

การใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N เพื่อประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว

วิทยา มะเสนา¹

บทคัดย่อ

แต่เดิมมา วิธีการประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วที่นิยมกันมาก ได้แก่ วิธี ARA หรือ Acetylene Reduction Assay ซึ่งจะวัดแก๊ส ethylene ($\text{H}_2\text{C} = \text{CH}_2$) ที่เกิดขึ้นมาจาก acetylene ($\text{HC} \equiv \text{CH}$) โดยนําย่อย nitrogenase ของจุลินทรีย์ ซึ่งเราจะอาศัยหลักการที่จุลินทรีย์ทำการรีดิวซ์แก๊สไนโตรเจน ($\text{N} \equiv \text{N}$) ซึ่งมีบอนด์สาม (triple bonds) เช่นเดียวกันกับ acetylene ข้อเสียของวิธี Acetylene Reduction Assay ก็คือ เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ประเมินการตรึงไนโตรเจนตลอดฤดูปลูกพืชที่ยาวนาน และมีความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมของนําย่อย nitrogenase อันจะส่งผลกระทบมายังค่าไนโตรเจนที่วัดได้ ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้หันมาใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาและประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วซึ่งให้ผลดีและมีความแม่นยำสูง ไม่ว่าฤดูปลูกพืชจะยาวนานหรือมีความแปรปรวนมากก็ตาม วิธีการนี้ได้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางทั่วโลก อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในประเทศไทยเรายังอยู่ในระดับที่จำกัดมาก บทความนี้ได้มุ่งเสนอความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการใช้ไอโซโทป ^{15}N ในการประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว

ในช่วงระยะเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมาจนกระทั่งถึงปัจจุบัน การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ในพืชตระกูลถั่วได้รับความสนใจอย่างล้นหลามจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ในระยะเริ่มแรก ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญ คือ การพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการที่เหมาะสมสำหรับวัดหรือประเมินปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ ในปัจจุบันเราสามารถวัดปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ใช้วิธีการต่าง ๆ หลายวิธี เช่น ปลูกพืชตระกูลถั่วที่ไม่ตรึงไนโตรเจนเปรียบเทียบกับ ถ้าพืชตระกูลถั่วตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ก็ย่อมจะมีปริมาณไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วมากกว่าพืชตระกูลถั่วที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ผลต่างของไนโตรเจนในพืชทั้งสองชนิดก็คือปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้นั่นเอง ทั้งนี้ก็โดยการให้พืชตระกูลถั่ว (fixing plant) และพืชตระกูลถั่วอื่น (non-fixing plant) ได้รับไนโตรเจนจากดินและจากปุ๋ยเท่ากัน วิธีการต่อมาคือ วิธีการที่เรียกว่า nitrogen balance ซึ่งจะศึกษาการแปรสภาพของไนโตรเจนที่ใส่ลงไปในรูปแบบปุ๋ยว่า ใส่ลงไปเท่าใด พืชดูดไปใช้เท่าใด สูญหายไปโดยวิธีใด และในปริมาณเท่าใด

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

คงอยู่ในดินมากน้อยแค่ไหน พืชได้รับไนโตรเจนเพิ่มขึ้นมากน้อยเพียงใด และจากที่ใด เราก็สามารถประเมินปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ในฤดูปลูกหนึ่ง ๆ แต่วิธีนี้มีข้อเสียอยู่หลายประการ อีกวิธีหนึ่งคือ วิธี Acetylene Reduction Assay (Hardy et al., 1973) ซึ่งนิยมใช้ติดต่อกันมาชวาระยะเวลาหลายปี แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ใช้วิธีการดังกล่าวน้อยลง เพราะวิธี Acetylene Reduction Assay มีข้อจำกัดหลายประการ และไม่เหมาะสมที่จะใช้ประเมินการตรึงไนโตรเจนตลอดฤดูปลูกพืชที่ยาวนาน และมีความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม ซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมของนําย่อย nitrogenase อันจะส่งผลกระทบมายังค่าของไนโตรเจนที่วัดได้โดยวิธีนี้ และยังมีจุดอ่อน คือ ความลำบากในการเก็บและวิเคราะห์ปมรากทั้งหมดอีกด้วย (Witty, 1983) ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจนในสภาพแวดล้อมที่เป็นจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพนัก ในระยะต่อมา นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะเมื่อมีการพัฒนาวิธีการใหม่ขึ้นมา คือ วิธีการเจือจางไอโซโทป ^{15}N หรือ Isotope Dilution Method (Fried and Broeshart, 1975; Fried and Middleboe, 1977) ซึ่งสามารถ

ขจัดปัญหาและจุดอ่อนของวิธี Acetylene Reduction Assay ได้เป็นอย่างดี ในปัจจุบัน วิธีการดังกล่าวได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางทั่วโลก แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคทางไอโซโทปเพื่อประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วยังใหม่ต่อนักวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยมาก ดังนั้น บทความนี้จึงเป็นการเสนอความรู้พื้นฐานทางไอโซโทปในการศึกษาและประเมินการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วเพื่อให้ผู้ที่สนใจได้ใช้ประกอบการศึกษาและอ้างอิงต่อไป

ไอโซโทปของธาตุไนโตรเจน (Isotopes of Nitrogen)

ธาตุไนโตรเจนจะมีไอโซโทปซึ่งจะแตกต่างกันตามมวลของอะตอม (atomic mass) จากมวล 12 ถึง 17 ตามรายละเอียดในตารางที่ 1 ไอโซโทปของธาตุไนโตรเจนจะมีทั้งไอโซโทปกัมมันตรังสี (radioactive isotopes หรือ radioisotopes) และไอโซโทปเสถียร (stable isotopes)

ไอโซโทปกัมมันตรังสีของธาตุไนโตรเจน ได้แก่ ^{12}N , ^{13}N , ^{16}N และ ^{17}N ซึ่งล้วนแต่มีครึ่งชีวิต (half-life) ที่สั้นมากเมื่อเทียบกับครึ่งชีวิตของธาตุอื่น เช่น ^{36}Cl (300,000 ปี), ^{14}C (5760 ปี), ^{90}Sr (28 ปี), ^3H (12.3 ปี), ^{22}Na (2.6 ปี), ^{35}S (87.2 วัน), ^{32}P (14.3 วัน) ในกรณีของธาตุไนโตรเจน ^{13}N จะเป็นไอโซโทปกัมมันตรังสีที่มีครึ่งชีวิตที่ยาวที่สุด คือ 10.05 นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าไอโซโทปกัมมันตรังสีของธาตุไนโตรเจนมีครึ่งชีวิตที่สั้นเกินไปสำหรับที่จะนำมาใช้เป็นตัวติดตาม (tracer) พฤติกรรมและกระบวนการแปรสภาพของธาตุไนโตรเจนอย่างมีประสิทธิภาพได้ ดังนั้น จึงมีทางเลือกอยู่ทางเดียวคือไอโซโทปเสถียรของธาตุนี้

เมื่อมาพิจารณาไอโซโทปเสถียรของธาตุไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ ^{14}N , ^{15}N จะเห็นได้ว่าปริมาณของไอโซโทปเสถียร $^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$ ตามธรรมชาติจะอยู่ในอัตราส่วนที่คงที่ คือ $272^+ 0.3:1$ ซึ่งจะเป็น ^{14}N เท่ากับ 99.6367 atom% ^{14}N และเป็น ^{15}N เท่ากับ 0.3663 ± 0.0004 atom% ^{15}N จากอัตราส่วนที่คงที่ของ $^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$ ตามธรรมชาตินี้เองที่นักวิทยาศาสตร์ได้นำมาเป็นเครื่องมือในการศึกษาพฤติกรรม (behavior) และกระบวนการแปรสภาพ (transformations) ของธาตุไนโตรเจนในดิน ปุ๋ย พืช สัตว์ ฯลฯ โดยใช้ไอโซโทปเสถียร ^{15}N เป็นตัวติดตาม ซึ่งโดยปกติจะใส่ ^{15}N ลงไปในรูปปุ๋ย (fertilizer) หรือสารอาหารอื่น ๆ (substrates) ให้กับสิ่งที่เราอยากจะทราบ

