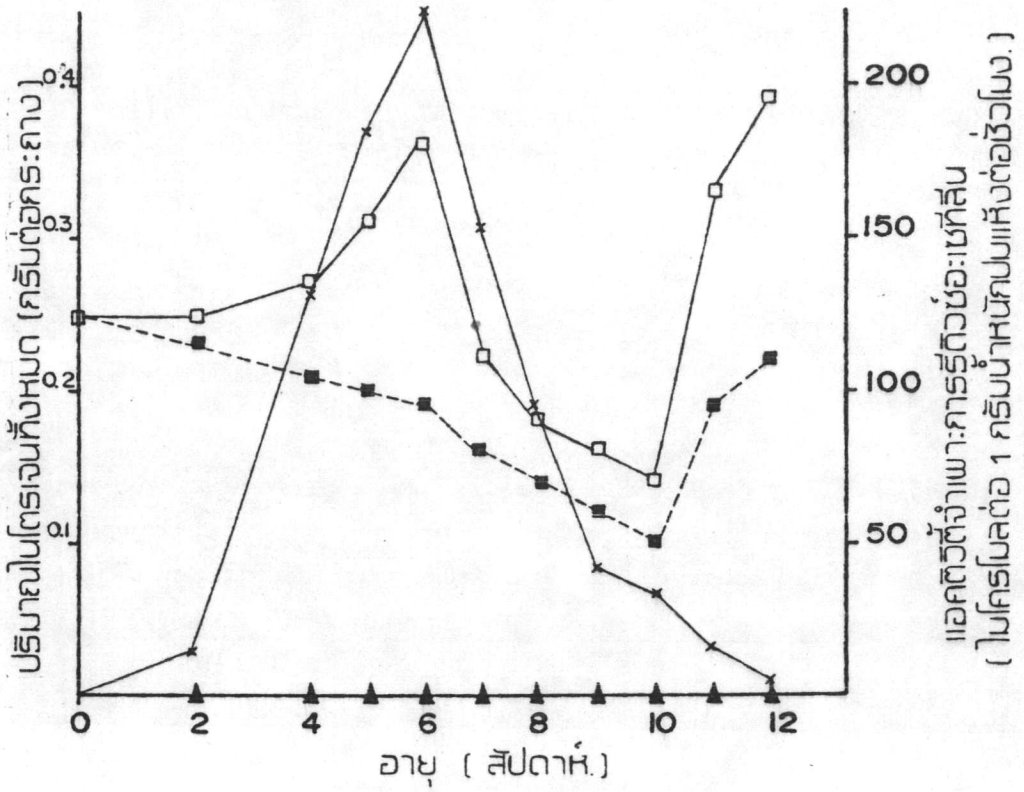
เมื่อนำเอสเคอริเคีย โคไล ที่มีนีฟพลาสมิดอยู่ด้วยมาเจริญเติบโตในสภาพที่มีการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนกับความขุ่นของเชื้อเป็นไปตามรูปที่ 16 จากรูปจะเห็นได้ว่า ค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนในเอสเคอริเคีย โคไล แม้เพียงใช้เวลาอินคิวเบทเชื้อแค่ 0.5 ชั่วโมง แอคติวิตี้นี้จะสูงไปเรื่อย ๆ

ตารางที่ 10 การทดลอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของกระถาง ที่ปลูกถั่วเหลืองระหว่างไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จากโปนิคัม 122

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (สัปดาห์)	ไม่คลุกเชื้อ	คลุกเชื้อ	ความแตกต่างทางสถิติ [2]	
	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทราย [1] (กรัมต่อกระถาง) [3]	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทราย (กรัมต่อกระถาง)	t-Value	การแปรผล
0	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	-	-
2	0.23 ± 0.08	0.25 ± 0.05	0.42	-
4	0.21 ± 0.03	0.27 ± 0.04	3.43	+
5	0.20 ± 0.06	0.31 ± 0.02	3.66	+
6	0.19 ± 0.03	0.36 ± 0.04	5.34	+
7	0.16 ± 0.04	0.22 ± 0.04	4.38	+
8	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.02	3.26	+
9	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.21	2.41	+
10	0.10 ± 0.08	0.14 ± 0.06	2.29	+
11	0.19 ± 0.03	0.33 ± 0.06	7.47	+
12	0.22 ± 0.33	0.39 ± 0.06	2.53	+

