บทที่ 2

วิธีการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 กาซที่ใช้

อะเซทีลีน	ของ	บริษัทลิทริโซ่ดเอ็นยิเนียริ่งจำกัด
เอทีลีน	ของ	Scott Environment Technology, Inc. USA.
ออกซิเจน	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
อาร์กอน	ของ	บริษัทไทยอินดัสเตรียลกาซจำกัด
อากาศอัด	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ไนโตรเจน	ของ	บริษัทไทยอินดัสเตรียลกาซจำกัด
ไฮโดรเจน	ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก และจากเครื่องให้กำเนิดไฮโดรเจน (Hydrogen generator) ของ General Electric

003755

1.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 ของ Bosch & Lomb

เครื่องเซนตริฟิวจ์ ของ Gallenkamp และ Superspeed 50 ของ MSE

เครื่องกาซโครมาโตกราฟฟี ของ Perkin Elmer Model F 17 และ Varian Model 3700

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) ของ Forma Scientific Company

เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum pump) ของ General Electric USA.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

1.4 อาหารสำเร็จ

อาหารสำเร็จทุกชนิดที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียในการทดลองนี้เป็นของบริษัทดิฟโก

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.1 ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 จากสายพันธุ์วิทยาและจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.2 เอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เอชี 5466 (พีอาร์ดี 1) ซึ่งบนโครโมโซมใหญ่มียีนเป็น trp his recA46 spc^R และมีพีพลาสมิด (อาร์พี 41 หรือ พีอาร์ดี 1) ประกอบด้วยยีนต้านยา 3 ชนิดคือ Km^R $Carb^R$ Tc^R รวมกับยีนของเคลบเซียลลาคือ rfb^+ gnd^+ his^+ nif^+ $shiA^+$ จาก Agricultural Research Council Unit of Nitrogen Fixation UK.

3. สูตรอาหาร

3.1 Yeast mannitol medium (Vincent, J.M. 1970) เป็นอาหารเยื้อวุ้นใช้สำหรับเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum) ประกอบด้วย

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แมนนิทอล	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	0.4	กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอล ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น (Bacto agar) 15 กรัมต่อลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2 Yeast mannitol congo red medium (Vincent, J.M. 1970) ใช้เป็นอาหารเชื้อจุลมเตรียมเช่นเดียวกับ 3.1 ใช้สำหรับทดสอบเชื้อไรโซเบียม ก่อนใช้เติมสีคองโกเร็ด (1 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร) ลงไป 10 มิลลิลิตรด้วย

3.3 Mannitol minimal medium หรือ Defined medium (Vincent, J.M. 1970, O' Gara, F., and Shanmugam, K.T. 1976) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับใช้ในการทดลองทั่วไปประกอบด้วย

แมนนิทอล	10.00	กรัม
โซเดียมกลูตาเมท	1.00	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.10	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.05	กรัม
กรดบอริค	10.0	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต	1.0	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.5	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.5	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.1	มิลลิกรัม
เฟอริคคลอไรด์	1.0	มิลลิกรัม
ไบโอติน	0.2	มิลลิกรัม

ปรับพีเอช ให้เป็น 6.8 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4 Nitrogenase induction medium (O' Gara, F., and Shanmugam, K.T. 1977) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ใช้สำหรับทดสอบการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 ประกอบด้วย

แมนนิทอล	1.00	กรัม
โซเดียมกลูโคเนท	5.60	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.10	กรัม
โซเดียมกลูตาเมท	1.00	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.05	กรัม
กรดบอริค	10.0	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต	1.0	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.5	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.5	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.1	มิลลิกรัม
เฟอริคคลอไรด์	1.0	มิลลิกรัม
ไบโอติน	0.2	มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะ เติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินความเข้มข้น 30, 20, และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.5 Bergersen's medium (Bergersen, F.J. 1961) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ใช้สำหรับทดสอบการเจริญเติบโตในแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ต่างกันของไรโซเบียม ประกอบด้วย

แหล่งต้นตอคาร์บอน (น้ำตาล)	10.00	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.45	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.10	กรัม
เฟอริคคลอไรด์	0.02	กรัม
โซเดียมกลูตาเมท	1.10	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.04	กรัม