หรืออยากติดตาม (tracee) และเมื่อครบกำหนดเวลา ก็นำตัวอย่าง (sample) มาวิเคราะห์หาอัตราส่วน $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะทำให้เราอธิบายพฤติกรรมและกระบวนการแปรสภาพของไนโตรเจนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ต่อไปนี้จะเรียกไอโซโทปเสถียร ^{15}N ว่า " ^{15}N " เพื่อง่ายต่อการเขียนและการอธิบาย อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งจะมีผู้เขียนเป็นอย่างอื่น เช่น ^{15}N หรือ N-15 หรือ 15-N เป็นต้น ซึ่งก็สื่อความหมายอันเดียวกัน คือ ไอโซโทปเสถียร ^{15}N นั่นเอง อย่างไรก็ตาม เพื่อให้สามารถเข้าใจได้ง่ายขึ้นจึงควรจะได้ทำความเข้าใจเกี่ยวกับศัพท์เฉพาะ ^{15}N ที่ใช้ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนเป็นพื้นฐานเสียก่อน

ศัพท์เฉพาะเกี่ยวกับไอโซโทป ^{15}N

% natural abundance ตามธรรมชาติจะมี ^{15}N อยู่ 0.3663 atom % ^{15}N ซึ่งเป็นค่าที่วัดได้จากบรรยากาศ (ตารางที่ 1) ค่านี้จะต่ำกว่าค่าที่วัดได้จากดินเล็กน้อย ในทางปฏิบัติจะถือว่า ค่า 0.3663 atom % ^{15}N เป็นค่าเฉลี่ยของ ^{15}N ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งเราเรียกค่านี้ว่า % natural abundance

% ^{15}N atom excess หรือ % ^{15}N a.e. ถ้าสารอาหารใดหรือตัวอย่างใด มี atom % ^{15}N สูงกว่า 0.3663 atom % ^{15}N แล้ว ส่วนที่เป็นค่าเกิน atom % ^{15}N ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (natural abundance) นั้นเราเรียกว่า % ^{15}N atom excess หรือ % ^{15}N a.e. เช่น ถ้าปุ๋ยไอโซโทปยูเรีย ($^{15}\text{NH}_2$)₂CO

ตารางที่ 1 ไอโซโทปกัมมันตรังสีของธาตุไนโตรเจน

Mass number	Natural abundance (%) [*]	Half-life ^{**}
12	—	0.0125 วินาที
13	—	10.05 นาที
14	99.6337	stable
15	0.3663	stable
16	—	7.36 วินาที
17	—	4.14 วินาที

^{*}เป็นค่าวิเคราะห์ไนโตรเจนในบรรยากาศโดย Junk and Svec (1958) ซึ่งแสดงให้เห็นอัตราส่วนของ $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ในแก๊สไนโตรเจน (N_2) เท่ากับ $272^+ 0.3 : 1$

^{**}ข้อมูลจาก Fried Lander and Kennedy (1955)

ที่ผลิตออกมาจากโรงงานมี ^{15}N อยู่ 10.00 atom % ^{15}N ก็ย่อมจะมีปริมาณ สุกติของ ^{15}N เท่ากับ 9.6337% ^{15}N atom excess ($10.00 - 0.3663 = 9.6337\% \text{ } ^{15}\text{N}$ a.e.)

^{15}N -labelling technique หรือ ^{15}N -tagging technique หมายถึง วิธีการทางนิวเคลียร์หรือวิธีการอื่นใดที่จะทำให้สาร หรือ วัตถุ ชนิดหนึ่งชนิดใดมี ^{15}N เป็นองค์ประกอบทางนิวเคลียร์ (isotopic composition) มากกว่าปริมาณ ^{15}N ที่มีอยู่ดั้งเดิมในสารหรือวัตถุนั้น หรือน้อยกว่าค่า natural abundance ในวัตถุนั้น สารหรือวัตถุดังกล่าวที่มีปริมาณของอะตอม ^{15}N เปลี่ยนแปลงไปโดยวิธีการข้างต้น เราเรียกว่า ^{15}N -labelled substrate หรือ ^{15}N -tagged substrate เช่น ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N หรือ ^{15}N -labelled fertilizer ($^{14}\text{NH}_4$) $_2$ SO $_4$ (เดิม) ($^{15}\text{NH}_4$) $_2$ SO $_4$ (ใหม่), พืชไอโซโทป ^{15}N หรือ ^{15}N -labelled plant หรือ ^{15}N -tagged plant, ฟางไอโซโทป ^{15}N หรือ ^{15}N -labelled straw หรือ ^{15}N -tagged straw เป็นต้น ส่วนสารหรือวัตถุใดก็ตามที่ไม่ถูกทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณไอโซโทป ^{15}N เราเรียกลักษณะหรือวัตถุนั้นว่า สารปกติ หรือ unlabeled substrate เช่น ($^{14}\text{NH}_4$) $_2$ SO $_4$ หรือ (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ ก็เป็น unlabelled ammonium sulfate เป็นต้น

^{15}N -enriched substrate และ ^{15}N -depleted substrate ในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางนิวเคลียร์ของไนโตรเจน ถ้ามีการทำให้สารใดมี ^{15}N เพิ่มขึ้นมากกว่าค่าของ % natural abundance (0.3663 atom % ^{15}N) เราเรียกลักษณะดังกล่าวที่มีไอโซโทป ^{15}N เพิ่มขึ้นว่า ^{15}N -enriched substrate แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าการเปลี่ยนแปลงนั้นได้ทำให้สารใดมีสัดส่วน ^{15}N ในองค์ประกอบนิวเคลียร์เหลือน้อยกว่าค่าของ % natural abundance เราเรียกลักษณะดังกล่าวว่า ^{15}N -depleted substrate %NdfF, %NdfS และ %NdfFix ถ้าเราปลูกพืชโดยการใส่ปุ๋ยลงไปด้วยพืชที่เราปลูกย่อมจะได้ไนโตรเจนมาจาก 2 ส่วน คือ ไนโตรเจนจากดิน (soil N) ไนโตรเจนจากปุ๋ย (fertilizer N) แต่ถ้าพืชที่เราปลูกเป็นพืชตระกูลถั่ว ซึ่งนอกจากพืชนี้จะได้นไนโตรเจนจากดินและจากปุ๋ยแล้ว พืชยังจะได้ไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจน (N_2 fixation) จากบรรยากาศ (atmosphere) หรือจากอากาศได้อีกทางหนึ่งอีกด้วย

สัดส่วนของไนโตรเจนที่พืชได้มาจากปุ๋ย เราเรียกว่า fNdfF หรือ fraction of N derived from fertilizer บางครั้งเขียน fNdf

สัดส่วนของไนโตรเจนที่พืชได้มาจากดิน เราเรียกว่า fNdfS หรือ fraction of N derived from soil บางครั้งเขียน fNdfs

ในกรณีของพืชตระกูลถั่วซึ่งจะได้ไนโตรเจนมาจากการบรรยากาศโดยการตรึงไนโตรเจนนั้นเราเรียกสัดส่วนของไนโตรเจนที่พืชตรึงได้ว่า fNdf Fix หรือ fraction of N derived from fixation บางครั้งเขียน fNdf fix แต่บางกรณีจะใช้ fNdfa ซึ่ง a จะหมายถึง air หรือ atmosphere นั้นเอง fNdfF, fNdfS และ fNdf Fix จะสัมพันธ์ในแต่ละกรณีดังนี้

