บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific Supply Co.Ltd., Thailand

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D 0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.3 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BKE 60 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.4 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น Gyrotary G10 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

1.5 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

1.6 เครื่องชั่งน้ำหนักทยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P บริษัท Sartorius, Germany

1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น Labophot-2 บริษัท Nikon, Japan

1.8 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHK บริษัท Olympus optical, Taiwan

1.9 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-T 220A

1.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore

1.10 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น Tomy SS-325 บริษัท SEIKO, Japan

1.11 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 บริษัท Mammert, U.S.A.

1.12 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromotography) รุ่น HP5890 Series II ของบริษัท Hewlett Packard, U.S.A.

1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่นKS-3000P บริษัท Kubota, Japan

2. สารเคมี

2.1 เอทธิลีน (Ethylene) บริษัท Thai Industrial Gas Co.Ltd., Thailand

2.2 แคลเซียมคาร์ไบด์ (calcium carbide)

2.3 ก๊าซไนโตรเจน (N_2) บริษัท Thai Industrial Gas Co.Ltd., Thailand

2.4 ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 บริษัท ปุ๋ยไข่มุก, ประเทศไทย

2.5 แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$) บริษัท Carlo erba reagnti, Italy

2.6 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo erba reagnti, Italy

2.7 แคลเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต ($CaSO_4.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany

2.8 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2Mo_4.2H_2O$) บริษัท Carlo erba reagnti, Italy

2.9 Nutrient broth บริษัท Difco, U.S.A.

2.10 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท ปรุงทิพย์, ประเทศไทย

2.11กลูโคส (food grade)

2.12 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, U.S.A.

2.13 แมนนิทอล (mannitol) บริษัท Merck, Germany

2.14 ซูโครส (food grade)

2.15 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol)

3. การแยกและคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้จากบริเวณผิวใบข้าว

3.1 การแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากใบข้าว

นำใบข้าวจากต้นข้าวที่มีอายุประมาณ 2 เดือนที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 35 ตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปล้างโดยแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเขย่าครั้งละ 10 นาที 5 ครั้ง แล้งจึงนำใบข้าวมาแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ บริเวณหน้าใบ และบริเวณหลังใบมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen-free medium) (ภาคผนวก ก) ส่วนน้ำที่ใช้ล้างใบข้าวครั้งท้ายสุดก็นำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนเพื่อแยกแบคทีเรียที่อยู่บนใบข้าว โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 3.1 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen-free-broth) ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

3.2.1 การวัดการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1 วัดอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยใช้วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น ซึ่งทำได้โดยปิดจุกยางที่คอขวดเลี้ยงเชื้อป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของก๊าซภายในขวด แล้วดูดอากาศออก 3 มิลลิลิตร

3.2.1.1 การเตรียมก๊าซอะเซทิลีน เตรียมได้โดยจากการนำแคลเซียมคาร์ไบด์ไปทำปฏิกิริยากับน้ำ แล้วเก็บก๊าซอะเซทิลีนที่เกิดขึ้นใส่ขวดทดลองขนาดเล็ก

นำก๊าซอะเซทิลีนที่ได้ฉีดเข้าแทนที่อากาศที่ดูดออกไป บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงฉีดตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เพื่อวัดปริมาณก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้น โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ : โพราแพคเอ็น (porapak N) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร ยาว 225 เซ็นติเมตร

ก๊าซตัวพา (carrier gas) : ก๊าซไนโตรเจน (N_2)

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 80 องศาเซลเซียส

ชนิดของเครื่องตรวจ : Flame Ionization Detector (FID)

อุณหภูมิของเครื่องตรวจ : 130 องศาเซลเซียส

อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน : 0.6 kg/cm^2

อัตราการไหลของอากาศ : 0.5 kg/cm^2

อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน : 5 kg/cm^2

ในการแยกก๊าซอะเซธิลีน และก๊าซเอทิลีนตามวิธีในข้อ 3.2.1 พบว่า retention time ของก๊าซเอทิลีนคือ 1.22 นาที และก๊าซอะเซธิลีนออกมาที่หลังที่เวลา 1.78 นาที โดยเปรียบเทียบกับพีคมาตรฐานซึ่งทำได้โดยนำก๊าซเอทิลีน 1 เปอร์เซ็นต์ มาฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (ภาคผนวก ง) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

3.2.2 หาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย โดยอบกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมครอน โดยทำการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักกระดาษเปล่าไว้ แล้วนำกระดาษนี้ไปกรองเซลล์แบคทีเรียหลังจากที่ได้วัดการตรึงไนโตรเจนโดยกรองผ่านกระดาษมิลลิพอร์ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรืออบจนน้ำหนักคงที่ แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองรวมกับเซลล์ แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มาคำนวณหาอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด

4. การตรวจสอบคุณสมบัติ และจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

โดยนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน แล้วแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ

4.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) การทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสและคะตาเลส

โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำโดยการย้อมสีแกรม (Gram's staining) เซลล์เพื่อตรวจดูโครงสร้างและการติดสีแกรม การตรวจสอบการเคลื่อนที่โดยดูลักษณะการเจริญในอาหาร semi-solid และการทดสอบทางชีวเคมีโดยการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แมนนิทอล มอลโตส ฟรักโตส แลคโตส กาแลคโตส และแรมโนส โดยเติมน้ำตาลที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหาร Andrad's carbohydrate broth ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็น กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ อาหารก็จะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดง เนื่องจาก Acid fuchsin ที่ใส่เป็นอินดิเคเตอร์นั่นเอง และการทดสอบออกซิเดส และคะตาเลส ทดสอบโดยใช้อัลฟาแนปทอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามลำดับ

4.2 การทดสอบไนเตรท รีดักชั่น (nitrate reduction) และดีไนตริฟิเคชั่น จะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส (nitrate reductase) ซึ่งจะเปลี่ยนไนเตรท ไปเป็นไนไตรท์ และเอนไซม์ไนไตรท์ รีดักเทส (nitrite reductase)ซึ่งจะเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นก๊าซแอมโมเนีย ดังสมการ

$$NO_3^- + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{nitrate reductase}} NO_2^- + NADP^+ + H_2O$$

$$NO_2^- + 3NADPH + 3H^+ \xrightarrow{\text{nitrite reductase}} NH_3 + 3NADP^+ + H_2O + OH^-$$

การทดสอบไนไตรท์สามารถทำได้โดยใช้น้ำยาอัลฟาแนปทิลามีนและน้ำยากรดซัลฟานิลิค อย่างละ 1 หยด โดยจะได้สีแดง แต่ถ้าไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน การทดสอบก็จะไม่เกิดสีแดงเพราะไม่มีไนไตรท์เหลืออยู่ ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยเติมผงสังกะสีลงไป ผงสังกะสีจะรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ ดังนั้นถ้าเกิดสีแดงขึ้น แสดงว่ามีไนเตรทอยู่ แต่ถ้าใส่ผงสังกะสีแล้วไม่เกิดสีแดง แสดงว่าไม่มีไนเตรทอยู่ นั่นคือไนเตรทถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซแอมโมเนียแล้ว

4.3 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

เมื่อศึกษาถึงโครงสร้าง การเคลื่อนที่ และการย้อมติดสีแกรม การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แมนนิทอล มอลโตส ฟรักโตส แลคโตส กาแลคโตส

และแรมโนส ตรวจดูกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ออกซิเดส และคะตาเลส ไนเตรท รีดักเทส และไนไตรท์ รีดักเทส เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทราบลักษณะแน่นอนในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol .1 (1984) แล้วจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

5. การแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ทำการทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงที่คัดเลือกได้

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth เพื่อเพิ่มจำนวน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย โดยปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จึงนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำเป็น suspension ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.1-0.4 เซลล์แบคทีเรียที่ได้นี้จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

5.2 การแปรผันแหล่งคาร์บอน (carbon source)

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งได้เตรียมไว้ในข้อ 5.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) และแมนนิทอล (mannitol) แล้วบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 48 ขวด เก็บตัวอย่างครั้งละ 4 ขวด ทุก 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่นตามวิธีในข้อ 3.2.1 โดยทำเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำเช่นเดียวกันทุกประการ แต่ไม่ได้ฉีดก๊าซอะเซทิลีนเข้าไป ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และหลังจากนั้นจึงหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2.2

5.3 การแปรผันอุณหภูมิ

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่แปรผันอุณหภูมิเป็น 20,30 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 4ขวด ทุก 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น ตามวิธีในข้อ 3.2.1 โดยทำเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำเช่นเดียวกันทุกประการ แต่ไม่ได้ฉีดก๊าซอะเซทิลีนเข้าไป และหลังจากนั้นจึงหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2.2

5.4 การแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 48 ขวด เก็บตัวอย่างครั้งละ 4 ขวด ทุก 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น ตามวิธีในข้อ 3.2.1 โดยทำเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำเช่นเดียวกันทุกประการ แต่ไม่ได้ฉีดก๊าซอะเซทิลีนเข้าไป ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และหลังจากนั้นจึงหาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2.2

6. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่มีผลต่อการเจริญของต้นข้าวเจ้าพันธุ์ กข1

เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ ว่าจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของข้าว ได้นำแบคทีเรียดังกล่าวมาพ่นลงบนใบข้าวเจ้าพันธุ์ กข1 เปรียบเทียบกับการใส่ปุ๋ยเคมี โดยแบ่งขั้นตอนการทดลองดังนี้

6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างดินที่จะนำมาทดลองปลูกต้นข้าว

เพื่อคัดเลือกหาดินที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองปลูกข้าวเริ่มต้นในดินที่นำมาเพาะปลูกข้าว เก็บตัวอย่างดินจากนาข้าว จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ดินนาข้าวอำเภอ

คลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี ดินนาข้าวอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี ดินนาข้าวอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในดินทำได้โดยใช้วิธีเจลดาล (Kjeldahl method) ตามเทคนิคของ Stayermark, (1951) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำตัวอย่างดิน 1.0-1.5 กรัมใส่ใน Kjeldahl flask เติมซอลท์มิกเจอร์ (salt mixture) 7 กรัม (ซึ่งประกอบด้วยไดโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) ในอัตราส่วน 19:1) แล้วค่อย ๆเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นจึงนำไปตั้งบนเตาย่อย โดยเริ่มจากไฟอ่อน ๆก่อน รอจนควันจางจึงใช้ไฟแรงย่อย โดยทำในตู้ควันจนได้สารละลายใส แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นจึงนำไปกลั่นบนเตากลั่นโดยดักจับแอมโมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริก (HBO_3) ที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ใส่อินดิเคเตอร์ที่ประกอบด้วยเมทธิลีนบลู และเมทธิลเรดผสมกันประมาณ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร จึงนำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน แล้วจึงคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\%\text{ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตรกรดHCl (ml) x ความเข้มข้นของกรด HCl (M) x 1.4}}{\text{ปริมาณสารตัวอย่าง(g)}}$$

6.2 การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่จะนำมาทดลองปลูกต้นข้าว

ได้ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยนำตัวอย่างดินที่พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนต่ำสุดจากการทดลองในข้อ 6.1 ซึ่งได้แก่ดินจากอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ซึ่งนำมาใช้ในการทดลองปลูกต้นข้าว และวัดหาค่าความเป็นกรด-ด่างโดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัมมาใส่น้ำที่มีฤทธิ์เป็นกลางปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

6.3 การเตรียมดิน และเมล็ดข้าวเจ้าพันธุ์ กข1 ที่จะนำใช้ในการปลูกทดสอบ

จากผลการทดลองในข้อ 6.1 พบว่าดินจากอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี มีปริมาณไนโตรเจนต่ำสุด จึงเลือกนำมาใช้ในการทดลองปลูกต้นข้าว แล้วนำดินมา

ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แล้วนำมาบรรจุในกระบะทดลองขนาด 43 cm x 18 cm x 22 cm บรรจุดินในกระบะที่ได้ผ่านการเช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำข้าวเจ้าพันธุ์ กข1 (*Oryza sativa* L.RD1) ที่ได้จากสถานีวิจัยข้าวบางเขน มาเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ แล้วนำมาเพาะในกระบะที่บรรจุดินที่ใช้ในการทดลองจำนวน 100 เมล็ด นับจำนวนต้นข้าวที่งอก เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นข้าว

เมื่อจะทำการเพาะปลูกต่อไปให้นำเมล็ดข้าวเจ้าพันธุ์ กข1 (*Oryza sativa* L.RD1) ที่ได้ทดลองแล้วว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูง มาทำการคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ แล้วทำการฆ่าเชื้อที่ผิวนอก โดยนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

6.4 การเตรียมปลูก และปักดำต้นกล้า

นำดินที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 รดน้ำให้ชุ่มโดยใช้น้ำปราศจากเชื้อแล้วหว่านเมล็ดข้าวเจ้าพันธุ์ กข1ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวนอกตามวิธีในข้อ 6.3 ลงในกระบะด้วยอัตราส่วน 1 เมล็ดต่อตารางเซ็นติเมตร หมั่นรดน้ำให้ชุ่มอยู่เสมอ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน แล้วจึงถอนไปปักดำ โดยนำต้นกล้าที่มีอายุ 22 วัน ที่เตรียมไว้ มาปักดำในกระบะที่บรรจุดินซึ่งได้เตรียมไว้ในข้อ 6.3 โดยทำการปักดำจำนวน 5 ต้นต่อกอ มีระยะห่างระหว่างกอเป็น 16 เซ็นติเมตร โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 7 ชุด ในแต่ละชุดทำการทดลอง 4 ซ้ำโดยวางแผนการทดลองแบบ randommize complete block design (RBD) ดังนี้

