สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
วิทยบริการ
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

13301

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

T100584

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบี่ยมในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

(A STUDY ON COMPARATIVE GROWTK OF RHIZOBIUM SPP. BY VARIOUS TYPES OF SUGAR)

โดย

นายเผ่าพันธุ์ สงรอง
นายอุบล แก้วเอียด

อาจารย์ฉนิมนันท์ เขนอักษร ประธานกรรมการ
อาจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการ

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(นางศรีประไพ ชื่นศรี)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
วันที่ 18 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2526

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 100584
วัน เดือน ปี.....

ปพ.
พ 825ก
2526

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ความสำเร็จและความสมบูรณ์ของปัญหาพิเศษเล่มนี้ได้มาด้วยความช่วยเหลือแนะนำตลอดจนให้ข้อคิดเห็นจากอาจารย์ฉนิมนันต์ เจนอักษร ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการที่ปรึกษา นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจากคณาจารย์คณะครุศาสตร์และวิทยาศาสตร์อุตสาหกรรม ที่มีความปรารถดี ต้องการให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลงด้วยดี ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ที่ได้กรุณาแก้ไขเพิ่มเติมในการสอบครั้งสุดท้าย จึงกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เพื่อให้ปัญหาพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีที่ไม่ได้กล่าวนามมาในที่นี้ด้วย

นายเผ่าพันธุ์ สงรอง
นายอุบล แก้วเอียด
มีนาคม 2526

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

(A Study on comparative growth of Rhizobium spp. by various types of Sugar)

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมโดยใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในอาหารเหลว 9 ชนิด คือสูตรที่ 1 Mannital, 2 น้ำตาลทราย, 3 น้ำตาลทราย + mannitol, 4 น้ำตาลมะพร้าว, 5 น้ำตาลมะพร้าว + mannitol, 6 น้ำตาลสีรำ 7 น้ำตาลสีรำ + mannitol, 8 น้ำตาลโตนด, 9 น้ำตาลโตนด + mannitol, โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB(Randomized Complete block)

ผลจากการศึกษาพบว่า อาหารเหลวที่เชื้อไรโซเบียมเจริญได้ดีที่สุดคืออาหารสูตรที่ 1 (Mannitol) และในอาหารที่เชื้อเจริญได้ต่ำที่สุดคืออาหารสูตรที่ 8 (น้ำตาลโตนด) ส่วนอาหารชนิดอื่น ๆ นั้นเชื้อสามารถเจริญระดับปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	9
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลและวิจารณ์ผล	15
สรุปผลการทดลอง	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ไรโซเบียม เป็นแบ็คเตรีที่มีความสำคัญ ซึ่งได้รับความสนใจกันมาเป็นเวลาช้านาน เนื่องจากเป็นแบ็คเตรีที่มีความสามารถพิเศษเฉพาะตัว โดยสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาให้พืชตระกูลถั่วใช้ในการเจริญเติบโตได้โดยตรง นอกจากนั้นไรโซเบียมยังเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนให้แก่ดินได้อีกด้วย ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้เองทำให้ นักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ ท่านได้การศึกษาเพื่อหาทางนำเอาไรโซเบียมมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ยิ่งในภาวะปัจจุบันด้วยแล้ว พืชเศรษฐกิจกลายชนิดเป็นพืชตระกูลถั่ว และการผลิตพืชเหล่านี้ของ เกษตรกรก็ยังประสบปัญหาขาดทุน เนื่องจากปุ๋ยมีราคาแพง เพื่อเป็นการประหยัดในการผลิตพืชเศรษฐกิจดังกล่าว หน่วยงานราชการหลายหน่วยงาน อาทิ กรมวิชาการเกษตร (สมศักดิ์, 2525) ได้ศึกษาค้นคว้าทดลองและหาวิธีการต่าง ๆ ที่จะหาทางลดต้นทุนการผลิต โดยนำเอา ไรโซเบียม มาใช้ประโยชน์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพราะไรโซเบียมเป็นแบ็คเตรีที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ เพียงแต่หาทางนำมาใช้เท่านั้น จึงได้มีการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol yeast extract agar (สมศักดิ์, 2516) และประสพผลสำเร็จ เพราะสามารถนำเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงได้ไปคลุกกับเมล็ดพืชตระกูลถั่วได้เลย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นการลดต้นทุนการผลิตเชื้ออยู่นั้นเอง ในระยะต่อมาได้มีนักวิชาการหลายท่านได้ใช้น้ำตาลต่าง ๆ ทดแทน Mannitol โดยพยายามลดอัตราการใช้ Mannitol ในสูตรอาหารต่าง ๆ ให้น้อยลง เช่น ใช้น้ำตาลทรายเป็นต้น

จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันนี้ การหาทางลดต้นทุนในการผลิตพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว ยังดำเนินต่อไปไม่สิ้นสุด และการหาทางนำไรโซเบียมมาใช้ก็ยังทำกันหลายหน่วยงาน โดยวิธีการดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดทั้งวิธีการใช้เชื้อให้มีประสิทธิภาพดีดี เพื่อเป็นการสนับสนุนวิชาการด้านนี้อีกทางหนึ่ง จึงทำการศึกษาสูตรอาหารโดยเปรียบเทียบน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในท้องตลาดทั่ว ๆ ไป ที่สามารถเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมได้ มาทดแทน Mannitol ซึ่งมีราคาแพงในขณะนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

2. เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเชื้อไรโซเบียมให้ต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ไรโซเบียม เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง อยู่ใน Order Eubacteriales. Family: Rhizobiaceae (Breed, 1957)