1. พืชที่ตรึงไนโตรเจน

$$1 = \text{fNdfF} + \text{fNdfS} + \text{fNdf Fix}$$

$$\text{หรือ } 100 = \% \text{NdfF} + \% \text{NdfS} + \% \text{Ndf Fix}$$

2. พืชอ้างอิงหรือพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน

$$1 = \text{fNdfF} + \text{fNdfS}$$

$$\text{หรือ } 100 = \% \text{NdfF} + \% \text{NdfS}$$

สำหรับการคำนวณปริมาณหรือสัดส่วนของไนโตรเจนที่พืชได้มาจากแหล่งต่าง ๆ นั้น เราจะต้องนำพืชทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) เสียก่อนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์เพื่อแยกอัตราส่วนระหว่าง $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ เพื่อให้ได้มาซึ่งค่า % ^{15}N atom excess ในตัวอย่างพืช (plant sample) จึงจะสามารถคำนวณต่อไปได้

$$\text{fNdfF} = \frac{\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ atom excess ในพืชทดลอง}}{\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ atom excess ในปุ๋ยไอโซโทปที่ใช้}}$$

และ

$$\% \text{NdfF} = \frac{\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ atom excess ในพืชทดลอง} \times 100}{\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ atom excess ในปุ๋ยไอโซโทปที่ใช้}}$$

ซึ่งในทำนองเดียวกันก็สามารถคำนวณไนโตรเจนที่มาจากดินได้ ส่วนไนโตรเจนที่มาจากบรรยากาศโดยการตรึงไนโตรเจนนั้นจะได้แยกอธิบายเป็นกรณีไปในภายหลัง

พืชที่ตรึงไนโตรเจน และพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางไอโซโทป ^{15}N นั้น เราจะต้องเกี่ยวข้องกับพืชสองประเภท คือ ประเภทแรกได้แก่ พืชที่ตรึงไนโตรเจน ซึ่งจะเป็น พืชตระกูลถั่ว (legume plant) และเป็น พืชที่มีปมราก (nodulating plant) อีกประเภทหนึ่งเป็น พืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ซึ่งมักจะเป็น พืชอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว (non-legume plant) และเป็น พืชที่ไม่มีปมราก (non-nodulating plant) เมื่อปลูกพืชที่ตรึงไนโตรเจนกับพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจนเพื่อเปรียบเทียบกัน เราจะเรียกพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจนว่า พืชอ้างอิง (reference plant) หรือ พืชมาตรฐาน (standard plant)

ในบางครั้งในรายงานการวิจัยจะเขียน **nod. plant** และ **non-nod. plant** ก็เป็นที่เข้าใจกันว่าเป็นพืชที่ตรึงไนโตรเจน และพืชอย่างอื่นเอง อย่างไรก็ตาม ในบางกรณีอาจจะใช้ **พืชตระกูลถั่วที่ไม่ตรึงไนโตรเจน (non-fixing legume plant)** เป็นพืชอ้างอิงก็ได้ ซึ่งจะได้กล่าวในตอนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของพืชอ้างอิง

การเจือจางไอโซโทป (isotope dilution) ในกรณีของไอโซโทปเสถียรของไนโตรเจนนั้น เราทราบแล้วว่า $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ตามธรรมชาติจะเป็นสัดส่วน 272 ± 0.31 ซึ่งหมายความว่า จะเป็น ^{14}N เท่ากับ $99.6367 \text{ atom } \% ^{14}\text{N}$ และเป็น ^{15}N เท่ากับ $0.3663 \pm 0.0004 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไนโตรเจนให้มี ^{15}N มากขึ้น เช่น ในรูปปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่มี ^{15}N ^{15}N เท่ากับ $30.6337 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ จะเห็นได้ว่า ปริมาณหรือความเข้มข้นของไอโซโทป ^{15}N ได้เปลี่ยนแปลงไป คือ เพิ่มขึ้น ก็ย่อมจะทำให้ไอโซโทป ^{14}N ลดสัดส่วนและความเข้มข้นลงจาก $99.6337 \text{ atom } \% ^{14}\text{N}$ เป็น $69.00 \text{ atom } \% ^{14}\text{N}$ และถ้าหากเราชั่ง $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จำนวน 20.00 กรัม และละลายในน้ำกลั่น ทำปริมาตรให้ได้ 500 มล. สารละลายนี้จะมี ^{15}N อยู่เท่ากับ $30.6337 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ แต่ถ้าหากเราจะทำให้สารละลายเดียวกันนี้มี ^{15}N ลดลงเป็น $15.3168 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ ก็ไม่หมายความว่าต้องเติมน้ำกลั่นเพื่อทำปริมาตรให้ได้ $1,000$ มล. หรือ 1 ลิตร ทั้งนี้ก็เพราะเหตุว่า ถ้าเพิ่มปริมาตรของสารละลายเป็น 1 ลิตร $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ ของสารละลายก็ยังจะอยู่คงเดิม คือ $30.6337 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ เพราะว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของไอโซโทป $^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$ ในสารละลายดังกล่าวจะคงเดิมไม่ว่าจะเติมน้ำลงไปกี่ลิตรก็ตาม วิธีที่จะทำให้เกิดการเจือจางไอโซโทปลงได้ ในกรณีของ ^{15}N ก็ทำได้โดยเติม ^{14}N ลงไปในรูปของ $(^{14}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในปริมาณที่เราสามารถจะคำนวณได้โดยไม่ยาก ซึ่งในที่สุดเมื่อไอโซโทป ^{14}N เพิ่มขึ้น ก็จะทำให้ไอโซโทป ^{15}N ถูกเจือจางลงไปในนั้นก็คือสัดส่วนไอโซโทป $^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$ ถูกทำให้เปลี่ยนไปโดยในระบบสารละลายอันเดียวกันนี้โดยวิธีการเจือจางไอโซโทปนั่นเอง

อนึ่ง ในการใช้ไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาวิจัยการตรึงไนโตรเจนจะต้องเพิ่มความระมัดระวังอย่าให้เกิดการเจือปนไอโซโทป (isotope contamination) เพราะเหตุว่าการเพิ่มหรือปะปนของ ^{14}N หรือ ^{15}N อันใดอันหนึ่งในระบบสารละลายไอโซโทปจะทำให้ $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ เปลี่ยนไปทันที และมีผลกระทบมาถึงผลการทดลองอย่างมาก อีกประเด็นหนึ่ง อาจจะมีผู้สงสัยว่า $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ ในสารละลายหรือในปุ๋ยจะเป็นอันเดียวกับ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารละลายหรือปุ๋ยนั้นหรือไม่ คำตอบก็คือไม่ใช่ เช่น ในปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่มีระดับไอโซโทป ^{15}N เท่ากับ $5, 10$ และ $50 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่คำนวณได้ตามสูตรของ $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ $21.21, 21.27$ และ $21.80\% \text{ N}$ ตามลำดับ ซึ่งไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ในปุ๋ยไอโซโทป $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่มีไอโซโทป ^{15}N เท่ากับ $5, 10$ และ $50 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ นั้น จะเป็นไอโซโทปเสถียร ^{15}N เท่ากับ $5, 10$ และ $50 \text{ atom } \% ^{15}\text{N}$ และเป็นไอโซโทปเสถียร ^{14}N เท่ากับ $95.0, 90.0$ และ $50.0 \text{ atom } \% ^{14}\text{N}$ ตามลำดับ

Isotope balance equation หรือ isotope dilution equation เมื่อเราจะทำการเจือจางไอโซโทป เราสามารถทำได้โดยง่ายโดยใช้สมการเจือจางไอโซโทปที่เรียกว่า isotope balance equation หรือ isotope dilution equation เช่นกรณี ^{15}N ข้างล่าง (IAEA, 1983)

1. กรณีที่ปุ๋ยทั้งสองชนิดเป็นปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (^{15}N -labelled fertilizer)

$$x(a_1) + y(a_2) = (x + y) \bar{a}$$

เมื่อ x = ปริมาณของปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ชนิดแรก
 a_1 = $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ ของปุ๋ยไอโซโทปชนิดแรก (ซึ่งมีค่าสูงกว่า)
 y = ปริมาณของปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ชนิดที่สอง (ซึ่งมีค่าต่ำกว่า)
 a_2 = $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ ของปุ๋ยไอโซโทปชนิดที่สอง (ซึ่งมีค่าต่ำ)
 $\bar{a}$ = $\text{atom } \% ^{15}\text{N}$ ที่ต้องการเมื่อเอาปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ชนิดแรกและชนิดที่สองผสมกันแล้ว ($x + y$)