1. เก็บตัวอย่างทรายตามวันที่กำหนด นำไปอบให้แห้งที่ 60°ซ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 13) ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ
2. การแปรผลเช่นเดียวกับตารางที่ 6
3. ปริมาณทรายประมาณ 650 กรัมต่อกระถาง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายและแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน ระหว่างต้นที่ไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

การเก็บตัวอย่างเป็นไปตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 11.3)

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายเป็นไปตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 13)

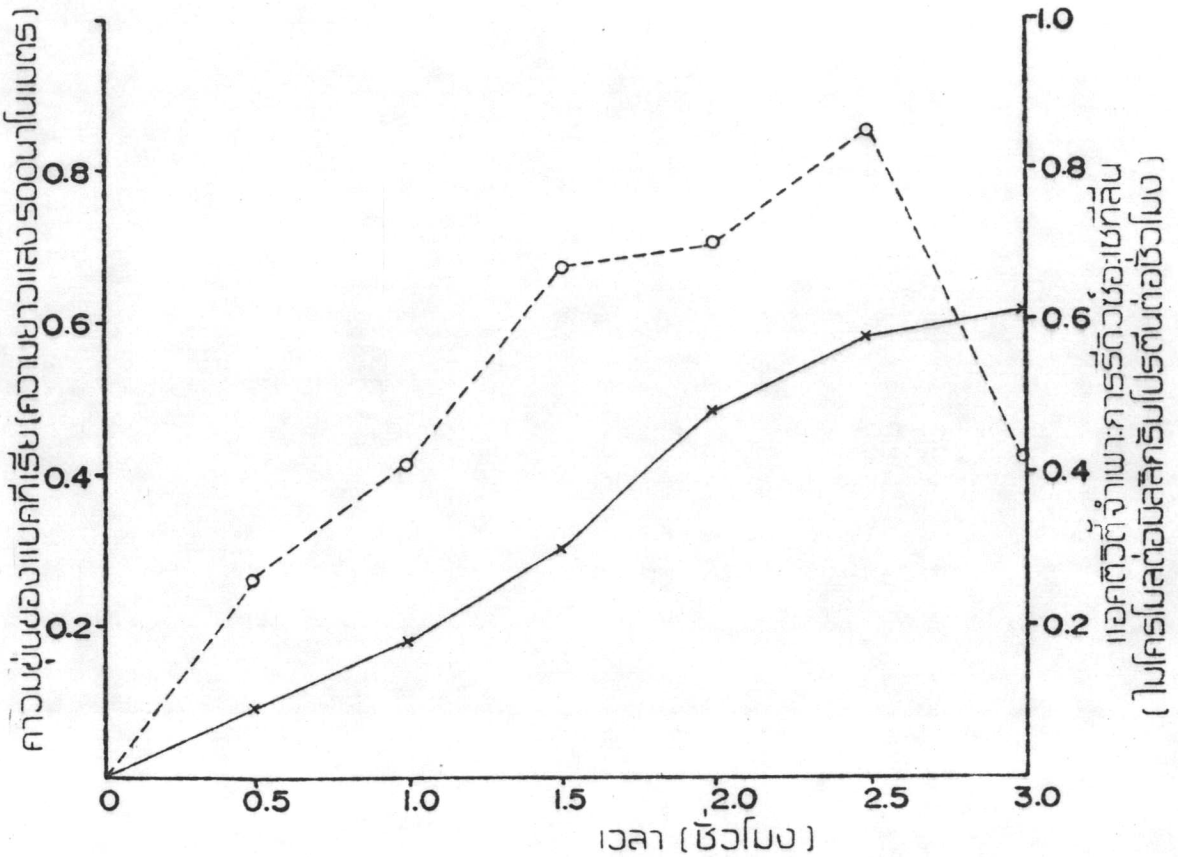
หมายถึง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของต้นที่คลุกเชื้อ

หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นคลุกเชื้อ

หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นที่ไม่คลุกเชื้อ

หมายถึง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในทรายของต้นที่ไม่คลุกเชื้อ

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) การทดลองนี้ทำตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.2) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คืออาหารสูตรที่ 3.8

×——×——× หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

o——o——o หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเชื้อ

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

จนถึง 2.5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่การแบ่งตัวของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะเซลคงตัว (stationary phase) จากนั้นการแบ่งตัวจะคงที่และค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะลดลง โปรดสังเกตว่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดมีค่าถึง 0.85 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ในขณะที่ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.52 หน่วย OD 500 แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเสริมด้วยเคล่อะมิโนแอซิด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดถึง 1.27 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงที่ความขุ่นของเชื้อ 0.43 หน่วย OD 500 ดังรูปที่ 17

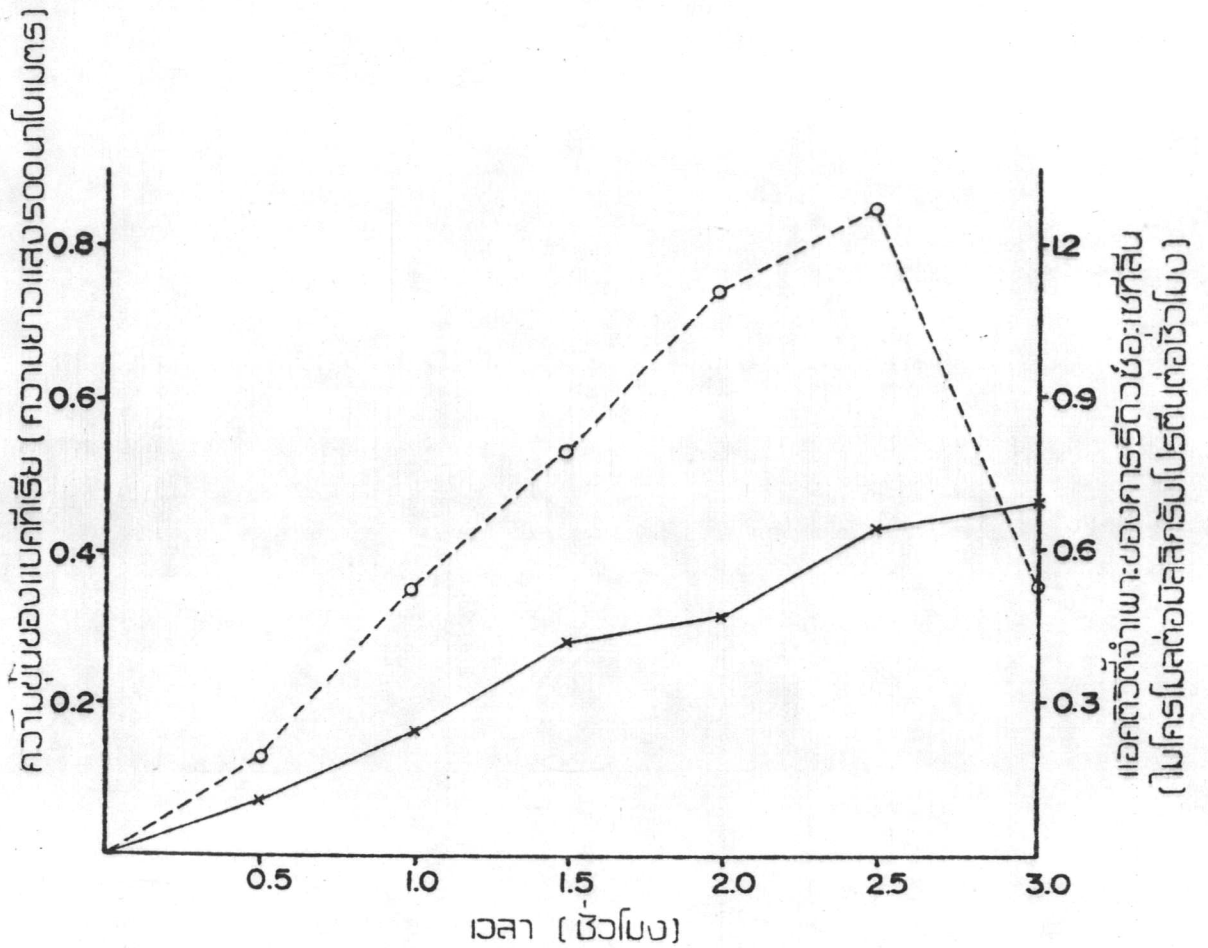
5.2 <u>การคอนจูเกทนีฟพลาส์มิดจากเอส์เคอริเคีย โคไล เข้าไรโซเบียม จาโปนิคัม 122</u>

จากการคอนจูเกทไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับ เอส์เคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) ซึ่งมีพลาส์มิดต้านยาและมีนีฟยีนเชื่อมติดอยู่ด้วย พบว่าการผสมพันธุ์ข้ามชนิดของแบคทีเรีย (intergeneric matings) เกิดขึ้นได้ด้วยความถี่ 1 X 10^{-3} ต่อแบคทีเรียตัวรับหนึ่งตัว ให้ชื่อคอนจูแกนท์ที่ได้ตามหมายเลขดังนี้คือ R_1 , R_2 , ..., R_{21} นอกจากนี้ยังพบว่า เอส์เคอริเคีย โคไล ตัวนี้มีความคงตัวสูงคือรักษาคุณสมบัติของการเป็นออกโซโทรบได้ดี ทั้งนี้ตัดสินจากความถี่ในการผันกลับซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 X10^{-7} ต่อแบคทีเรียหนึ่งตัว ดังตารางที่ 11 นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโคโลนีของคอนจูแกนท์เหมือนกับไวลด์ไทพ์ทุกประการเพียงแต่การเกิดโคโลนีนานกว่าคือใช้เวลาถึง 10 วัน ในขณะที่ไวลด์ไทพ์ใช้เวลาเพียง 7 วัน

5.3 <u>เปรียบเทียบแอคติวิตี้ของการรีดิวซ์อะเซทีลีนระหว่างคอนจูแกนท์กับไวลด์ไทพ์</u>

ได้สุ่มคอนจูแกนท์มา 8 ตัว เพื่อนำมาศึกษาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีน โดยใช้สภาวะพื้นฐานอันเดียวกับไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ดังตารางที่ 12 พบว่าในช่วงเวลา 12 วัน คอนจูแกนท์ (R11) มีแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูงสุดคือ 44 นาโนโมลต่อยวดทดลอง และยังพบว่าคอนจูแกนท์บางตัวให้ค่าแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนสูง บางตัวก็ต่ำกว่าไวลด์ไทพ์ ส่วนการเจริญเติบโตพบว่าทุกตัวเจริญเติบโตได้ทัดเทียมกัน

เมื่อทดลองนำคอนจูแกนท์ (R11) มาหาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนและเจริญตัวเทียบกับไวลด์ไทพ์ ภายใต้สภาวะการรีดิวซ์อะเซทีลีนดังกล่าว พบว่าการเจริญเติบโตของคอนจูแกนท์



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของ เอสเคอริเคีย โคไล เค12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี1) การทดลองนี้ทำตามที่ระบุไว้ใน วิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.2) ยกเว้นแต่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อคือสูตรที่ 3.9

