1181

ใบรับรองปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาปฐพีวิทยา

เรื่อง

การตรวจสอบหาเชื้อไรโซเบียมในดิน โดยวิธี 'Plant - infection test'

Evaluation of Indigenous Rhizobium Populations

in Soils by Plant - Infecton Test.

โดย

นางสาว รัชดา ชาญตีสิงห์

นางสาว อมรรัตน์ โสมกลาง

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา .....

(รศ.ดร. สุมิตรา ภู่วโรดม)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. สุมิตรา ภู่วโรดม)

หัวหน้าภาควิชาปฐพีวิทยา

ปพ.
ส331ก
2536

วันที่ 19 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2537

14386

การตรวจสอบหาเชื้อไรโซเบียมในดิน โดยวิธี 'Plant - infection test'

Evaluation of Indigenous Rhizobium Populations in Soils by Plant - Infection Test.

T099761

โดย

นางสาว รัชดา ชาญติสิงห์
นางสาว อมรรัตน์ โสมกลาง

เสนอ

ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ปฟ.
ร331ก
2536

ธนพนู.....
เลขทะเบียน 99761
วัน,เดือน,ปี.....

พ.ศ. 2536

ปัญหาพิเศษฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ถ้าปราศจากความกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำของ รศ.ดร สุมิตรา ภู่วโรดม อาจารย์ภาควิชา ปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง สำหรับความช่วยเหลือมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล ที่กรุณาช่วยถ่ายภาพประกอบในปัญหาพิเศษ

ขอขอบพระคุณ คุณนุจรี บุญแปลง เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ และ คุณสำราญ ช้างน้อย ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณเสิศชาย หนูพลาย และคุณวุฒิชัย มีโพธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องคอมพิวเตอร์ และเครื่องพิมพ์สำหรับพิมพ์ และ พี่ เพื่อน น้อง ๆนักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาปฐพีวิทยา ที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทดลองนี้ทุกคน

ความดีและประโยชน์อื่นใดที่จะได้รับจากปัญหาพิเศษฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้มีพระคุณอย่างสูงสุด พี่และน้องซึ่งสนับสนุนและให้กำลังใจมาตลอดระยะเวลาการศึกษา และคณาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อตรวจสอบเชื้อไรโซเบียมในดินแต่ละแหล่งโดยวิธี 'Plant - infection test' ในการทดลองทำ Serial dilution ของดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ 9 แหล่ง คือ ดินจากแปลงปลูกอ้อย และ ดินจากแปลงปลูกข้าว จ. กำแพงเพชร, ดินจากแปลงปลูกถั่วและปลูกหญ้า จ. นครสวรรค์, ดินจากแปลงปลูกยาง และ ดินจากแปลงปลูกปาล์ม จ. ชุมพร, ดินจากแปลงปลูกข้าวโพด จ. พิจิตร, ดินจากแปลงปลูกข้าว และ ดินจากแปลงปลูกหญ้า จ. สุโขทัย, ดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา (ทำการเก็บ 2 ช่วงคือ ช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2536 และช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537) และเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (control)

นำดินที่ได้มาทำ serial dilution มา inoculate ในถั่วเซนโตรซีมา ที่ปลูกใน Niftal tubes และ Gibson tubes โดยแต่ละ dilution ทำการ inoculate 3 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่า ดินจากแปลงปลูกอ้อย และ ดินจากแปลงปลูกข้าว จ. กำแพงเพชร, ดินจากแปลงปลูกยาง จ. ชุมพร, ดินจากแปลงปลูกข้าว และ ดินจากแปลงปลูกหญ้า จ. สุโขทัย, ดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา มีเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมาอยู่ในดิน ส่วนดินจากแปลงปลูกถั่วและปลูกหญ้า จ. นครสวรรค์, ดินจากแปลงปลูกปาล์ม จ. ชุมพร, ดินจากแปลงปลูกข้าวโพด จ. พิจิตร ไม่มีเชื้อไรโซเบียม ระยะเวลาในการเกิดปมจะแตกต่างกัน คือ การปลูกใน Niftal tubes จะใช้ระยะเวลาในการเกิดปมได้เร็วกว่าและดีกว่าการปลูกใน Gibson tubes นอกจากนี้ลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมาใน Niftal tubes ยังสามารถเจริญได้ดีกว่าใน Gibson tubes ซึ่งสังเกตได้จาก ส่วนของลำต้นและใบจะมีสีเขียวกว่า ปมจะมีขนาดใหญ่กว่าและปริมาณมากกว่าด้วย

การคำนวณหาปริมาณไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant(MPN) ของดินตัวอย่างที่มีเชื้อไรโซเบียมดังกล่าว พบว่า ดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา มีปริมาณไรโซเบียมมากที่สุด โดยพิจารณาจากค่า MPN และดินที่เก็บมาช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2536 จะมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมมากกว่าที่เก็บมา ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ คือ 2.3×10^4 ต่อกรัมดินเปียก กับ 2.53×10^4 ต่อกรัมดินแห้ง สำหรับในช่วงแรก และ 2.3×10^4 ต่อกรัมดินเปียก กับ 2.4×10^4 ต่อกรัมดินแห้ง ในช่วงหลังตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดนั่นเอง

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญตารางภาคผนวก	ข
สารบัญภาพ	ง
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการทดลอง	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	8
ผลการทดลอง	13
สรุปผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	24

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงผลการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกแบบ Niftal tubes	14
ตารางที่ 2	แสดงผลการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกแบบ Gibson tubes	14
ตารางที่ 3	แสดงค่า MPN ของดินแต่ละตัวอย่าง (คำนวณต่อกรัมดินเปียก)	17
ตารางที่ 4	แสดงค่า MPN ของดินแต่ละตัวอย่าง (คำนวณต่อกรัมดินแห้ง)	18

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางผนวกที่ 1	Cross - inoculation groups and *Rhizobium* - Legumes Associations.	25
ตารางผนวกที่ 2	แสดงการจำแนกไรโซเบียมในระบบใหม่	26
ตารางผนวกที่ 3	Estimate of Rhizobium numbers obtained by methods of calculation from ten - fold serial dilutions with three tubes at each level.	27
ตารางผนวกที่ 4	N - free Nutrient Solution (Broughton and Dilworth,1970)	28
ตารางผนวกที่ 5	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 1 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal	29
ตารางผนวกที่ 6	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 1 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson	30
ตารางผนวกที่ 7	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 2 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal	31
ตารางผนวกที่ 8	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 2 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson	32
ตารางผนวกที่ 9	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 3 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal	33
ตารางผนวกที่ 10	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 3 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson	33
ตารางผนวกที่ 11	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 4 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal	34
ตารางผนวกที่ 12	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 4 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson	35
ตารางผนวกที่ 13	แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 5 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal	36

หน้า

ตารางผนวกที่ 14 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 5 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 36

ตารางผนวกที่ 15 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 6 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal 37

ตารางผนวกที่ 16 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 6 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 37

ตารางผนวกที่ 17 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 7 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal 38

ตารางผนวกที่ 18 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 7 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 39

ตารางผนวกที่ 19 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 8 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal 40

ตารางผนวกที่ 20 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 8 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 41

ตารางผนวกที่ 21 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (a) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal 42

ตารางผนวกที่ 22 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (a) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 43

ตารางผนวกที่ 23 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (b) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal 44

ตารางผนวกที่ 24 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (b) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson 45

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	เปรียบเทียบจำนวนปมและลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเขนโตรซีมา ในหลอด Niftal และ Gibson ที่ใส่เชื้อลงไป	46
ภาพที่ 2	เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมของถั่วเขนโตรซีมาในหลอด Niftal และ Gibson ที่ใส่เชื้อลงไป	47
ภาพที่ 3	เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเขนโตรซีมาใน Niftal tubes ที่ใส่เชื้อ กับ ไม่ใส่เชื้อ	48
ภาพที่ 4	เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมที่รากของถั่วเขนโตรซีมาใน Niftal tubes ใส่เชื้อ กับ ไม่ใส่เชื้อ	49
ภาพที่ 5	เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเขนโตรซีมาใน Gibson tubes ที่ไม่ใส่เชื้อ กับ ใส่เชื้อ	50
ภาพที่ 6	เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมที่รากของถั่วเขนโตรซีมาใน Gibson tubes ที่ไม่ใส่เชื้อ กับ ใส่เชื้อ	51