เย็นใจ,(2523) รายงานว่า Rhizobium Spp. เป็นแบคแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะพิเศษเฉพาะตัวคือ เมื่อเข้าไปอยู่ในปมรากถั่วแล้วสามารถที่จะตรึงเอาก๊าซไนโตรเจน (N_2) จากอากาศ นำมาสร้างเป็นสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งพืชสามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตแก่ถั่วได้ ดังนั้นถ้าสามารถเพาะเชื้อไรโซเบียมให้เจริญในรากพืชได้ ก็จะทำให้ถั่วสามารถตรึงไนโตรเจน เพิ่มขึ้น

ลักษณะของ เชื้อไรโซเบียมมีรูปร่างไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนสภาพรูปร่างได้ตามสิ่งแวดล้อม คือเมื่ออยู่ในดินจะมีลักษณะเป็นแท่งยาว (rod) ซึ่งต่อมาจะเปลี่ยนเป็นแท่งกลม (Coccoid) หรืออาจมีรูปร่างเป็นกิ่งก้านสาขารูป X,Y ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะต่าง ๆ ของชีพจักรของเชื้อว่าอยู่ในสภาพแวดล้อมอย่างไร เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมจะมีรูปร่างเป็นท่อนยาวเล็ก (rod) และเคลื่อนไหวโดย Flagella อาจเปลี่ยนรูปเป็น Bacteriod ได้เมื่อให้สารประกอบบางอย่าง เช่น acid Phosphate Sodium succinate ผสมกับ Glyceral และ Caffeine ผสมกับ Cumarine ลงในอาหาร นอกจากนี้ยังมีสารประกอบ alkaloid อื่น ๆ เช่น Pyridine และ Chinoline ซึ่งอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไรโซเบียมเช่นกัน (4)

Date (1970) กล่าวว่าในสภาพที่อาหารมี pH ประมาณ 6.5 – 7.0 จะเหมาะสมกับสภาพการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม (14)

สมศักดิ์,(2525) กล่าวว่าเชื้อไรโซเบียมก่อนที่จะเข้าไปอยู่ในท่อเส้นด้ายในปมรากถั่วจะมีรูปร่างแบบทรงกลม และมี Flagella (Swarmer Cocci) เมื่อเข้าไปอยู่ในปมจะเปลี่ยนแปลงเป็นแท่งยาว (rod) มีขนาด 2 – 3 ไมโครเมตร 0.5 ไมโครเมตร (7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bisset (1959) ได้แยกเชื้อไรโซเบียมในเขตร้อนพบว่าไรโซเบียมพวกนี้มีขนาด 0.3 + 1 ไมโครเมตร มี Flagella 2 เส้น เป็นแบบ Polar สำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่า บางสายพันธุ์ไม่เจริญในอาหาร Peptone water agar และไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดได้เลย แต่สำหรับบางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลซึ่งจะเกิดกรดหรือทั้งกรดและก๊าซ ได้ภายใน 14 วัน

Damery and Alexander (1969) ได้ทดสอบว่าไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพอะไรสามารถสร้าง Polysaccnaride ได้มากกว่าและผลิต amino acid พวก Lucine, Isolucine,Valine,Alannine,Serine,glutamic acid Aspartic acid,Phenylanie,Tyrosine,Methionine,S-methyl cystine

ซึ่งเป็นไรโซเบียมที่ไม่มีประสิทธิภาพไม่สามารถจะผลิตได้ แต่ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพและไม่มีประสิทธิภาพนั้น จะไม่มีความแตกต่างกันในด้านการผลิตไวตามินบี 12 และการขับ Pantothenic และ niacin

Breed และคณะ (1957) ได้จำแนกชีพจักรและการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม ดังนี้

1. เป็น cell รูปร่างทรงกลมไม่เคลื่อนที่ (non - motile) ซึ่งเตรียมตัวที่จะเป็น swarmer (Pre-Swarmer) พบอยู่ในสารละลายดิน (Soil solution) มี pH เป็นกลาง

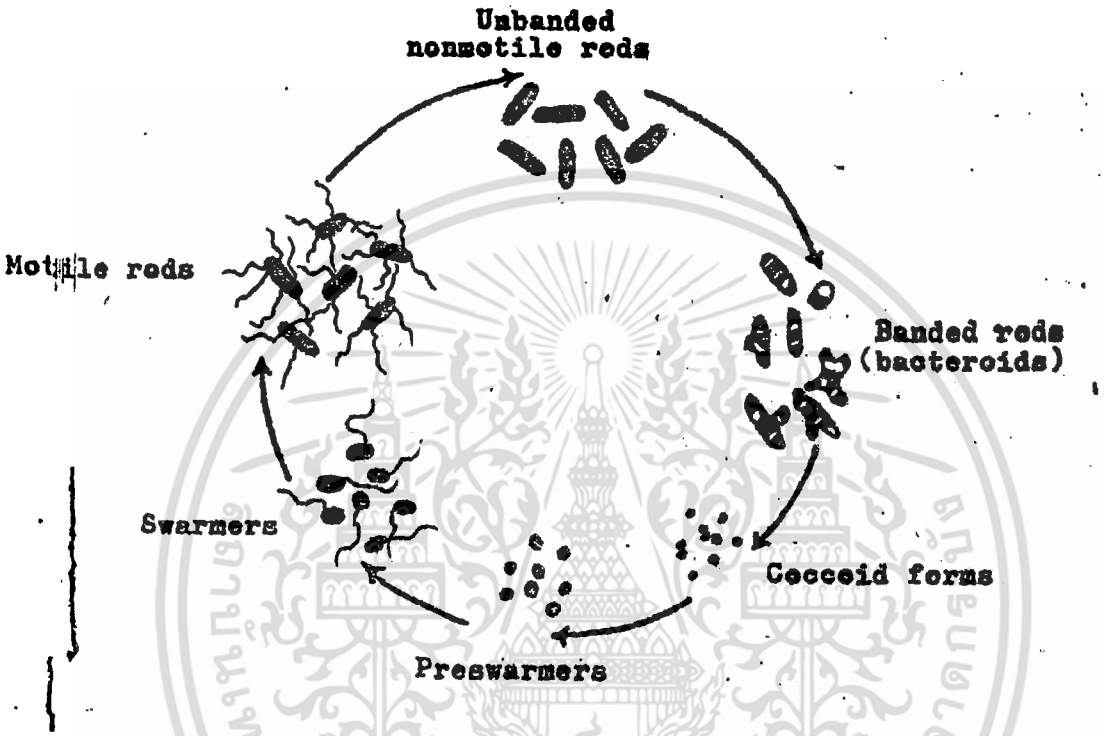
2. Cell มีรูปร่างเป็นทรงกลมโตขึ้น ไม่เคลื่อนที่เช่นเดียวกัน พบในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสภาพแวดล้อมที่มีคาร์โบไฮเดรต และ Phosphate