ไทอะมิน (วิตามิน บี1)	0.10	มิลลิกรัม
ไบโอติน	0.10	มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.6 Nutrient agar (Vincent, J.M. 1970, Tjepkema, J., and Evans, H.J. 1975) เป็นอาหารสูตรสำเร็จของบริษัทดิฟโก ใช้สำหรับทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเร็วเนื่องจากเชื้อไรโซเบียมไม่เจริญบนอาหารนี้ โดยละลายนิวเตรียนท์อะการ์ 23 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.7 Davis minimal medium (Davis, B.D., and Mingioli, E.S. 1950, Miller, J.H. 1972) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับใช้ในการเก็บรักษาเอสเคอริเคียโคไล เค 12 เจซี 5466 (เอชอาร์ดี 1) ประกอบด้วย

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม
กลูโคส	2.0	กรัม
ทริปโตแฟน	25	มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน เตตราซัยคลิน และสเปคติโนมัยซิน ความเข้มข้น 30, 20, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

3.8 Nitrogen fixation minimal medium (ปรับปรุงจาก Streicher, S.; Gurney, E.; and Valentine, R.C. 1971) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (เอชอาร์ดี 1) ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.25	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.00	กรัม

เฟอรัสซัลเฟต	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.01	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.20	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม
ทริปโตแฟน	25	มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.6 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.9 NFDM medium (Cannon et al. 1974a) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) ประกอบด้วย

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.10	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	12.06	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.40	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท	25.00	มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟต	25.00	มิลลิกรัม
เคซีนไฮโดรไลเสท (เคสอะมิโนแอซิด)	100	มิลลิกรัม
ทริปโตแฟน	25.00	มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.10 L - broth (Luria, S.E.; Adams J.N.; and Ting, R.C. 1960) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดมของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) ประกอบด้วย

ทริปโตน	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5	กรัม

โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะเติมคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 สารละลายต่างสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; and David, M.M. 1949)

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัม และโซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตท 6 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติม 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป 300 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมไอโอไดด์ 1 กรัม และน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

4.2 สารละลายต่างสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry et al. 1951)

4.2.1 สารละลายคาร์บอเนทคอปเปอร์

ผสม 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคาร์บอเนต 50 มิลลิลิตร กับ 0.5 เปอร์เซ็นต์คอปเปอร์ซัลเฟต และ 1 เปอร์เซ็นต์โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรท 2 มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายโฟลิน - ซิโอคาลโตฟีนอลรีเอเยนต์

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท12.5 กรัม และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ 2 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2 - 3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชำป้องกันแสง

4.3 สารละลายกรดบอริค - อินดิเคเตอร์ (Bremmer and Edwards 1965)

ละลายกรดบอริค 40 กรัมในน้ำร้อน 1,400 มิลลิลิตร เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 2 ลิตร เติม 400 มิลลิลิตรของ 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และ 40 มิลลิลิตรของอินดิเคเตอร์ผสม

(ประกอบด้วยโบรโมครีซ่อลกรีน 0.66 กรัม และเมทิลเร็ด 0.33 กรัมใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 1 ลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นค่อย ๆ เติม 0.05 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปจนกระทั่งได้สารละลายซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนไปเป็นสีเขียวอ่อน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร

4.4 สารละลายอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน (Sloger, C. 1969) เป็นปุ๋ยสำหรับการปลูกถั่วเหลืองประกอบด้วย

แมกนีเซียมคลอไรด์	0.17800	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.25600	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.16500	กรัม
โปตัสเซียมซัลเฟต	0.08200	กรัม
ซีเควสตรีนไอรอนคีเลต	0.02000	กรัม
แคลเซียมซัลเฟต	0.00200	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.00400	กรัม
กรดบอริค	0.00300	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.00020	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต	0.00020	กรัม
โมลิบดีนัมไตรออกไซด์	0.00009	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

5. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

5.1 ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 (Vincent, J.M. 1970)

ไรโซเบียมที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บรักษาไว้บนวุ้นเอียงที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อยีส์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) ที่เสริมด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต 3 กรัมต่อลิตรในขวดที่ปิดจุกเกลียวแล้วเคลือบด้วยพาราฟิน เมื่อต้องการใช้ในการทดลอง จะเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อใหม่โดยเขี่ยเชื้อมาจากขวดที่เก็บไว้นี้ เฉพาะพวกคอนจูแกนท์จะเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน

และเตตราซัยคลินลงในอาหารนี้ปริมาณ 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.2 เอล์เคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) (Dixon, R.A., and Postgate, J.R. 1972)

แบทีเรียชนิดนี้ถูกเก็บรักษาไว้บนวุ้นเอียงที่บรรจุอาหารสูตรปรับต่ำของเดวิส์ (สูตรอาหารที่ 3.7) (กรดนี้ไม่ต้องเติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน) ในขวดที่ปิดจุกแล้วเคลือบด้วยพาราฟิน เมื่อต้องการใช้จึงเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงบนจากเพาะเชื้อใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำของเดวิส์ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน เตตราซัยคลิน และล์เปคติโนมัยซิน จากขวดที่เก็บไว้นี้

6. การศึกษาการเจริญเติบโตของไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

6.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับระยะเวลาและความเข้มของการดูดแสง

นำเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีส์ตแมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) เขย่าที่ 30° ซ 100 รอบต่อนาที นาน 7 วัน เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีส์ตแมนนิทอลใหม่ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ในขวดกรวยแก้วที่ปลอดเชื้อ เขย่าที่ 30° ซ 100 รอบต่อนาที นาน 3 - 13 วัน ติดตามปริมาณความขุ่นของเซลโดยวัดการดูดแสงที่ 500 นาโนเมตร แล้วดูดเชื้อมา 0.1 มิลลิลิตร กระจายเซลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 9.9 มิลลิลิตร เจือจางให้มีปริมาณต่าง ๆ กัน นำ 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรอุตมยีส์ตแมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วบนผิวอาหารนี้โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม บ่มที่ 30° ซ 7 - 10 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นแล้วหารด้วย 0.1 คูณด้วยอัตราส่วนกลับของการเจือจางก็จะเป็นจำนวนเซลต่อมิลลิลิตรที่แท้จริงของความขุ่นที่ความยาวแสง 500 นาโนเมตร ณ ช่วงเวลานั้น (Pelczar C.J., Jr. and Chan E.S.C., 1977)

6.2 ความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีส์ตแมนนิทอล เขย่าที่ 30° ซ 100 รอบต่อนาที นาน 7 วัน แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุตมยีส์ตแมนนิทอล

(สูตรอาหารที่ 3.1) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำของเบอเกอเล่น (สูตรอาหารที่ 3.5) ที่มีกลูโคส์ ฟรุคโตส์ ซูโครส์ และยีสซีเนท เป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับแมนนิทอลจำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดกรวยแก้วที่ปลอดเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 30 ซ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ติดตามปริมาณความขุ่นของเชื้อที่เพิ่มขึ้นโดยวัดการดูดแสงที่ 500 นาโนเมตร

7. การวัดการรีดิวซ์อะเซทีลีน (Hardy, et al. 1968)

7.1 การวัดแอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนในไรโซเบียม ฉาโปนิคัม 122 (O' Gara, F.; and Shanmugam, K.T. 1977)