คำนำ

เชื้อไรโซเบียม เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในปมรากถั่วซึ่งจะทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่ว เชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเซนโตรซีมา จัดอยู่ในกลุ่ม cowpea group ในการจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามแบบ Cross - inoculation group เชื้อไรโซเบียมในกลุ่ม cowpea group ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว และถั่วเดสโมเดียม เป็นต้น แต่เดิมนักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่าเชื้อในกลุ่ม cowpea นี้ไม่มีความเฉพาะเจาะจงอย่างแท้จริงกับพืชตระกูลถั่ว คือสามารถเกิดปมได้กับเชื้อไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ ต่อมาได้มีรายงานว่าความเชื่อนี้ไม่เป็นความจริงเสมอไป เพราะถั่วเซนโตรซีมา ถึงแม้จะเกิดปมได้จากเชื้อไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ก็ตาม แต่ประสิทธิภาพในการเกิดปมจะต่ำและปมที่เกิดก็ตรึงไนโตรเจนได้ไม่ดีเท่าที่ควร และได้มีการทำการทดลองพบว่า ในดินทั่วๆ ไปก็ใช่ว่าจะมีเชื้อไรโซเบียมอยู่ วิธีการหนึ่งที่จะใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไรโซเบียมในดิน และประสิทธิภาพในการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม คือ Plant - infection test วิธีการนี้ได้ใช้พืชตระกูลถั่วเป็นพืชทดสอบ แล้วทำการ inoculate ดินตัวอย่างลงไป หากดินตัวอย่างใดมีเชื้อไรโซเบียมอยู่ก็จะทำให้รากถั่วเกิดปม

ดังนั้นในงานการทดลองนี้ จึงทำขึ้นเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไรโซเบียมในดินแหล่งต่างๆ โดยวิธี Plant - infection test โดยดินที่ใช้นั้นเป็นดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และพืชที่ใช้ทดสอบคือ ถั่วเซนโตรซีมา เพื่อเป็นการยืนยันถึงความเฉพาะเจาะจงของเชื้อไรโซเบียม และให้รู้ว่าในดินโดยทั่วๆ ไปไม่ได้มีเชื้อไรโซเบียมอยู่ด้วย

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1 ศึกษาเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไรโซเบียมในดินตัวอย่างแต่ละแหล่ง โดยวิธี 'Plant - infection test'

2 ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา โดยวิธีการปลูกแบบ Niftal tubes และ Gibson tubes

3 คำนวณและประเมินหาค่า MPN ของดินที่มีเชื้อไรโซเบียม โดยวิธีของ Brockwell

ตรวจเอกสาร

ถั่วเซนโตรซีมา หรือ ถั่วลาย (Centrosema or butterfly pea)

เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้ในแถบร้อน อเมริกากลาง และหมู่เกาะคาริบเบียน พบขึ้นทั่วไปตามทุ่งหญ้าธรรมชาติ ตลอดจนริมแม่น้ำรวมทั้งข้างถนน แล้วจึงถูกนำเข้ามาในเอเชียตอนใต้เพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดิน และเป็นปุ๋ยพืชสด ต่อมาก็แพร่กระจายไปทั่ว และใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ และกลายเป็นพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ในปัจจุบันถั่วเซนโตรซีมามีอยู่ 2 พันธุ์ที่ใช้ในการทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ คือ พันธุ์ดั้งเดิม (common centro) และพันธุ์เบลแลลโต (belalto) (Grof and Harding, 1970)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถั่วเซนโตรซีมามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pubescens*

ชื่ออังกฤษ Centro

ชื่อไทย ถั่วลาย, ถั่วเซนโตรซีมา หรือ ถั่วเซนโตร

ถั่วเซนโตรซีมา อยู่ใน genus *Centrosema* มีอยู่หลาย species ที่มีการทดลองปลูกเป็นอาหารสัตว์ แต่ที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ species *pubescens* ถั่วลายหรือถั่วเซนโตรเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นเถาเลื้อย 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) สีขาวและมีสีม่วงบริเวณโคนกลีบดอก ดอกยาว 1 - 3.5 เซนติเมตร กว้าง 2 - 3 เซนติเมตร ฝักจะแบนและหนายาวประมาณ 4 - 17 เซนติเมตร ขอบฝักมีสันนูนมีลายสีดำ (Grof and Harding, 1970; อารีย์, 2526)

ลักษณะทั่วๆ ไป

ถั่วเซนโตรซีมาจัดเป็นพวกที่มีลักษณะการเจริญแบบเลื้อยพันกับสิ่งที่อยู่ใกล้ (trailing or twining legumes) ออกรากตรงข้อที่สัมผัสกับดิน แต่ถ้าปลูกร่วมกับหญ้าและไม่ได้ทำการตัดหรือไม่ได้ปล่อยให้สัตว์เข้าเล็มเป็นเวลานานๆ ต้นถั่วก็จะเกี่ยวพันกับหญ้าและชูส่วนยอดขึ้นเพื่อรับแสงสว่าง ส่วนอื่นๆ ก็จะแผ่ปกคลุมพื้นดิน ซึ่งเป็นการช่วยขจัดปัญหาเกี่ยวกับเรื่องวัชพืช และรักษาคุณภาพของดินไว้ได้อย่างดี (Humphreys, 1978 and 1980; บุญฤา, 2526)

ถั่วเซนโตรซีมาเป็นพืชที่ชอบดินชื้น และภูมิอากาศร้อนชื้น ทนแล้งได้พอใช้และขึ้นได้ดีในบริเวณที่ได้รับฝนเฉลี่ย 1,500 มิลลิเมตรขึ้นไป แต่ในบริเวณที่แห้งแล้งก็สามารถขึ้นได้ แต่การเจริญเติบโตไม่ดีนัก ใบมักจะร่วง แต่ยังคงมีชีวิตอยู่ได้แล้วจะเจริญใหม่เมื่อมีฝน

ถั่วเซนโตรซีมาขึ้นได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย (อารีย์, 2526) จัดเป็นพืชวันสั้น เพราะมีการตอบสนองต่อช่วงกลางวันสั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือช่วง 12.8 - 25.6 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการทนแล้งได้ดี ขึ้นได้ดีในดินกรด และดินที่มีการระบายน้ำดี แต่ไม่ทนทานต่อสภาพน้ำขังต่อเนื่อง (ชาญชัย, 2518; บุญฤา, 2523)

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ของถั่วเซนโตรซีมาก็เหมือนกับถั่วเขตร้อนชนิดอื่น โดยถั่วเซนโตรซีมาจะเริ่มมีปมภายหลังจากการงอกแล้ว ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ เท่าที่มีรายงานปรากฏดังนี้ ในการทำทุ่งหญ้าผสมสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 138 - 280 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปี และมีโปรตีนรวมประมาณ 23 เปอร์เซนต์ในช่วงของฤดูการเจริญเติบโต และประมาณ 15 เปอร์เซนต์ในช่วงฤดูหนาว (Andrew and Robin, 1969)

ไรโซเบียม (Rhizobium spp.)

