บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี ช่อลุง ญาเหวย ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 2

1.2 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate : $(NH_4)_2SO_4$)

1.3 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride : NaCl)

1.4 แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulphate : $MnSO_4$)

1.5 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride : KCl)

1.6 แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate : $MgSO_4$)

1.7 กลูโคส (glucose : $C_6H_{12}O_6$)

1.8 ผงวุ้น (agar)

1.9 พาราไนโตรฟีนอล (ρ-Nitrophenol)

1.10 เททราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (4-Nitrophenyl phosphate)

1.11 โซเดียมอะซีเทต (sodium acetate : $C_2H_3NaO_2$)

1.12 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate : $NaCO_3$)

1.13 โซเดียมไฟเทต (sodium phytate : $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$)

1.14 ไอรอนไฟเทต (iron phytate : $C_6H_{18}O_{24}P_6Fe_4$)

1.15 อะลูมินัมไฟเทต (aluminum phytate : $C_6H_{18}O_{24}P_6Al_4$)

1.16 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphatate : Na_2HPO_4)

1.17 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (calcium chloride dihydrate : $CaCl_{24}•2H_2O$)

1.18 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (ferrous sulphate heptahydrate : $FeSO_4•7H_2O$)

1.19 บอริกแอซิด (boric acid : H_3BO_3)

1.20 ซิงซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (zinc sulphate heptahydrate : $ZnSO_4•7H_2O$)

1.21 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทาไฮเดรต (copper sulphate pentahygrate : $CuSO_4.5H_2O$)

1.22 แอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate : $(NH_4)_6Mo_7O_{24}•4H_2O$)

1.23 ซัลฟิวริกแอซิด (sulfuric acid : H_2SO_4)

1.24 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide : H_2O_2)

1.25 วาเนโดโมลิบเดต (vanadomolypdate : NH_4VO_3)

1.26 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH)

1.27 แอมโมเนียมฟลูออไรด์ (ammonium fluoride : NH_4F) 17

1.28 แอสคอร์บิกแอซิด (ascorbic acid : $C_6H_8O_6$)

1.29 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate : KH_2PO_4)

1.30 แลนทานัมคลอรไรด์ (lanthanum chloride : $LaCl_2$)

2. อุปกรณ์

2.1กระถางขนาด 6 X 10 นิ้ว

2.2ถุงพลาสติก

2.3พลั่วตักดิน

2.4เครื่องแก้วสำหรับการเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินและพืช

2.5กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

2.6ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

2.7ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

2.8 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave)

2.9 เครื่องเขย่า (table rotary shaker)

2.10 วอเตอร์บาร์ท (water barth)

2.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

2.12 พีเอชมิเตอร์ (pH meter)

2.13 เครื่องย่อยตัวอย่าง (digestion block)

2.14 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.15 เครื่องกลั่นไนโตรเจน (nitrogen distillation apparatus)

2.16 อะตอมมิกแอบซอบชันโฟโตมิเตอร์ (atomic absorption photometer)

2.17 เฟลมโฟโตมิเตอร์ (flame photometer)

3. วิธีการทดลอง

3.1 เตรียมตัวอย่างต้นข้าวและการแยกเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 ปลูกข้าวในดินกรดจัดในสภาพเรือนกระจก

เก็บตัวอย่างดินกรดจัดชุดดินระแงะ (Ra; Sulfic Endoaquepts) ที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร จากพื้นที่ซึ่งไม่ผ่านการทำเกษตรกรรม ใส่ในกระถางๆ ละ 4 กิโลกรัม จำนวน 32 กระถาง แบ่งเป็นส่วนที่ใส่ปูนแคลเซียมไฮดรอกไซด์กระถางละ 11.11 กรัม จำนวน 16 กระถาง เพื่อปรับพีเอชเป็น 5.5 จากนั้นใส่น้ำให้ท่วม และขังน้ำไว้ในกระถางเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระวังไม่ให้น้ำแห้ง ปลูกข้าวจำนวน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ลูกแดงปัตตานี ช่อลุง และญาเหวย พันธุ์ละ 4 ซ้ำ สังเกตการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างต้นข้าว โดยใช้พลั่วขุดล้อมต้นข้าวให้มีดินติดหนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อเป็นตัวแทนของข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดินกรดจัดที่ไม่ผ่านการปรับปรุงและผ่านการปรับปรุงดินโดยการใส่ปูน

3.1.2 เก็บตัวอย่างข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดินกรดจัด

เก็บตัวอย่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 ที่ปลูกในพื้นที่ดินกรดจัดชุดดินมูโน๊ะ (Mu; Sulfic Endoaquepts) ซึ่งได้รับการปรับปรุงแล้ว จากแปลงที่มีการจัดการที่แตกต่างกัน คือ แปลงที่ 1 ไม่ใส่ปูนและไม่ใส่ปุ๋ย แปลงที่ 2 ไม่ใส่ปูนแต่ใส่ปุ๋ยตามปกติ แปลงที่ 3 มีการใส่ปูน 1.25 ตันต่อไร่ร่วมกับการใส่ปุ๋ย จากแปลงทดลองของศูนย์ศึกษาพัฒนาพิกุลทอง ในระยะที่ข้าวมีอายุ 1 เดือนหลังปักดำโดยใช้พลั่วขุดล้อมกอข้าวให้มีดินติดดินติดหนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อเป็นตัวแทนของข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดินกรดจัดที่ได้รับการปรับปรุงและมีการจัดการที่แตกต่างกัน

3.1.3 แยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน กาบใบ และบริเวณรอบรากพืช

ชั่งดินที่ติดมากับต้นข้าว 1 กรัม ส่วนของกาบใบให้ตัดบริเวณเหนือรากขึ้นมาไม่เกิน 1 เซนติเมตร และบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ให้แยกส่วนของดินออกไปจนกระทั่งเหลือดินที่ติดอยู่หนาไม่เกิน 2 มิลลิเมตร นำแต่ละส่วนมาแยกใส่ในขวดซึ่งบรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 99 มิลลิลิตร ซึ่งได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} เท่า แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนของสารละลายมาเจือจาง (dilution) เป็น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ตามลำดับ จากนั้นใช้สารละลายที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า มาเลี้ยงโดยการดรอบเพลต (drop plate) ในอาหารแข็งสูตร modified Pikovskaya's medium (D-glucose = 10, $(NH_4)_2SO_4$ = 0.5, NaCl = 0.2, $MnSO_4$ = 0.005, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ = 0.2 และ KCl = 0.2 กรัมต่อลิตร) ที่มีฟอสฟอรัสในรูปของโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปรับพีเอชเป็น 4 ทำการดรอบเพลตตัวอย่างละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับปริมาณของจุลินทรีย์ที่ได้ สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการ

ดรอบเพลต นำโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาสตรีคเพลต (streak plate) ในอาหารสูตรเดิมจนกระทั่งได้เป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อไว้ในหลอดเพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป

3.2 การทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อ

3.2.1 ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอส- ฟาเทส

นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที วัดระดับพีเอชของอาหารทุก 4 วัน วัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส โดยดูดเชื้อในสารละลายปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมโซเดียมอะซีเทตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) พีเอช 4.8 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมเททราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (4-Nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 10 มิลลิ- โมลาร์ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศา-เซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมคาร์บอเนตที่อิ่มตัว 3.6 มิลลิลิตร นำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยดูดพาราไนโตรฟีนอล (ρ-Nitrophenol) ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมอะซีเทตบัฟเฟอร์เขย่าให้เข้ากัน และนำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเช่นเดียวกับในตัวอย่าง และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นนาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร (nmol $min^{-1}mL^{-1}$) และคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงไว้ทดสอบต่อไป

3.2.2 การเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์โดยวิเคราะห์ลำดับเบส

นำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร modified Pikovskaya's medium ซึ่งมีฟอสฟอรัสในรูปไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Isoplant II kit (Wako Pure Chemical

Industries Co. Ltd., Japan) นำดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอเป็น template และใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ NS1 และ NS7R ทำปฏิกิริยา พีซีอาร์จำนวน 30 รอบโดย denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 53°C เป็นเวลา 1 นาที และ extention ที่ 75°C เป็นเวลา 1 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาหาลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM 310 Genetic Analyzer with a Big Dye Terminator version (3.0) และใช้ ไพรเมอร์จำนวน 4 ชนิดคือ M13F, M13R, basid2 และ basid3 ในการวิเคราะห์ลำดับเบสขนาด 1.75 kb นำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน BLASTN database program (Hoo *et al*., 2004)

3.2.3 ทดสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 จำนวน 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 12 วัน และนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสโดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 แต่ใช้โซเดียมอะซีเทตบัฟเฟอร์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ที่มีพีเอช 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 และ 7 โดยทำ 3 ซ้ำ