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีส์ต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) เขย่าที่ 30 ซ 100 รอบต่อนาที นาน 7 วัน เก็บเซลโดยการปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที 10 นาที และกระจายเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อไนโตรซีเนล่อินดักชัน (สูตรอาหารที่ 3.4) ปริมาตรเท่าเดิม เชื้อที่ได้นี้จะเป็นเชื้อตั้งต้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนโตรซีเนล่อินดักชันใหม่ ในอัตราส่วน 1 : 20 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วขนาด50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง Suba seal ยารอบ ๆ ปากขวดด้วยพาราฟิล์ม เปลี่ยนให้เป็นบรรยากาศ์อาร์กอนโดยใช้เครื่องปั๊มดูดให้เป็นสูญญากาศ์ แล้วบรรจุกาซ์อาร์กอนลงไปแทนที่เท่ากับ 1 บรรยากาศ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) เติมอะเซทีลีน 4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มดูดเอาอาร์กอนออกมาจากขวด 2.4 มิลลิลิตร แล้วฉีดอะเซทีลีนปริมาณเท่ากันลงไปแทนที่ เขย่าที่ 28 ซ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาจึงเติมออกซิเจนลงไปให้มีความดันเท่ากับ 0.76 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 28 ซ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที หาปริมาณของเอทีลีนที่เกิดขึ้นจากการรีดิวซ์อะเซทีลีนโดยเอ็นไซม์ไนโตรซีเนล์ โดยใช้เข็มดูดเอากาซ์ในขวดกรวยแก้วออกมา 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟฟีของ Perkin Elmer Model F 17 ซึ่งมีดีเทคเตอร์เป็นชนิด Hydrogen flame ionization คอลัมน์พอราแพคเอ็น ขนาด 0.6 x 45 เซนติเมตร และใช้ไนโตรเจนเป็นกาซ์พาด้วยความเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 ซ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ 75 ซ และอุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 100 ซ ในกรณีที่ใช้เครื่องกาซ์โครมาโตกราฟฟีของ Varian Model 3700 ใช้ดีเทคเตอร์ชนิด Hydrogen flame ionization คอลัมน์พอราแพค-เอ็นขนาด 0.28 X 200 เซนติเมตร และใช้ไนโตรเจนเป็นกาซ์พาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิของคอลัมน์ 90° ซ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ 110° ซ อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 150° ซ หาปริมาณของกาซ์เอทีลีนโดยการวัดความสูงของพีคที่ได้เทียบกับกาซ์เอทีลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน วัดความยุ่นของเยื่อที่ความยาวแล่ง 500 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนของเยื้อทั้งหมดโดยวิธีลอรี สำหรับพวกคอนลูแกนท์จะมีวิธีทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้นแต่อาหารเลี้ยงเยื้อทุกชนิดที่ใช้จะเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ลงไปด้วยปริมาณ 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีนหรือแอคติวิตี้จำเพาะของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส์คือจำนวนนาโนโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเยื้อต่อวัน

7.2 การวัดแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีนของเอส์เคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1) (Cannon, F.C.; Dixon, R.A.; and Postgate, J.R. 1976)

เยี่ยเยื้อจากอาหารสูตรปรับต่ำของเดวิส์ (สูตรอาหารที่ 3.7) มาเจริญบนอาหารเลี้ยงเยื้อแข็งเอ็นเอฟดีเอ็ม (สูตรอาหารที่ 3.9) ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน เตตราซัยคลิน และส์เปคติโนมัยซินปริมาณ 30, 20, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่ 30° ซ ภายใต้บรรยากาศ์ไนโตรเจน 3 - 4 วัน เลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่มา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเยื้อสูตรอุดมแอล-บรอท (สูตรอาหารที่ 3.10) จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน ปริมาณ 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มที่ 37° ซ 24 ชั่วโมง แล้วเติมลงในอาหารเลี้ยงเยื้อสูตรปรับต่ำสำหรับการตรึงไนโตรเจน (สูตรอาหารที่ 3.8) หรือในอาหารเลี้ยงเยื้อเอ็นเอฟดีเอ็มในอัตราส่วน 1 : 20 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง นำไปเปลี่ยนให้เป็นบรรยากาศ์อาร์กอนโดยดูดอากาศ์ออกให้หมด แล้วบรรจุกาซ์อาร์กอนเข้าไปแทนที่ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) เติมอะเซทีลีน 4 เปอร์เซ็นต์ บ่มเยื้อที่ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หาปริมาณเอทีลีนที่เกิดขึ้นทุกครึ่งชั่วโมง โดยใช้เข็มดูดเอากาซ์ในขวดออกมา 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องกาซ์โครมาโตกราฟฟี Varain Model 3700 วัดความยุ่นของเซลที่ความยาวแล่ง 500 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนของเยื้อทั้งหมดโดยวิธีลอรี แอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีลีนคือจำนวนไมโครโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเยื้อต่อชั่วโมง

8. <u>การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอรี</u> (Herbert et al. 1971)

ล้างเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วกระจายเซลให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 100 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลที่เตรียมไว้นี้ 0.5 มิลลิลิตรผสมกับ 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 100° ซ 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายคาร์บอเนตคอปเปอร์ 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน-ซีโอคาลโตฟีนอลรีเอเยนต์ (เจือจาง 1 : 2) 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้อีก 30 นาที วัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวแล่ง 500 นาโนเมตร