บุคคลแรกที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในปมรากถั่วได้สำเร็จ คือ Beijerinck (1988) และได้ให้ชื่อว่า ไรโซเบียม

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ที่อาศัยอยู่ในดิน มีความสามารถพิเศษในการเข้าสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่วได้ จัดอยู่ใน

Division *Protophyta*

Class *Schizomycetes*

Order *Eubactriales*

Family *Rhizobiaceae*

Genus *Rhizobium*

ไรโซเบียมมีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) มีขนาดกว้างประมาณ 0.5 - 0.9 μm ยาว 1.2 - 3.0 μm. เป็นพวกแกรมลบ (gram negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ในบางกรณีจะอยู่ในลักษณะรูปร่างทรงกลม (cocci) หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) เมื่ออาศัยอยู่ในปมรากถั่วหรืออาจมีลักษณะเป็นแบคทีรอยด์ (bacteroid) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้ง x-shaped, y-shaped, star-shaped, pear-shaped และ club-shaped ปะปนกันอยู่ ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) แต่ในบางครั้งก็สามารถ

อาศัยอยู่ในที่ที่มีอากาศน้อยเพียง 0.01 บรรยากาศได้ เคลื่อนไหวโดยใช้แส้ (flagella) ซึ่งมีทั้งแบบ monotrichous และ peritrichous

โดยปกติแล้วไรโซเบียมจะมีลักษณะแตกต่างกันเป็น 2 พวกใหญ่ๆ เมื่อพิจารณาจากการเจริญเติบโต คือ พวกที่เจริญเติบโตเร็ว (fast-growers) ที่มีการแบ่งตัวทุก ๆ 1 - 3 ชั่วโมง จะได้โคโลนีที่มีขนาดใหญ่ และเห็นได้ภายใน 2 - 4 วัน ส่วนอีกพวกหนึ่งจะเป็นพวกที่มีการเจริญเติบโตช้า (slow-growers) มีการแบ่งตัวทุกๆ 4 - 8 ชั่วโมง ให้โคโลนีขนาดเล็กจะปรากฏให้เห็นได้ในเวลา 5 - 8 วันบนอาหารวุ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไรโซเบียมอยู่ระหว่าง 28 - 30 องศาเซลเซียส (Alexander, 1961; สมศักดิ์, 2521)

การจำแนกเชื้อไรโซเบียม สามารถทำได้หลายวิธี แต่โดยทั่วไปที่นิยมใช้คือ จำแนกตามความสามารถในการทำให้เกิดปมที่รากถั่วว่ามีความสัมพันธ์กันกับถั่วกลุ่มใด ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า Cross-inoculation group หรือ Plant-inoculation group คือ ไรโซเบียมแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจง (specific) ต่อชนิดหรือกลุ่มของถั่วต่างกันไป (Buchanan et al., 1974 and Rao, 1977a) การแบ่ง species ของไรโซเบียมในกลุ่มต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางผนวกที่ 1 (Burton, 1965) ในบางกรณีไรโซเบียมก็สามารถเกิดปมกับพืชตระกูลถั่วต่างกลุ่มกันได้ (Wilson, 1944) ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Symbiotic promiscuity แต่ปมจะเป็นชนิดที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหรือไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของไรโซเบียมและชนิดของถั่ว (Elmes, 1976; Johnson and Beringer, 1976; Wilson, 1944)

ทางด้านสรีระวิทยาและพันธุกรรมของไรโซเบียม ได้มีผู้ค้นคว้าและพบว่าไรโซเบียมในกลุ่มพืชเดียวกันมีความสามารถแตกต่างกันเป็นอันมาก จึงได้การจำแนกไรโซเบียมออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ พวกที่มีการเจริญเติบโตเร็ว (fast-growers) และพวกที่มีการเจริญเติบโตช้า (slow-growers) และภายใน 2 กลุ่มนี้ก็แบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ดังตารางผนวกที่ 2 จะเห็นว่าตามวิธีการที่จัดใหม่นี้ ไรโซเบียมที่เข้ากับถั่วเหลืองจะมีได้ทั้งพวกที่เจริญเติบโตเร็วและเจริญเติบโตช้า แต่ถ้าเป็นการจัดตามวิธีเก่านั้นจะพิจารณาแต่เฉพาะชนิดที่เจริญเติบโตช้าเท่านั้น

การประเมินหาปริมาณหรือจำนวนไรโซเบียมในดิน สามารถกระทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน เนื่องจากในดินมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกนอกเหนือจากไรโซเบียมอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะพวกที่มีลักษณะทางสรีระคล้ายคลึงกับของไรโซเบียม จึงเป็นผลทำให้การประเมินหาปริมาณของไรโซเบียม เป็นไปได้ค่อนข้างยุ่งยากเมื่อเทียบกับการประเมินหาปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่สามารถค้นหาอาหารเฉพาะสำหรับไรโซเบียมได้ การประเมินหาปริมาณไรโซเบียมทั้งหมด

(total population) โดยวิธี 'Plate-count' จึงกระทำได้ยากและได้ผลไม่แน่นอน เนื่องจากการแยกนับโคโลนีของไรโซเบียมในขณะที่มีโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดอื่นขึ้นปะปนอยู่ด้วยนั้นกระทำได้ยาก ในปัจจุบันการประเมินหาปริมาณของไรโซเบียมทั้งหมดในดิน มักนิยมใช้วิธี 'Plant - Infection Test' ซึ่งเป็นการประเมินโดยการทำ Serial dilution ของดินแล้วนำไปใส่ (inoculate) ในพืชทดสอบ (ต้นถั่ว) ที่กำลังเจริญแล้ว ประเมินปริมาณไรโซเบียมจากจำนวนปมที่เกิดขึ้นที่บริเวณราก โดยอาศัยสมมติฐานที่ว่า **"ปมหนึ่งปมที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากการเข้าสู่รากและการทำให้เกิดปมของเซลล์ไรโซเบียม หนึ่งเซลล์"** แต่เนื่องจากไรโซเบียมมีหลายสายพันธุ์ ฉะนั้นการประเมินปริมาณทั้งหมดของไรโซเบียมในดินจำเป็นต้องใช้พืชทดสอบคือ พืชตระกูลถั่วที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำๆ คือ สามารถให้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในดินเข้าสู่รากและทำให้เกิดปมได้ ส่วนการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมในดินเฉพาะสายพันธุ์ สามารถกระทำได้โดยใช้พืชทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ไรโซเบียมนั้นๆ

ในกรณีการเลือกใช้พืชทดสอบนั้น ตามความเป็นจริงแล้วไม่น่าจะมีความจำเป็นเท่าไรนัก เนื่องจากว่าถ้าจะทำการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วชนิดใดๆ ก็น่าจะใช้ถั่วชนิดนั้นๆ เป็นพืชทดสอบและใช้เมล็ดถั่วนั้นๆสำหรับการทดสอบได้เลย นอกจากนี้ในการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมนั้น โดยทั่วไปส่วนใหญ่จะเป็นการประเมินโดยใช้ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ทั้งยังต้องทำการทดลองติดต่อกันเป็นประจำ ดังนั้น เครื่องปลูก วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ จำเป็นจะต้องมีขนาดเล็กและเหมาะสม ซึ่งจะเห็นได้จากการประเมินที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ จะเป็นการประเมินการเกิดปมในหลอดแก้วหรือในกล่องขนาดเล็ก ที่บรรจุด้วยอาหารวุ้นหรือ vermiculite ผสมกับอาหารพืช ซึ่งเป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยเป็นการรวมเอา การทำ serial dilution กับ plant - infection technique เข้าไว้ด้วยกัน แนวความคิดนี้ เป็นของ Bonish (1979) เรียกว่า 'whole - soil inoculation' (Brockwell, Holliday and Pilka 1988)

การประเมินหาปริมาณไรโซเบียม โดยใช้หลอดแก้วบรรจุอาหารวุ้นนั้น หมายถึงให้พืชทดสอบเจริญใน Gibson tube (1963) ซึ่งก็คือหลอดแก้วที่บรรจุอาหารพืช (ในที่นี้ใช้ N - free nutrient solution) ที่เอียงให้ได้ความชัน (slope) ที่เหมาะสม ทำให้มีพื้นที่ผิวของอาหารวุ้นสำหรับการเจริญและการแพร่กระจายของรากพืชทดสอบพอสมควร เพื่อให้การหยั่งลึกลงไปได้ของรากพืชทดสอบสะดวกขึ้น นอกจากนี้ควรพิจารณาสัดส่วนของปริมาณอาหารวุ้นควรจะเตรียมให้เหมาะสมต่อความง่ายในการหยั่งลึกของรากพืชทดสอบด้วย