3. Cell ขยายตัวเป็นรูปวงรี (Ellipsoidal) มี Flagella ปรากฏอยู่เมื่ออยู่ในระยะ Swarmer ซึ่งจะเคลื่อนที่ได้เร็ว

4. Cell ขยายตัวมากขึ้นจนเป็นท่อนยาวเล็ก (rod) เคลื่อนที่ช้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Cell แบ่งตัวเป็นส่วน ๆ โดยที่ Chromatin แยกเป็นกลุ่ม ๆ และเป็นก้อนกลม ในที่สุดจะแยกตัวเป็น Pre-swarmer อีกครั้งหนึ่ง (10)



สมศักดิ์ (2526) ได้แบ่งเชื้อไรโซเบียมตามกลุ่มต่าง ๆ ของถั่วได้ดังนี้

1. Rhizobium meliloti เชื้อไรโซเบียมชนิดนี้ สามารถเข้าไปสร้างปมในถั่วพวก Alfalfa Group (Medico spp.) ที่ใช้ในทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์

2. Rhizobium trifolii พบในถั่วพวก Clover Group (Frifolium spp.)

3. Rhizobium Leguminosarum ไรโซเบียมที่พบในปมรากถั่วพวก Pea and vetch Group (pisum Vicia and Lathrus spp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Rhizobium Phareoli พบในถั่วพวก Bean Group (Phaseorus spp.) เป็นถั่วเมล็ดแบน เช่นถั่วแขก ถั่วแดง ถั่วฝ้า

5. Rhizobium Japonicum คือไรโซเบียมที่เข้าไปอยู่ในปมรากถั่วพวก Soybean Group

6. Rhizobium Lupini จะพบในถั่วพวก Lipine Group (Lupinu spp.) ซึ่งไม่มีในเมืองไทย

7. Rhizobium spp. พบในถั่วพวก ถั่วพุ่ม ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว

8. Specific Rhizobium spp. คือ ไรโซเบียมที่เข้าไปอยู่ในถั่วโดยเฉพาะเจาะจงเท่านั้น ที่รู้จักได้แก่ โสน ถั่วลิสง (5)

Buchanan และคณะ (1974) ได้จัดแบ่งกลุ่มไรโซเบียมตามใน Family Rhizobiumceae ออกเป็น 2 Genus คือ

1. Genus Rhizobium เป็นพวกที่สามารถทำให้เกิดปมรากกับพืชตระกูลถั่วและตรึงไนโตรเจนได้

2. Genun Sgrobacterium พวกที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ Genus Rhizobium แบ่งได้เป็น 2 พวก ดังต่อไปนี้

2.1) มี Flagella 2 –6 เส้น เป็นแบบ Peritrichous เจริญได้รวดเร็วบน Yeast Extract manital congored agar 3 – 5 วัน มีโคโลนีกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 – 4 มิลลิเมตร สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายอย่าง เช่น Glucose, mannitol และบางสายพันธุ์ต้องการ Biotin คือ Rhizobium Leguminosarum Rhizobium trifolii, Rhizobium phareoli Rhizobium meliloti.

2.2) มี Flagella แบบ Polar หรือ Sub-polar เจริญบน Yeast extract mannitol congo-red agar ภายใน 5 – 7 วัน โคโลนีกลม ทึบแสง มี granule ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ Pentose เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้ มักเกิดกับปมถั่วในเขตร้อน คือ

Rhizobium Japonicum

Rhizobium Lupini (11)

Breed และคณะ (1957) ได้จัดแบ่งไรโซเบียมตามลักษณะทางสรีรวิทยาได้ 2 กลุ่ม ซึ่งได้ศึกษาจากปฏิกิริยาใน Litmus milk คือ

1. พวกที่ทำให้ Litmus milk เป็นด่าง ยังแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม

1.1 กลุ่มของไรโซเบียมที่ทำให้เกิด Serum zone ในนมได้แก่ Rhizobium leguminosarum, Rhizobium phaseoli, Rhizobium frifolii

1.2 กลุ่มของไรโซเบียมที่ไม่เกิด Serum zone ในนม มี glagella แบบ monotrichous ได้แก่ Rhizobium lupini, Rhizobium japonicum

2. พวกที่ทำให้ Litmus milk เป็นกรด และเกิด Serum Zone ในนม มีอยู่กลุ่มเดียว คือ Rhizobium meliloti (10)

Norris (1965) ได้แบ่งกลุ่มไรโซเบียมโดยอาศัยการผลิตกรดหรือด่างในอาหาร yeast extract mannitol agar แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ

พวกเจริญเร็วและผลิตกรด ได้แก่ Rhizobium phaseoli, Rhizobium trifolii, Rhizobium meliloti

พวกที่เจริญช้า และผลิตด่างได้แก่ Rhizobium japonicum, Rhizobium lupini

Burton (1965) ได้จัดแบ่งไรโซเบียมโดยอาศัย ความสามารถในการทำให้เกิดปมแก่รากถั่ว ซึ่งเกิดปมถั่วชนิดใด ก็จัดไว้ใน species นั้น ซึ่งวิธีนี้ไม่มีความแน่นอน เพราะเชื้อไรโซเบียมบางชนิดสามารถทำให้เกิดปมแก่ถั่วกลุ่มอื่นได้ ซึ่งเรียกว่า Symbiotic promiscuity จึงเป็นการยากที่จะจัดกลุ่มไรโซเบียมให้ได้แน่นอนเพราะในแต่ละวิธีจะแยก-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พร้องทั้งนั้น จึงอาจใช้หลายวิธีรวมกันได้แต่วิธี Cross inoculation group เป็นวิธีที่นิยมใช้ (12)

Graham. (1964) ได้จัดแบ่งไรโซเบียม แบบ numerical technique โดยได้ศึกษาถึงลักษณะ ความคล้ายคลึงของจุลินทรีย์ที่อยู่ใน Family Rhizobiaceae จำนวน 100 ลักษณะ ซึ่งสรุปได้ว่า ไรโซเบียมพวกที่เจริญเติบโตเร็ว มีความคล้ายคลึงกับ Agrobacterium มากที่สุด แต่แทบจะไม่มีความคล้ายคลึงกับไรโซเบียมพวกที่เจริญเติบโตช้าเลย (15)

นันทกร และคณะ (2517) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่ทำให้เกิดปม และตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเหลือง คือไรโซเบียมใน Rhizobium japonicum ซึ่งมีไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในแง่ของการทำให้เกิดปม กับถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ไรโซเบียมสายพันธุ์ THA 2, UB 110 M, THA 5, THA 1, UB 8-9, UB 76, UB 15-7, THA 6, UB 122, UB 117, THA 4, UB 110, UB 94 (1)

บัณฑิต และคณะ(2517) ได้ศึกษาพบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ 8-T 110, 76, 15 – 17 และ 63 เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดปมกับถั่วเหลือง และสามารถตรึงไนโตรเจนรวมกับถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ. 2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (2)

ปรีชา และคณะ (2521) ได้กล่าวว่าการศึกษาสายพันธุ์ของไรโซเบียมนั้น ต้องค้นคว้าวิจัยหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับถั่วพันธุ์ใหม่ ๆ การค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสายพันธุ์ใหม่ของไรโซเบียมนั้นอาจทำได้หลายทาง เช่น การค้นคว้าไรโซเบียมตามธรรมชาติการทำให้ไรโซเบียมกลายพันธุ์ โดยใช้สาร เคมี และรังสีเป็นต้น (3)

แสวง และสมศักดิ์(2518) ได้ศึกษาการใช้สายพันธุ์ไรโซเบียม ที่มีประสิทธิภาพกับการปรับปรุง ผลผลิตของถั่วนั้นจำเป็นต้องผลิตเซลไรโซเบียมสายพันธุ์นั้น ๆ ให้ได้ปริมาณมากๆ ให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร ประกอบกับการลลุกเชื้อไรโซเบียมนั้นปกติ ต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อในอัตราประมาณ 10,000 เซล ต่อ 1 เมล็ดของถั่ว จะเห็นได้ว่าต้องใช้เซลเชื้อไรโซ-เบียม เป็นจำนวนมาก จึงจะต้องผลิตในลักษณะของอุตสาหกรรม

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อไรโซเบียม ในห้องปฏิบัติการที่ใช้คือ Mannitol Yeast extract medium ซึ่งประกอบด้วย

1.	mannitol	10 กรัม
2.	yeast extract	0.2 กรัม
3.	K_2HPO_4	0.5 กรัม
4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 กรัม
5.	NaCl	0.7 กรัม
6.	$CaCO_3$	3 กรัม

น้ำ 1000 มิลลิกรัม แต่อาหารชนิดนี้มีราคาแพง จึงต้องคัดองค์ประกอบบางอย่างไม่ต้องใส่ ซึ่งองค์ประกอบที่คัดออกไปนี้ ไม่มีความจำเป็นหรือลดกิจกรรมของเชื้อไรโซเบียม ในขณะที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ โดยปราศจากต้นถั่วเลยหรือองค์ประกอบของอาหารบางชนิด อาจกำหนดไว้สูงเกินความจำเป็น ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ของเชื้อไรโซเบียม จากการใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ S-18 พบว่าสามารถใช้ maltose, glucose, glucolin และน้ำตาลทราย แทน mannitol และใช้ยีสต์ทำขนมปัง แทน yeast extract ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในการเลี้ยงเชื้อ ในห้องปฏิบัติการพบว่า ไม่จำเป็นต้องใช้ $CaCO_3$ ในทุกกรณีซึ่งไม่ปรากฏว่าเชื้อไรโซเบียม จะลดการสูญเสียประสิทธิภาพในการทำให้เกิดปมและการตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วแต่อย่างใด (8)