9. <u>การทดสอบความถี่ในการผันกลับ</u> (Reversion frequency) ของเอสเคอริเคีย โคไล เค 12 เจซี 5466 (พีอาร์ดี 1)

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดมยีสต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) บ่มที่ 37 ซ 24 ชั่วโมง ดูด 0.1 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 9.9 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณเซลต่าง ๆ กัน จากนั้นดูดมา 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำแมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.3) ที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยกรดอะมิโนทริปโตแฟน เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วบนผิวอาหารนี้โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม บ่มที่ 37 ซ 7 วัน นับและเทียบจำนวนโคโลนีในสารอาหารทั้งสอง

10. <u>การผสมพันธุ์</u> (Miller, J.H. 1972, Dixon, R.A.; Cannon, F.C.; and Kondorosi, A. 1976, Kuykendall, L.D. 1979)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตัวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) เขย่าที่ 30 ซ 100 รอบต่อนาที 7 วัน ส่วนแบคทีเรียตัวให้นำมาเลี้ยงในแอล-บรอท (สูตรอาหารที่ 3.10) บ่มที่ 37 ซ 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียตัวให้นี้มา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์แมนนิทอล เขย่าที่ 37 ซ 150 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียตัวรับและตัวให้ซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอลนี้มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอลใหม่ 8 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 34 ซ 60 รอบต่อนาที

48 ชั่วโมง นำมาเลือกจางให้มีปริมาณคอนจูแกนท์ต่าง ๆ กัน แล้วดูดมาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำแมนนิทอลคองโกเร็ด (สูตรอาหารที่ 3.3) ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ซ 10 วัน แล้วสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น

11. <u>การทดสอบการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการเกิดปมในรากถั่วเหลือง</u> (nodulation)

พืชตัวอย่างที่เลือกมาทดลองในที่นี้คือ ถั่วเหลือง สจ. 4 ซึ่งปลูกในขวด 2 ใบ คล้องกันอยู่แบบ Leonard jar assemblies (ดัดแปลงจาก Vincent, J.M. 1970) โดยขวดใบบนใส่ทราย ขวดใบล่างใส่สารละลายอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน

11.1 <u>การเตรียมทราย</u>

นำทรายน้ำจืดมาร่อนและล้างให้สะอาดอย่างน้อย 10 ครั้ง บรรจุทรายนี้ประมาณ 650 กรัมน้ำหนักแห้งลงในขวดบนของลีโอนาร์ดจาร์ นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดันไอน้ำอย่างน้อย 3 ชั่วโมง

11.2 <u>การเตรียมอุปกรณ์</u>

ประกอบด้วยขวดสองใบ ใบแรกเป็นขวดเบียร์ ปริมาตรประมาณ 600 มิลลิลิตร ตัดก้นขวดออกขวดนี้จะใส่ทรายน้ำจืดจนเต็ม แล้วกลับลงไปบนขวดใบที่สอง ซึ่งเป็นขวดปากกว้างขนาด 1 ลิตร และรับกันพอดีกับขวดเบียร์ ขวดใบที่สองนี้จะใส่สารอาหารที่จำเป็นของพืชทุกชนิดยกเว้นสารต้นตอไนโตรเจน

11.3 <u>การเพาะและบำรุงรักษาพืชตัวอย่าง</u> (Sloger, C. 1969, Vincent, J.M. 1970)

เลือกเมล็ดถั่วที่มีลักษณะอวบสมบูรณ์ ไม่ลีบไม่แตก และไม่มีร่องรอยของแมลงมาเจาะกิน นำมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลเป็นเวลา 5 นาที และ 0.2 เปอร์เซ็นต์เมอคิวริคคลอไรด์ซึ่งทำให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเมล็ดในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อประมาณ 10 ครั้ง พบว่าขั้นตอนนี้สามารถแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ลักษณะด้วยกันคือ

ก. พวกที่เปลือกเมล็ดย่น แสดงว่าเปลือกเมล็ดอ่อนนุ่มพร้อมที่จะงอกแล้ว

ข. พวกที่เปลือกเมล็ดแตกหรือพองออก แสดงว่าต้นอ่อนได้ถูกทำลายไปแล้ว

ค. พวกที่เปลือกเมล็ดคงลักษณะเดิมไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าเป็นพวกเมล็ดกระด้าง (Dormant seeds)

นำเมล็ดที่มีลักษณะเปลือกเมล็ดย่นไปเพาะบนทรายที่ปลอดเชื้อโดยการขุดหลุมตื้นฝังเมล็ดถั่ว 5 เมล็ดต่อ 1 ขวด หยอดเชื้อลงบนบริเวณที่ฝังเมล็ดถั่วแห่งละ 1 มิลลิลิตร (เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล (สูตรอาหารที่ 3.1) ในกรณีที่เป็นคอนจูแกนท์เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จนได้แบคทีเรียประมาณ 10^9 เซลต่อมิลลิลิตร) กลบหลุมแล้วปิดปากขวดด้วยฝาอลูมิเนียมที่ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดรอจนเมล็ดงอกซึ่งกินเวลา 3-5 วัน จึงถอนต้นที่ไม่ต้องการออกให้เหลือประมาณ 2 - 3 ต้นใน 1 ขวด แล้วเทหินก้อนเล็ก ๆ ที่ปลอดเชื้อลงไปบนผิวทรายให้สูงขึ้นมาประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายที่เติมลงไประเหยเร็วจนเกินไป นำไปตั้งไว้ที่แจ้งและคอยเติมสารละลายอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน (สูตรอาหารที่ 4.4) ที่ปลอดเชื้อลงในขวดล่างเพื่อให้ทรายชุ่มอยู่เสมอ เพื่อป้องกันการขาดน้ำของต้นถั่ว แล้วปักไม้ลงในขวดบนเพื่อเป็นหลักยึดต้นถั่วไว้ สังเกตดูการเจริญเติบโตและการเกิดปม

11.4 การเก็บพืชตัวอย่าง

กรรมวิธีในการเก็บคือ ตัดส่วนยอดเหนือจากพื้นดินประมาณ 1 เซนติเมตร แยกไว้ใช้หาโปรตีนและไนโตรเจนทั้งหมด ส่วนรากนำไปชะทรายออกให้หมด ซับให้แห้ง เพื่อนำไปหาอัตราการตรึงไนโตรเจน ส่วนทรายเก็บตัวอย่างมาเพื่อไว้หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยเก็บลุ่มบริเวณผิวหน้าดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตร

11.5 การหาแอคติวิตี้การรีดิวซ์อะเซทีลีน

นำตัวอย่างพืชส่วนที่เป็นรากมาล้างน้ำให้สะอาด ซับให้แห้ง แล้วใส่ขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีจุกยางจุกอยู่ ยารอบ ๆ ปากขวดด้วยพาราฟิล์มเพื่อกันไม่ให้ก๊าซภายในขวดรั่วออกมา

ได้ ดูดอากาศภายในออกให้หมดโดยใช้เครื่องปั๊มดูดอากาศ แล้วบรรจุกาซอาร์กอนเข้าไปแทนที่เท่ากับ 1 บรรยากาศ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ดูดอาร์กอนออก 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรแล้วบรรจุอะเซทีลีนเข้าไปแทนที่ด้วยปริมาตรเท่ากัน ดูดกาซผสม (อาร์กอน + อะเซทีลีน) ออก 20 เปอร์เซ็นต์ บรรจุออกซิเจนปริมาตรเท่ากันเข้าแทนที่ อินคิวเบทที่อุณหภูมิห้อง (30 ซ) 1 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทีลีนที่เกิดขึ้นเทียบกับเอทีลีนมาตรฐาน จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก นับจำนวนปมและชั่งน้ำหนักปม แอคติวิตี้จำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน คือ จำนวนไมโครโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้นต่อ 1 กรัมน้ำหนักปมแห้งต่อชั่วโมง

12. การหาปริมาณโปรตีนของใบถั่ว

12.1 การสกัดโปรตีนจากใบพืช (สุนันทา เจิมหรรษา 2522)