×——×——× หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

o---o---o หมายถึง แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของเชื้อ

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 11 การเคลื่อนย้ายพลาสมิดพีอาร์ดี 1 จากเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 ไปให้ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 โดยวิธีคอนจูเกชัน

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (เซลต่อมิลลิลิตร)	จำนวนคอนจูแกนท์ (เซลต่อมิลลิลิตร)	ความถี่การเคลื่อนย้ายพลาสมิด [1]	ความถี่ในการฝืนกลับ [2]
เอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1)	2×10^8	2×10^5	1×10^{-3}	1×10^{-7}
ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122	2×10^8			

1. คือจำนวนคอนจูแกนท์ทั้งหมดหารด้วยจำนวนเซลทั้งหมดของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122
2. คือจำนวนรีเวอร์แตนท์ (revertant) ทั้งหมดหารด้วยจำนวนเซลทั้งหมดของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1)

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตและการสร้างอะเซทีลีนของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 และคอนลูแกนท์ในช่วงระยะเวลา 12 วัน

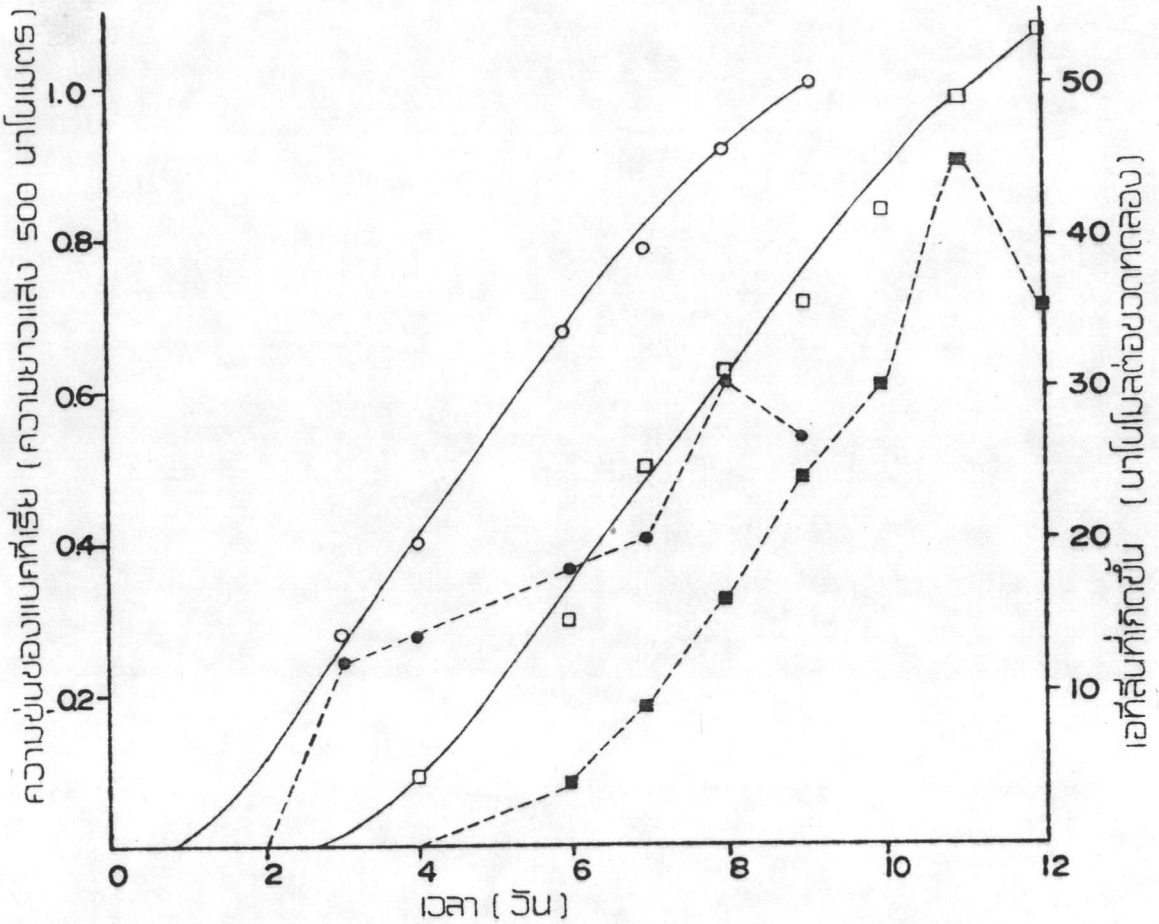
หมายเลขชื่อเชื้อ	ความขุ่นสูงสุดของเชื้อ[1]	แอคติวิตี้การสร้างอะเซทีลีน[2] (นาโนโมลต่อขวดทดลอง)
R_1	1.2	25
R_4	1.2	38
R_6	1.2	29
R_7	1.2	33
R_{10}	1.2	36
R_{11}	1.2	44
R_{13}	1.2	31
R_{18}	1.2	36
I22	1.3	30