1. กระบะควบคุมที่ไม่ใส่ทั้งปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 และไม่พ่นด้วยแบคทีเรียบนใบข้าว
2. กระบะที่ใส่ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 ปริมาณ 12 kg.N/ไร่ (แต่ไม่ได้พ่นแบคทีเรียบนใบข้าว)
3. กระบะที่ใส่ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 ปริมาณ 8 kg.N/ไร่ (แต่ไม่ได้พ่นแบคทีเรียบนใบข้าว)
4. กระบะที่ใส่ปุ๋ยยูเรียสูตร 46-0-0 ปริมาณ 5 kg.N/ไร่ (แต่ไม่ได้พ่นแบคทีเรียบนใบข้าว)

5. กระบะที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย แต่พ่นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้บนใบข้าว
6. กระบะที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย แต่พ่นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้บนใบข้าว
7. กระบะที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย แต่พ่นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้บนใบข้าว

โดยในกระบะที่ใส่ปุ๋ยยูเรียจะใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะใส่ในวันที่ทำการปักดำ และครั้งที่ 2 จะใส่ในระยะที่ข้าวแตกกอสูงสุด คือเมื่อมีอายุได้ 63 วัน โดยแบ่งใส่ครั้งละครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ต้องใส่ทั้งหมด

6.5 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่จะนำไปพ่นบนใบข้าว

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงที่คัดเลือกได้ มาทำการเพิ่มจำนวนโดยนำไปเลี้ยงในอาหาร nutrient broth 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าขวดทดลองบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 5.1

6.6 การพ่นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงลงบนใบข้าว

นำหัวเชื้อเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 6.5 ไปพ่นลงบนใบข้าวอายุ 1 เดือน โดยพ่นห่างจากใบประมาณ 1 ฟุต

6.7 เปรียบเทียบวัดอัตราการเจริญของข้าวที่มีการพ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ กับชุดการทดลองที่ไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรียแต่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียแทน

เปรียบเทียบอัตราการเจริญของต้นข้าวที่พ่นด้วยแบคทีเรีย และที่ไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรียแต่ใส่ปุ๋ยยูเรียปริมาณ 5 8 และ 12 กิโลกรัมต่อไร่ โดยการวัดความสูงของลำต้น และน้ำหนักแห้งของต้นข้าวทุก 2 สัปดาห์

6.8 ตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนบนใบข้าวที่มีการพ่น และไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

โดยตัดใบต้นข้าวอายุ 3 เดือนที่มีการพ่น และที่ไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ขนาด 1 เซ็นติเมตร x 20 เซ็นติเมตร จำนวน 1 ใบ มาใส่ในขวดทดลอง

ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดจุกยาง ฉีดก๊าซอะเซธิลีน ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ แล้วนำมาหาอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยเทคนิคอะเซธิลีนรีดักชั่นตามที่ได้กล่าวมาในข้อ 3.2.1 แล้วจึงนำมาชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้งของใบข้าวโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ตรวจสอบและพิสูจน์ยืนยันการอยู่ร่วมกันของของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนกับใบข้าวที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย

โดยนำใบข้าวที่ได้พ่น และไม่ได้พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

7.1 การเตรียมตัวอย่างในการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

ตัดใบข้าวเจ้าพันธุ์ กข1ที่มีอายุ 3 เดือนที่พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ 2, 6, 12 และใบข้าวที่ไม่ได้พ่นแบคทีเรียขนาด 0.3 เซนติเมตร x 0.3 เซ็นติเมตรผ่านขั้นตอนการ fixation เพื่อรักษาคุณสมบัติของเซลล์ไว้ โดยแช่ในกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นตามลำดับดังนี้ 70 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยในแต่ละช่วงใช้เวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) เพื่อรอที่จะทำขั้นตอนต่อไป แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกแล้ว มาทำให้แห้ง (drying process) เพื่อทำให้เซลล์แห้งโดยวิธี critical point drying machine เพื่อไม่ให้เสียรูปร่างไป แล้วจึงนำเซลล์ที่แห้งแล้วมาติดบน specimen holder แล้วเคลือบด้วยทองคำ ตรวจดูการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบนผิวใบข้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลค ตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-T 220A