บทที่ 2

วิธีดำเนินการศึกษา

2.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน ราก และลำต้นอ้อยจากแปลงปลูกอ้อย

สำรวจแหล่งเพาะปลูกอ้อยที่ไม่ใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกอ้อยในจังหวัดขอนแก่น นครราชสีมาและอุดรธานี

เก็บตัวอย่างรากและลำต้นอ้อย และดินที่อยู่บริเวณรอบๆ ราก ซึ่งเจริญในแปลงเพาะปลูก โดยขุดดินรอบๆ รากต้นอ้อยที่เจริญในดินดังกล่าว นำลำต้น รากและดินรอบรากใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง และนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป

2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดิน (Free living bacteria) ขั้นปฐมภูมิ (Idris *et al*, 2007)

2.2.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อย 1 กรัม ละลายใน quarter strength Ringer solution (ภาคผนวก 2) ปริมาตร 9 ml และทำ serial dilution ให้มีความเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-9}

2.2.1 นำสารละลายดินแต่ละความเจือจางมา 100 µl เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LGIP medium (ภาคผนวก 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

2.2.3 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร LGIP medium ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลากแบบไขว้บนอาหารชนิดเดิม และเก็บที่อุณหภูมิ -70°C

2.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยในส่วนของราก ลำต้นและยอดอ้อยแบบพึ่งพากัน (Endophytic bacteria) ขั้นปฐมภูมิ (Mirza *et al*, 2001)

2.3.1 นำตัวอย่างราก ลำต้น และยอดของอ้อย มาทำความสะอาดผิวนอกด้วยน้ำประปาเพื่อล้างเศษดินออก และทำให้ผิวนอกปลอดเชื้อโดยแช่ตัวอย่างอ้อยใน 5% chloramines T และ70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ส่วนของลำต้นและยอดอ้อยจะปลอกเปลือกด้วยมีดปลอดเชื้อแล้วนำส่วนที่ต้องการจุ่มแอลกอฮอล์และผ่านเปลวไฟ

2.3.2 นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยใช้โถบดที่ปลอดเชื้อ แล้วทำให้เป็นสารแขวนลอยของตัวอย่างด้วย 5% sucrose ปริมาตร 5 ml

2.3.3 ทำ serial dilution ใน quarter strength Ringer solution ให้มีความเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-5}

2.3.4 นำสารแขวนลอยแต่ละความเจือจางมา 100 µl เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LGIP medium แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

2.3.5 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร LGIP medium ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลากแบบไขว้บนอาหารชนิดเดิม และเก็บที่อุณหภูมิ -70°C

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนขั้นทุติยภูมิ

เป็นการทดสอบหากิจกรรมของ nitrogenase enzyme โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ตามวิธีของ Loiret *et al*, 2004 ดังนี้

2.4.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้เจริญบนจานอาหาร LGIP แล้วเคลื่อนย้ายเชื้อลงในอาหาร LB broth (ภาคผนวก 1) ปริมาตร 10 ml บ่มแบบเขย่าที่ 180 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.2 ปั่นล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำสารแขวนลอยแบคทีเรียใน LGIP broth ที่ไม่มี bromothymol blue ปริมาตร 5 ml แล้วปรับให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.08

2.4.3 ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย 500 µl ใส่ลงใน semi solid LGIP medium ที่ไม่ใส่ indicator เช่นเดียวกัน ปริมาตร 5 ml ในขวดยาฉีดขนาด 25 ml ที่ปิดด้วยจุกยางและพันทับด้วยพาราฟิล์ม