ส่วนการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมโดยใช้หลอดแก้วที่บรรจุ vermiculite ผสมกับอาหารพืชนั้น เรียกโดยย่อว่า Niftal ซึ่งวิธีนี้จะใช้สารละลายธาตุอาหารพืช คือ N - free nutrient เหมือนกับที่ใช้ใน Gibson tube แต่ใช้ปริมาตรต่างกันและใช้กระดาษฟางหรือกระดาษเช็ดมืออย่างหนาเป็นส่วนที่ให้รากพืชทดสอบฝังและหยั่งลึกลงด้านล่าง ทั้งนี้จะต้องให้ส่วนของพืชที่ยังเป็นเมล็ด อยู่ต่ำกว่าผิว vermiculite ประมาณ 2 มิลลิเมตร กล่าวกันว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีเดิมที่ใช้ Gibson tube เพราะได้มีการปรับปรุงการหมุนเวียนของอากาศภายในหลอดทดสอบให้ดีขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างดินจากจังหวัด กำแพงเพชร, ฉะเชิงเทรา, นครสวรรค์, ชุมพร, พิจิตร สุโขทัย
2. หลอดทดลองสำหรับปลูกขนาด (25 x 200 มม.) พร้อมฝาปิด KIMKAP และที่วางหลอด
3. กระดาษฟาง
4. เครื่องแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. Autoclave
6. เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652, TAL 655 และ TAL 688
7. เมล็ดถั่ว *Centrosema pubescens*
8. เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียด
9. ตู้เขี่ยเชื้อพร้อมอุปกรณ์
10. เครื่องเขย่า
11. ตะแกรงร่อนดินขนาด 2 มิลลิเมตร
12. สารเคมี
13. ชั้นสำหรับปลูกพร้อมอุปกรณ์

<u>วิธีการทดลอง</u>

1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่างดิน

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ดังนี้ คือ

- ดินตัวอย่างที่ 1 พื้นที่ปลูกอ้อย ต ทุ่งเศรษฐี อ. เมือง จ. กำแพงเพชร : เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 2 พื้นที่ปลูกข้าว บ้านพรานกระต่าย ต พรานกระต่าย อ. ถ้ำกระต่ายทอง จ. กำแพงเพชร : เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 3 พื้นที่ปลูกถั่วและปลูกหญ้า บ้านหนองบือ ต. หนองกรด อ. เมือง จ. นครสวรรค์ : เมื่อวันที่ 15 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 4 พื้นที่ปลูกยาง อ. ประทิว จ. ชุมพร : เมื่อวันที่ 10 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 5 พื้นที่ปลูกปาล์ม อ. ประทิว จ. ชุมพร เมื่อวันที่ 10 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 6 พื้นที่ปลูกข้าวโพด บ้านสระยายชี ต เนินปอ อ. สามง่าม จ. พิจิตร : เมื่อวันที่ 16 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 7 พื้นที่ปลูกข้าว บ้านบ้านนา ต. เมืองเก่า อ. เมือง จ. สุโขทัย : เมื่อวันที่ 16 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 8 พื้นที่ปลูกหญ้า บ้านปากคลอง ต เมืองเก่า อ. เมือง จ สุโขทัย : เมื่อวันที่ 16 กันยายน 2536
- ดินตัวอย่างที่ 9 พื้นที่แปลงทดลองปลูกถั่วลาย ศูนย์ศึกษาพัฒนาโครงการตามพระราชดำริ อ. เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา ซึ่งทำการเก็บ 2 ครั้ง

(a). ครั้งที่ 1 เก็บในช่วงเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2536

(b). ครั้งที่ 2 เก็บในช่วงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537

วิธีการเก็บ ใช้ soil tube 2 แบบ คือ แบบท่อ และ แบบเกลียว โดยก่อนที่จะทำการเก็บดินตัวอย่างในแต่ละที่ต้องล้างทำความสะอาดและฉีดด้วยแอลกอฮอล์ 95 % แล้วจุดไฟเผาเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ และป้องกันการปนเปื้อน (contaminate) จากดินตัวอย่างแหล่งอื่นๆ ทำการสุ่ม (random) เก็บดินในพื้นที่อย่างทั่วถึง

1.2 การเตรียมตัวอย่างดิน

ทำการร่อนดินในแต่ละแหล่งที่เก็บมาทั้งหมด โดยร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร สำหรับนำไปทำ Serial dilution และเก็บดินไว้ในตู้เย็น (ก่อนร่อนดินควรอบตะแกรงร่อนเพื่อฆ่าเชื้อ)

2. การเตรียมหลอดปลูกที่มีอาหาร Niftal และ Gibbson

2.1 การเตรียมหลอดอาหาร Niftal tubes

- แช่กระดาษฟางด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลองสำหรับปลูก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- รินน้ำกลั่นที่แช่กระดาษฟางทิ้ง(พยายามรินออกให้มากที่สุด)
- หลังจากนั้นใส่สารละลาย N - free nutrient ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด ปริมาณหลอดละ 22 - 25 มิลลิลิตร
- ปิดฝาหลอด (ฝาปิด KIMKAP) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.2 การเตรียมหลอดอาหาร Gibbson

- ชั่งวุ้น (Agar) จำนวน 15 กรัม ต่อ สารละลาย N - free nutrient 1,000 มิลลิลิตร
- นำไปต้มเพื่อให้วุ้นละลายเข้ากันกับสารละลาย
- แล้วนำสารละลายไปวัดหาค่า ความเป็นกรด-ด่าง โดย pH-meter ให้อยู่ในช่วง pH 6.6 - 6.8 (ใช้ 1 N NaOH, HCl เป็นตัวปรับ)
- ใช้ไซริงค์ดูดสารละลายมาปริมาตร 27 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด
- ปิดจุกสำลีแล้วหุ้มฟรอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว นำหลอดสารละลายมาเอียงให้ได้ความชันพอเหมาะ

3 การเพาะต้นถั่วสำหรับใช้ทดสอบการเกิดปม (Infection test)

คัดเลือกเมล็ดถั่วเซนโตรซีมาที่สมบูรณ์ สะอาด และมีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณ 10 กรัม แช่ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) พอดีท่วมเมล็ด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วรีบทำการรินเอากรดออกให้มากที่สุด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลายๆ ครั้ง (ควรทำอย่างรวดเร็ว ไม่เช่นนั้นเมล็ดอาจได้รับความร้อนที่เกิดจากการรวมตัวกันของ

กรดกับน้ำมากเกินไป) จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะในอาหารวุ้น 15% ที่บรรจุอยู่ใน petri dish เกลี่ยให้มีระยะห่างระหว่างเมล็ดเท่าๆ กัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 48 - 50 ชั่วโมง โดยวางให้กลับด้านที่มีวุ้นขึ้นข้างบนเพื่อที่จะทำให้ รากที่ออกมาเป็นเส้นตรงไม่คดงอ

เมื่อรากงอกยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร นำกล้าลงปลูกใน หลอดอาหาร Niftal & Gibbson ที่เตรียมไว้แล้ว ปลูกจำนวน 1 ต้น ต่อ 1 หลอด การปลูกกระทำโดยใช้คีมปลายงอ (forcep) ที่มีความยาวพอสมควร คีบต้นถั่วเบาๆ ใส่เข้าไปในหลอดตรงบริเวณที่ต้องการ หุ้มหลอดด้วย aluminum foil นำหลอดที่ปลูกเรียบร้อยแล้วไปวางไว้ในที่พืชสามารถได้รับแสงเพียงพอ และเหมาะสมที่จัดเตรียมไว้แล้ว

4 การวางแผนการทดลอง และการประเมินผล แบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

- การทำ Tenfold dilution series

หลังจากเตรียมตัวอย่างดิน เมล็ดถั่ว รวมทั้ง หลอดอาหารสำหรับปลูก (ขั้นตอนที่ 1 - 3) เรียบร้อยแล้ว นำดิน 10 กรัมใส่ลงไปในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลาประมาณ 5 นาที จะได้สารละลายดินที่มีความเข้มข้น $1 : 10^1$ จากนั้นใช้ไปเปต (pipet) ดูดสารละลายดินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดฝาเกลียว (screw cap) ดูดขึ้นลงอย่างน้อย 5 - 6 ครั้งเพื่อล้างดินและแบคทีเรียออกจากไปเปต เขย่านาน 2 - 3 นาทีจะได้สารละลายดินความเข้มข้น $1 : 10^2$ แล้วใช้ไปเปตดูดสารละลายดินจากหลอดนี้มา 1 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้สารละลาย ที่มีระดับความเข้มข้นตามต้องการ ดังนี้

ดินตัวอย่างที่ 1 - 8 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $1 : 10^1$ ถึง $1 : 10^4$

ดินตัวอย่างที่ 9 (a),(b) เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $1 : 10^1$ ถึง $1 : 10^9$

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652

เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $1 : 10^0$ ถึง $1 : 10^6$

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 655

เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $1 : 10^0$ ถึง $1 : 10^6$

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 688

เตรียมให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $1 : 10^0$ ถึง $1 : 10^6$

- ขั้นตอนการทำ inoculate

ใช้ไปเปตดูดสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มา 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ (inoculate) ลงไปในหลอดปลูก 1 หลอด (หลอดปลูกจากขั้นตอนที่ 3) โดยแต่ละระดับความเข้มข้นทำการ inoculate 3 ซ้ำ จนครบทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แล้วนำกลับไปวางไว้ในที่ที่ได้รับแสงเช่นเดิม หลังจากนั้นประมาณ 21 วัน สังเกตการเกิดปมที่ราก ทำการบันทึกผล

หมายเหตุ : ทุกขั้นตอนของการทำการทดลองควรทำในสภาพปลอดเชื้อ

ผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกิดปมของเชื้อบริสุทธิ์

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเกิดปมของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 โดยใช้ Niftal และ Gibson tubes ผลการทดลองปรากฏว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเกิดปมได้ในหลอดอาหารแบบ Niftal และ Gibson ในระดับ dilution ต่างๆ คล้ายคลึงกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปมแตกต่างกัน คือ ในวิธี Niftal tubes จะใช้ระยะเวลาในการเกิดปมน้อยกว่า วิธี Gibson tubes คือ

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 652

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Niftal tubes 14 วัน

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Gibson tubes 24 วัน

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 655

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Niftal tubes 15 วัน

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Gibson tubes 24 วัน

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 688

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Niftal tubes 15 วัน

ใช้ระยะเวลาในการเกิดปมในวิธี Gibson tubes 21 วัน

ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงผลการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกแบบ Niftal tubes.

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1 : 10^0$	+	+	+
$1 : 10^1$	+	+	+
$1 : 10^2$	+	+	+
$1 : 10^3$	+	+	+
$1 : 10^4$	+	+	+
$1 : 10^5$	+	+	+
$1 : 10^6$	+	+	+

ตารางที่ 2 แสดงผลการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม TAL 652, TAL 655 และ TAL 688 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกแบบ Gibson tubes.

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1 : 10^0$	+	+	+
$1 : 10^1$	+	+	+
$1 : 10^2$	+	+	+
$1 : 10^3$	+	+	+
$1 : 10^4$	+	+	+
$1 : 10^5$	+	+	+
$1 : 10^6$	+	+	+

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

2. ประสิทธิภาพและปริมาณการเกิดเชื้อในดินต่างๆ

✧ ประสิทธิภาพในการเกิดปมของดินแหล่งต่างๆ พบว่าดินจากแปลงปลูกอ้อย กับ ดินจากแปลงปลูกข้าว จ. กำแพงเพชร, ดินจากแปลงปลูกยาง จ. ชุมพร, ดินจากแปลงปลูกข้าว กับ ดินจากแปลงปลูกหญ้า จ. สุโขทัย และ ดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา มีเชื้อไรโซเบียม ซึ่งผลจากการทดลองมีดังนี้

ดินตัวอย่างที่ 1 คือ ดินจากแปลงปลูกอ้อย จ. กำแพงเพชร

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$ และ $1 \cdot 10^3$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 21 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

Contaminate

ดินตัวอย่างที่ 2 คือ ดินจากแปลงปลูกข้าว จ. กำแพงเพชร

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$ และ $1 : 10^2$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 23 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ไม่พบว่าเกิดปม

ดินตัวอย่างที่ 4 คือ ดินจากแปลงปลูกยาง จ. ชุมพร

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 . 10^1$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 26 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ไม่พบว่าเกิดปม

ดินตัวอย่างที่ 7 คือ ดินจากแปลงปลูกข้าว จ. สุโขทัย

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 23 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ไม่พบว่าเกิดปม

ดินตัวอย่างที่ 8 คือ ดินจากแปลงปลูกหญ้า จ. สุโขทัย

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 24 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

Contarminate

ดินตัวอย่างที่ 9 (a) คือ ดินจากแปลงทดสอบปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 17 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 17 วัน

ดินตัวอย่างที่ 9 (b) คือ ดินจากแปลงทดสอบปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา

ปลูกในหลอดอาหาร Niftal

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 18 วัน

ปลูกในหลอดอาหาร Gibson

เกิดปมที่ระดับ dilution $1 : 10^1$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$ และ $1 : 10^4$

รวมระยะเวลาในการเกิดปม 24 วัน

รายละเอียดแสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 5 - 24

ส่วนดินจากแปลงปลูกถั่วและปลูกหญ้า จ. นครสวรรค์, ดินจากแปลงปลูกปาล์ม จ. ชุมพร และดินจากแปงปลูกข้าวโพด จ. พิจิตร ไม่มีเชื้อไรโซเบียม

✧ ปริมาณการเกิดเชื้อในดินต่างๆ

ในการประเมินหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน สามารถทำได้โดยการคำนวณหาค่า MPN ซึ่งเป็นค่าปริมาณของเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant โดยจะอาศัยลักษณะของการเกิดปมในแต่ละระดับ dilution ซึ่งมี 3 ซ้ำ นำไปเทียบหาค่า MPN ที่ประเมินได้จากวิธีของ Brockwell ในตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการคำนวณหาค่า MPN ที่ได้ในดินตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงค่า MPN ของดินแต่ละตัวอย่าง (คำนวณต่อกรัมดินเปียก)

สิ่งทดลอง	ค่า MPN (ต่อกรัมดินเปียก)	
	ปลูกใน Niftal tubes	ปลูกใน Gibson tubes
ดินตัวอย่างที่ 1	1.47×10^2	-
ดินตัวอย่างที่ 2	1.5×10	-
ดินตัวอย่างที่ 3	-	-
ดินตัวอย่างที่ 4	4.0	-
ดินตัวอย่างที่ 5	-	-
ดินตัวอย่างที่ 6	-	-
ดินตัวอย่างที่ 7	-	-
ดินตัวอย่างที่ 8	-	-
ดินเขาหินซ้อน (a)	2.3×10^4	2.3×10^4
ดินเขาหินซ้อน (b)	2.3×10^4	2.3×10^4

หมายเหตุ :- ดินเขาหินซ้อน (a) และ (b) มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นดินที่ปลูกถั่วเซนโตรซีมาโดยเฉพาะ ในขณะที่ดินตัวอย่างอื่นๆ ที่พบเชื้อไรโซเบียมนั้นจะมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก

99761

ตารางที่ 4 แสดงค่า MPN ของดินแต่ละตัวอย่าง (คำนวณต่อกรัมดินแห้ง)

สิ่งทดลอง	ค่า MPN (ต่อกรัมดินแห้ง)	
	ปลูกใน Niftal tubes	ปลูกใน Gibson tubes
ดินตัวอย่างที่ 1	1.81×10^2	-
ดินตัวอย่างที่ 2	1.81×10	-
ดินตัวอย่างที่ 3	-	-
ดินตัวอย่างที่ 4	4.49	-
ดินตัวอย่างที่ 5	-	-
ดินตัวอย่างที่ 6	-	-
ดินตัวอย่างที่ 7	-	-
ดินตัวอย่างที่ 8	-	-
ดินเขาหินซ้อน (a)	2.5×10^4	2.5×10^4
ดินเขาหินซ้อน (b)	2.37×10^4	2.37×10^4

หมายเหตุ :- ดินเขาหินซ้อน (a) และ (b) มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นดินที่ปลูกถั่วเซนโตรซีมาโดยเฉพาะ ในขณะที่ดินตัวอย่างอื่นๆ ที่พบเชื้อไรโซเบียมนั้นจะมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก

สรุปผลการทดลอง

ความเชื่อดั้งเดิมของเกษตรกรเชื่อกันว่า ดินโดยทั่วไปน่าจะมีเชื้อไรโซเบียมอยู่ แต่จากการตรวจหาเชื้อไรโซเบียมในดินจากแหล่งต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่าดินที่ไม่มีเชื้อไรโซเบียมส่วนใหญ่จะเป็นที่ไม่เคยปลูกถั่วมาก่อน ดังนั้นถ้าต้องการจะใช้พื้นที่ดินแหล่งนั้นๆ เพื่อการปลูกพืชตระกูลถั่ว ก็สมควรที่จะคลุกเมล็ดถั่วด้วยเชื้อไรโซเบียมก่อนนำไปทำการปลูกเสียก่อน

สำหรับดินจากแปลงปลูกยางและปาล์ม ที่จังหวัดชุมพรนั้น น่าจะพบเชื้อไรโซเบียมอยู่มากเพราะโดยปกติแล้วพื้นที่เหล่านี้จะใช้พืชตระกูลถั่วเป็นพืชปลูกแซม แต่จากผลการทดลองไม่พบเชื้อไรโซเบียมเลยในแปลงปลูกปาล์มและพบปริมาณเล็กน้อยในแปลงปลูกยาง ทั้งนี้เนื่องมาจากดินที่เก็บมาทำการทดลองครั้งนี้เก็บหลังจากที่พายุเกย์เข้าแล้ว ซึ่งมีผลทำให้ดินเก่าที่เคยปลูกถั่วถูกพัดพาหายไป ปริมาณเชื้อไรโซเบียมจึงลดลง

เมื่อพิจารณาดินจากแปลงปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นดินจากแปลงปลูกถั่วเซนโตรซีมา จึงพบว่ามีเชื้อไรโซเบียม แต่ในการทดลอง การเก็บดินตัวอย่างนี้ทำการเก็บ 2 ช่วง คือ ช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2536 และช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537 ทั้งนี้ด้วยวัตถุประสงค์ คือ ต้องการตรวจสอบว่าความร้อนและความแห้งแล้งของดิน จะมีผลทำให้เชื้อไรโซเบียมในดินสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้หรือไม่ และผลที่ได้ก็ คือ สามารถพบเชื้อไรโซเบียมในดินตัวอย่างนี้ทั้ง 2 ช่วงการเก็บ แสดงว่าความร้อนและความแห้งแล้งของดินไม่สามารถทำให้เชื้อตายได้

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา โดยวิธีปลูกใน Niftal และ Gibson tubes พบว่าการปลูกใน Niftal tubes สามารถทำให้รากถั่วเซนโตรซีมาเกิดปมได้ดีและเร็วกว่าการปลูกใน Gibson tubes อีกทั้งการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมาก็สามารถเจริญได้ดีกว่า สังเกตได้จากส่วนของลำต้นและใบจะมีสีเขียวกว่า ปมจะมีขนาดใหญ่กว่าและปริมาณมากกว่าด้วย

การคำนวณหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant(MPN) ของดินตัวอย่างที่มีเชื้อไรโซเบียม พบว่าดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา มีปริมาณไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant มากที่สุด

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียมจากดินแหล่งต่างๆ ที่มีต่อต้นถั่วเซนโตรซีมา ในห้องปฏิบัติการทั้งที่ปลูกใน Niftal และ Gibson tubes ณ ระดับ Dilution ที่แตกต่างกัน พบว่าที่ระดับ Dilution สูงๆ ประสิทธิภาพในการเกิดปมจะต่ำกว่าที่ระดับ Dilution ต่ำๆ ซึ่งสังเกตได้จากการทดลองใช้เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์สายพันธุ์ TAL 652, TAL 655, TAL 688 เป็นตัวควบคุม (Control) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเกิดปม แต่ผลการทดลองที่เกิดขึ้นในดินตัวอย่างบางแหล่งที่ให้ผลแตกต่างไปจากนี้ เช่น ดินตัวอย่างที่ 8 ระดับ Dilution $1 : 10^4$ มีปมเกิดขึ้นในขณะที่ระดับ Dilution $1 : 10^3$ ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่าไม่มีปมเกิดขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าระดับ Dilution ของดินเกิดการเปลี่ยนแปลงไปโดยแมลงที่บินเข้าไปในหลอดปลูกที่มีระดับ Diution ระดับหนึ่ง แล้วบินกลับออกไปยังหลอดอื่นที่มีระดับ Dilution ต่างกัน สารละลายเดิมที่ติดไปกับตัวแมลงก็จะไปทำให้สารละลายธาตุอาหารในหลอดนั้นๆ เกิดการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นไปได้บ้าง และบางหลอดที่เกิดการ Contaminate จากเชื้อจุลินทรีย์อื่นนั้น อาจเป็นเพราะดินตัวอย่างที่นำมาทำ Serial dilution ไม่ได้ทำการอบฆ่าเชื้อก่อน จึงเป็นไปได้ที่ในดินเหล่านั้นจะมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นปะปนอยู่มาก นอกจากนี้แมลงยังมีส่วนที่เป็นตัวนำเชื้อจุลินทรีย์อื่นเข้าไปปะปนในสารละลายได้ด้วย

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการปลูกแบบ Niftal และ Gibson พบว่า การปลูกใน Niftal tubes จะทำให้รากถั่วเซนโตรซีมาเกิดปมได้ดีกว่าและใช้ระยะเวลาในการเกิดปมเร็วกว่าที่ปลูกใน Gibson tubes ทั้งนี้เป็นเพราะ Niftal tubes มีการใช้ฝาปิดหลอดที่เจาะช่องให้อากาศผ่านเข้าออกได้ดี การระบายอากาศ (Aeration) ภายในหลอดจึงเกิดได้ดีกว่า ในขณะที่การปลูกใน Gibson tubes ใช้จุกสำลีที่หุ้มด้วย Aluminum foil จึงทำให้การระบายอากาศไม่ดีเท่าที่ควร ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ยังมีผลทำให้การเจริญของถั่วเซนโตรซีมาใน Niftal tubes เจริญได้ดีกว่าใน Gibson tubes ซึ่งสังเกตได้จากส่วนของลำต้นและใบจะมีสีเขียวกว่า ปมจะมีขนาดใหญ่กว่าและปริมาณมากกว่าด้วย ส่วนการคำนวณหาปริมาณไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant (MPN) ของดินตัวอย่างที่มีเชื้อไรโซเบียม พบว่าดินจากแปลงปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริเขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา มีปริมาณไรโซเบียมต่อดิน 1 กรัม inoculant มากที่สุด คือ ได้ค่า MPN สูงที่สุดนั่นเอง และในดินตัวอย่างบางตัวไม่สามารถคำนวณหาค่า MPN ได้นั้นก็เนื่องมาจากในดินไม่มีเชื้อไรโซเบียม และเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นนั่นเอง

14386

เอกสารอ้างอิง

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

ดร นันทกร บุญเกิด 2527 **เอกสารการฝึกอบรมปุ๋ยชีวภาพ : ชีววิทยาของเชื้อไรโซเบียมและการเพิ่มผลผลิตครั้งที่ 1.** โดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน

บุญฤา วิไลพล 2523. **ทุ่งหญ้าเขตร้อนประยุกต์.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 106 หน้า

ดร บุญฤา วิไลพล 2526 **พืชอาหารสัตว์เขตร้อนและการจัดการ.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 11

พิชัย สราญรมย์ 2528. **ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับถั่วเหลืองสำหรับการศึกษาระดับปริญญา" ไรโซเบียมและปม ".** พิมพ์ครั้งที่ 2 หน้า 104.

พรพรรณ จงสุขสันติกุล 2528. **การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมของไม้กระถินยักษ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 107 หน้า.

สมศักดิ์ วังใน 2521 **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน.** ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 168 หน้า.

สมศักดิ์ วังใน 2525 **การตรึงไนโตรเจน : ไรโซเบียม - พืชตระกูลถั่ว.** ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน พิมพ์ครั้งที่ 4 283 หน้า.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์ 2526. **พืชอาหารสัตว์ : หลักและปฏิบัติ.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม หน้า 51 - 52.

Alexander, M. 1961. **Introduction to soil microbilogy.** New York and London, John Wiley and Sons. 427p.

Andrew, C.S. and I.F. Fergus 1964. **Techniques in plant nutrition and fertility survey.** Some Concepts and method in Subtropical pasture Research C' welath Bur. Pasture and Field Crops Bull. 47 (C' welath Agr. Bur., Farnham Royal, England). 69p.

Bogden, A.V. 1973. **Tropical pasture and fodder plants.** Longman.

Buchanan, R.E., N.E. Gibbsons, S.T. Gowen, J.G. Holt, J. Listen, R.G.E. Murrey, G.F. Niven, W.W. Ravin and R.Y. Stanier. 1974. **Burgey,s manual of determinative bacteriology.** 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 1268.

Burton, J.C. and R.L. Curely. 1965. **Comparative efficiency of liquid and peat - base inoculate on field grown soybean.** Agron. J. 57 : 379 - 381.

Crower, L.V. 1968. **A paper presented in the seminar at D.T.R.I. Los Banos, Philippines.**

Elmes, R.P.T. 1976. **Cross inoculation relationships of Psophocarrpus tetragonolobus and its *Rhizobium* with other Legumes and rhizobia Pa Pue New Guines Agric.** J 27 (3) : 53 - 57.

Grof, B. and W.A.T. Harding. 1970. **Yield attributes of some species and a ectotype of *Centroserna* in North Queensland, Q. J. Agric Anim. Sci.** 27 : 237 - 239.

Humphrey, L.R. 1978 **Tropical Pasture and Fodder Crops, Longman Crop Limited, London.**

Humphrey, L.R. 1980. **A guide to better pastures for the tropics and sub - tropics.** 4th ed. Wright Stephenson and Co. (Australia) Pty. Ltd.

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

Rao, N.S.S. 1977a **Soil Microorganisms and Plant Growth.** Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. 289p.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 Cross-inoculation groups and *Rhizobium*-Legumes Associations

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

ตารางผนวกที่ 2 แสดงการจำแนกไรโซเบียมในระบบใหม่

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*

ตารางผนวกที่ 3 Estimate of Rhizobium numbers obtained by two methods of calculation from ten - fold serial dilutions with three tubes at each level.

No. of positive tubes				Estimates of no. in aliquot of lowest dilution		
Relative dilution				MPN estimate from Brockwell et al. (1975)	Total no. of positives	Estimate from Fisher and Yales (1963)
10	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
3	3	3	3	>=2300	12	>=1726
3	3	3	2	919	11	861
3	3	3	1	424	10	424
3	3	3	0	230	9	180
3	3	2	1	147	9	180
3	3	2	0	91.8	8	88
3	3	1	0	42.4	7	38
3	3	0	0	23	6	17
3	2	1	0	14.7	6	17
3	2	0	0	9.2	5	8.6
3	1	0	0	4.2	4	3.8
3	0	0	0	2.3	3	1.7
2	1	0	0	1.5	3	1.7
2	0	0	0	0.9	2	0.9
1	0	0	0	0.4	1	0.4
Approximate range factor for 95% fiducial limits (* , /)				4.1		4.8

ตารางผนวกที่ 4 N - free Nutrient Solution (Broughton and Dilworth, 1970).

Stock	Element	M	From	MW	g / l	M
1.	Ca	1000	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	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	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.5	123.3	0.5
	K	250	K_2SO_4	174.06	87.0	0.5
	Mn	1	$MnSO_4 \cdot H_2O$	169.02	0.338	0.002
4.	B	2	H_3BO_3	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.2	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.69	0.100	0.0004
	Co	0.1	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	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.

ตารางผนวกที่ 5 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 1 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	+
$1:10^2$	+	-	+
$1:10^3$	+	-	+
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 21 วัน

ตารางผนวกที่ 6 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 1 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1 : 10^1$	contaminate	contaminate	contaminate
$1 : 10^2$	contaminate	contaminate	contaminate
$1 : 10^3$	contaminate	contaminate	contaminate
$1 : 10^4$	contaminate	contaminate	contaminate

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2537

ตารางผนวกที่ 7 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 2 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	-
$1:10^2$	-	-	+
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2537

รวมระเวลาการเกิดปม 23 วัน

ตารางผนวกที่ 8 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 2 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1 : 10^1$	-	-	-
$1 : 10^2$	-	-	-
$1 : 10^3$	-	-	-
$1 : 10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2537

ตารางผนวกที่ 9 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 3 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2537

ตารางผนวกที่ 10 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 3 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2537

ตารางผนวกที่ 11 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 4 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	+	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 4 เมษายน 2537

รวมระเวลาการเกิดปม 26 วัน

ตารางผนวกที่ 12 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 4 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2537

ตารางผนวกที่ 13 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 5 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2537

ตารางผนวกที่ 14 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 5 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2537

ตารางผนวกที่ 15 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 6 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 9 ธันวาคม 2537

ตารางผนวกที่ 16 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 6 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	-
$1:10^2$	-	-	-
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 9 ธันวาคม 2537

ตารางผนวกที่ 17 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 7 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	-	-	+
$1:10^2$	-	+	-
$1:10^3$	+	-	-
$1:10^4$	-	-	+

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 23 วัน

ตารางผนวกที่ 18 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 7 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1 : 10^1$	-	-	-
$1 : 10^2$	-	-	-
$1 : 10^3$	-	-	-
$1 : 10^4$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2537

ตารางผนวกที่ 19 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 8 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	+
$1:10^2$	+	-	+
$1:10^3$	-	-	-
$1:10^4$	+	-	+

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 24 วัน

ตารางผนวกที่ 20 แสดงผลการเกิดปมของดินตัวอย่างที่ 8 โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	contaminate	contaminate	contaminate
$1:10^2$	contaminate	contaminate	contaminate
$1:10^3$	contaminate	contaminate	contaminate
$1:10^4$	contaminate	contaminate	contaminate

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2537

ตารางผนวกที่ 21 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (a) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	+
$1:10^2$	+	+	+
$1:10^3$	+	+	+
$1:10^4$	+	+	+
$1:10^5$	-	-	-
$1:10^6$	-	-	-
$1:10^7$	-	-	-
$1:10^8$	-	-	-
$1:10^9$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 4 มกราคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 21 มกราคม 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 17 วัน

ตารางผนวกที่ 22 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (a) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	+
$1:10^2$	+	+	+
$1:10^3$	+	+	+
$1:10^4$	+	+	+
$1:10^5$	-	-	-
$1:10^6$	-	-	-
$1:10^7$	-	-	-
$1:10^8$	-	-	-
$1:10^9$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 4 มกราคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 21 มกราคม 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 17 วัน

ตารางผนวกที่ 23 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (b) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Niftal

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	+	+
$1:10^2$	+	+	+
$1:10^3$	+	+	+
$1:10^4$	+	+	+
$1:10^5$	-	-	-
$1:10^6$	-	-	-
$1:10^7$	-	-	-
$1:10^8$	-	-	-
$1:10^9$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 27 มีนาคม 2537

รวมระยะเวลาการเกิดปม 18 วัน

ตารางผนวกที่ 24 แสดงผลการเกิดปมของดินเขาหินซ้อน (b) โดยวิธี Whole - soil inoculation technique ทดสอบปลูกในหลอดอาหาร Gibson

ระดับความเข้มข้น	ผลการเกิดปมของต้นถั่วลาย (*Centrosema pubescens*)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
$1:10^1$	+	-	-
$1:10^2$	-	-	+
$1:10^3$	+	-	-
$1:10^4$	-	+	+
$1:10^5$	-	-	-
$1:10^6$	+	-	-
$1:10^7$	-	-	-
$1:10^8$	-	-	-
$1:10^9$	-	-	-