3.2.4 ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัส

3.2.4.1 ศึกษาวิธีการทดสอบการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสโดยเชื้อ จุลินทรีย์ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 12 วัน นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนที่ 2 ไม่ต้มและนำไปทดสอบการละลายฟอสฟอรัส โดยนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) กำหนดสิ่งทดลองเป็น 4 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำดังนี้

1. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
3. จุลินทรีย์ที่ผ่านการต้ม 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
4. จุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการต้ม 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร

นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดพีเอช นับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable cell) โดยนำมาดรอบเพลตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารสูตร Potato dextose agar (PDA) พีเอช 4 ซึ่งประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และ

วุ้น 17 กรัมต่อลิตร ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยนำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำไปทำให้เกิดสีโดยใช้ โมลิบดินัมบลู (Molybdenum blue) (จำเป็น, 2546) ในช่วงเริ่มต้นและหลังจากบ่มเชื้อกับสารละลายโซเดียมไฟเทตเป็นเวลา 14 และ 24 ชั่วโมง

3.2.4.2 ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปต่างๆ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya'medium พีเอช 4 ซึ่งมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 12 วัน ดูดสารละลายของอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปแยกใส่ในขวดซึ่งบรรจุสารละลายโซเดียมไฟเทต ไอรอนไฟเทต หรืออะลูมินัมไฟเทตปริมาณ 100 มิลลิลิตร (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เขย่าให้เข้ากันโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ กำหนดสิ่งทดลองเป็น 6 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำดังนี้

1. น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร + สารละลายไอรอนไฟเทต 100 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร + สารละลายอะลูมินัมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
4. เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
5. เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร + สารละลายไอรอนไฟเทต 100 มิลลิลิตร
6. เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร + สารละลายอะลูมินัมไฟเทต 100 มิลลิลิตร

นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำไปทำให้เกิดสีโดยใช้ โมลิบดินัมบลู (Molybdenum blue) ในช่วงเริ่มต้นและหลังจากบ่มเชื้อกับสารละลายเป็นเวลา 14 และ 24 ชั่วโมง

3.2.5 ผลของอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ซึ่งมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียม ไฟเทต ไอรอนไฟเทต และอะลูมินัมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) วัดพีเอช นับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสทุก ๆ 4 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ กำหนดสิ่งทดลองเป็น 6 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปไอรอนไฟเทต 100 มิลลิลิตร
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
4. เชื้อจุลินทรีย์ + อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร
5. เชื้อจุลินทรีย์ + อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปไอรอนไฟเทต 100 มิลลิลิตร
6. เชื้อจุลินทรีย์ + อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมไฟเทต 100 มิลลิลิตร

3.3 ศึกษาผลของแคตไอออนบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และการละลายโซเดียมไฟเทต

3.3.1 ผลของอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานีส และแคลเซียมไอออนต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 ซึ่งมีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีแคตไอออนในรูปอะลูมินัมไอออน (Al^{3+}) เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ความเข้มข้น 0, 5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดพีเอช ความขุ่น นับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอส- ฟาเทสทุก ๆ 4 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ กำหนดสิ่งทดลองเป็น 10 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อจุลินทรีย์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ + อะลูมินัม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ + อะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ + เฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ + เฟอรัส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แมงกานีส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
9. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แคลเซียม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์
10. อาหารเลี้ยงเชื้อ + แคลเซียม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์

3.3.2 ผลของอะลูมินัม เฟอรัส แมงกานี และแคลเซียมไอออนต่อการปลดปล่อยฟอสฟอรัสจากโซเดียมไฟเทตของเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 ซึ่งมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 12 วัน ดูดสารละลายของอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปแยกใส่ในขวดซึ่งบรรจุสารละลายโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแคตไอออนในรูปของอะลูมินัมไอออน เฟอรัสไอออน แมงกานีสไอออน และแคลเซียมไอออนให้มีความเข้มข้นของแคตไอออน 3 ระดับคือ 0, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ กำหนดสิ่งทดลองเป็น 10 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำดังนี้

1. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร
2. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
3. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + อะลูมินัม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
4. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + อะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
5. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + เฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
6. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + เฟอรัส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
7. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + แมงกานีส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
8. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
9. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + แคลเซียม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
10. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + แคลเซียม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร

นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 รวมทั้ง

วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำไปทำให้เกิดสีโดยใช้โมลิบดินัมบลู (Molybdenum blue) ทั้งช่วงเริ่มต้นและสิ้นสุดการบ่ม

3.3.3 ผลของอะลูมินัมต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสที่ปลดปล่อยจากโซเดียมไฟเทตโดยเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium พีเอช 4 ซึ่งมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสในรูปของโซเดียมไฟเทตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 12 วัน ดูดสารละลายของอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวปริมาณ 3 มิลลิลิตร แยกใส่ในขวดซึ่งบรรจุสารละลายโซเดียมไฟเทต (ฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายอะลูมินัมไอออน ให้มีความเข้มข้นของอะลูมินัม 2 ระดับคือ 0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ กำหนดสิ่งทดลองเป็น 3 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำดังนี้

1. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร
2. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร
3. สารละลายโซเดียมไฟเทต 100 มิลลิลิตร + อะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร + เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตร

แบ่งสารละลายมาวัดพีเอช และอีกส่วนหนึ่งนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยนำไปทำให้เกิดสีโดยใช้โมลิบดินัมบลู ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และวิเคราะห์อะลูมินัมในสารละลายโดยทำให้เกิดสีด้วยสารละลายอะลูมินอนและวัดค่าการดูดกลืนแสง (มลรวี, 2540) หลังจากเติมอะลูมินัมลงไปครั้งแรก จากนั้นนำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดพีเอช วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และวิเคราะห์อะลูมินัม หลังจากนั้นเติมสารละลายอะลูมินัมลงไปในขวดเดิมเป็นครั้งที่ 2 และแบ่งสารละลายมาวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 48 ชั่วโมง แบ่งสารละลายมาวัดพีเอช วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และวิเคราะห์อะลูมินัมเป็นครั้งสุดท้าย

3.4 ทดสอบผลของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตแอซิดฟอสฟาเทสต่อการเจริญเติบโตของข้าวในอาหารวุ้น

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานีมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (sodium hypochlorite) 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเพาะในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกเมล็ดที่มียอดและรากยาวใกล้เคียงกันมาปลูกในอาหารแข็งสูตร Murashige & Skoog (MS) พีเอช 4 ที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3 ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

เมื่อต้นกล้ามีความสูงประมาณ 2 นิ้ว นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya's medium เป็นเวลา 12 วัน มาใส่ในขวดบริเวณรอบ ๆ ต้นกล้า โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างข้าวที่ปลูกโดยการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต ไอรอนไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ทำการทดลอง 4 ซ้ำ หลังจากปลูก 1 เดือนนำต้นข้าวมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในต้นข้าวตามคู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช (จำเป็น, 2546)

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรม SPSS for window version 10.0 (กัลยา, 2542) แล้วนำค่าที่ได้มาสรุปผลการทดลอง

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige & Skoog

ธาตุ	สูตร	น้ำหนักสาร (กรัมต่อลิตร)	หมายเหตุ
Stock A			
ไนโตรเจน	NH_4NO_3	16.5	ใช้ stock A 100
โพแทสเซียม	KNO_3	19.0	มิลลิลิตรสำหรับเตรียม

แคลเซียม	$CaCl_2.2H_2O$	4.4	อาหาร 1 ลิตร
แมกนีเซียม	$MgSO_4.7H_2O$	3.7	
Stock B	- โซเดียมไฟเทต ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$)	0.0249	
ฟอสฟอรัส	- ไอรอนไฟเทต ($C_6H_{18}O_{24}P_6Fe_4$)	0.0238	ชั่งฟอสฟอรัสแต่ละรูปตามน้ำหนักที่กำหนดสำหรับเตรียมอาหาร 1 ลิตร (P=5 มิลลิกรัมต่อลิตร)
	- อะลูมินัมไฟเทต ($C_6H_{18}O_{24}P_6Al_4$)	0.0207	
	- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.0230	
Stock C			
เหล็ก	$FeSO_4.7H_2O$	2.78	ใช้ stock C 10 มิลลิลิตรสำหรับเตรียมอาหาร 1 ลิตร
	Na_2EDTA	3.73	
Stock D			
แมงกานีส	$MnSO_4.H_2O$	2.23	ใช้ stock D 1 มิลลิลิตรสำหรับเตรียมอาหาร 1 ลิตร
สังกะสี	$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	
โบรอน	H_3BO_3	6.20	
ทองแดง	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	
โมลิบดีนัม	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.25	
	KI	0.083	