ใช้ใบทั้งหมดของถั่วเหลืองประมาณ 3 - 5 กรัม นำไปบดในครก โดยมีน้ำผสมปริมาตรเป็น 2 เท่าของน้ำหนักใบ กรองกากออกด้วยผ้ากอส ทำซ้ำอีก 2 ครั้งรวมน้ำใสเข้าด้วยกัน นำไปปั่นแยกเอาเศษใบออกที่ 5,000 รอบต่อนาที 10 นาที ตกตะกอนจากส่วนน้ำใสด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติคโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ทิ้งไว้ 2 - 3 นาที นำไปปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที 3 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติค 5 เปอร์เซ็นต์ นำตะกอนมาละลายใน 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณประมาณ 5 เท่าของตะกอน นำไปต้มที่ 50 ซ ครึ่งชั่วโมง นำสารละลายที่ได้นี้มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท

12.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Layne, E. 1957)

ผสมสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตรกับสารละลายไบยูเรท 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวแล่ง 540 นาโนเมตร

13. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากใบถั่ว

ใช้วิธีย่อยสารตัวอย่างตามวิธีเคลดาล์ดัดแปลงใหม่โดยเนลสันและโซมเมอร์ (Nelson, D.W., and Sommers, L.E. 1973) และหาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการต้มกลั่นโดยไตเตรทกับกรดตามวิธีของเบรมเมอร์และเอทเวิท (Bremmer and Edwards 1965)

การย่อยและการกลั่นสารตัวอย่าง

ผสมพืชตัวอย่างอบแห้ง 0.1 กรัม หรือทรายตัวอย่างอบแห้ง 0.5 กรัมกับ 1.1 กรัมของเกลือผสมคาตาลิสต์ (ประกอบด้วยโปตัสเซียมซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และซีลีเนียมในอัตราส่วน 100 : 10 : 1) ใส่ในหลอดย่อยโฟลินวู (Folin Wu digestion tube) ขนาด 80 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 4 มิลลิลิตรนำไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิประมาณ 300 ° ซ จนกระทั่งสารตัวอย่างเปลี่ยนจากสีดำไปเป็นสีเขียวใส ซึ่งจะกินเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นต้มย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวใสไปเป็นสีขาวขุ่น แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร จึงนำไปหาปริมาณแอมโมเนียโดยใช้สารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วนี้ 10 มิลลิลิตรผสมกับ 10 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร นำไปต้มกลั่นโดยหลอดกลั่นเคลดาล์ รองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยขวดกรวยแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 5 มิลลิลิตรของสารละลายกรดบอริค-อินดิเคเตอร์ไว้จนกระทั่งได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 30 มิลลิลิตรจึงหยุดกลั่น

การไตเตรทหาปริมาณแอมโมเนียที่กลั่นออกมา

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาหาปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยไตเตรทกับกรดซัลฟุริคความเข้มข้นมาตรฐาน 0.005 นอร์มอลจนกระทั่งถึงจุดสมมูลย์ โดยใช้สารละลายกรดบอริค-อินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตรผสมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตรแล้วไตเตรทกับกรดซัลฟุริค 0.005 นอร์มอลเป็นตัวชี้นำ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีม่วงอ่อน จดปริมาตรของกรดซัลฟุริคที่ใช้ นำไปคำนวณเป็นปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารละลายโดย

1 มิลลิลิตรของกรดซัลฟุริคความเข้มข้นมาตรฐาน 0.005 นอร์มอล จะเท่ากับ 70 ไมโครกรัมของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน

14. การแยกเชื้อจากปมรากถั่ว (Vincent, J.M. 1970)

แยกปมจากรากถั่วเหลืองอายุ 4 - 5 สัปดาห์ นำมาล้างให้สะอาด แช่ใน 20 เปอร์เซ็นต์ไฮโปคลอไรท์ 5 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ผิวนอก แล้วล้างในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 5 ครั้ง นำมาบดในจานที่ปลอดเชื้อ แล้วใช้ห่วง (loop) แตะมาเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแย็งยีสต์

แมนนิทอลคองโกเร็ด (สูตรอาหารที่ 3.2) ในกรณีที่เป็นตอนจูแกนท้เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินความเข้มข้น 30, 20 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่ 28 - 30 °ซ 7 - 10 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น