สมศักดิ์ และคณะ (2520) รายงานว่าเมื่อใช้น้ำตาลทรายแทน mannitol ใช้ยีสต์ทำขนมปังแทน yeast extract และไม่ใช้ $CaCO_3$ ปรากฏว่าอาหารสูตรนี้สามารถใช้เลี้ยงเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ CB - 138 และ S - 18 ได้เป็นอย่างดีไม่สูญเสียคุณภาพ และลดต้นทุนการผลิตได้ถึง 85 – 90% เมื่อใช้สูตรอาหารที่ปรับปรุงขึ้นใหม่ดังกล่าวนี้ พร้อมทั้งลดปริมาณของ K_2PO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ลงด้วย (6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอดแก้ว
2. หม้อนึ่งความดัน
3. ตู้อบจานเลี้ยงเชื้อ
4. ขวดกลมปากแคบ
5. ขวดแบนขนาด 275 มิลลิลิตร
6. จานเพาะเชื้อ
7. ไปเปตขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร
8. แท่งแก้วรูปตัว แอล (L)
9. เครื่องเขย่า (Shaker)
10. เครื่อง Spectrophotometer Model 20
11. เชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง strain 916 , 1101
    ถั่วลิสง strain 200,201
    ถั่วเขียว strain 301,302
12. อาหาร Mannitol yeast extract congo-red agar
13. อาหารสำหรับทดลอง การใช้น้ำตาล
    สูตร 1 Mannitol 5 gm.
    สูตร 2 น้ำตาลทราย 5 gm.
    สูตร 3 Mannitol 1 gm. น้ำตาลทราย 4 gm.
    สูตร 4 น้ำตาลมะพร้าว 5 gm.
    สูตร 5 Mannitol 1 gm. กับน้ำตาลมะพร้าว 4 gm.
    สูตร 6 น้ำตาลสีรำ 5 gm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตร 7 Mannitol 1 gm. กับน้ำตาลสีรำ 4 gm.

สูตร 8 น้ำตาลโตนด 5 gm.

สูตร 9 Mannitol 1 gm. กับน้ำตาลโตนด 4 gm.

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างเชื้อ (Suspension เชื้อ)

ก. เขี่ยเชื้อจาก stock ลงในอาหารวุ้นแบบเชื้อไว้ 7 วัน ทำให้เชื้อเจือจางโดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารวุ้นแต่ละหลอดใช้ loop เขี่ยเชื้อให้กระจายในน้ำ เขย่าให้เข้ากัน

ข. ใช้ pipet ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูด suspension ของเชื้อในข้อ ก. แต่ละสายพันธุ์ใส่ลงในหลอดน้ำกลั่น ที่บรรจุน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ทำให้เชื้อเจือจางอัตรา 1 : 10

ค. ใช้ pipet ดูด suspension ในข้อ ข. ใส่ในขวดที่มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ประมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่เชื้อขวดละ 0.2 มิลลิลิตร ใส่เชื้อลงไปทุก ๆ treatment โดยกำหนดให้

สูตรอาหารที่ 1 เป็น control และสูตรที่ 2,3,4,5,6,7,8 และ 9 เป็นสูตรที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละ treatment ทำ 6 ซ้ำ

ง. นำขวดที่ใส่เชื้อแล้วไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) ใช้ความเร็ว 100 รอบ/นาที ตรวจผลการเจริญเติบโตของเชื้อในวันที่ 5

2. การวัดการเจริญของเชื้อ

ก. นำเชื้อข้อ ง. มาวัดความขุ่นเชื้อ (O.D.) ด้วยเครื่อง Spectopho

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tometer ใช้ช่วงความยาวคลื่น 430 nm.

ข. นำเชื้ออายุ 5 วันมาทำให้เจือจาง 1 : 1000000 ถึง 10^{-6} ทำทุก ๆ .treatment

ค. ใช้ pipet ดูดเชื้อที่เจือจาง 10^{-6} ของแต่ละ treatment มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร yeast extract congo-red agar

ง. ใช้แท่งแก้วรูปตัว แอล เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหาร

จ. บ่มจานเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเลือกโคโลนีในจานเพาะเชื้อ ที่มีโคโลนีที่ใหญ่ช่วง 30 – 300 โคโลนีเซลโดยเลือกลักษณะโคโลนีที่ใหญ่ เป็นเมือกเยิ้มไม่ดูดสี congo-red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกผลการศึกษา

1. วัดความขุ่นของเชื้อในอาหารเหลว หลังจากใส่เชื้อแล้ว 5 วัน ด้วยเครื่อง Spectophotometer Model 20

2. นับ Colony เชื้อโดยวิธี plate count ในตอนสุดท้ายของการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง

วันเริ่มการทดลอง 15 กันยายน 2525
วันสิ้นสุดการทดลอง 15 " ม 2525
รวมระยะเวลาการทดลอง 90 วัน

สถานที่ทำการทดลอง

ตึกฟิชไร่ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complet Block Design

ทำการทดลอง 6 Replication 9 treatment ดังนี้

Treatment ที่ 1 ใช้ Mannitol 5 gm.

Treatment ที่ 2 ใช้ น้ำตาลทราย 5 gm.

Treatment ที่ 3 ใช้ น้ำตาลทราย 4 gm.+Mannitol 4 gm.

Treatment ที่ 4 ใช้ น้ำตาลมะพร้าว 5 gm.

Treatment ที่ 5 ใช้ น้ำตาลมะพร้าว 4 gm. + Mannitol 1 gm.

Treatment ที่ 6 ใช้ น้ำตาลสีรำ 5 gm.

Treatment ที่ 7 ใช้ น้ำตาลสีรำ 4 gm. + Mannitol 4 gm.

Treatment ที่ 8 ใช้ น้ำตาลโตนด 5 gm.

Treatment ที่ 9 ใช้ น้ำตาลโตนด 4 gm. + Mannitol 1 gm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลว (น้ำตาลชนิดต่าง ๆ) โดยจัดแบ่งอาหารเป็น 9 สูตร (treatment) คือสูตรที่ 1 Mannitol 5 gm. สูตรที่ 2, น้ำตาลทราย 5 gm. สูตรที่ 3, น้ำตาลทราย 4 gm. + Mannitol 1 gm. สูตรที่ 4, น้ำตาลมะพร้าว 5 gm. สูตรที่ 5, น้ำตาลมะพร้าว 4 gm. + Maniitol 1 gm. สูตรที่ 6, น้ำตาลสีรำ 5 gm, สูตรที่ 7, น้ำตาลสีรำ 4 gm. + Maniitol 1 gm. สูตรที่ 8, น้ำตาลโตนด 5 gm. สูตรที่ 9, น้ำตาลโตรนด 4 gm. + Mannitol 1 gm. ซึ่งใช้ศึกษาเชื้อไรโซเบียม 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 301, 302 ของถั่วเขียวสายพันธุ์ 916, 1101 ของถั่วเหลือง, สายพันธุ์ 200, 201 ของถั่วลิสง จากการศึกษาโดยการวัดค่า O.D. หลังจากใส่เชื้อในอาหาร เป็นเวลา 5 วัน ผลปรากฏว่า การเจริญเติบของเชื้อไรโซเบียม ในสูตรอาหารต่าง ๆ (treatment) ก่อให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 2) คือให้ค่า F - Ratio 16.67 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี Duncan's new mutiple Range test ผลปรากฏว่า (ตารางที่ 1) คือ ความผันแปรของสูตรอาหารทั้ง 9 สูตร (treatment) สามารถจัดแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม a ab be bcd de และ e และสูตรอาหารที่มีแนวโน้มว่าการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมที่ดีสุดทั้ง 6 สายพันธุ์ คือสูตรที่ 1 (Maniitol) แต่ยังคาบเกี่ยวอาหารสูตรที่ 2 (น้ำตาลทราย) ส่วนสูตรอาหารที่มีแนวโน้มของการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมต่ำที่สุด คือ สูตรอาหารที่ 8 (น้ำตาลโตนด และสูตรที่ 9 (น้ำตาลโตนด + Mannitol) แต่ยังคาบเกี่ยวอยู่กับสูตรที่ 5 (น้ำตาลมะพร้าว + Mannitol) สูตรที่ 6 น้ำตาลสีรำและสูตรอาหารที่ 7 (น้ำตาลสีรำ + Mannitol)

ผลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าอาหารสูตรที่ 1 Mannitol เชื้อเจริญได้ดีที่สุดเนื่องจากเชื้อไรโซเบียมเป็นบักเตรีที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลพวก Monosac charicle ซึ่งในสูตรอาหารที่ 1 เป็นน้ำตาลพวก Momosaceharide ดังนั้นเชื้อจึงจะเจริญได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนอาหารสูตรที่วิเคราะห์ว่าเชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดคือ อาหารสูตรที่ 8 คือน้ำตาลโคนด ซึ่งเป็นน้ำตาลพวก Disaccharide การเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตได้ช้า ทั้งนี้เพราะเชื้อไรโซเบียมต้องใช้เอนไซม์ ย่อยสลายน้ำตาลพวก Disaccharide ให้เป็นน้ำตาลพวก Monosaccharide อีกทีหนึ่ง ก่อนที่เชื้อไรโซเบียมจะนำมาเป็นอาหารได้ และอีกประการหนึ่งอาจเป็นเพราะว่า น้ำตาลชนิดอื่น ๆ อาจมีสารเคมีบางชนิดและกรรมวิธีในการผลิตใส่สารกันบูดลงไปในน้ำตาลด้วยก็ได้ เพื่อให้คุณภาพของน้ำตาลชนิดนั้น ๆ อยู่ได้นานในการจำหน่ายในท้องตลาด

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อศึกษาปริมาณโคโลนีของเชื้อไรโซ-เบียม นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Mannitol yeast Gxtract congo-red agar ตามตารางที่ 3 นั้น เชื้อ 6 สายพันธุ์ หลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อมาแล้วในอาหารเหลว โดยตรวจนับปริมาณโคโลนีในวันที่ 5 หลังจากเลี้ยงบนอาหารแข็ง จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4) ผลปรากฏว่า จำนวนโคโลนีที่ขึ้นได้บนอาหารแข็ง ไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติ คือให้ค่า F - Ratio 1.39 แต่มีแนวโน้มว่าปริมาณโคโลนีใน treatment ที่ 1 Mannitol จำนวนโคโลนีของเชื้อไรโซเบียมมากที่สุด โดย treatment ที่ 3 > treatment ที่ 6 > treatment ที่ 4,> treatment ที่ 7,> treatment ที่ 5,> treatment ที่ 8,> tratment ที่ 2 treatment > ที่ 9, คือ 28.17, 23.11, 20.06, 19.11, 18.33, 17.90, 16.12, 15.25 และ 12.55 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผล

จากการทดลองใช้น้ำตาลทั้ง 9 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมพบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมในอาหารน้ำตาล สูตรที่ 1 คือ Mannitol สามารถทำให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ ส่วนอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งใช้น้ำตาลทรายพบว่า เชื้อไรโซเบียมสามารถเจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกับอาหาร Mannitol แต่ถ้าพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตก็จะเห็นว่าสูตรที่ 1 นั้นเป็นอาหารที่มี Mannitol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีราคาแพง ฉะนั้นในการที่จะผลิตเชื้อไรโซเบียมในรูปอุตสาหกรรมไม่ควรใช้ Mannitol เมื่อมีน้ำตาลชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อโดยเชื้อเจริญได้ใกล้เคียงกับ Mannitol โดยเฉพาะน้ำตาลทรายซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีราคาถูก และหาได้ง่ายในท้องตลาด ซึ่งจะเห็นได้ว่า น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันทางด้านราคา แต่ในการที่จะนำมาใช้เลี้ยงเชื้อไรโซเบียมให้ผลไม่แตกต่างกันเลยส่วนน้ำตาลชนิดอื่นจากการทดลอง เช่น น้ำตาลสีรำ, น้ำตาลโตนด, น้ำตาลมะพร้าว การเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควรเพราะอาจเนื่องมาจากหลายเหตุ เช่น เราไม่ทราบกรรมวิธีการผลิต และอาจมีสารพิษบางอย่างปะปนมาในน้ำตาลจึงทำให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร

100584

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. นันทกร บุญเกิด, วรวิชญ์ รุงรัตนกสิน และปรีชา วดีศิริศักดิ์. 2517. การคัดสายพันธุ์บักเตรีปมรากถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน รายงานผลการทดลองของพืชน้ำมัน, กรมวิชาการเกษตร 321 หน้า.

2. บัณฑิต ตันศิริ, เย็นใจ วสุวัต และสมศักดิ์ วังใน. 2517. ไรโซเบียมที่เหมาะสมกับถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ.2 เมื่อปลูกในดินโคราช. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ 8 : 19-12

3. ปรีชา วดีศิริศักดิ์, สมศักดิ์ โคตรพงษ์ และนันทกร บุญเกิด. 2521. การคัดสายพันธุ์บักเตรีปมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพสูง ในการตรึงไนโตรเจน และเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ.4 ในสภาพที่ไม่มีการปรับปรุงมาก. รายงานประจำปี. กรมวิชาการเกษตร 820. หน้า

4. เย็นใจ วสุวัต. 2523. การปลูกถั่วเหลือง, เอกสารวิชาการเล่ม 3 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 86 หน้า

5. สมศักดิ์ วังใน. 2516. การตรึงไนโตรเจนไรโซเบียม – พืชตระกูลถั่ว ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. 139 หน้า.

6. สมศักดิ์ วังใน, และสายพิน พรหวีวัฒน์. 2520. การปรับปรุงอาหารสำหรับการผลิตเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ CB – 238 และ S –18 เป็นอุตสาหกรรม รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลือง. สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ 238 – 248 หน้า.

7. สมศักดิ์ วังใน. 2525. การตรึงไนโตรเจน ไรโซเบียม – พืชตระกูลถั่ว. ภาควิชาปฐพีวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 283 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. แสวง รวยสูงเนิน และสมศักดิ์ วังใน. 2518. ฤทธิ์พลของคาร์บอน และประสิทธิภาพของไรโซเบียมสายพันธุ์ S – 18. การประชุมวิชาการครั้งที่ 14 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48 หน้า.

9. Bisset, K.A. 1959. Some Characters of Rhizobium Strain From Tropical Legumes. J. Gen Microbiol. 20 : 89 - 90.

10. Breed, R.S.,E.G.D. Murray and N.S. Smith. 1957. Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology, 7th ed. Baltimore: William and Wilkins Company.

11. Buchanan, R.E.,N.E. Gibbsons; S.T. Cowan;Jor Holt J. Liston; RGE Murray; CF Niven: A.W. Ravin; and R.Y. Strainer. 1974. Bergey's Manual of Determinative. Bacteriology. 8th ed. Baltimore: The William and Wilkins Company.

12. Borton, J.C. 1965. The Rhizobium Legume Association Microbiology and Soil Fertility. Oregon State University Press.

13. Damery, J.T. and M. Alexander. 1968. Physiology Difference Between Effective and Ineffective Strains of Rhizobium Soil Science. 108 : 209 - 216.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Date, R.A. 1970. Microbiological Problems in the Inoculation and Modulation of Legumes. Plant and Soil. 32 : 703 - 725

15. Graham, P.H. 1964. The Application of Computor Technique to the Taxonomy the Root Nodule bacteria of Legumes J. Gen Microbiol. 35 : 511 - 517.

16. Norris, D.O. 1965. Acid Production by Rhizobium A Unifying Concept. Plant and Soil 22 : 143 - 166.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเชื้อใน Rhizobium จากค่า O.D. ในอาหารเหลว

Treatment	Block (ซ้ำ)						ผลรวม	เฉลี่ย
	I (เขียว 301)	II (เขียว 302)	III (เหลือง 916)	IV (เหลือง1101)	V (ลิสง 200)	VI (ลิสง 201)		
I	0.665	0.767	0.802	0.76	0.752	0.762	4.508	0.751 (a)
II	0.656	0.755	0.653	0.455	0.727	0.649	3.887	0.647 (ab)
III	0.586	0.613	0.692	0.354	0.644	0.697	3.586	0.597 (bc)
IV	0.516	0.657	0.634	0.429	0.535	0.586	3.357	0.559 (bed)
V	0.428	0.638	0.520	0.354	0.38	0.441	2.761	0.460 (de)
VI	0.476	0.431	0.331	0.310	0.43	0.591	2.569	0.488 (de)
VII	0.498	0.379	0.303	0.428	0.516	0.514	2.638	0.439 (de)
VIII	0.553	0.353	0.256	0.330	0.351	0.456	2.299	0.383 (e)
IX	0.404	0.454	0.396	0.302	0.484	0.355	2.395	0.399 (e)
ผลรวมซ้ำ	4.782	5.047	3.722	4.587	4.819	5.043	28	0.518 (GM)

ตารางที่ 2 วิเคราะห์ค่า O.D. ของหรือไรโซเบียมที่วัดจากอาหารเหลว (น้ำตาลชนิดต่าง ๆ)

Source of variation	d.f	SS	MS	F-ratio
Replication	5	0.136	0.027	4.5** 2.45 3.51
treatment	8	0.775	0.097	16.167** 2.18 2.99
Error	40	0.237	0.006	
Total	53	1.148		

C.V. = 14.95%

L.S.D. = 0.10

$L.S.D._{01}$ = 0.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณโคโลนีไรโซเบียมในอาหารเหลว 9 สูตร (น้ำตาลชนิดต่าง ๆ) ที่นำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง

Treatment	Block (สายพันธุ์) Replication						Total	เฉลี่ย
	I (เขียว301)	I[I] (302เขียว)	III (เหลือง916)	IV (เหลือง1101)	V (ลิสง200)	VI (ลิสง201)		
I	70.67	10.67	30.33	17.67	26.33	13.33	169	28.17
II	12.00	9.2"	13.63	14.67	12.67	29.33	91.5	15.25
III	29.33	14.00	19.67	26.67	14.33	34.66	138.66	23.11
IV	24.00	12.33	11.00	16.67	33.33	17.33	114.66	19.11
V	35.00	10.33	12.09	23.00	12.66	14.33	107.41	17.90
VI	16.67	32.33	10.00	12.33	15.67	33.33	120.33	20.06
VII	15.33	12.33	18.33	20.00	15.33	28.67	109.99	18.33
VIII	15.00	10.67	27.00	23.63	10.00	11.00	97.00	16.17
IX	10.66	12.33	16.00	13.33	13.00	10.03	75.32	12.55
Total	228.66	124.19	158.05	167.67	153.32	191.98	1023.87	18.89
X^2	8651.03	2116.36	3180.75	3333.71	3079.87	4899.39		

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ปริมาณโคโลนีไรโซเบียมในอาหารเหลว (น้ำตาลชนิดต่างๆที่นำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง)

Source of variation	df	SS	MS	F-ratio
Rep-SS.	5	716.30	143.26	1.39 NS
treatment	8	1004.01	125.50	1.22 NS
Error	40	4127.66	103.19	
Total	53			

C.V. = 53.57 %

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารน้ำยาลชนิดต่าง ๆ (จำนวนเซล/ 1 ซซ.)

Treatment (สูตรอาหาร)	Block (สายพันธุ์)					
	I ถั่วเขียว301	II ถั่วเขียว302	III ถั่วเหลือง916	IV ถั่วเหลือง1101	V ถั่วลิสง200	VI ถั่วลิสง201
I	70.67×10^6	10.67×10^6	30.33×10^6	17.67×10^6	26.33×10^6	13.33×10^6
II	12.00×10^6	9.20×10^6	13.63×10^6	14.67×10^6	12.67×10^6	29.33×10^6
III	29.33×10^6	24.00×10^6	19.67×10^6	26.67×10^6	14.33×10^6	34.66×10^6
IV	24.00×10^6	12.33×10^6	11.00×10^6	16.67×10^6	33.33×10^6	17.33×10^6
V	35.00×10^6	10.33×10^6	12.09×10^6	23.00×10^6	12.66×10^6	14.33×10^6
VI	16.67×10^6	32.33×10^6	10.00×10^6	12.30×10^6	15.67×10^6	33.33×10^6
VII	15.33×10^6	12.33×10^6	18.33×10^6	20.33×10^6	15.33×10^6	28.67×10^6
VIII	15.00×10^6	10.67×10^6	27.00×10^6	23.63×10^6	10.00×10^6	11.03×10^6
IX	10.66×10^6	12.33×10^6	16.00×10^6	13.33×10^6	13.00×10^6	10.03×10^6
Total						

สูตรอาหารวุ้น

- K_2HPO_4 0.5 gm.
- $MgSO_4 7H_2O$ 0.2 gm.
- NaCl 0.1 gm.
- Yeast Gxtract 0.5 gm.
- Mannitol 10.0 gm.
- วุ้น 10 gm.
- $CaCO_3$ 3.0 gm.
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- Congo - red 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเหลว

สูตรที่ 1

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $MgSO_4 7H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast Extract 0.25 gm.
- Mannitol 5 gm.
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_4 7H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast Extract 0.25 gm.
- น้ำตาลทราย 5.0 gm.
- น้ำกลั่น 500 ml.

สูตรที่ 3

- K_2Hpo_4 0.25 gm.
- $MgSO_4 7H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast Extract 0.25 gm.
- Mannitol 1 gm. + น้ำตาลทราย 4.0 gm.
- น้ำกลั่น 500 ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 4

- K_2HpO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_47H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast + Gxtract 0.25 gm.
- น้ำตาลมะพร้าว 5.0 gm.
- น้ำกลั่น 500 M.L.

สูตรที่ 5

- K_2HpO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_47H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- yeast Gxtract 0.25 gm.
- Mannitol 1.0 gm. + น้ำตาลมะพร้าว 4.0 gm.
- น้ำกลั่น 500 M.L.

สูตรที่ 6

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_47_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast Gxtract 0.25 gm.
- น้ำตาลสีรำ 5.0 gm.
- น้ำกลั่น 500 M.L. (1/2 ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 7

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_4 7H_2O$ 0.70 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yest Gxtract 0.25 gm.
- Mannitol 1.0 gm. +น้ำตาลสีรำ 4 gm.
- น้ำกลั่น 500 ml.

สูตรที่ 8

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_4 7H_2O$ 0.10 gm.
- NaCl 0.50 gm.
- yeast Gxtract 0.25 gm.
- น้ำตาลโตนด 5.0 gm.
- น้ำกลั่น 5.0 gm.

สูตรที่ 9

- K_2HPO_4 0.25 gm.
- $Mg_2SO_4 7H_2O$ 0.10 hm.
- NaCl 0.50 gm.
- Yeast Gxtract 0.25 gm.
- Mannitol 1 gm. + น้ำตาลโตนด 4 hm.
- น้ำกลั่น 500 Ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้