2. กรณีที่ปุ๋ยชนิดแรกเป็นปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N และอีกชนิดหนึ่งเป็นปุ๋ยธรรมดา (unlabelled fertilizer)

$$\frac{x(a_1)}{x + y} = \bar{a}'$$

เมื่อ x = ปริมาณของปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (labelled fertilizer)
 a_1 = $\% ^{15}\text{N}$ atom excess ของปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (labelled fertilizer)
 y = ปริมาณของปุ๋ยธรรมดา (unlabelled fertilizer)

$\bar{a}' = \% \text{ } ^{15}\text{N atom excess}$ ที่ต้องการเมื่อเอาปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N กับปุ๋ยธรรมชาติผสมกันแล้ว ($x + y$)
 ในกรณี (2) $a_2 = a_0 = 0.3663 \text{ atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} = 0 \% \text{ } ^{15}\text{N atom excess}$

อนึ่ง ทั้งกรณี (1) และ (2) การใช้ปุ๋ยผสมกันควรจะเป็นปุ๋ยประเภทเดียวกัน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรียผสมกับยูเรีย หรือแอมโมเนียมไนเตรดผสมกับแอมโมเนียมไนเตรด เป็นต้น

ไอโซโทป ^{15}N กับการตรึงไนโตรเจน

เมื่อได้ทำความเข้าใจกับศัพท์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับไอโซโทป ^{15}N พอเป็นพื้นฐานแล้ว ต่อไปก็จะเข้าสู่การใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว ซึ่งมีวิธีใช้อยู่ 3 วิธี (Hardarson, 1985) คือ

1. การใช้แก๊ส $^{15}\text{N}_2$ โดยตรง
2. การใช้วิธีเจือจางไอโซโทป (isotope dilution method)
3. การใช้ความแตกต่างระหว่าง $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ ของบรรยากาศกับ $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ ของดินโดยตรง (difference in natural abundance of ^{15}N)

ซึ่งจะขอแยกอธิบายแต่ละวิธีดังต่อไปนี้

1. การใช้แก๊ส $^{15}\text{N}_2$ โดยตรง

นับเป็นวิธูปหาลของการนำไอโซโทป ^{15}N มาใช้ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจน เริ่มโดย Burris and Miller (1941) วิธีนี้เป็นวิธีที่ตรงเป่าที่สุด คือ ปลูกพืชตระกูลถั่วในตู้ปลูกพืช (growth chamber) และให้ $^{15}\text{N}_2$ แก่พืช $^{15}\text{N}_2$ ที่กล่าวถึงนี้จะมี $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ สูงกว่า $0.3663 \text{ atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ ซึ่งเป็นค่าของ ^{15}N ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เมื่อนำพืชมาวิเคราะห์พืชจะมี $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ สูงขึ้น แสดงว่าพืชตรึงไนโตรเจนโดยนำเอา $^{15}\text{N}_2$ มาใช้ได้โดยตรง ข้อเสียของวิธีนี้ คือ จะต้องปลูกพืชในตู้ปลูกพืช (Witty and Day, 1978) ทำให้การทดลองดำเนินไปได้ในช่วงเวลาที่จำกัดมาก นอกจากนั้น สภาพแวดล้อมในตู้ปลูกพืชจะแตกต่างจากสภาพแวดล้อมในไรทดลอง การประเมินผลการตรึงไนโตรเจนโดยพืชตระกูลถั่วโดยวิธีนี้จึงไม่สะท้อนปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ตลอดฤดูปลูกตามสภาพที่แท้จริง ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่เป็นที่ยอมรับกันในทางปฏิบัติ ยกเว้นจะใช้ในการทดลองระยะสั้น ๆ เพื่อการศึกษาขั้นต้นบางประการเท่านั้น

2. การใช้วิธีเจือจางไอโซโทป

หลักการของวิธีนี้ก็คือ ทำการปลูกพืช 2 ชนิดเปรียบเทียบกัน คือ พืชตระกูลถั่วที่ตรึงไนโตรเจนกับพืชอ้างอิง ปลูกพืชทั้งสองในดินเดียวกันให้ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ที่มีระดับไอโซโทป ^{15}N หรือ $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ อันเดียวกันที่มีค่าสูงกว่า $0.3663 \text{ atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ และพืชทั้งสองได้รับอัตราปุ๋ยเท่ากัน สมมติว่าพืชทั้งสองชนิดต่างก็ไม่ตรึงไนโตรเจน ดังนั้น เมื่อเรานำพืชทั้งสองมาวิเคราะห์ก็ย่อมจะมี $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ เท่ากัน เพราะได้รับไนโตรเจนจากแหล่งเดียวกัน คือ จากดิน (^{14}N) และจากปุ๋ยไอโซโทป (^{15}N) แต่ในกรณีพืชตระกูลถั่วตรึงไนโตรเจน ถ้วยย่อมได้รับไนโตรเจนจาก 3 แหล่ง คือ จากดิน (^{14}N) จากปุ๋ยไอโซโทป (^{15}N) และบรรยากาศโดยการตรึงไนโตรเจน (^{14}N) เมื่อเรานำถั่วมาวิเคราะห์ก็พบว่า $\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}$ ของถั่วจะต่ำกว่าของพืชอ้างอิง ทั้งนี้ก็เพราะไอโซโทป ^{15}N ในถั่วจะถูกเจือจางโดย ^{14}N จากบรรยากาศหรือจากการตรึงไนโตรเจนนั่นเอง ทั้งนี้จะถูกเจือจางมากน้อยเท่าใดย่อมขึ้นอยู่กับปริมาณของไนโตรเจนที่ถั่วตรึงได้ สรุปง่าย ๆ หลักการนี้ก็คือ อาศัยความแตกต่างของการเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในพืชที่ตรึงไนโตรเจนกับพืชอ้างอิงนั่นเอง (Fried and Broeshart, 1975; Fried and Meddleboe, 1977) โดยที่หากเอาว่าพืชอ้างอิงและพืชตระกูลถั่วจะดูดไนโตรเจนจากดินและจากปุ๋ยเป็นสัดส่วนเท่ากันตามหลักการของ A-value (Fried and Broeshort, 1975) ซึ่งโดยหลักการนี้ ถ้าในดินมีแหล่ง (source) ของธาตุอาหารพืชธาตุใดธาตุหนึ่งอยู่ 2 แหล่งในช่วงเวลาเดียวกัน พืชจะดูดธาตุอาหารเหล่านั้นตามสัดส่วนของปริมาณที่เป็นประโยชน์ต่อพืชของแต่ละธาตุอาหารนั้น ๆ ดังนั้น จากหลักการนี้ของ A-value ถ้าในดินมีแหล่งของธาตุไนโตรเจนอยู่ 2 แหล่ง คือ ไนโตรเจนจากดินและไนโตรเจนจากปุ๋ย ที่เราใส่ลงไป เช่น 20 กก. N/ไร่ และถ้าเราทราบค่าพืชที่เราปลูกภายใต้สภาพที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนจากปุ๋ยอยู่ในต้นพืชเป็นจำนวนเท่าใดแน่ชัดแล้ว เราจะสามารถคำนวณปริมาณ "ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช" ของไนโตรเจนจากดินได้โดยใช้สูตร

$$A = \frac{B(1-y)}{y}$$

เมื่อ A = ปริมาณของ available nutrient ในดิน (ในกรณีนี้คือไนโตรเจน)

B = ปริมาณหรืออัตราของธาตุอาหารจากปุ๋ยที่ใส่ลงไป
 ในรูปไนโตรเจน

y = สัดส่วน (proportion) ของไนโตรเจนที่พืชได้จาก
 ปุ๋ยไนโตรเจน

ในการเก็บตัวอย่างพืชทดลองมาวิเคราะห์ ควรจะเก็บพืชอย่างอิงและพืชตรึงไนโตรเจนในเวลาเดียวกัน แยกเป็นส่วนของฝักและส่วนของต้นและใบ ซึ่งและสับหรือตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยเริ่มจากตัวอย่างที่มี atom % ^{15}N ต่ำที่สุดเสียก่อนเพื่อป้องกันการเจือปนของไอโซโทป และจะต้องทำความสะอาดกรรไกรหรือเครื่องมือที่ใช้ตัดตัวอย่างทุกครั้งก่อนที่จะเริ่มใช้กับตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไป ตัวอย่างพืชที่จะนำมาวิเคราะห์จะต้องผ่านการอบที่ $72-80^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 72 ชม. วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) ในพืช โดยวิธี Kjeldahl method และวิเคราะห์อัตราส่วน $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ โดยเครื่อง Emission Spectrometer หรือ Mass Spectrometer การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โปรดดูรายละเอียดตามวิธีของ Lloyd-Jones et al. (1974) และ Fiedler and Proksch (1975)

พืชอ้างอิงหรือพืชมาตรฐาน (reference plant หรือ standard plant) ความแม่นยำและประสิทธิภาพของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วจะผูกพันอยู่กับการเลือกพืชอ้างอิงที่เหมาะสมเป็นอย่างมาก (Wagner and Zapata, 1982) ในการเลือกพืชอ้างอิงควรจะพิจารณาคุณสมบัติต่อไปนี้

1. พืชอ้างอิงจะต้องเป็นพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ซึ่งจะสามารถตรวจสอบได้โดยง่ายโดยใช้วิธี acetylene reduction assay (Hardy et al., 1973)

2. พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนควรมีลักษณะของระบบราก (rooting pattern) คล้ายกัน เพื่อที่จะได้มาซึ่งธาตุอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจนจากดินและปุ๋ยในบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

3. พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนควรมีช่วงระยะการเจริญเติบโต (growth stages) และระยะการเก็บเกี่ยวคล้ายคลึงกัน ซึ่งจะมีช่วงการปลูกและการเก็บเกี่ยวพร้อมกัน

4. พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนควรจะตอบสนองต่อความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ความแห้งแล้ง ฯลฯ ในระหว่างช่วงการเจริญเติบโตได้ในลักษณะเดียวกัน

Rennie (1982) ได้เสนอว่าพืชที่อยู่ในข่ายที่จะเป็นพืชอ้างอิงได้ดี ได้แก่ พืชต่อไปนี้

1. เป็นตระกูลอื่นที่ไม่ตรึงไนโตรเจน
2. เป็นพืชตระกูลถั่วที่ไม่มีปมราก
3. ถ้าดินที่ทำการทดลองขาด strain ของ Rhizobium ที่เหมาะสม ซึ่งเฉพาะถั่วที่ผ่านการคลุกเชื้อไรโซเบียมที่เหมาะสม

(inoculated) เท่านั้นจึงจะตรึงไนโตรเจนได้ในดินดังกล่าว ในกรณีนี้เราสามารถใส่พืชตระกูลถั่วชนิดเดียวกันแต่ไม่ผ่านการคลุกเชื้อ (uninoculated legume-plant) เป็นพืชอ้างอิงได้

ในการใช้วิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ประเมินปริมาณของไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้นั้น โดยทั่วไปจะมีสถานการณ์ที่แตกต่างกัน 3 สถานการณ์ คือ

1. **พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนเจริญเติบโตภายใต้ระบบไนโตรเจนเดียวกัน (same $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ pool)** โดยวิธีนี้เราจะทำการปลูกพืชสองชนิดในดินเดียวกัน พืชจะได้รับปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ชนิดเดียวกันซึ่งมี atom % ^{15}N เท่ากัน และในปริมาณของไนโตรเจนที่เท่ากัน (ใส่ปุ๋ยอัตราเดียวกัน) เราจะหักหักเอาว่าพืชทั้งสองชนิดจะดูดไนโตรเจนจากดินและจากปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N ในสัดส่วนที่เท่ากัน แต่อาจจะแตกต่างกันในปริมาณของไนโตรเจนตามหลักการของ A-value ดังได้กล่าวแล้ว ในสถานการณ์เช่นนี้พืชที่ตรึงไนโตรเจนจะได้รับไนโตรเจนจาก 3 แหล่ง คือ จากดิน (^{14}N) จากปุ๋ยไอโซโทป (^{15}N) และจากบรรยากาศ (^{14}N) ในรูปแก๊สไนโตรเจน ในขณะเดียวกัน พืชอ้างอิงจะได้รับไนโตรเจนจาก 2 แหล่งเท่านั้น คือ จากดิน (^{14}N) และจากปุ๋ยไอโซโทป (^{15}N) ดังนั้น จะเกิดการเจือจางไอโซโทป ^{15}N โดยไอโซโทป ^{14}N ในสัดส่วนที่น้อยกว่า ในกรณีของพืชที่ตรึงไนโตรเจนเราอาศัยความแตกต่างดังกล่าวประเมินปริมาณของไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้

ในการคำนวณเราจะใช้สูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ Ndf Fix} =$$

$$\frac{(1 - \% ^{15}\text{N atom excess ในพืชที่ตรึงไนโตรเจน}) \times 100}{\% ^{15}\text{N atom excess ในพืชอ้างอิง}}$$

$$\text{ปริมาณ } \text{N}_2 \text{ ที่ตรึงได้ (กก. N/ไร่)} =$$

$$\frac{\% \text{ Ndf Fix} \times \text{ปริมาณ N ทั้งหมดในพืชที่ตรึงไนโตรเจน}}{100}$$

สำหรับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืช (total N yield) คำนวณได้จากสูตรข้างล่าง

$$\text{ปริมาณ N ทั้งหมดในพืช (กก. N/ไร่)} =$$

$$\frac{\text{น้ำหนักแห้งของพืช} \times \% \text{ N ในพืช}}{100}$$

แล้วจึงนำผลที่ได้จากการคำนวณไปประเมินปริมาณไนโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ต่อไป

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพืชที่ตรึงไนโตรเจน (fixing plants) และพืชอ้างอิงในการทดลองต่าง ๆ

พืชที่ตรึงไนโตรเจน	พืชอ้างอิง	ผู้ทำการทดลอง
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Arachis hypogaea</i> (0) ¹	Rennie et al. (1978)
<i>Casuarina equisetifolia</i>	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Gauthier et al. (1985)
<i>Glycine max</i>	<i>Brassica rapus</i>	Rennie (1984)
	<i>Glycine max</i> (N)	Ham (1978)
	<i>Glycine max</i> (O)	Rennie (1984)
	<i>Glycine max</i> (N, O)	Wagner and Zapata (1982)
	<i>Glycine max</i> (I, N, O)	Rennie (1984)
	<i>Hordeum vulgare</i>	Rennie (1982)
	<i>Sorghum sudanese</i>	Wagner and Zapata (1982)
	<i>Sorghum vulgare</i>	Ghelfi et al. (1984)
	<i>Zea mays</i>	Witty and Ritz (1984)
<i>Lotononis bainesis</i>	<i>Digitaria decumbens</i> (+)	Vallis et al. (1977)
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Festuca arundinaceae</i>	Heichel et al. (1983)
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Chloris gayana</i> (+)	Vallis et al. (1977)
<i>Medicago sativa</i>	<i>Festuca arundinaceae</i>	McAuliffe et al. (1958)
	<i>Lolium multiflorum</i>	Ladd (1981)
	<i>Medicago sativa</i> (IN)	Henson and Heichel (1984)
	<i>Phalaris aquatica</i>	Ledgart et al. (1985b)
	<i>Rumex acetosella</i>	Ledgart et al. (1985b)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i> (D/W)	Ventura and Watanaba (1983)
	<i>Oryza sativa</i> (O)	Wanataba and Lin (1984)
<i>Paspalum notatum</i> cv. batalais	<i>Paspalum notatum</i> cv. pensacola	Boddy et al. (1983b)
<i>Phasesolus vulgaris</i>	<i>Brassica rapa</i>	Witty (1983b)
	<i>Hordeum vulgare</i>	Rennie and Kemp (1984)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Witty (1983a)
	<i>Lolium multiflorum</i>	Butler and Ladd (1985a)
<i>Stylosanthes humilis</i>	<i>Chloris gayana</i> (+)	Villas et al. (1967)
<i>Trifolium repens</i>	<i>Festuca arundinaceae</i> (+)	McAuliffe et al. (1958)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i> (O)	Rennie et al. (1983)
<i>Vicia faba</i>	<i>Lolium perenne</i>	Witty (1983a)
<i>Vigna luteola</i>	<i>Chloris gayana</i>	Vallis et al. (1977)

¹ พืชที่ตรึงไนโตรเจนจะได้รับการปลูกเชื้อไรโซเนียมที่เหมาะสม

(+) หมายถึง ปลูกผสมกัน (mixed stand) : N = non-nodulating

I = ineffective Rhizobium inoculation; O = no inoculation

IN = ineffectively nodulated genotype; D = dryland; W = wetland

2. พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนเติบโตภายใต้ระบบไนโตรเจนที่ต่างกัน (different ¹⁵N/¹⁴N pool) สถานการณ์นี้จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเรามีความจำเป็นที่จะต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้แก่พืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจนในอัตราที่ต่างกัน เพราะเหตุว่าถ้าพืชตระกูลถั่วได้รับปุ๋ยไนโตรเจนมากจะทำให้ตรึงไนโตรเจนได้น้อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้แก่พืชตระกูลถั่วในอัตราที่ต่ำ ในขณะที่ปุ๋ยอัตราเดียวกันนี้

จะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืชอ้างอิงได้ ตามปกติโดยเฉพาะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ในทางปฏิบัติจะใส่ปุ๋ยให้พืชทั้งสองประเภทดังนี้ (Fried and Broeshart, 1975) พืชอ้างอิง 50-100 กก. N/ เฮกตาร์ หรือประมาณ 8-15 กก. N/ ไร่ ส่วนพืชตระกูลถั่วใช้อัตรา 10-20 กก. N/ เฮกตาร์ หรือประมาณ 1.5-3 กก. N/ ไร่ ในการคำนวณ จะใช้สูตรที่แตกต่างจากสถานการณ์ที่ 1 คือ

$$\% \text{ Ndf Fix} = \frac{100 (1 - \text{NdfF ในพืชที่ตรึง N}) + \% \text{ NdfF ในพืชที่ตรึง N(R-1)}}{\% \text{ NdfF ในพืชอ้างอิง}}$$

เมื่อ R = จำนวนเท่าของอัตราปุ๋ยที่ใส่ให้พืชอ้างอิงเมื่อเทียบกับที่ใส่ให้พืชที่ตรึง เช่น ใส่ปุ๋ยพืชอ้างอิง 20 กก.N/ไร่ พืชที่ตรึงในโตรเจน 2.5 กก.N/ไร่ ในกรณีนี้ R = 20 ÷ 2.5 = 8 เท่า

ที่เอาค่า R มาคิดด้วยเพราะถือว่า % NdfF จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราปุ๋ยในโตรเจนที่ใส่ได้เพิ่มขึ้นนั่นเอง

3. กรณีใส่ปุ๋ยไอโซโทปเฉพาะสำหรับทดลองหนึ่งในขณะที่ปัจจัยอื่น ๆ เหมือนกันหมด ("single-treatment" substrate labelling methodology) กรณีนี้เป็นการผสมผสานวิธีทางไอโซโทป 2 วิธีเข้าด้วยกัน คือ วิธีใส่ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (Field and Broeshart, 1981) กับวิธีใช้สำหรับทดลองเดี่ยว (single treatment) ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์ขึ้นมา (Fried et al., 1975) กล่าวคือ ระบบพืช ดิน ปุ๋ย และสภาพแวดล้อมในทุกตำรับทดลองจะเหมือนกันหมด ยกเว้นแต่เพียงว่าหนึ่งตำรับภายในบรรดาดำรับที่ใส่ปุ๋ยเท่านั้นที่จะได้ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (ตำรับอื่น ๆ ในตำรับที่ใส่ปุ๋ยได้รับปุ๋ยในโตรเจนธรรมดา) ดังตัวอย่างในตารางที่ 3 โดยวิธีนี้จะทำให้สามารถศึกษาอิทธิพลของช่วงเวลาการใส่ปุ๋ย ชนิดของปุ๋ย ตลอดจนวิธีการใส่ปุ๋ย ควบคู่ไปพร้อมกับการศึกษาการตรึงในโตรเจนในการทดลองเดียวกัน

ตารางที่ 3 ตัวอย่างกรณีใส่ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N เฉพาะสำหรับทดลองในขณะที่ปัจจัยอื่น ๆ เหมือนกันหมด

พืชทดลอง	อัตราปุ๋ย (กก.N/ไร่)	
	หว่าน	ใส่เป็นแถว
ถั่วพุ่ม 1ก	1.5*	1.5
ถั่วพุ่ม 1ข	1.5	1.5*
ข้าวฟ่าง 2ก	3.0	3.0
ข้าวฟ่าง 2ข	3.0	3.0*

* ใส่ปุ๋ยไอโซโทป ^{15}N (^{15}N labelled fertilizer)

ในการคำนวณปริมาณในโตรเจนที่พืชตรึงได้ จะใช้สูตรต่อไปนี้

$$e = 100 (1 - \frac{Rc}{a}) + c (R - 1 + \frac{Rg}{a}) - f$$

เมื่อ

e = % Ndf Fix

R = อัตราปุ๋ยสำหรับพืชอ้างอิง ÷ อัตราปุ๋ยสำหรับพืชตรึงในโตรเจน

a = % NdfF ในพืชอ้างอิง

c = % NdfF ในพืชตรึงในโตรเจน

g = Ndfu.F หรือ % ในโตรเจนที่พืชอ้างอิงได้รับจากปุ๋ยธรรมดา

f = % Ndfu.F หรือ % ในโตรเจนที่พืชตรึงในโตรเจนได้รับจากปุ๋ยธรรมดา

$$\text{ปริมาณในโตรเจนที่พืชตรึงได้ (กก.N/ไร่)} = \frac{\% \text{ Ndf Fix} \times \text{ปริมาณ N ทั้งหมดในพืชตรึง N}}{100}$$

ข้อดีของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาการตรึงในโตรเจน Danso (1986) ได้สรุปข้อดีของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาการตรึงในโตรเจนในพืชตระกูลถั่วไว้ย่อย่างละเอียดดังนี้

1. เป็นวิธีที่ประเมินปริมาณของในโตรเจนที่พืชตระกูลถั่วตรึงได้ในสภาพแวดล้อมจริงได้เป็นอย่างดี
2. เป็นวิธีที่ทำให้เราสามารถแยกได้ว่าในโตรเจนในพืชตระกูลถั่วเป็นในโตรเจนที่มาจากดิน จากปุ๋ย และจากบรรยากาศในสัดส่วนและปริมาณเท่าใด
3. เราสามารถใช้วิธีนี้ประเมินปริมาณในโตรเจนที่พืชตรึงได้ แม้ว่าผลผลิตของพืชจะได้รับความเสียหายจากโรคแมลง สัตว์ สภาพดินที่ไม่เหมาะสม ฯลฯ
4. โดยวิธีนี้เราไม่จำเป็นต้องปลูกพืช control ที่พื้นธรรมชาติ คือ ให้พืช control มีในโตรเจนจากปุ๋ยเท่ากับศูนย์ หรือต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งเป็นแนวทางปฏิบัติเมื่อใช้วิธีเปรียบเทียบผลต่างของปริมาณในโตรเจนทั้งหมดในพืช control กับพืชตระกูลถั่ว หรือที่เรียกว่า total nitrogen difference method
5. ในการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงในโตรเจน วิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N นี้จะมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงในโตรเจนของถั่วในสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้โดยการเปรียบเทียบ % ^{15}N atom excess ระหว่างตำรับทดลองและระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องปลูกอ้างอิง
6. โดยวิธีนี้เราสามารถศึกษาผลกระทบของการใส่ปุ๋ย P หรือปุ๋ย N ที่มีต่อการตรึงในโตรเจนของพืชตระกูลถั่วได้อย่างเด่นชัดและโดยอิสระจากการดูดในโตรเจนจากดินและปุ๋ยของพืช

7. ความคลาดเคลื่อนในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้อันเป็นผลมาจากการเลือกพืชอ้างอิงไม่เหมาะสมกับพืชที่ตรึงไนโตรเจนนั้นจะเกิดขึ้นน้อยมาก โดยเฉพาะเมื่อปริมาณการตรึงไนโตรเจนโดยพืชตระกูลถั่วมีมากขึ้น นอกจากนั้น ความคลาดเคลื่อนในการคำนวณการตรึงไนโตรเจนที่อาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในทางลดของอัตราส่วน $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ในดินเมื่อเวลาผ่านไปนั้นจะมีน้อยโดยวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N (Witty, 1983)

ข้อเสียของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในการตรึงไนโตรเจน
จุดอ่อนของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนนั้นพอสรุปได้ดังนี้

1. ปัญหาการเลือกพืชอ้างอิงที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ง่ายนักที่จะจับคู่พืชต่างชนิดกัน โดยให้มีคุณสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน (Wagner and Zapata, 1982; Chalk, 1985)

2. ปัญหาที่เกี่ยวกับการใส่ปุ๋ยให้สม่าเสมอในดินเพื่อที่รากพืชจะดูดไปใช้ได้เท่า ๆ กัน ทั้งพืชอ้างอิงและพืชที่ตรึงไนโตรเจน เป็นการลำบากที่จะหาพืชที่มีระบบรากเหมือนกันเพื่อที่จะให้ดูดไนโตรเจนจากอาณาบริเวณเดียวกันหรือคล้าย ๆ กันได้

3. เมื่อเวลาผ่านไปอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ ^{15}N และ ^{14}N โดยที่อินทรีย์ไนโตรเจนในดิน (mineral N) อาจจะมีน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เป็น ^{14}N เพราะตามหลักการของ "priming effect" เมื่อมีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนลงไปจะทำให้ไนโตรเจนจากดิน (^{14}N) เป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้น โดยน้อยอัตราส่วนของ $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$ อาจจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเวลาผ่านไป

4. ปัญหาเกี่ยวกับการประเมินระบบไนโตรเจนในดิน (N pool) เพื่อพิจารณาในระดับที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของไนโตรเจนทั้งหมดในดินที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืชตระกูลถั่วที่ตรึงไนโตรเจน (A-value)

อย่างไรก็ตาม จุดอ่อนของวิธีเจือจางไอโซโทป ^{15}N นี้ มีผู้มีความเห็นว่ามีปัญหาใหญ่ เพราะสามารถแก้ไขได้ ยิ่งกว่านั้นวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการใช้ในการประเมินการตรึงไนโตรเจนโดยพืชตระกูลถั่วในปัจจุบัน (Witty 1983; Danso, 1986)

3. การใช้หลักความแตกต่างระหว่าง atom % ^{15}N ของบรรยากาศกับ atom % ^{15}N ของดินโดยตรง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าดินส่วนมากจะมี atom % ^{15}N สูงกว่า atom % ^{15}N ของบรรยากาศเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลมาจาก

การเปลี่ยนแปลงทางนิวเคลียร์ในระหว่างขบวนการกำเนิดดิน (Hardarson, 1985) ดังนั้น จึงมีผู้ประยุกต์ใช้กับการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว ซึ่งภายใต้หลักการนี้พืชที่ตรึงไนโตรเจนย่อมจะมี atom % ^{15}N ต่ำกว่าพืชอ้างอิงที่ปลูกในดินเดียวกัน (Amarger et al., 1979; Kohl et al., 1980) แต่อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของ atom % ^{15}N ระหว่างดินกับบรรยากาศจะมีน้อยมาก ดังนั้นจึงได้ใช้หน่วยเรียกเฉพาะคือ เดลต้า ^{15}N หรือ $\delta^{15}\text{N}$ หรือ $\Delta^{15}\text{N}$ ใช้หน่วย ‰ (หนึ่งในพัน) และคำนวณดังนี้ (Vose, 1982)

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left(\frac{^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ sample}}{^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ air}} - 1 \right) \times 1,000$$

$$\% \text{Ndf Fix} = \left(\frac{1 - ^{15}\text{N} \text{ ‰ (พืชตรึง)} - ^{15}\text{N} \text{ ‰ air}}{^{15}\text{N} \text{ ‰ (พืชอ้างอิง)} - ^{15}\text{N} \text{ ‰ air}} \right) \times 100$$

เนื่องจากวิธีนี้มีทั้งผู้สนับสนุนและผู้โต้แย้งในทางสร้างสรรค์ จึงมีรายละเอียดมาก อีกทั้งเป็นวิธีการที่กำลังได้รับความสนใจในการวิจัยเพื่อพัฒนาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นสำหรับการใช้วัดการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว จึงได้ขอแยกออกเป็นบทความอีกตอนหนึ่งต่างหาก (วิทยา, 2529)

สรุป

การใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในการศึกษาและวิจัยการตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่ว นับได้ว่ามีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีอื่น ๆ เช่น วิธี Acetylene Reduction Assay ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้งานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนที่ใช้เวลานานตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว เพราะความคลาดเคลื่อนของค่าวัดภายใต้สภาพที่มีความแปรปรวนของกิจกรรมของน้ำย่อยที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งความลำบากในการประเมินการตรึงไนโตรเจนจากปมรากถั่วทั้งหมด วิธีที่ใช้ไอโซโทป ^{15}N มีความเหมาะสมที่จะใช้ประเมินการตรึงไนโตรเจนโดยพืชตระกูลถั่วในไร่ปลูกได้แม้ว่าพืชจะมีช่วงระยะการเจริญเติบโตนานเท่าใดก็ตาม เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ได้มีการใช้ในประเทศอื่น ๆ ที่เจริญแล้วมาเป็นเวลานานหลายปีแล้ว แต่ในประเทศไทยของเราเพิ่งจะเริ่มใช้เทคนิคนี้บ้าง ประปรายทั้งนี้เพราะขาดเครื่องมือและระบบวิเคราะห์ไอโซโทป ^{15}N ซึ่งมีราคาแพงมาก ขาดบุคลากรที่สามารถใช้เครื่องมือและระบบวิเคราะห์ ^{15}N ได้อย่างแท้จริง และขาดงบประมาณในการดำเนินการวิจัยเนื่องจากสารไอโซโทป ^{15}N มีราคา

แพงมาก ดังนั้น งานวิจัยเกี่ยวกับไอโซโทป ^{15}N ในประเทศไทย แต่เดิมมาจึงเป็นการร่วมมือหรือเป็นลูกมือให้กับนักวิทยาศาสตร์ในประเทศอื่น ๆ การวิเคราะห์ตัวอย่างก็กระทำโดยการส่งไปวิเคราะห์ในต่างประเทศ แต่ในปัจจุบันได้เริ่มมีเครื่องมือและระบบวัดไอโซโทป ^{15}N ภายในประเทศไทยแล้ว เช่น ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีเครื่อง ^{15}N Analyzer-Emission Spectrometer ซึ่งได้รับความช่วยเหลือจาก JICA และที่กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร มีเครื่อง ^{15}N Analyzer-Emission Spectrometer และเครื่อง Micromass Spectrometer ซึ่งได้รับความช่วยเหลือจาก UNDP ซึ่งคาดว่าจะมีส่วนสนับสนุนงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N ในการประเมินการตรึงไนโตรเจน ตลอดจนกระบวนการแปรสภาพต่าง ๆ ของไนโตรเจนในดิน-พืชในอนาคตต่อไป จึงหวังว่าบทความนี้จะให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไอโซโทป ^{15}N ในด้านดังกล่าวแก่ผู้ที่สนใจได้พอสมควร

คำนิยาม

ผู้เขียนผ่านการฝึกอบรมและมีประสบการณ์ด้านการใช้เครื่องมือและเทคนิคทางไอโซโทป ^{15}N และไอโซโทปแกมมาในรังสีในการวิจัยด้านดิน-พืช จาก Kyushu University และ The National Institute for Environmental Studies ประเทศญี่ปุ่น; International Atomic Energy Agency ประเทศออสเตรีย และ The Macaulay Land Use Research Institute, Scotland ประเทศสหราชอาณาจักร จึงใคร่ขอขอบพระคุณสถาบันที่กล่าวถึงที่ได้ประสาทวิชาการในสาขานี้ให้แก่ผู้เขียน

เอกสารอ้างอิง

- วิทยา มะเสนา. 2529. ก้าวใหม่ในการวัดการตรึงไนโตรเจน: การใช้ ^{15}N ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ. วารสารวิชาการเกษตร 4: 164-168.
- Amarger, N. et al., 1979. Estimate of symbiotic fixed nitrogen in field grown soybean using variations in ^{15}N natural abundance. Plant and Soil. 52: 269-280.
- Boddy, R.M. et. al., 1983a. The ^{15}N -isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. Soil Biol. Biochem 15: 25-32.
- Boddy, R.M. et. al., 1983b. The use of ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. Can. J. Microbiology 29: 1036-1045.
- Burris, R.H., C.E. Miller. 1941. Application of ^{15}N to the study of biological nitrogen fixation, Science 93: 114-115.
- Butler, J.H.A. and J.N. Ladd. 1985a. Symbiotically fixed and soil-derived nitrogen in legumes grown in pots in soils with different amounts of available nitrate. Soil Biol. Biochem. 17: 47-55.
- Butler, J.H.A. and J.N. Ladd. 1985b. Growth and nitrogen fixation by *Medicago littoralis* in pot experiments: effect of plant density and competition from *Lolium multiflorum*. Soil Biol. Biochem. 17: 335-361.
- Chalk, P.M. 1985. Review, Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application. Soil Biol. Biochem. 17: 389-410.
- Danso, S.K.A. 1986. Review: Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application Comments Soil Biol. Biochem. 18: 243-244.
- Fieldler, R. and G. Proksch. 1975. The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: A review. Analytica Chimica Acta 78: 1-62.
- Fried, M. and H. Broeshart. 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by legume crops. Plant and Soil 43: 707-711.
- Fried, M. and H. Broeshart. 1981. A further extension of the method for independently measuring the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 62: 331-336.
- Fried, M. and V. Middleboe. 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 47: 713-715.
- Fried, M., R.J. Soper and H. Broeshart. 1975. ^{15}N labelled single treatment fertility experiments. Agron. J. 67: 393-396.
- Gauthier, D. et al. 1985. Assessment of N_2 fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with Frankia ORS 021001 using ^{15}N methods. Soil Biol Biochem. 17: 375-379.
- Ghelfi, R.A. et al. 1984. Measurement of dinitrogen fixation by Soybean (*Glycine max* L.) using ^{15}N in field conditions. Ciencia del Suelo 2: 45-51.
- Ham, G.E. 1978. Use of ^{15}N in evaluating symbiotic N_2 fixation of field-grown soybeans. In Isotopes in Biological Dinitrogen fixation, pp. 151-161. IAEA, Vienna.
- Hardarson, G. 1985. The use of ^{15}N methodology to assess N_2 fixation and guidelines for improvement of N_2 fixation in grain legumes. FAO/IAEA Agricultural Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Austria.
- Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47-81.
- Heichel, G.H., C.P. Vance and D.K. Barnes. 1983. Symbiotic nitrogen fixation of alfalfa, birdsfoot, trefoil, and red clover. In Proceedings of the 14th International Grasslands Congress. pp. 336-338. Westview Press, Boulder, Colorado.
- Henson, R.A. and G.H. Heichel. 1984. Partitioning of symbiotically fixed nitrogen in soybeans and alfalfa. Crop Science 24: 986-990.
- IAEA. 1983. A guide to the use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition: calculations and interpretation of data. IAEA-TECDOC-288. pp. 1-56.
- Kohl, D.H. G. shearer and J.E. Harper. 1980. Estimates of N_2 fixation based on differences in natural abundance of ^{15}N in nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. Plant Physiol. 66: 61-65.
- Ladd, J.N. 1981. The use of ^{15}N in following organic matter turnover, with special reference to rotation system. Plant and Soil 58: 401-411.
- Ledgard, S.F. et al., 1985b. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil N by nodulated legumes and reference plants in the ^{15}N dilution measurement of N_2

- fixation: grasshopper application method. *Soil Biol. Biochem.* 17: 323-328.
- McAuliffe, C. et al., 1958. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . *Agron. J.* 50: 334-337.
- Rennie, R.J. 1982. Quantifying dinitrogen (N_2) fixation by ^{15}N isotope dilution: the question of the nonfixing control plant. *Canada J. Botany* 60: 856-861.
- Rennie, R.J. 1984. Comparison of N balance and ^{15}N isotope dilution to quantify N_2 fixation in field grown legumes. *Agron. J.* 76: 785-790.
- Rennie, R.J. and G.A. Kemp. 1984. ^{15}N -determined time course for N_2 fixation in two cultivars of field bean. *Agron. J.* 76: 146-154.
- Rennie, R.J., D.A. Rennie and M. Fried. 1978. Concepts of ^{15}N usage in dinitrogen fixation studies. In *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*, pp. 107-130. IAEA, Vienna.
- Rennie, R.J. et al., 1983. ^{15}N isotope dilution to quantify dinitrogen (N_2) fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. *Canadian J. Botany* 61: 1667-1671.
- Vallis, I. et al; 1967. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. III. The uptake of small additions of ^{15}N -labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne. *Australian J. Agric. Res.* 18: 865-877.
- Vallis, I., E.F. Henzell, and T.R. Evans. 1977. Uptake of soil nitrogen by legumes in mixed swards. *Australian J. Agric. Res.* 28: 413-425.
- Ventura, W. and I. Watanabe. 1983. ^{15}N dilution technique of assessing the contribution of nitrogen fixation to rice plant. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29: 123-131.
- Vose, P.B. et al. 1982. ^{15}N as a tool in biological nitrogen research, BNF Technology for Tropical Agriculture, Graham, P.H. and S.C. Harris (Eds), CIAT, Cali, pp. 575-592.
- Wagner, G.H. and F. Zapata. 1982. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agron. J.* 74: 607-612.
- Watanabe, I. and C. Lin. 1984. Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas sp.* *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 117-124.
- Witty, J.F. 1983. Estimating N_2 -fixation in the field using ^{15}N -labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.* 15: 631-639.
- Witty, J.F. 1983a. Measurement of N fixation in the field by isotope dilution; Problems of declining soil enrichment. In *The Physiology, Genetics and Nodulation of Temperate Legumes*. pp. 253-268. Pitman, London.
- Witty, J.F. and K. Ritz. 1984. Slow release ^{15}N fertilizer formulations to measure N_2 fixation by isotope dilution. *Soil Biol. Biochem.* 16: 657-661.

Use of ^{15}N Technique in the Study of Nitrogen Fixation in Legumes

By

Wittaya Masayna

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

ABSTRACT

In the past, the Acetylene Reduction Assay (ARA) was the most widely used technique for assessing nitrogen fixation. The principle of this technique is the measurement of ethylene gas which is produced from acetylene by the activity of nitrogenase. The quantification of nitrogen fixation is based on the fact that nitrogen ($\text{N} \equiv \text{N}$), exhibiting triple bonds as the acetylene, will be reduced to ammonia. The chief disadvantage of this technique is its unreliability to estimate nitrogen fixation over a long growing season and with marked variations in agro-climatic conditions which may affect nitrogenase activity and, therefore, nitrogen fixation.

Currently, the ^{15}N technique is being used extensively by scientists worldwide to study nitrogen fixation. It provides a more reliable means of quantifying fixation irrespective of the length of the growing season and variations of agro-climatic conditions. However, in Thailand, the use of the ^{15}N technique is still very limited. This article introduces the basic principles underlying the application of the ^{15}N technique in assessing nitrogen fixation in legumes.