2.4.4 เปลี่ยนบรรยากาศในขวดยาฉีดให้เป็นแก๊สไนโตรเจน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.5 เปลี่ยนบรรยากาศในขวดยาฉีดอีกทีด้วยแก๊สอาร์กอน แล้วดูดแก๊สอาร์กอนออกจากขวดยาฉีดในปริมาตร 3 ml แล้วเติมแก๊ส acetylene 3 ml ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2.4.6 ตรวจดูการรีดิวส์แก๊ส acetylene โดยดูดแก๊สจากขวดยาฉีด 500 µl มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography ประเภท flame ionized detector (FID) โดยใช้ Column Porapak N 80/100, 3 mm inner diameter, 2 m long สภาวะในการทดลองจะใช้อุณหภูมิ Column 100°C, Injector 200°C, Detector 220°C และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาในอัตราเร็ว 25 ml/min วัดปริมาณการสร้างแก๊ส ethylene ที่เกิดขึ้นนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ฉีดด้วยแก๊ส ethylene มาตรฐาน

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ,1951)

นำขวดยาฉีดที่ใช้วิเคราะห์การรีดิวส์แก๊ส acetylene มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียใน Semi-solid LGIP medium ปริมาตร 5 ml ดังนี้

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A: ละลาย copper sulfate 0.5 g และ sodium citrate 1 g ในน้ำ 100 ml

สารละลาย B: ละลาย sodium carbonate 20.0 g และ NaOH 4.0 g ในน้ำ 1 l

สารละลาย C: ผสมสารละลาย A 1 ml กับสารละลาย B 50 ml (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

สารละลาย D: สารละลาย 1 N Folin-ciocalteu

วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Semi-solid LGIP medium ต้มใน 1 M NaOH เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก แล้วทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง

2.5.2 ดูดสารที่ต้มแล้วปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย C 5 ml ลงในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 5-10 นาที

2.5.3 เติมสารละลาย D 0.25 ml ลงไป ทิ้งไว้ 20-30 นาที

2.5.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.5.5 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานจาก bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 และ 1000 µg/ml ทำการวิเคราะห์ตามวิธีเดียวกับการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในข้อ 2.5.2-2.5.4 นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ bovine serum albumin

2.6 การศึกษาการสร้าง Indole acetic acid (IAA) ของเชื้อแบคทีเรีย

2.6.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จาก LGIP medium เลี้ยงในอาหาร DF minimal salt medium (Dworkin and Foster, 1958) (ภาคผนวก 1) 5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วย DF salts minimal mediumให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 MacFarland tube

2.6.2 ดูดเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว 20 µl ใส่ลงใน DF minimal salt medium ที่เติม L-tryptophan ที่มีความเข้มข้น 500 µg/ml ปริมาตร 5 ml แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.6.3 ตรวจวิเคราะห์ผลโดยนำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5500 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมา 1 ml ใส่ลงใน Salkowski's reagent (ภาคผนวก 2) ปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.6.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 nm นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Standard IAA

2.7 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

2.7.1 นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 และ 2.3.3 มาแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็น free living และ endophytic bacteria โดยใช้อาหาร nutrient broth (ภาคผนวก 1) และ King's B medium (ภาคผนวก 1)

2.7.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 10 ml บ่มแบบเขย่าที่ 180 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 MacFarland tube

2.7.3 หยดเชื้อปริมาตร 20 µl ลงบนจานอาหาร Pikovskaya's medium (ภาคผนวก 1) ปกติที่เป็นอาหารชั้นเดียว (Ayyadurai *et al*, 2006) และที่มีการปรับปรุงเป็น 2 ชั้น บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-7 วัน ตรวจผลโดยการวัด Halo/Clear zone ที่เกิดขึ้น โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและเส้นผ่านศูนย์กลางของ Halo/Clear zone แล้วนำมาคำนวณตามสมการเพื่อหาค่า Solubilization index (SI) (Edi-Premono *et al.*, 1996)

$$SI = \frac{\text{colony diameter} + \text{halo/clear zone diameter}}{\text{Colony diameter}}$$

2.7.4 นำ 50 µl ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วในข้อ 2.6.1 เลี้ยงใน National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) (ภาคผนวก 1) ปริมาตร 20 ml บ่มที่ 30°C ที่ 180 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูจากการ Decolorize สีของ Bromophenol blue ซึ่งเป็น indicator ใน NBRIP medium และวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป