สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2537

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับถั่วเซนโตรซีมา

โดย

รศ.ดร. สุมิตรา ภู่วโรดม

ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
SB
327
.N843
1538

กันยายน 2538

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 26599
วัน, เดือน, ปี 6 S.A. 2539

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียม ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสำหรับถั่วเซน-โตรซีมา แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งเป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน โดยวิธี plant infection test ซึ่งปลูกใหลอดทดลอง 2 ชนิด ได้แก่ 1) Gibson tube ซึ่งเป็นอาหารวุ้นและใช้กันแพร่หลายมานาน 2) Niftal tube เป็นการปลูกพืชในอาหารเหลว มีกระดาษฟางเป็นตัวยึดราก โดยใช้ถั่วเซนโตรซีมา ซึ่งเป็นถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็กเป็นพืชทดสอบ ผลการทดลองโดยใช้เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ (TAL 652, TAL 655 และ TAL 688) และดินตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง ปรากฏว่า ถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในNiftal tube สามารถเกิดปมได้ดีกว่าและเร็วกว่าเมื่อปลูกใน Gibson tube กล่าวคือ เมื่อ inoculate ถั่วเซนโตรซีมาด้วยเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์จะเกิดปมในเวลา 14 วัน ใน Niftal tube ในขณะที่ถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกใน Gibson tube ใช้เวลาประมาณ 23 วัน ในการเกิดปม เมื่อ inoculate ด้วยดินที่มีเชื้อไรโซเบียมปรากฏว่าดินที่มีปริมาณไรโซเบียมต่ำ (ค่า MPN ประมาณ 10^2 เซล/กรัมดินแห้ง) การปลูกใน Gibson tube จะไม่เกิดปม ในขณะที่การปลูกใน Niftal tube เกิดปมได้ การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า Niftal tube สามารถใช้นับเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี plant infection test ได้ดี สามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้ เนื่องจากไม่ต้องใช้ agar ในส่วนผสมของอาหาร

ส่วนที่สองเป็นการสำรวจเพื่อประเมินปริมาณเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาในดิน โดยปลูกถั่วใน Niftal tube และทำการเก็บดินตัวอย่างจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศจำนวน 34 ตัวอย่าง นำดินมาทำ serial dilution แล้ว inoculate ให้กับถั่ว หลังจากนั้น ทำนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี MPN ผลการทดลองปรากฏว่า มีดิน 23 ตัวอย่างที่มีเชื้อไรโซเบียมในดินสำหรับถั่วเซนโตรซีมา แต่จำนวนเชื้อที่พบส่วนใหญ่มีปริมาณต่ำมากคือ มีจำนวนเชื้อต่ำกว่า 10^2 เซล/กรัมดินแห้ง จำนวน 6 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^3 เซล/กรัมดินแห้ง จำนวน 6 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^4 เซล/กรัมดินแห้ง จำนวน 4 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^5 เซล/กรัมดินแห้ง จำนวน 5 ตัวอย่าง และ ต่ำกว่า 10^6 เซล/กรัมดินแห้ง จำนวน 2 ตัวอย่าง ค่าสูงสุดของไรโซเบียมที่ได้จากการสำรวจครั้งนี้คือ 7.34 x 10^5 เซล/กรัมดินแห้ง จากผลการทดลองยังพบว่า ดินที่มีเชื้อไรโซเบียมตั้งแต่ 10^3 เซล/กรัมดินแห้งขึ้นไป เป็นดินที่เก็บจากบริเวณที่มีการปลูกถั่วเซนโตรซีมาอยู่ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างดิน ส่วนดินที่ปลูกพืชอื่นอยู่ ถึงแม้จะอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการปลูกถั่วเซนโตรซีมาก็ตาม จะมีเชื้อไรโซเบียมในปริมาณที่ต่ำหรือไม่มีเชื้อไรโซเบียมอยู่ สำหรับแปลงปลูกพืชทั่วไปไม่พบเชื้อไรโซเบียมในดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนที่สามเป็นการทดสอบเชื้อไรโซเบียมในดิน 8 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ และไม่ใส่เชื้อ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตซีมาที่ปลูกใน Leonard-jar โดยทำการ inoculate ถั่วเซนโตรซีมาด้วยสารละลายดินที่ dilution 10^{-1} และ 10^{-3} หลังจาก 5 สัปดาห์ ทำการชั่งน้ำหนักแห้งต้น และนับจำนวนปมราก ผลการทดลองปรากฏว่า การเจริญเติบโตของถั่วเมื่อ inoculate ด้วยสารละลายที่ 10^{-1} โดยทั่วไปจะดีกว่าที่ 10^{-3} และดินที่มีจำนวนเชื้อไรโซเบียมสูงคือในระดับ 10^{5} เซล/กรัมดินแห้ง มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของต้น ราก และจำนวนปมถั่ว มากกว่าดินที่มีจำนวนเชื้อไรโซเบียมในดินน้อย นอกจากนั้นเชื้อที่มีอยู่ในดินเหล่านี้ยังให้ผลดีกว่าเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ TAL 655 แต่ด้อยกว่า TAL 652 ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนเซลที่ inoculate ของ TAL 652 ในตอนต้นมีปริมาณสูงกว่าเชื้อที่มีอยู่ในดิน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Selection of Effective Cowpea Rhizobial Strains for Centrosema pubescens

ABSTRACT

Selection of effective nitrogen fixation rhizobial strains for Centrosema pubescens was carried out in three separate experiments. The first experiment was conducted to compare the two growth system for counting populations of soils by whole soil technique, i.e. 1) Gibson tube with N free agar slant 2) Niftal tube with N free solution using towel paper as supporter. Centrosema pubescens a small seed legume was used as a test plant for 10 soil samples and 3 rhizobial strains (TAL 652, TAL 655, TAL 688). The result indicated that Centrosema grown in Niftal tube results in faster nodule formation (14 days) than Gibson tube which required 23 days for nodule formation. When soil rhizobial number was lower than 10^2 cells/ g of soil, plant grown in Gibson tube failed to nodulate whereas in Niftal tube the nodule was found. This experiment indicated that Niftal tube can be used for counting rhizobium in soil by plant infection test.

Enumeration of indigenous soil rhizobial population for Centrosema was conducted in 34 soil samples collected from different parts of the country using Niftal tube as the growth system. Nodules were found in 23 soil samples but the number of rhizobia (by MPN) were relatively low. Number of soil sample with MPN < 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 and 10^6 cells/g soil were 6, 6, 4, 5 and 2 samples, respectively. The highest rhizobia estimate was 7.34×10^5 cells/g soil. It was also found that soil with rhizobia number higher than 10^3 cells/g soil were collected from the area where Centrosema were grown at the time of sampling. Soil samples collected from plots growing other crops even it was closed to where Centrosema was grown, the population of rhizobia was low or not found.

The third experiment was conducted in Leonard jar using 8 soil samples containing high number of rhizobial population from the second experiment. Suspensions (10 fold dilution) of the 10^{-1} and 10^{-3} were used as whole soil inocula. After 5 weeks, plants were harvested, dry matter weight of shoot and root together with nodule number were determined. The result indicated that plant inoculated with 10^{-1} dilution grown better than 10^{-3} dilution. Soils with rhizobia number more than 10^5 cells/g soil resulted in higher shoot and root dry matter weight and nodule number compared to soil with lower rhizobia number. The rhizobium in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

these soils were found to be more effective than Rhizobium strain TAL 655 but not as effective as strain TAL652.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	iii
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
สารบัญตารางภาคผนวก	viii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่า Most Probable Number (MPN) ของปริมาณเชื้อไรโซเบียม สำหรับถั่วเซนโตรซีมา ในดินตัวอย่าง	16
ตารางที่ 2 จำนวนปม น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของรากที่ได้จากการทดลองใน Leonard jar เมื่อ inoculate ด้วย whole soil solution ความเข้มข้น 10^{-1}	18
ตารางที่ 3 จำนวนปม น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของรากที่ได้จากการทดลองใน Leonard jar เมื่อ inoculate ด้วย whole soil solution ความเข้มข้น 10^{-3}	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไป และการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมา ในหลอดทดลองแบบ Gibson และ Niftal tubes 23

รูปที่ 2 การเกิดปมของรากถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Gibson และ Niftal tubes 24

รูปที่ 3 การเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Gibson tube 25

รูปที่ 4 การเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Niftal tube 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1	การจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามระบบ Cross-inoculation group	27
ตารางภาคผนวกที่ 2	การจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามระบบใหม่	28
ตารางภาคผนวกที่ 3	สารละลาย N free nutrient solution ที่ใช้ในการทดลอง	29
ตารางภาคผนวกที่ 4	ตารางสำหรับคำนวณหาค่า Most Probable Number ของเชื้อไรโซเบียม	30
ตารางภาคผนวกที่ 5	วิธีคำนวณหาค่า Most Probable Number ของเชื้อไรโซเบียมในดิน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ถั่วเซนโตรซีมา เป็นถั่วอาหารสัตว์ที่มีศักยภาพสูงของไทย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายชนิด ตั้งแต่ดินทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ จนถึงดินเปรี้ยวจัด (Tin, 1991) การตรึงไนโตรเจนในถั่วเซนโตรซีมา เกิดจากเชื้อไรโซเบียมซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Cowpea type สำหรับเชื้อไรโซเบียมในกลุ่มนี้ เชื่อกันว่า สามารถสร้างปมที่มีประสิทธิภาพจากเชื้อไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ (strain) จึงไม่จำเป็นต้องคลุกเชื้อก่อนปลูก อย่างไรก็ตาม Norris (1965), Date (1983) และ People et al. (1989) รายงานว่าความเชื่อดังกล่าวข้างต้นไม่เป็นจริงเสมอไป เพราะถั่วในสกุลเซนโตรซีมา (Centrosema) ถึงแม้จะสร้างปมได้กับเชื้อหลายสายพันธุ์ก็ตาม ปมส่วนใหญ่จะไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคลุกเชื้อไรโซเบียมให้กับถั่วเซนโตรซีมาก่อนปลูก สำหรับประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร โดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน ได้ผลิตเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมา โดยใช้สายพันธุ์ไรโซเบียมจากศูนย์ NifTAL ที่มลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่คัดเลือกโดย University of Malaysia ประเทศมาเลเซีย (Halliday and Somasegaran, 1984 และ วิทยา ธนานุสนธ์ ติดต่อเป็นการส่วนตัว) อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติ กรมปศุสัตว์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกถั่วเซนโตรซีมา เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์หรือเป็นพืชคลุมดิน ไม่ได้แนะนำให้เกษตรกรคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูก เนื่องจากเชื่อว่ามีเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาอยู่แล้วในดิน แต่จากการสังเกตและขุดดูปมถั่วในแปลงที่ไม่เคยมีการปลูกถั่วเซนโตรซีมาก่อน พบว่าถ้าไม่มีการคลุกเชื้อไรโซเบียม ถั่วส่วนมากจะไม่มีปมหรือมีปมค่อนข้างน้อย (สุมิตรา 2532) แต่ในแปลงที่มีการปลูกถั่วเซนโตรซีมามานาน ส่วนใหญ่จะพบว่ามีปมที่ราก และจากการทดลองในกระถางเพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน สุมิตรา (2535) พบว่า เชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมถั่วที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อไรโซเบียมที่นำมาจาก NifTAL

โดยทั่วไปแล้ว การปลูกพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วอาหารสัตว์ให้สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยเฉพาะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำนั้น จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้างปมของพืชตระกูลถั่วอย่างมาก การที่ถั่วจะสามารถสร้างปมได้ดีหรือไม่นั้น ปัจจัยสำคัญที่สุดอย่างหนึ่งคือจำนวนเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่เดิมในดิน ถ้าดินมีเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วชนิดนั้นอยู่แล้ว การคลุกเชื้อไรโซเบียมอาจไม่จำเป็น วิธีการทดสอบที่จะใช้เป็นเครื่อง ชี้บ่งถึงจำนวนเชื้อไรโซเบียมในดินสามารถทำได้ทั้งในภาคสนาม ซึ่งจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน ส่วนการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแต่เดิมนั้น นิยม isolate ให้ได้เชื้อไรโซเบียมที่บริสุทธิ์ หลังจากนั้น นำไปทดสอบในพืช แล้วจึงประเมินปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในดิน ซึ่งจะต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่อนข้างมากเช่นกัน ต่อมา Brockwell et al. (1988) ได้ดัดแปลง วิธีนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่เดิมในดิน (indigenous rhizobium) ของ Bonish (1979) และเรียกวิธีนี้ว่า whole-soil inoculation technique วิธีนี้ใช้การปลูกถั่วในหลอดทดลอง โดยมี vermiculite เป็นตัวยึดราก และ inoculate ถั่วที่ปลูกด้วยสารละลายดิน (soil suspension) ที่ได้จากการทำ serial dilution และประเมินปริมาณเชื้อในดินโดยวิธี Most Probable Number (MPN) ภายหลังการปลูกถั่วเป็นเวลา 28 วัน จากการทดลอง Brockwell et al. (1988) รายงานว่าวิธีนี้สามารถใช้เป็นเครื่องชี้บ่งว่าดินนั้นควรได้รับการ inoculate ด้วยเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูกหรือไม่ นอกจากนั้น เขายังพบว่า ควรจะมีเชื้อไรโซเบียมจำนวน 30 เซล และถ้าจะให้ได้ผลดีควรมีเชื้อไรโซเบียมจำนวน 100 เซลต่อเมล็ดถั่ว เพื่อให้การสร้างปมเกิดได้รวดเร็ว สำหรับการทดลองครั้งนี้จะใช้วิธี whole-soil technique เป็นวิธี inoculate เชื้อไรโซเบียมให้กับถั่วเซนโตซีมา

จากรายงานข้างต้น จะเห็นว่า ยังมีความไม่แน่นอนในแนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับการคลุกเชื้อให้กับถั่วเซนโตรซีมา ทั้งนี้เพราะแปลงถั่วที่ปลูกมาเป็นเวลานาน ส่วนใหญ่สามารถเกิดปมได้ดี และมีประสิทธิภาพ (สุมิตรา 2535) แต่ถ้าหากในดินไม่มีเชื้อไรเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาอยู่ หรือมีอยู่ในปริมาณน้อยเกินไป อาจทำให้การปลูกถั่วเซนโตรซีมาในระยะแรกไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ทั้งนี้เพราะ ดินที่ใช้ปลูกถั่วอาหารสัตว์ โดยทั่วไปแล้ว มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการที่จะสำรวจปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดิน เพื่อให้ได้แนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับการคลุกเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม และการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Gibson tube และ Niftal tube
2. สำรวจปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดิน (indigenous to soil) จากดินที่ปลูกพืชชนิดต่าง ๆ จากหลายแหล่ง
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินจากข้อ 2 โดยการทดสอบใน Leonard jar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. ถั่วเซนโตรซีมา หรือถั่วลาย (Centrosema or butterfly pea)

เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้ แถบร้อนของอเมริกากลาง และหมู่เกาะคาริบเบียน พบขึ้นทั่วไปตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ ตลอดจนริมแม่น้ำรวมทั้งข้างถนน แล้วจึงถูกนำเข้ามาในเอเชียตอนใต้เพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดิน และเป็นปุ๋ยพืชสด ต่อมาก็แพร่กระจายไปทั่วและใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ และกลายเป็นพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันถั่วเซนโตรซีมามีอยู่ 2 พันธุ์ ที่ใช้ในการทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ คือ พันธุ์ดั้งเดิม (common centro) และพันธุ์เบลแลลโต (belalto) (Grof and Harding. 1970)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถั่วเซนโตรซีมาจัดอยู่ใน genus *Centrosema* มีอยู่หลาย species แต่ที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ species *pubescens* ถั่วเซนโตรซีมาเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นเถาเลื้อย ลำต้นมีขน ใบมี 3 ใบย่อย เป็นแบบ pinnately trifolilate leaf แต่ละใบคล้ายรูปไข่ปลายแหลม ยาวถึง 7 เซนติเมตร กว้าง 4.5 เซนติเมตร ใต้ใบมีขนละเอียดอ่อน ดอกเป็นแบบ raceme เกิดในระหว่างมุมใบโดยมีก้านของช่อดอกชูขึ้นมา ดอกมีขนาดใหญ่ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกย่อย ประมาณ 3-5 ดอก กลีบดอกอันใหญ่ (standard) สีขาวและมีสีม่วงบริเวณโคนกลีบ ดอกยาว 1-3.5 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ฝักจะแบนและหนายาวประมาณ 4-7 เซนติเมตร ขอบฝักมีสันนูนมีลายสีดำ (Grof and Harding, 1970)

1.2 ลักษณะทั่วไป

ถั่วเซนโตรซีมาเจริญเติบโตได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นพืชวันสั้น เพราะมีการตอบสนองต่อช่วงกลางวันสั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือช่วง 12.8-25.6 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการทนแล้งได้ดี ขึ้นได้ดีในดินกรด และดินที่มีการระบายน้ำดี แต่ไม่ทนทานต่อสภาพน้ำขังต่อเนื่อง (ชาญชัย, 2518)

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเซนโตรซีมาก็เหมือนกับถั่วเขตร้อนชนิดอื่น โดยถั่วเซนโตรซีมาจะเริ่มมีปมภายหลังจากการงอกแล้ว ประมาณ 2-3 สัปดาห์ Moore (1962) รายงานว่า ถั่วเซนโตรซีมาสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 235 กก./เฮกตาร์/ปี เมื่อถั่วเซนโตรซีมาอายุได้ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนขึ้นไป ส่วน Whitney et al. (1967) พบว่า ถั่วเซนโตรซีมาในระยะออกดอกตรึงไนโตรเจนได้สูงถึง 204 กก./เฮกตาร์/ปี

2. ไรโซเบียม (Rhizobium spp.)

2.1 การจำแนกเชื้อไรโซเบียม

การจำแนกเชื้อไรโซเบียมสามารถทำได้หลายวิธี แต่เดิมนิยมใช้วิธี Cross-inoculation group หรือ Plant-inoculation group ซึ่งเป็นการ จำแนกตามความสามารถของเชื้อไรโซเบียมในการทำให้เกิดปมที่รากถั่ว ทั้งนี้เนื่องจากเชื่อกันว่า ไรโซเบียมแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจง (specific) ต่อชนิดหรือกลุ่มของถั่วต่างกันไป (Buchanan et al. 1974) แต่ในบางกรณีไรโซเบียมในกลุ่มจำแนกหนึ่ง ก็สามารถเกิดปมกับพืชตระกูลถั่วต่างกลุ่มกันได้ เรียกการเกิดในลักษณะนี้ว่า symbiotic promiscuity แต่ปมที่เกิดขึ้นจะเป็นชนิดที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหรือไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของไรโซเบียมและชนิดของถั่ว (Elmes, 1976; Johnson and Berringer, 1976)

การจำแนกเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี Cross-inoculation group เป็นวิธีที่ง่าย ใช้กันแพร่หลายมานาน แต่มีปัญหาที่กล่าวมาแล้ว ในปัจจุบัน จึงได้มีการจำแนกไรโซเบียมออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ พวกที่มีการเจริญเติบโตเร็ว (fast-growers) จัดอยู่ใน Genus Rhizobium และพวกที่มีการเจริญเติบโตช้า (slow-growers) จัดอยู่ใน Genus Bradyrhizobium และภายใน 2 กลุ่มนี้ก็แบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ดังตารางผนวกที่ 2 สำหรับเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาจัดอยู่ใน Genus Bradyrhizobium

2.2 การประเมินปริมาณไรโซเบียมในดิน

การประเมินหาปริมาณหรือจำนวนไรโซเบียมในดิน สามารถกระทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน เนื่องจากในดินมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกนอกเหนือจากไรโซเบียมอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะพวกที่มีลักษณะทางสรีระคล้ายคลึงกับของไรโซเบียม จึง ทำให้การประเมินหาปริมาณของไรโซเบียมเป็นไปได้ค่อนข้างยุ่งยากเมื่อเทียบกับการประเมินหาปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในปัจจุบันยังไม่สามารถค้นหาอาหารเฉพาะสำหรับไรโซเบียมได้ ดังนั้นการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมทั้งหมด (total population) โดยวิธี "Plate-count' จึงกระทำได้ยากและได้ผลไม่แน่นอน เนื่องจากการแยกนับโคโลนีของไรโซเบียมในขณะที่มีโคโลนี ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นขึ้นปะปะอยู่ด้วยนั้นกระทำได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน และการทดสอบว่าเชื้อที่มีอยู่นั้นเป็นเชื้อไรโซเบียมหรือไม่ วิธีที่ดีที่สุดคือ การทดสอบการเกิดปมในพืช เรียกวิธีนี้โดยรวมว่าวิธี plant infection test หรือ วิธี Most Probable Number (MPN) ซึ่งอาศัยหลักการว่า **"ปมหนึ่งปมที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากการเข้าสู่รากและการทำให้เกิดปมของเซลล์ไรโซเบียมหนึ่งเซลล์"** วิธีนี้สามารถนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่ขึ้นปะปนอยู่กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่นในดิน นอกจากนั้น วิธี Plant infection test นี้ยังสามารถใช้นับปริมาณเชื้อที่ผลิตเพื่อจำหน่ายด้วย

วิธี Plant infection test นี้ สามารถใช้ได้ดีทั้งในถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็ก และเมล็ดขนาดใหญ่ ทำได้ทั้งในห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลอง สำหรับในห้องปฏิบัติการ และถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็ก เช่น ถั่วเซนโตรซีมานั้น นิยมใช้วิธีของ Gibson (1963) ซึ่งเป็นการปลูกพืชในหลอดทดลองและใช้ N free nutrient agar เป็นวัสดุปลูก ต่อมาศูนย์ NIfTAL ที่มลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาวิธีการปลูกถั่วในหลอดทดลองขึ้นมาใหม่ และให้ชื่อว่า Niftal tube วิธีการของ Niftal tube นี้จะใช้กระดาษเช็ดมืออย่างหนาที่ไม่ฟอกสี (towel paper) หรือ กระดาษฟางเป็นตัวยึดเหนี่ยวของราก และใช้ N free nutrient solution เป็นแหล่งของอาหาร นอกจากนั้นยังใช้จุกพลาสติกที่มีฟันด้านใน ซึ่งอาจจะเจาะรูด้านข้างหรือไม่เจาะรูก็ได้เป็นจุกปิด ทำให้การหมุนเวียนของอากาศดีขึ้น ยังผลให้การเจริญเติบโตและการเกิดปมของถั่วดีขึ้นด้วย (Somasegaran ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

การใช้วิธี plant infection test เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน ทำได้โดยนำตัวอย่างดินมาทำ serial dilution แล้ว inoculate ให้กับต้นถั่วซึ่งปลูกไว้ในหลอดทดลอง วิธีนี้ Brockwell et al. (1988) ได้ดัดแปลงมาจาก วิธีนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่เดิมในดิน (indigenous rhizobium) ของ Bonish (1979) และเรียกวิธีนี้ว่า whole-soil inoculation technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียม ที่มีประสิทธิภาพสำหรับถั่วเซนโตรซีมาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1: เป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเกิดปมของถั่วในหลอดทดลอง 2 ชนิด

ส่วนที่ 2: เป็นการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ

ส่วนที่ 3: เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินใน Leonard jar

รายละเอียดของการทดลองทั้ง 3 ส่วนจะกล่าวในตอนต่อไป

การทดลองส่วนที่ 1: เป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี plant infection test ซึ่งปลูกในอาหาร 2 ชนิดคือ

ก) Gibson tube ซึ่งเป็นอาหาร N free nutrient agar ตามวิธีของ Gibson วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมแพร่หลายสำหรับการทดสอบในถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็ก

ข) Niftal tube เป็นการปลูกพืช ใน N free nutrient solution โดยใช้กระดาษเช็ดมืออย่างหนา (ชนิดไม่ฟอกสี) หรือกระดาษฟางเป็นตัวยึดราก ปิดด้วยจุกพลาสติก (ชื่อการค้า KIMCAP) ซึ่งมีฟันด้านใน (เพื่อไม่ให้จุกแนบกับหลอดทดลอง) ที่ KIMCAP นี้อาจเจาะรูไว้เพื่อให้การระบายอากาศดีขึ้น แต่ในการทดลองนี้ เนื่องจากในห้องที่ incubate มีแมลงมาก จึงไม่ได้เจาะรูเอาไว้

1. การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดินเพื่อนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม ทำโดยเลือกพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกพืชต่างชนิดกัน การเก็บตัวอย่างใช้ soil tube ก่อนเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ล้าง soil tube ให้สะอาด แล้วฉีดพ่นด้วย แอลกอฮอล์ 95% หลังจากนั้น จุดไฟเผา เพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้สักครู่ให้เย็น ทำการขุดเจาะถึงระดับความลึก 15 ซม. แต่ละพื้นที่ ทำการสุ่มเก็บ ประมาณ 15 จุด เก็บใส่ในถุงพลาสติกและแช่เย็นเพื่อนำกลับห้องปฏิบัติการ เมื่อกลับถึงห้องปฏิบัติการ ทำการร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2.00 มม. เก็บดินตัวอย่างที่ได้ไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน สำหรับการทดลองนี้ใช้ดินทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง และเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์คือ TAL 652, TAL 655 และ TAL 658 รายละเอียดของบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินเป็นดังนี้

- ตัวอย่างที่ 1 พื้นที่ปลูกอ้อย ต. ทุ่งเศรษฐี อ. เมือง จ. กำแพงเพชร
- ตัวอย่างที่ 2 พื้นที่ปลูกข้าว ต. พรานกระต่าย อ. ถ้ำกระต่ายทอง จ. กำแพงเพชร
- ตัวอย่างที่ 3 พื้นที่ปลูกถั่วและหญ้า ต. หนองกรด อ. เมือง จ. นครสวรรค์
- ตัวอย่างที่ 4 พื้นที่ปลูกข้าวโพด ต. เนินปอ อ. สามง่าม จ. พิจิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวอย่างที่ 5 พื้นที่ปลูกข้าว ต. เมืองเก่า อ. เมือง จ. สุโขทัย
- ตัวอย่างที่ 6 พื้นที่ปลูกหญ้า ต. เมืองเก่า อ. เมือง จ. สุโขทัย
- ตัวอย่างที่ 7 พื้นที่ปลูกยาง อ. ประทิว จ. ชุมพร
- ตัวอย่างที่ 8 พื้นที่ปลูกปาล์ม อ. ประทิว จ. ชุมพร
- ตัวอย่างที่ 9 พื้นที่แปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมา ศูนย์ศึกษาพัฒนตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน 2536
- ตัวอย่างที่ 10 พื้นที่แปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมา ศูนย์ศึกษาพัฒนตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่างในเดือนกุมภาพันธ์ 2537

2. การเตรียม Niftal และ Gibson tubes

2.1 การเตรียม Gibson tubes

- ละลาย Agar จำนวน 15 กรัม ต่อสารละลาย N free nutrient 1,000 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 6.6-6.8 โดยใช้ 1 N NaOH หรือ HCl
- ดูดสารละลายปริมาตร 27 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด
- ปิดจุกสำลีแล้วหุ้มฟรอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- วางหลอดในแนวราบให้ได้ slope พอเหมาะ

2.2 การเตรียม Niftal tubes

- แช่กระดาษฟางด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลองสำหรับปลูก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- รินน้ำกลั่นที่แช่กระดาษฟางทิ้ง (พยายามรินออกให้มากที่สุด)
- ใส่สารละลาย N free nutrient ลงไปในหลอดทดลองหลอดละ 22-25 มิลลิลิตร
- ปิดฝาหลอดด้วย KIMKAP แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเพาะต้นถั่วสำหรับใช้ทดสอบการเกิดปม (Infection test)

คัดเลือกเมล็ดถั่วเซนโตรซีมาที่สมบูรณ์ สะอาด และมีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณ 10 กรัม แช่ในกรดซัลฟูรกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ให้ท่วมเมล็ด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที รินเอากรดออกให้มากที่สุด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลายๆ ครั้ง (ควรทำอย่างรวดเร็ว ไม่เช่นนั้น เมล็ดอาจได้รับความร้อนที่เกิดจากการรวมตัวของกรดกับน้ำมากเกินไป) จากนั้น นำเมล็ดไปเพาะในอาหารวุ้น 15% ที่บรรจุใน petri dish เกลี่ยให้มีระยะห่างระหว่างเมล็ดเท่า ๆ กัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน โดยวางให้กลับด้านที่วุ้นขึ้นข้างบนเพื่อที่จะให้รากที่งอกออกมาเป็นเส้นตรงไม่คดงอ

เมื่อรากงอกยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำกล้าลงปลูกในหลอด Niftal และ Gibson tubes ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ต้นต่อ 1 หลอด การปลูกกระทำโดยใช้คีมปลายงอ (forcep) ที่มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวพอสมควร คีบต้นถั่วเบาๆ ใส่เข้าไปในหลอดตรงบริเวณที่ต้องการหุ้มหลอดด้วย aluminum foil นำหลอดที่ปลูกเรียบร้อยแล้วไปไว้ในที่พืชสามารถได้รับแสงเพียงพอ

4. การ inoculate ดินโดยวิธี whole-soil technique

4.1 การเตรียมสารละลายแบบ tenfold dilution series

นำดิน 10 กรัม ใส่ลงไปในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน Erlenmyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลาประมาณ 5 นาที จะได้สารละลายดินที่มีความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นใช้ไปเปต (pipet) ดูดสารละลายดินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดฝาเกลียว (screw cap) ดูดขึ้นลงอย่างน้อย 5-6 ครั้ง เพื่อล้างดินและแบคทีเรียออกจากไปเปต เขย่านาน 2-3 นาทีจะได้สารละลายดินความเข้มข้น 10^{-2} แล้วใช้ไปเปตดูดสารละลายดินจากหลอดนี้มา 1 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้สารละลายที่มีระดับความเข้มข้นตามต้องการ ดังนี้

ดินตัวอย่างที่ 1-8 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4}

ดินตัวอย่างที่ 9-10 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652, 655, 688

เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

4.2 ขั้นตอนการทำ inoculate

ใช้ไปเปตดูดสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ inoculate ลงไปในหลอดปลูก Gibson และ Nittal tubes 1 มิลลิลิตรต่อหลอด แต่ละระดับความเข้มข้นทำการ inoculate 3 ซ้ำ แล้วนำกลับไปวางไว้ในที่ที่ได้รับแสงเช่นเดิม สังเกตการเจริญเติบโตของถั่ว การเกิดปมที่ราก บันทึกผลวันที่สามารถเห็นปมที่รากวันแรก หลังจากปลูก 21 วัน บันทึกการเกิดปม ถ้ามีการเกิดปม บันทึกเป็นบวก และไม่เกิดปม บันทึกเป็นลบ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณเชื้อไรโซ เบียม โดยตาราง MPN การคำนวณหาค่า MPN ได้แสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 4

การทดลองส่วนที่ 2: เมื่อได้ผลจากการทดลองส่วนที่ 1 ว่าหลอดทดลองแบบ Gibson หรือ Niftal tubes เป็นอุปกรณ์ปลูกที่ดีสำหรับนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน ใช้วัสดุปลูกนั้นเพื่อนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมสำหรับตัวอย่างดินอีก 24 ตัวอย่างข้างล่าง สำหรับวิธีการทดลองต่าง ๆใช้รายละเอียดเช่นเดียวกับการทดลองส่วนที่ 1 และบันทึกผลการเกิดปม ภายหลังปลูก 21 วัน

- ตัวอย่างที่ 11 ดินจากแปลงปลูกหญ้าเก่า แต่ปัจจุบันไม่มีพืชขึ้นปกคลุม สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี
- ตัวอย่างที่ 12 ดินจากแปลงปลูกถั่วฮามาต้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวอย่างที่ 13 ดินจากแปลงปลูกหญ้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี
- ตัวอย่างที่ 14 ดินจากแปลงปลูกหญ้าผสมถั่วฮามาต้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี
- ตัวอย่างที่ 15 ดินจากแปลงปลูกฮามาต้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี
- ตัวอย่างที่ 16 ดินจากแปลงปลูกฮามาต้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี
- ตัวอย่างที่ 17 ดินจากแปลงปลูกถั่วพร้า สถานีพัฒนาที่ดินบางปะกง จ. ชลบุรี
- ตัวอย่างที่ 18 ดินจากแปลงปลูกมะพร้าว สถานีพัฒนาที่ดินบางปะกง จ. ชลบุรี
- ตัวอย่างที่ 19 ดินจากแปลงปลูกหญ้าแฝก ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
- ตัวอย่างที่ 20 ดินจากแปลงปลูกหญ้า ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
- ตัวอย่างที่ 21 ดินจากแปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมาและถั่วอื่น ๆ ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
- ตัวอย่างที่ 22 ดินจากแปลงปลูกข้าวโพด ใกล้ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา
- ตัวอย่างที่ 23 ดินจากแปลงปลูกถั่วฮามาต้า ถั่ว Sirato ผสมกับหญ้า สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. บุรีรัมย์
- ตัวอย่างที่ 24 ดินจากแปลงปลูกถั่ว Ali-cover ผสมกับหญ้า สถานีบำรุงพันธุสัตว์ จ. บุรีรัมย์
- ตัวอย่างที่ 25 ดินจากแปลงไม้ดอกไม้ประดับและหญ้าธรรมชาติ สถานีบำรุงพันธุสัตว์ จ. บุรีรัมย์
- ตัวอย่างที่ 26 ดินจากแปลงปลูกหญ้ารูซี่ สถานีบำรุงพันธุสั ตว์ จ. บุรีรัมย์
- ตัวอย่างที่ 27 ดินจากแปลงปลูกหญ้าบาเฮียและมะขาม สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. สุรินทร์
- ตัวอย่างที่ 28 ดินจากแปลงปลูกกระถิน ถั่ว Sirato ถั่วเซนโตรซีมา ผสมกับหญ้าบาเฮีย สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จ. สุรินทร์
- ตัวอย่างที่ 29 ดินจากแปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมา ถั่วฮามาต้า ผสมกับหญ้ารูซี่ ศูนย์อาหารสัตว์ทับกวาง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
- ตัวอย่างที่ 30 ดินจากแปลงปลูกหญ้าพื้นเมือง มะพร้าว มะขาม ศูนย์อาหารสัตว์ทับกวาง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวอย่างที่ 31 ดินจากแปลงปลูกหญ้าสตาร์และหญ้าพื้นเมือง ศูนย์อาหารสัตว์ทับกวาง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
- ตัวอย่างที่ 32 ดินจากแปลงปลูกหญ้าสตาร์และหญ้าพื้นเมือง ศูนย์อาหารสัตว์ทับกวาง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
- ตัวอย่างที่ 33 ดินจากแปลงปลูกถั่วเหลือง อ. เมือง จ. นครสวรรค์
- ตัวอย่างที่ 34 ดินจากแปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมา AIT จ. ปทุมธานี

การทดลองส่วนที่ 3: การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมใน Leonard jar

การทดลองในส่วนนี้เป็นการคัดเลือกตัวอย่างดินที่มีเชื้อไรโซเบียมในปริมาณมากมาทดสอบกับถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในชุดทดสอบแบบ Leonard jar

ชุด Leonard jar ที่ใช้ทดสอบเป็นชนิดที่ดัดแปลงมาจากอุปกรณ์ดั่งเดิม เพื่อใช้วัสดุที่หาง่าย และราคาถูก ชุด Leonard jar นี้ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนบนเป็นถ้วยพลาสติก ด้านล่างเจาะรูและมีไส้ตะเกียงเพื่อจุ่มลงไปในขวดบรรจุสารละลายด้านล่าง ในถ้วยพลาสติกบรรจุทราย หรือ vermiculite เพื่อใช้เป็นวัสดุปลูก ส่วนล่างเป็นขวดแก้วบรรจุสารละลาย N free nutrient soltuion สำหรับเป็นแหล่งของอาหาร

3.1 การเตรียมขวด Leonard jar

ล้างทรายแม่น้ำให้สะอาด แล้วใส่ในถ้วยพลาสติก ปิดถ้วยด้วย Aluminum foil ป้องกันการติดเชื้อแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 126 องศาเซเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นึ่งฆ่าเชื้อขวดแก้วสำหรับใส่สารละลาย ที่อุณหภูมิ 126 องศาเซเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลาย N free (ที่เตรียมโดยการต้มน้ำกลั่นเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น) จำนวน 800 มล. ใส่ลงในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำถ้วยพลาสติกมาวางบนขวดสารละลาย

3.2 การปลูกและการ inoculate ด้วยเชื้อ

ทำเช่นเดียวกับการปลูกในหลอดทดลอง แต่รอให้รากมีความยาวประมาณ 0.5 ซม. จึงนำไปปลูกในทรายที่เตรียมไว้ โดยใช้ forcep (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) เจาะรูที่ทรายลึกประมาณ 1 ซม. ขวดละ 4 รู จากนั้นใช้ forcep คีบต้นถั่วมาปลูกในรูที่เจาะไว้ inoculate ด้วยเชื้อไรโซเบียมตามความเข้มข้นที่ต้องการ กลบเมล็ดถั่วด้วยทราย หลังจากนั้น ปิดทับด้านบนของทรายด้วยกรวดเม็ดเล็ก ๆ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อน สำหรับขวดแก้วที่ใส่สารละลายใช้กระดาษพันรอบ ๆขวดเพื่อป้องกันแสงกระทบราก นำขวดที่ได้ไปวางในเรือนปลูกพืชและให้ได้รับแสงอย่างเพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ตำรับการทดลอง

การทดสอบใน Leonard jar ประกอบด้วยเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากการทดลองที่ 2 โดยคัดเลือกดินที่มีเชื้อไรโซเบียม จำนวนมากมา 8 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไรโซเบียมที่ได้จากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 2 ตัวอย่าง และไม่ใส่เชื้อ (control) รวมทั้งสิ้นเป็น 11 ตัวอย่างดังนี้

1) ไม่ใส่เชื้อ
2) ดินตัวอย่างที่ 12
3) ดินตัวอย่างที่ 20
4) ดินตัวอย่างที่ 23
5) ดินตัวอย่างที่ 28
6) ดินตัวอย่างที่ 29
7) ดินตัวอย่างที่ 31
8) ดินตัวอย่างที่ 32
9) ดินตัวอย่างที่ 34
10) เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652
11) เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 655

นำดินแต่ละตัวอย่างมาทำ serial dilution แบบ ten fold แล้วใช้สารละลายที่ได้เป็น whole-soil inocula (Bonish, 1979; Brockwell et al., 1988) การทำ whole-soil inocula ทำดังนี้ ชั่งดิน 10 กรัมใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มล. เขย่าให้เนื้อดินแยกออกจากกันอย่างดี สารละลายนี้มีความเข้มข้น 10^{-1} ดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-1} นี้มาจำนวน 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 9 มล. เขย่าให้เข้ากันดี สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 10^{-2} ทำต่อไปในลักษณะเดียวกัน whole-soil inocula ที่ใช้ในสำหรับการทดลองครั้งนี้คือ 10^{-1} และ 10^{-3} การที่เลือกใช้ความเข้มข้นในระดับนี้เนื่องจาก คาดว่า ความเข้มข้นของ whole-soil inocula ทั้ง 2 ระดับนี้ จะทำให้เห็นความแตกต่างของประสิทธิภาพในการเกิดปม และการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม (Kang et al., 1991) สำหรับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652 และ TAL 655 นั้นเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ จึงใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-6} นอกจากนั้นในการทดลองนี้ยังประกอบด้วยตำหรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) การ inoculate เชื้อให้กับต้นถั่วใช้สารละลาย soil suspension ที่เตรียมไว้ 1 มล. ต่อเมล็ดถั่ว 1 เมล็ด เมื่อปลูกถั่วได้ 5 สัปดาห์ ทำการเก็บถั่วมานับจำนวนปม และหาน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

ส่วนที่ 1:

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเกิดปมของถั่วในหลอดทดลอง 2 ชนิดคือ Gibson และ Niftal tubes โดยมีการทดสอบทั้งในเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ และดิน 10 ตัวอย่าง ผลการทดลองเป็นดังนี้

1.1 เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์

เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์คือ TAL 652, TAL 655 และ TAL 658 สามารถเกิดปมได้ในหลอดทดลองทั้ง Gibson และ Niftal tubes ในระดับ dilution ของเชื้อตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} เหมือนกันแต่ระยะเวลาตั้งแต่ inoculate จนสังเกตเห็นปมวันแรกต่างกันดังนี้

- เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652:
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube 24 วัน
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 14 วัน
- เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 655:
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube 24 วัน
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 15 วัน
- เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 658:
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube 21 วัน
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 15 วัน

1.2 ดินตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง

ผลจากการทดลองนับปริมาณเชื้อในดินโดยเปรียบเทียบการปลูกใน Gibson และ Niftal tubes ปรากฏผลดังนี้

- ตัวอย่างที่ 1 พื้นที่ปลูกอ้อย ต. ทุ่งเศรษฐี อ. เมือง จ. กำแพงเพชร
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube ไม่พบการเกิดปม
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 21 วัน
    - พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}
- ตัวอย่างที่ 2 พื้นที่ปลูกข้าว ต. พรานกระต่าย อ. ถ้ำกระต่ายทอง จ. กำแพงเพชร
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube ไม่พบการเกิดปม
  - ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 23 วัน
    - พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวอย่างที่ 3 พื้นที่ปลูกถั่วและหญ้า ต. หนองกรด อ. เมือง จ. นครสวรรค์
  ไม่พบการเกิดปมทั้งใน Gibson และ Niftal tubes
- ตัวอย่างที่ 4 พื้นที่ปลูกข้าวโพด ต. เนินปอ อ. สามง่าม จ. พิจิตร
  ไม่พบการเกิดปมทั้งใน Gibson และ Niftal tubes
- ตัวอย่างที่ 5 พื้นที่ปลูกข้าว ต. เมืองเก่า อ. เมือง จ. สุโขทัย
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube ไม่พบการเกิดปม
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 23 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
- ตัวอย่างที่ 6 พื้นที่ปลูกหญ้า ต. เมืองเก่า อ. เมือง จ. สุโขทัย
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube ไม่พบการเกิดปม
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 24 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-4}
- ตัวอย่างที่ 7 พื้นที่ปลูกยาง อ. ประทิว จ. ชุมพร
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube ไม่พบการเกิดปม
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 26 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}
- ตัวอย่างที่ 8 พื้นที่ปลูกปาล์ม อ. ประทิว จ. ชุมพร
  ไม่พบการเกิดปมทั้งใน Gibson และ Niftal tubes
- ตัวอย่างที่ 9 พื้นที่แปลงทดลองปลูกถั่วเซนโตรซีมา ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่าง พฤศจิกายน 2536
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube 17 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 17 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
- ตัวอย่างที่ 10 พื้นที่แปลงทดลองปลูกถั่วเซนโตรซีมา ศูนย์ศึกษาพัฒนตามพระราชดำริเขาหินซ้อน อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่าง กุมภาพันธ์ 2537
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Gibson tube 24 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
  ระยะเวลาในการเกิดปมใน Niftal tube 18 วัน
  พบปมที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา เมื่อ inoculate ด้วยเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ และดินปรากฏว่าถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกใน Niftal tube สามารถเจริญเติบโตและเกิดปมได้ดีกว่าและเร็วกว่าใน Gibson tube กล่าวคือเมื่อ inoculate ถั่วเซนโตรซีมาด้วยเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ จะเกิดปมในเวลา 14 วัน ใน Niftal tube ในขณะที่ถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกใน Gibson tube ใช้เวลาประมาณ 23 วัน ในการเกิดปม สำหรับการ inoculate ด้วยดินด้วยวิธี whole soil technique ปรากฏว่า ดินที่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่ำ (ค่า MPN ประมาณ 10^{2} เซล/กรัมดินแห้ง) การปลูกใน Gibson tube จะไม่เกิดปม ในขณะที่การปลูกโดยใช้ Niftal tube เกิดปมได้ ผลการทดลองนี้ ยืนยันคำกล่าวอ้างของนักวิทยาศาสตร์ที่ศูนย์ NifTAL มลรัฐฮาวายที่พบว่า การเจริญเติบโตและการเกิดปมของถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็ก และเกิดปมยาก สามารถเกิดปมได้ดีเมื่อปลูกในหลอดทดลองแบบ Niftal เมื่อเปรียบเทียบกับ หลอดทดลองแบบ Gibson (Dr. Padma Somasegaran ติดต่อเป็นการส่วนตัว) ทั้งนี้เพราะหลอดทดลองแบบ Niftal มีจุกปิดแบบที่ทำให้มีการหมุนเวียนของอากาศได้บ้าง ในขณะที่หลอดทดลองแบบ Gibson เป็นหลอดที่ปิด อากาศที่ผ่านเข้าออกจากจุกที่เป็นสำลีมีน้อยกว่ามาก การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า หลอดทดลองแบบ Niftal สามารถใช้เป็นวัสดุปลูกเพื่อนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม โดยวิธี plant infection test ได้ดี สามารถประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย เนื่องจากไม่ต้องใช้ agar ในส่วนผสมของอาหาร

ส่วนที่ 2:

เป็นผลจากการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ จากการทดลองที่ 1 จำนวน 10 ตัวอย่าง และจากดินตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณอื่น 24 ตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากตารางปรากฏว่าจากดินทั้งหมด 34 ตัวอย่าง มีดิน 23 ตัวอย่างที่มีเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมา แต่ดินส่วนใหญ่มีจำนวนเชื้อไรโซเบียมในปริมาณที่ต่ำมาก คือ มีจำนวนเชื้อต่ำกว่า 10^{2} เซล/ กรัมดินแห้ง จำนวน 6 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^{3} เซล/ กรัมดินแห้ง จำนวน 6 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^{4} เซล/ กรัมดินแห้ง จำนวน 4 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^{5} เซล/ กรัมดินแห้ง จำนวน 5 ตัวอย่าง ต่ำกว่า 10^{6} เซล/ กรัมดินแห้ง จำนวน 2 ตัวอย่าง สำหรับค่าสงสุดของไรโซเบียมในดินที่ได้จากการสำรวจครั้งนี้คือ 7.34×10^{5} เซล/ กรัมดินแห้ง

เมื่อพิจารณาตามพืชที่ปลูกจะพบว่า ดินที่มีเชื้อไรโซเบียมตั้งแต่ 10^{3} เซล/ กรัมดินแห้ง ขึ้นไป จะเป็นดินที่เก็บจากบริเวณที่มีการปลูกถั่วอาหารสัตว์ โดยเฉพาะถั่วเซนโตรซีมาอยู่ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างดิน ส่วนดินที่ปลูกพืชชนิดอื่นอยู่ ถึงแม้จะอยู่ในบริเวณที่มีการปลูกถั่วเซนโตรซีมาก็ตาม (เช่นดินที่เก็บจากแปลงปลูกข้าวโพดที่ใกล้กับศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน) จะมีเชื้อไรโซเบียมในปรมาณที่ต่ำมากหรือไม่มีเชื้อไรโซเบียมอยู่ การทดลองนี้ยืนยันข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ส่วนที่ 3:

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกใน Leonard jar ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 จากตารางปรากฏว่า เมื่อ inoculate ถั่วเซนโตรซีมาด้วยดินที่ dilution 10^{-3} เชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดิน และ เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ TAL 652 และ TAL 655 มีผลต่อจำนวนปม น้ำหนักแห้งของต้นถั่ว และน้ำหนักแห้งของรากถั่ว แตกต่างกันทางสถิติ กล่าวคือ ดินที่ inoculate ด้วยเชื้อสายพันธุ์ TAL 652 ให้จำนวนปม น้ำหนักแห้งต้นและน้ำหนักแห้งรากสูงสุด โดยจำนวนปมสูงสุดมีค่าเท่ากับ 50.3 ปม/ขวด ในขณะที่จำนวนปมต่ำสุดเท่ากับ 6.3 ปม/ขวด และในตำรับที่ไม่ได้รับการ inoculate ไม่มีการเกิดปม สำหรับน้ำหนักแห้งของต้นสูงสุดคือ 0.933 กรัม/ขวด ซึ่งสูงกว่าตำรับการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักแห้งของต้นที่รองลงมาได้แก่ตำรับการทดลองที่ได้รับการ inoculate ด้วยดินตัวอย่างที่ 34 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.827 กรัม/ขวด ส่วนตำรับการทดลองที่ให้น้ำหนักแห้งของต้นต่ำสุดได้แก่ตำรับการทดลองที่ได้รับเชื้อจากดินตัวอย่างที่ 20 ที่ให้น้ำหนักแห้งต้นเพียง 0.105 กรัม/ขวด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับตำรับที่ไม่ได้รับการ inoculate ด้วยดิน (control)

ในทำนองเดียวกัน น้ำหนักแห้งของรากที่มีค่าสูงสุดคือตำรับที่ได้รับเชื้อ TAL 652 ที่มีค่า 0.210 กรัม/ขวด รองลงมาคือตำรับที่ได้รับดินตัวอย่างที่ 34 ที่มีค่า 0.200 กรัม/ขวด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักแห้งรากต่ำสุดได้แก่ ตำรับที่ไม่ได้รับเชื้อ

สำหรับการ inoculate ถั่วเซนโตรซีมาด้วยดินที่ dilution 10^{-3} นั้นให้ผลการทดลองทั้งจำนวนปม น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งรากในทำนองเดียวกับ เมื่อ inoculate ด้วยดินที่ dilution 10^{-1} (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อไรโซเบียมในดินที่มาจากแหล่งต่างกัน มีผลต่อการเกิดปม และเจริญเติบโตของถั่วแตกต่างกัน ซึ่งตรงกับรายงานของสุมิตรา (2535) ที่พบว่าเชื้อไรโซ เบียมที่แยกจากปมที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่างกัน และตรงกับรายงานของ Norris (1965) และ Date (1983)ที่กล่าวว่า เชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดิน อาจสามารถสร้างปมได้ในถั่วเซนโตรซีมา แต่ปมส่วนหนึ่งอาจไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนั้น จากการทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นว่า ถ้าดินมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมน้อยเกินไป การเจริญเติบโตของต้นในระยะแรกอาจไม่ดีเท่าที่ควร จากการทดลองนี้พบว่า เมื่อดินมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมสูง เช่นดินตัวอย่างที่ 29 และ 34 ซึ่งมีค่า MPN สูงถึง 10^{5} เซล/กรัมดินแห้ง ถั่วจะสามารถสร้างปมและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่เมื่อดินมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมในระดับ 10^{3} การเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมาจะไม่ค่อยดีนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26599

ตารางที่ 2 จำนวนปม น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของรากที่ได้จากการทดลอง ใน Leonard jar เมื่อ inoculate ด้วย whole soil solution เข้มข้น 10^{-1}

ตำรับการทดลอง	จำนวนปมต่อขวด	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม/ ขวด)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม/ ขวด)
Control	0.0 a	0.115 ab	0.058 a
ดินตัวอย่างที่ 12	6.3 ab	0.218 d	0.112 b
ดินตัวอย่างที่ 20	9.8 bc	0.105 a	0.065 a
ดินตัวอย่างที่ 23	15.3 cd	0.162 bc	0.120 b
ดินตัวอย่างที่ 28	23.8 e	0.333 e	0.157 c
ดินตัวอย่างที่ 29	35.0 f	0.545 f	0.157 c
ดินตัวอย่างที่ 31	25.0 e	0.203 cd	0.105 b
ดินตัวอย่างที่ 32	10.8 bc	0.203 cd	0.115 b
ดินตัวอย่างที่ 34	50.3 g	0.827 g	0.200 d
TAL 652*	49.0 g	0.933 f	0.210 d
TAL 655*	21.8 de	0.287 e	0.127 b

* = inoculate ด้วยเชื้อไรโซเบียมที่ 10^{-6} dilution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 จำนวนปม น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของรากที่ได้จากการทดลอง ใน Leonard jar เมื่อ inoculate ด้วย whole soil solution เข้มข้น 10^{-3}

ตำรับการทดลอง	จำนวนปมต่อขวด	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม/ ขวด)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม/ ขวด)
Control	0.0 a	0.115 a	0.58 a
ดินตัวอย่างที่ 12	8.8 ab	0.127 a	0.097 b
ดินตัวอย่างที่ 20	7.8 ab	0.265 c	0.133 d
ดินตัวอย่างที่ 23	8.0 ab	0.125 a	0.120 bcd
ดินตัวอย่างที่ 28	21.3 c	0.172 b	0.100 b
ดินตัวอย่างที่ 29	20.5 c	0.343 d	0.105 bc
ดินตัวอย่างที่ 31	8.0 ab	0.115 a	0.100 b
ดินตัวอย่างที่ 32	9.0 ab	0.135 a	0.70 a
ดินตัวอย่างที่ 34	11.5 b	0.260 c	0.220 e
TAL 652*	49.0 d	0.933 e	0.210 e
TAL 655[8]	21.8 c	0.287c	0.127 cd

* = inoculate ด้วยเชื้อไรโซเบียมที่ 10^{-6} dilution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย มณีดุลย์ 2518 ถั่วลาย ข่าวสารชมรมนักพืชอาหารสัตว์ 2(2) : 12-13.

บุญฤา วิไลพล 2526 พืชอาหารสัตว์เขตร้อนและการจัดการ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุมิตรา ภู่วโรดม อภิศักดิ์ โพธิ์ปั้น ประยุทธ วิไลวรรณ อดุลย์เดช สุทธิสิงห์ สมศักดิ์ ชัยนา และสุดจิตต์ สวนมาลี 2532 การใช้เชื้อไรโซเบียมและปุ๋ยฟอสฟอรัสในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพถั่วอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายงานการวิจัยเสนอต่อโครงการน้ำพระทัยจากในหลวง (อีสานเขียว) กองทัพบก 80 หน้า

สุมิตรา ภู่วโรดม 2535 การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ในถั่วเซน-
โตรซีมา รายงานการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2535 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 48 หน้า

Bonish, P.M. 1979. Clover rhizobia in soils: assessment of effectiveness using the plant infection count method. N. Z. J. Agric. Res. 22: 89-93.

Brockwell, J., R.A. Holliday, and A. Pilka. 1988. Evaluation of the symbiotic nitrogen-fixing potential of the soils by direct microbial means. Plant Soil 108:163-170.

Buchanan, R.E., A.W. Ravin and R.Y. Stanier. 1974. Burgey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1268 pp.

Date, R.A. 1983. Microbiological consideration -Rhizobium specificity for nodulation and nitrogen fixation. In Burt et al. (eds.), The Role of Centrosema, Desmodium and Stylosanthes in Improving Tropical Pastures. pp. 221-226. Westview Tropical Agriculture Series No.6, Westview Press., USA.

Elmes, R.P.T. 1976. Cross inoculation relationships of Psophocarrpus tetregonolobus and its Rhizobium with other legumes and rhizobia. Papua New Guines Agric. J. 27(3) : 53-57.

Grof, B. and W.A.T. Harding. 1970. Yield attributes of some species and a ecotype of Centrosema in North Queensland. Qld. J. Agric. Anim. Sci. 27: 237-240.

Halliday, J. and P. Somasegaran. 1984. The Rhizobium Gerplasm Resource at Niftal : Catalogue of Strains. University of Hawaii Niftal Project and Mircen.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Humphey, L.R. 1978. A guide to better pastures for the tropics and subtropics of coastal Australia. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 14: 1273-1275.

Kang, U.G., P. Somasegaran, H.J. Hoben and B.B. Bohlool. 1991. Symbiotic potential, competitiveness, and serological properties of Bradyrhizobium japonicum indigenous to Korean Soils. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1038-1045.

Moore, A.W. 1962. The influence of legume on soil fertility under a grazed tropical pasture. Emp. J. Exp. Agric. 30: 239-242.

Norris, D.O. 1965. Acid production by Rhizobium : A unifying concept. Plant Soil 22: 143-166.

People, M.B., A.W. Faizah, B. Rerkasem and D.F. Herridge. 1989. Methods for Evaluation Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field. Australian Center for International Agriculture Research. 76 pp.

Johnson, A.W.B. and J.E. Berringer. 1976. Pea root nodules containing more than one Rhizobium species. Nature 263: 502-504.

Tin, D.M.M. 1991. Early summer yield of six tropical grasses in the first year of association with Centrosema pubercens. Unpublished M.Sc. thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok.

Whitney, A.S., Y. Kanehiro and G.D. Sherma. 1967. Nitrogen relationship of three tropical legumes in pure strain and grass mixture. Agron. J. 59: 47-50

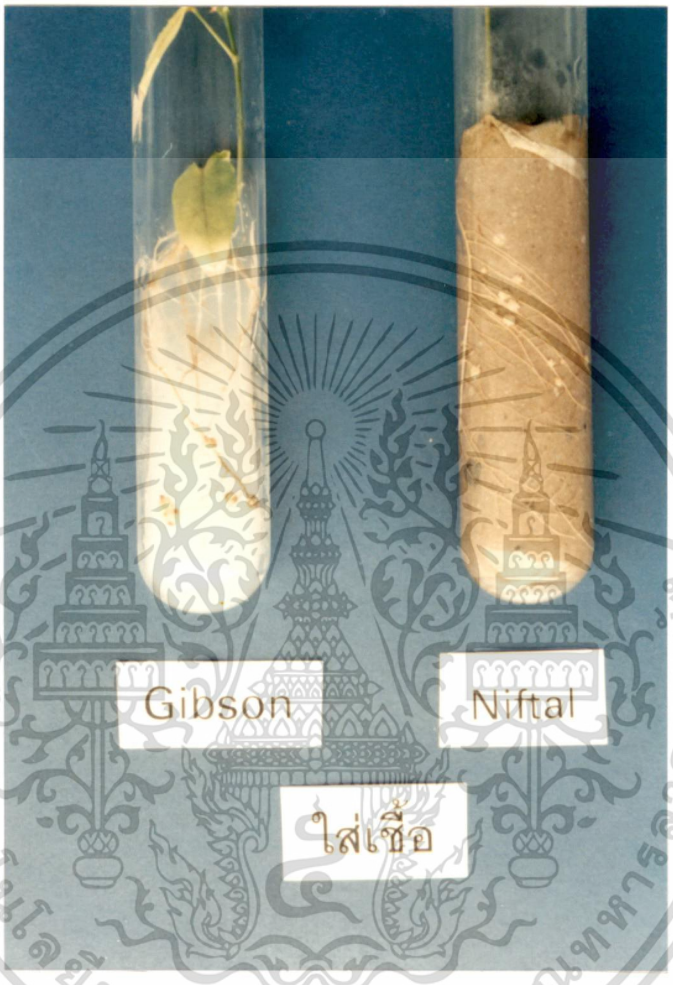
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไป และการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมา ในหลอดทดลองแบบ Gibson และ Niftal tubes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 การเกิดปมของรากถั่วเขียวโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Gibson และ Niftal tubes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 การเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Gibson

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 การเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ปลูกในหลอดทดลองแบบ Niftal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ภาคผนวก 1 การจำแนกไรโซเบียมตามระบบ Cross-inoculation groups

Cross-inoculation group	Rhizobium species	Host Genera	Legume Included
Alfalfa group	*R. meliloti*	*Medicago* *Melilotus* *Trigonella*	Alfalfa Sweet clover Fenugreek
Bean group	*R. phaseoli*	*Phaseolus*	Beans
Soybean group	*R. japonicum*	*Glycine*	Soybean
Clover group	*R. trifolii*	*Trifolium*	Clovers
Pea group	*R. leguminosarum*	*Pisum* *Lens* *Lathyrus* *Vicia*	Pea Lentil Sweetpea Vetch
Lupine group	*R. lupini*	*Lupinus* *Ornithopus*	Lupines Serradella
Cowpea group	—	*Vigna* *Archis* *Crotalaria* *Pueraria* *Phseolus* *Lespedezs*	Cowpea Peanut Crotalaria Kudzu Lima bean Lespedeza

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงการจำแนกไรโซเบียมตามระบบใหม่

ไรโซเบียม	พืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย
พวกเจริญเติบโตเร็ว (Fast growers)	
Rhizobium meliloti	ถั่วอัลฟัลฟา (Medicago), Melitotus และ Trogonella
Rhizobium leguminosarum	
biovar. trofolii	ถั่วโคลเวอร์ (Trifolium spp.)
biovar. phaseoli	ถั่วแดงหลวง, ถั่วปี่นโต, ถั่วแขก (ฝัก) *(Phaseolus vulgaris), Pheolus multifolis*
biovar. viceae	ถั่วลันเตา (Pisum), ถั่วปากอ้า (Vicia), เลนส์ (Lens) และ Lathyrus
Rhizobium loti	Lupinus, Lotus, Anthyllis, Ornithopus
Rhizobium fredii	ถั่วเหลือง (Glycine max)
พวกเจริญเติบโตช้า (Slow growers)	
Bradyrhizobium japonicum	ถั่วเหลือง (Glycine max)
Bradyrhizobium spp.	
- sp (Vigna)	ถั่วเขียว, ถั่วลิสง, ถั่วฝักยาว ฯลฯ
- sp (Lupinus)	*Lupinus sp., Lotus pedunclatus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 N-free Nutrient Solution (Broughton and Dilworth, 1970)

Stock	Element	M	From	MW	g / l	M
1	Ca	1000	$CaCl_2.2H_2O$	147.03	249.1	2.0
2	P	500	KH_2PO_4	136.09	136.1	1.0
3	Fe	10	Fe - citrate	355.04	6.7	0.02
	Mg	250	$MgSO_4.7H_2O$	246.5	123.3	0.5
	K	250	K_2SO_4	174.06	87.0	0.5
	Mn	1	$MnSO_4.H_2O$	169.02	0.338	0.002
4	B	2	H_3BO_3	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	$ZnSO_4.7H_2O$	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.2	$CuSO_4.5H_2O$	249.69	0.100	0.0004
	Co	0.1	$CoSO_4.7H_2O$	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.98	0.048	0.0002

For each 10 liters of full strength culture solution, take 5.0 ml. each of solution 1 to 4, then add to 5.0 liters of water, then dilute to 10 liters. Use 1N NaOH to adjust the pH to 6.6-6.8 For plus N control treatments, KNO_3 (0.05%) is added giving an concentration of 70 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ตารางสำหรับคำนวณหาค่า Most Probable Number (MPN) ของเชื้อไรโซเบียม

C.ten-fold dilutions ; (A = 10)

Positive tubes		Dilution step (s)			
n = 4	n = 2	s = 10			
40	20	$7x10^8$			
39					
38	19	6.9			
37		3.4			
36	18	1.8			
35		1.0			
34	17	$5.9x10^7$			
33		3.1	s = 8		
32	16	1.7	$7x10^6$		
31		1.0			
30	15	5.8	6.9		
29		3.1	3.4		
28	14	1.7	1.8		
27		1.0	1.0		
26	13	$5.8x10^5$	$5.8x10^5$		
25		3.1	3.1	s = 6	
24	12	1.7	1.7	$7x10^4$	
23		1.0	1.0		
22	11	$5.8x10^4$	$5.8x10^4$	6.9	
21		3.1	3.1	3.4	
20	10	1.7	1.7	1.8	
19		1.0	1.0	1.0	
18	9	$5.8x10^3$	$5.8x10^3$	$5.9x10^3$	
17		3.1	3.1	3.1	s = 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

C.ten-fold dilutions ; (A = 10)

Positive tubes		Dilution step (s)			
n = 4	n = 2	s = 10			
16	8	1.7	1.7	1.7	$7x10^{2}$
15		1.0	1.0	1.0	
14	7	$5.8x10^{2}$	$5.8x10^{2}$	$5.8x10^{2}$	6.9
13		3.1	3.1	3.1	3.4
12	6	1.7	1.7	1.7	1.8
11		1.0	1.0	1.0	1.0
10	5	$5.8x10^{1}$	$5.8x10^{1}$	$5.8x10^{1}$	$5.9x10^{1}$
9		3.1	3.1	3.1	3.1
8	4	1.7	1.7	1.7	1.7
7		1.0	1.0	1.0	1.0
6	3	5.8x1	5.8x1	5.8x1	5.8x1
5		3.1	3.1	3.1	3.1
4	2	1.7	1.7	1.7	1.7
3		1.0	1.0	1.0	1.0
2	1	0.6	0.6	0.6	0.6
1		0.6	0.6	0.6	0.6
0	0				
Approx range		10^{9}	10^{7}	10^{5}	10^{3}

Factor, 95%

fiducial limits[+] n = 2 6.6

n = 4 3.8

[*] Calculated from table $VIII_2$ of Fisher and Yates (1963)

[+] Cochran ; Biometrics, 1950, 6, 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิธีคำนวณหาค่า MPN ของเชื้อไรโซเบียมในดินตัวอย่าง

<u>วิธีคำนวณ :</u> ตัวอย่างดินที่ 22 ซึ่งมีผลจากการทดลองเป็นดังนี้

การทดลองนี้มี 6 dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} (ค่า s = 6)

แต่ละ dilution มี 4 ซ้ำ (ค่า n = 4)

ปริมาตร inoculant ที่ใช้เท่ากับ 1 มล.

1. อ่านค่าจำนวนหลอดทั้งหมดที่เป็นบวกจากตารางบันทึกผล

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา				จำนวนหลอดที่เกิดปม
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	
10^{-1}	+	+	+	+	4
10^{-2}	+	+	+	+	4
10^{-3}	+	+	-	+	3
10^{-4}	+	+	+	-	3
10^{-5}	+	+	+	+	4
10^{-6}	+	+	+	+	4
				รวม	22

2. เมื่อได้จำนวนหลอดที่เป็นบวก (+) ทั้งมดแล้ว ให้อ่านค่าจากตารางภาคผนวกที่ 4 โดยอ่านค่าที่ n = 4 และ s = 6 ซึ่งจากตารางจะมีค่าเท่ากับ 6.9×10^{4}

3. คำนวณค่า MPN ของไรโซเบียมต่อกรัม inoculant จากสูตร

$$MPN = (m \times d)/ v$$

ซึ่ง m = ค่าที่อ่านได้จากตาราง

d = dilution ต่ำสุด (10^{-1})

v = ปริมาตรที่ใช้ในการ inoculate (ml)

ดังนั้น ค่า MPN ของดินตัวอย่างที่ 22 = $(6.9 \times 10^{4}) \times 1/ 1$

$= 6.9 \times 10^{5}$ ต่อกรัมดินเปียก

4. เมื่อได้ค่า MPN ของไรโซเบียมต่อกรัมดินแห้งแล้ว นำไปคำนวณเป็นจำนวนต่อกรัมดินแห้ง โดยนำดินตัวอย่างไปหาความชื้น ด้วยการอบที่อุณหูมิ 100 C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้