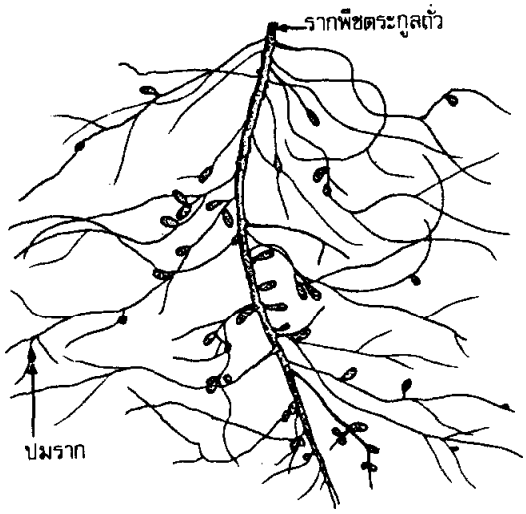
บทปฏิบัติการที่ 19

การตรึงกาซไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์แบบพึ่งพาอาศัย

การเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับดิน 2 ใน 3 ส่วนเกิดโดยการตรึงกาซไนโตรเจนของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถจะตรึงกาซไนโตรเจนจากอากาศ โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนเมื่อเจริญอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ เชื้อบักเตรี **Rhizobium** ที่เจริญอยู่กับรากพืชตระกูลถั่ว เชื้อแอคติโนมัยสีท **Frankia** ที่เจริญอยู่กับรากพืชใน order Fagales สาหร่ายที่เจริญอยู่กับเชื้อราที่เรียกว่าไลเคน (lichen) สาหร่ายที่เจริญอยู่กับพืชชั้นต่ำพวก liverworts สาหร่ายที่เจริญอยู่กับแหนแดง (**Azolla**) และสาหร่ายที่เจริญอยู่กับปรง (cycads) เป็นต้น

Rhizobium ซึ่งเจริญอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว มีบทบาทสำคัญในการตรึงกาซไนโตรเจน จะเข้าสู่รากพืชทางรากขนอ่อน มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและขณะเดียวกันก็กระตุ้นให้รากพืชแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดเป็นปมราก (root nodule) ขึ้น กาซไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียในปมรากแล้วรวมตัวกับสารพวกคาร์โบไฮเดรตจากพืชเป็นกรดอะมิโน และเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ต่อไป ส่วนที่เหลือใช้จะส่งไปยังพืช บางส่วนถูกปล่อยออกมาสู่ดินพืชและจุลินทรีย์รอบ ๆ รากพืชตระกูลถั่วนำไปใช้ประโยชน์ได้ เชื้อ **Rhizobium** แต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของพืชตระกูลถั่ว สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพหรือเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่วจะตรึงกาซไนโตรเจนได้สูง เกิดปมขนาดใหญ่ มีสีชมพูสดใส ผิวเต่งตึง สายพันธุ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพหรือไม่เฉพาะเจาะจงต่อพืชตระกูลถั่วตรึงกาซไนโตรเจนได้ต่ำ เกิดปมขนาดเล็กสีซีด



Rhizobium เป็นบักเตรีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นจนถึงปานกลาง (1–3 ไมครอน) มีแฟลกเจลลา เซลล์ที่อายุน้อยเคลื่อนที่ได้ สังเกตเห็นแกรนูล (granule) ของเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (β-hydroxybutyrate) ไดซักเจนไม่มีเอ็นโดสปอร์ เมื่อเจริญอยู่ในรากพืชตระกูลถั่วมักจะมีรูปร่างไม่แน่นอน เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาระยะนี้เรียกว่าแบ็กทีรอยด์ (bacteroid) อาจจะพบรูปร่างเป็นแท่ง, รูปตัววาย (Y) รูปตัวเอ็กซ์ (X) รูปตัวที (T) รูปตัวแอล (L) รูปตัววี (V) และรูปกลม เป็นต้น ส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารพวกโพลีแซ็กคาไรด์หรือสารเมือกเป็นจำนวนมาก ถ้าเจริญอยู่อย่างอิสระจะไม่สามารถตรึงกาซไนโตรเจนได้

วัตถุประสงค์

แยกเชื้อ **Rhizobium** จากปมรากพืช และศึกษารูปร่างของเชื้อในปมราก เปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์

1. ปมรากพืชตระกูลถั่ว
2. เมอร์คูลิกคลอไรด์ ($HgCl_2$) 0.1%
3. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
4. แอลกอฮอล์ 95%
5. ปิเปต 1 มล.
6. จานเลี้ยงเชื้อ
7. ปากคีบ
8. สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
9. สไลด์หลุม
10. ใบมีด
11. สีย้อมเมธิลีน-บลู (methylena blue)
12. อาหารวุ้น Mannitol Yeast Extract - Congo Red Agar
13. หลอดอาหารวุ้นเอียงของ **Mannitol** Yeast **Extract** - Congo Red Agar

วิธีปฏิบัติ

การตรวจเชื้อ **Rhizobium** ในปมรากพืชตระกูลถั่ว

1. เลือกปมรากถั่วที่มีขนาดใหญ่ เต่ง และสีชมพูสดใส ล้างดินออกให้สะอาดด้วยน้ำประปา ใช้ใบมีดที่คมและสะอาดตัดปมที่เลือกไว้ออกจากราก โดยให้เหลือชิ้นส่วนของรากติดอยู่กับปมถั่วเล็กน้อยแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

2. ฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของปมรากโดยแช่ในเมอร์คูลิกคลอไรด์ 0.1% 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อหลาย ๆ ครั้ง

3. นำปมไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% 3 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อหลายๆ ครั้ง

4. นำปมรากใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มล. ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วบีบปมรากให้แตกแล้วแกว่งในหยดน้ำกลั่นให้ผสมกันอย่างสม่ำเสมอ

5. นำของเหลวจากข้อ 4. ไปศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์ โดยสเมียร์บนแผ่นสไลด์ ฟิกซ์ด้วยเปลวไฟและย้อมสีเมธิลีน-บลูนาน 5 นาที ล้างน้ำให้สะอาด ซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์

6. ศึกษาการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ในของเหลวจากปมราก โดยการทำเทคนิคหยดแขวน

การศึกษาและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ **Rhizobium** จากปมราก

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มของเหลวในจานเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4. (2 ห่วง) ย้ายไปจานที่ 2. ที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มล. ไว้แล้วเช่นกัน และทำเช่นเดียวกันต่อไปถึงจานที่ 6. เพื่อให้ปริมาณ **Rhizobium** เจือจางไปเรื่อย ๆ

2. เท **Mannitol Yeast Extract-Congo Red Agar** ที่หลอมเหลวอยู่อุณหภูมิประมาณ 45° ซ. ลงในจานที่ 2. – 6. หมุนจานให้ของเหลวจากปมรากกระจายในอาหารอย่างสม่ำเสมอ

3. เมื่ออาหารแข็งตัว กลับจาน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 – 5 วัน (สำหรับพวกเจริญเร็ว) และ 5 – 10 วัน (สำหรับพวกเจริญช้า)

4. เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะกลมใส, ขาวขุ่นหรือสีชมพูจาง ๆ มีเมือกเยิ้ม ไม่ดูดสีคองโกเรด ย้ายลงเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นเอียง **Mannitol Yeast Extract - Congo Red Agar**

5. ศึกษารูปร่างและการเคลื่อนที่ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ เช่นเดียวกับข้อ 5. และข้อ 6.

<u>คำถาม</u>

1. ทำไมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปมราก เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมีลักษณะแตกต่างกัน?

2. อธิบายกลไกการทำให้เกิดปมรากในพืชตระกูลถั่ว โดยเชื้อ **<u>Rhizobium</u>**?

3. สารประกอบอินทรีย์ตัวแรกและสารประกอบอินทรีย์ตัวแรกที่เกิดจากการตรึงกาซไนโตรเจนคืออะไร?

4. **Mannitol Yeast Extract-Congo Red Agar** จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใด?

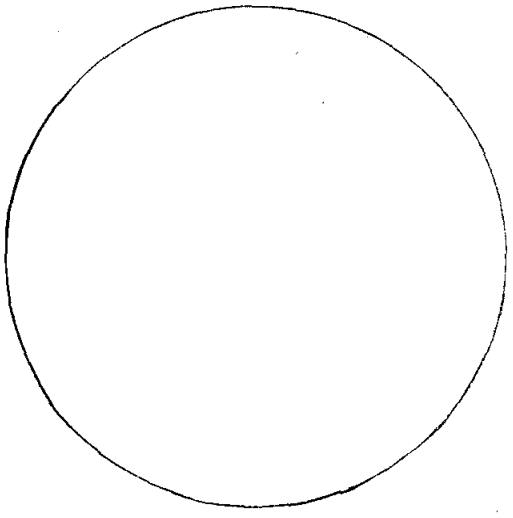
<u>รายงานผลปฏิบัติการที่ 19</u>

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ _____ ผู้ร่วมงาน _____

<u>วาดภาพแสดงรูปร่างของ Rhizobium จากการย้อมสีเมธิลีน-บลู</u>

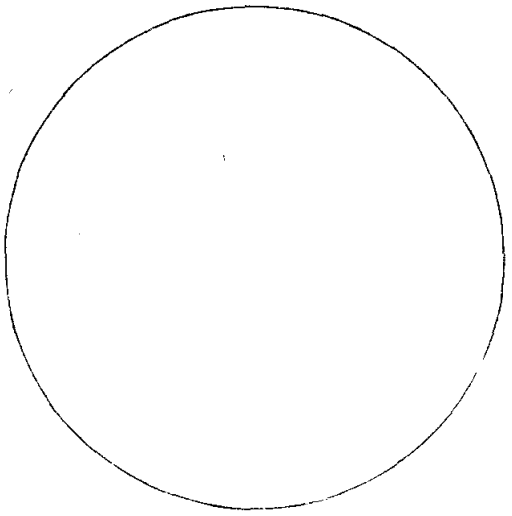
1. เชื้อในของเหลวจากปมรากพืชตระกูลถั่ว



พืช _____

กำลังขยาย _____

2. เชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร เลี้ยง เชื้อ



ชนิดอาหาร เลี้ยง เชื้อ _____

กำลังขยาย _____

บันทึกผล เปรียบ เทียบรูปร่างและการ เคลื่อนที่ระหว่าง เชื้อในของ เหลวจากปมรากและ เชื้อบริสุทธิ์

การศึกษา	เชื้อในของ เหลวจากปมราก	เชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร เลี้ยง เชื้อ
รูปร่าง (ย้อมสี เมธิลีน–บลู)		
การ เคลื่อนที่ (เทคนิคหยดแขวน)		