1. เป็นค่าที่อ่านได้ภายหลังจากการบ่มเชื้อ 12 วัน
2. เป็นค่าที่วัดได้จากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3.4 ที่ 28°ซ สำหรับคอนลูแกนท์จะเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ปริมาณ 30 , 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

(R11) จะเจริญได้ช้ากว่าไวลด์ไทพ์ แต่รูปแบบของการเจริญเติบโตจะเป็นแบบเดียวกัน นั่นคือมีความลาดชัน (slope) เท่ากัน สำหรับแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนนั้นพบว่ามีแนวโน้มที่จะสูงขึ้น แต่ก็ไม่ต่างจากไวลด์ไทพ์อย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 18

5.4 <u>การทดลองประสิทธิภาพการรีดิวซ์อะเซทีลีนของปมรากถั่วเหลืองจากต้นที่ไม่คลุกเชื้อ คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์</u>

จากการศึกษาตัวแปรของการตรึงไนโตรเจนของต้นถั่วเหลืองที่ผ่านมาทั้งหมด พบว่าส่วนใหญ่ค่าตัวแปรเหล่านี้จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป และความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านี้กับค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน (ดรรชนีของการตรึงไนโตรเจน) จะเป็นลัดส่วนโดยตรงต่อกันในช่วง 6 สัปดาห์แรก ดังนั้นจึงเลือกสัปดาห์ที่ 4 และ 5 เป็นช่วงเวลาการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างต้นที่ไม่คลุกเชื้อ คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ จากตารางที่ 13 พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเทียบระหว่างต้นที่คลุกด้วยไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับต้นที่ไม่คลุกเชื้อจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเทียบระหว่างคอนจูแกนท์กับไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กลับพบว่าค่าต่าง ๆ ส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าของน้ำหนักสดและแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นที่คลุกด้วยคอนจูแกนท์มีค่าสูงกว่าต้นที่คลุกด้วยไวลด์ไทพ์เล็กน้อย สำหรับในสัปดาห์ที่ 5 นั้น (ตารางที่ 14) พบว่าเมื่อเทียบระหว่างต้นที่คลุกด้วยไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 กับต้นที่ไม่คลุกเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าเทียบระหว่างคอนจูแกนท์กับไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 จะพบว่าค่าน้ำหนักสดและจำนวนปมไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนจะมีค่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำปมของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 มาแยกตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 หัวข้อ 14 พบว่าคอนจูแกนท์ที่แยกได้ยังคงความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาปฏิชีวนะอยู่ด้วย ในขณะที่ไวลด์ไทพ์ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ซึ่งพบทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 นั้นย่อมแสดงว่าพลาสมิดที่มียีนต้านยาทั้งสามยังคงมีอยู่ในคอนจูแกนท์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าขนาดและลักษณะของปมระหว่างไวลด์ไทพ์และคอนจูแกนท์ไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนจูแกนท์ (R11) การทดลองนี้ทำตามวิธีที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง (บทที่ 2 ข้อ 7.1) อาหารเลี้ยงเชื้อคืออาหารสูตรที่ 3.4

หมายถึง การเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

หมายถึง การเจริญเติบโตของคอนจูแกนท์ (R11)

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของคอนจูแกนท์ (R11)

ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์เซทีลีนของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างไม่คลุกเชื้อ คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนลูแกนท์

หมายเลข ชื่อเชื้อ	น้ำหนักสด (กรัมต่อต้น)	ความแตกต่างทางสถิติ[1] t-value	การแปรผล	จำนวนปม (ปมต่อต้น)	ความแตกต่างทางสถิติ t-value	การแปรผล	แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน[4]	ความแตกต่างทางสถิติ t-value	การแปลผล	การเจริญบนอาหาร[5] เลี้ยงเชื้อแข็ง + ยาปฏิชีวนะ
ไม่คลุกเชื้อ	$1.10^{+}_{-}0.59$									
122	$2.54^{+}_{-}0.37$	5.06[2]	+	$12.83^{+}_{-}1.47$			$0.68^{+}_{-}0.15$			เจริญไม่ได้
R_1	$2.57^{+}_{-}0.32$	0.17[3]	-	$8.67^{+}_{-}1.21$	5.35	+	$0.93^{+}_{-}0.32$	1.65	-	เจริญได้
R_4	$2.56^{+}_{-}0.03$	0.15	-	$7.50^{+}_{-}1.52$	6.18	+	$0.79^{+}_{-}0.19$	1.08	-	เจริญได้
R_6	$2.64^{+}_{-}0.28$	0.50	-	$8.83^{+}_{-}2.71$	3.17	+	$1.28^{+}_{-}0.48$	2.89	+	เจริญได้

1. ในการทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ซ้ำ ดังนั้นค่า degree of freedom รวมมีค่าเท่ากับ 10 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ค่า t ที่เปิดจากตารางที่ค่าเท่ากับ 2.23 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 2.23 แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (+) ถ้าค่าt ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 2.23 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-)

2. เป็นความแตกต่างทางสถิติระหว่างต้นไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

3. เป็นความแตกต่างทางสถิติระหว่างต้นคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และ คอนลูแกนท์

4. คือจำนวนไมโครโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นต่อต้นต่อชั่วโมง

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งยีส์ตแมนนิทอล์คอิงโกเร็ด (สูตรอาหารที่ 3.2) ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ปริมาณ 30,20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

หมายเลข	น้ำหนักสด	ความแตกต่างทางสถิติ[1]		จำนวนปม	ความแตกต่างทางสถิติ		แอคติวิตี้จำเพาะ	ความแตกต่างทางสถิติ		การเจริญบนอาหาร[5]
ของเชื้อ	(กรัมต่อต้น)	t-value	การแปรผล	(ปมต่อต้น)	t-value	การแปรผล	การรีดิวซ์อะเซทิลีน[4]	t-value	การแปรผล	เลี้ยงเชื้อแข็ง+ยาปฏิชีวนะ
R_7	$2.98^{+}_{-}0.36$	2.07	-	$12.67^{+}_{-}2.34$	0.14	-	$1.00^{+}_{-}0.31$	2.18	-	เจริญได้
R_8	$2.99^{+}_{-}0.65$	1.48	-	$14.00^{+}_{-}3.52$	0.80	-	$0.93^{+}_{-}0.21$	2.22	-	เจริญได้
R_9	$2.75^{+}_{-}0.34$	1.02	-	$12.67^{+}_{-}6.06$	0.06	-	$0.74^{+}_{-}0.18$	0.57	-	เจริญได้
R_{10}	$2.69^{+}_{-}0.17$	0.91	-	$11.33^{+}_{-}1.21$	1.92	-	$0.86^{+}_{-}0.54$	0.77	-	เจริญได้
R_{11}	$2.88^{+}_{-}0.37$	1.60	-	$10.83^{+}_{-}5.00$	0.94	-	$0.92^{+}_{-}0.22$	2.17	-	เจริญได้
R_{13}	$2.85^{+}_{-}0.63$	1.89	-	$12.50^{+}_{-}3.56$	0.21	-	$1.00^{+}_{-}0.37$	1.89	-	เจริญได้
R_{18}	$2.66^{+}_{-}0.24$	1.88	-	$11.67^{+}_{-}3.50$	0.75	-	$0.93^{+}_{-}0.28$	1.88	-	เจริญได้

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักสด จำนวนปม และแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของต้นถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 5 ระหว่างไม่คลุกเชื้อ คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และคอนซูแกนท์

หมายเลขชื่อเชื้อ	น้ำหนักสด (กรัมต่อต้น)	ความแตกต่างทางสถิติ[1] t-value	การแปรผล	จำนวนปม (ปมต่อต้น)	ความแตกต่างทางสถิติ t-value	การแปรผล	แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน[4]	ความแตกต่างทางสถิติ t-value	การแปรผล	การเจริญบนอาหารเสี้ยงเชื้อแข็ง + ยปฏิชีวนะ
ไม่คลุกเชื้อ	1.71±0.30									
122	3.54±0.26	11.06[2]	+	18.50±3.27			2.93±0.51			เจริญไม่ได้
R_1	3.50±0.24	0.24[3]	-	16.00±1.41	1.71	-	4.21±0.99	2.81	+	เจริญได้
R_4	3.55±0.27	0.07	-	16.83±1.47	1.13	-	4.03±0.85	2.72	+	เจริญได้
R_6	3.54±0.32	0.02	-	19.00±1.26	0.34	-	3.77±0.24	3.64	+	เจริญได้
R_7	3.70±0.27	1.01	-	17.50±1.87	0.65	-	4.76±0.96	4.13	+	เจริญได้

1. ในการทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ซ้ำ ดังนั้นค่า degree of freedom รวมมีค่าเท่ากับ 10 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ค่า t ที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 2.23 ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 2.23 แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(+) ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 2.23 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-)
2. เป็นความแตกต่างทางสถิติระหว่างต้นไม่คลุกเชื้อ และคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122
3. เป็นความแตกต่างทางสถิติระหว่างต้นคลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และ คอนซูแกนท์
4. คือจำนวนไมโครโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นต่อต้นต่อชั่วโมง
5. อาหารเสี้ยงเชื้อแข็งยีสต์แมนนิทอลคองโกเร็ด (สูตรอาหารที่ 3.2) ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ปริมาณ 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

หมายเลขซื่อเชื้อ	น้ำหนักสด (กรัมต่อตัน)	ความแตกต่างทางสถิติ[1]		จำนวนปม (ปมต่อตัน)	ความแตกต่างทางสถิติ		แอคติวิตี้จำเพาะ การรีดิวซ์อะเซทีลีน[4]	ความแตกต่างทางสถิติ		การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง + ยาปฏิชีวนะ[5]
		t-value	การแปรผล		t-value	การแปรผล		t-value	การแปรผล	
R_8	3.55±0.08	0.11	-	16.83±2.32	1.01	-	4.02±0.88	2.61	+	เจริญได้
R_9	3.64±0.14	0.56	-	17.67±1.63	0.55	-	4.01±0.65	3.20	+	เจริญได้
R_{10}	3.60±0.68	0.17	-	16.50±1.52	1.35	-	3.99±0.42	3.92	+	เจริญได้
R_{11}	3.82±0.52	1.18	-	16.50±1.87	1.30	-	4.82±0.55	6.11	+	เจริญได้
R_{13}	3.57±0.25	0.22	-	17.67±2.16	0.52	-	4.37±0.72	4.10	+	เจริญได้
R_{18}	3.54±0.03	0.004	-	17.00±1.41	1.03	-	4.33±0.64	4.17	+	เจริญได้