หมายเหตุ :- + เกิดปม

\- ไม่เกิดปม

ทำการ inoculate เมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2537

เริ่มเกิดปม วันที่ 8 เมษายน 2537

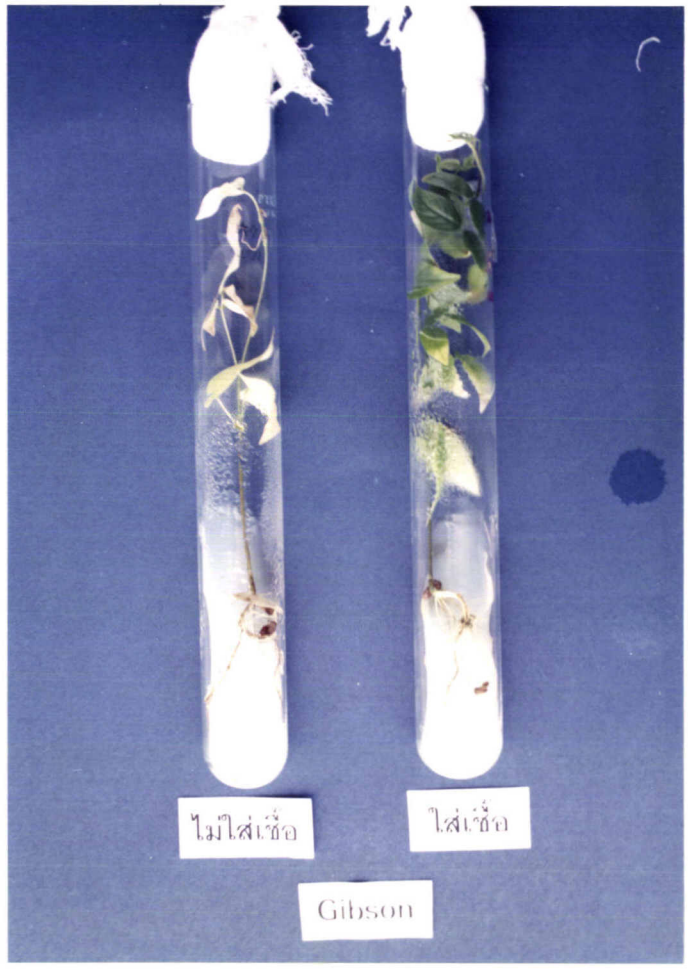
รวมระยะเวลาการเกิดปม 24 วัน

ภาพที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนปมและลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมา ในหลอด Niftal และ Gibson ที่ใส่เชื้อลงไป

ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมของถั่วเขนโตรซีมาในหลอด Niftal และ Gibson ที่ใส่เชื้อลงไป

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเซนโตรซีมา ใน Niftal tubes ที่ใส่เชื้อ กับ ไม่ใส่เชื้อ

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมที่รากของถั่วเซนโตรซีมา ใน Niftal tubes ใส่เชื้อ กับ ไม่ใส่เชื้อ



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเขนโตรซีมา ใน Gibson tubes ที่ไม่ใส่เชื้อ กับ ใส่เชื้อ

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะการเกิดปมที่รากของถั่วเขนโตรซีมา ใน Gibson tubes ที่ไม่ใส่เชื้อ กับ ใส่เชื้อ

การคำนวณหาค่า MPN ของดินตัวอย่าง

<u>วิธีการคำนวณ</u>

1. จากตารางบันทึกผลการทดลอง ประสิทธิภาพในการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมาที่ระดับ dilution ต่างๆ ทำการเลือกช่วง dilution มาช่วงหนึ่ง ซึ่งในช่วงที่เลือกนี้จะต้องมีระดับ dilution ที่มีประสิทธิภาพการเกิดปมต่ำมากจนไม่สามารถเกิดปมได้ อย่างน้อยหนึ่งระดับ dilution

2. ในแต่ละระดับ dilution จะทำการ inoculate 3 ซ้ำ ดังนั้นในการคำนวณจะต้องนำผลการทดลองที่เกิดขึ้นในแต่ละระดับ dilution มาเปลี่ยนเป็นคะแนน เช่น ถ้าผลที่ได้ในแต่ละระดับ dilution เกิดปมทั้ง 3 ซ้ำ คะแนนที่ได้จะเป็น 3 และถ้าในแต่ละระดับ dilution ไม่เกิดปมเลยทั้ง 3 ซ้ำ คะแนนที่ได้จะเป็น 0

3. เมื่อได้คะแนนแต่ละระดับ dilution ครบตามช่วง dilution ที่เลือกไว้ทั้งหมดแล้ว นำคะแนนทั้งหมดไปเทียบหาค่า MPN ที่ประเมินได้จากวิธีของ Brockwell ในตารางภาคผนวกที่ 3

4. ค่า MPN คือ ปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัม inoculant ดังนั้นค่า MPN ที่เทียบออกมาได้จากตาราง จะมีหน่วยเป็น เซลต่อกรัม inoculant เนื่องจาก 1 กรัม inoculant เทียบได้กับระดับ dilution ของดิน ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินจึงมีหน่วยเป็น เซลต่อระดับ dilution ต่ำสุด เหตุที่ต้องเป็นที่ระดับ dilution ต่ำสุดก็เนื่องจากว่าในการคำนวณเป็นการเลือกช่วงของ dilution มาคำนวณเพราะฉะนั้นระดับความเข้มข้นที่ใช้จะต้องสูงที่สุด ซึ่งก็เป็นระดับ dilution ต่ำสุด

5. ในการทดลองดังกล่าวตัว inoculant ที่ใช้คือ ดินเปียก ดังนั้นปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่คำนวณได้จึงเป็นปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัมดินเปียก แต่ตามหลักความเป็นจริงควรจะคำนวณหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัมดินแห้ง เพราะฉะนั้นสามารถคำนวณต่อโดยอาศัยเปอร์เซนต์ความชื้นของดินที่คำนวณหาได้จาก

$$\% \text{ ความชื้นของดิน} = \{(\text{น้ำหนักดินเปียก} - \text{น้ำหนักดินแห้ง})/\text{น้ำหนักดินแห้ง}\} \times 100$$

6. เมื่อได้เปอร์เซนต์ความชื้นของดินแล้ว นำมาเทียบหาปริมาณน้ำหนักดินแห้งที่มีอยู่ใน 1 กรัมดินเปียก ดังนี้

สมมติ คำนวณหา %ความชื้นของดิน ได้เท่ากับ 15 % หมายความว่า

ดินเปียก	115	กรัม คิดเป็นดินแห้ง	100		กรัม
ดินเปียก	1	กรัม คิดเป็นดินแห้ง	(100 x 1)/115		กรัม
			= 0.87		กรัม

∴ ในดินเปียก 1 กรัมมีปริมาณดินแห้ง = 0.87 กรัม

7. เมื่อทราบปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัมดินเปียก และน้ำหนักของดินแห้งแล้วก็สามารถที่จะคำนวณหา ปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อ 1 กรัมดินแห้งได้ ดังนี้

สมมติ ปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่คำนวณได้ในดินเปียก 1 กรัม

มีค่าเท่ากับ 1.47×10^4 เซล

ดังนั้น น้ำหนักดินแห้ง 0.87 กรัมก็จะมีเชื้อไรโซเบียม

เท่ากับ 1.47×10^4 เซลเช่นเดียวกัน

น้ำหนักดินแห้ง	0.87	กรัม มีเชื้อไรโซเบียม	1.47×10^4	เซล
น้ำหนักดินแห้ง	1	กรัม มีเชื้อไรโซเบียม	$(1.47 \times 10^4) \times 1/0.87$	เซล

∴ ปริมาณเชื้อไรโซเบียมใน 1 กรัมดินแห้ง มีค่าเท่ากับ 1.69×10^4 เซล

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

ผลการทดลองจากตารางบันทึกประสิทธิภาพในการเกิดปมของถั่วเซนโตรซีมา คำนวณหาค่า MPN ของดินจากแปลงทดลองปลูกพืชอาหารสัตว์ ศูนย์ศึกษาและพัฒนาตามพระราชดำริ เขาหินซ้อน จ. ฉะเชิงเทรา เก็บเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2536 ทำได้ดังนี้

1 เลือกช่วงระดับ dilution คือ $1 : 10^2$, $1 : 10^3$, $1 : 10^4$ และ $1 : 10^5$

2. เมื่อพิจารณาการเกิดปมในแต่ละระดับ dilution ซึ่งทำการ inoculate 3 ซ้ำ คะแนนที่ได้ในแต่ละ dilution คือ 3 3 3 0

3. นำคะแนนของช่วง dilution คือ 3 3 3 0 ไปเทียบหาค่า MPN ที่ประเมินได้จากวิธีของ Brockwell ในตารางภาคผนวกที่ 3 จะได้ค่า MPN เท่ากับ 230

4. ดังนั้น ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินเขาหินซ้อน (a) จะเท่ากับ $230 / 10^{-2}$ หรือ 2.30×10^4 เซล / กรัม inoculant

5. คำนวณหาเปอร์เซนต์ความชื้น ของดินเขาหินซ้อนดังนี้

ชั่งน้ำหนักดินเปียก (ก่อนอบ) = 20.00 กรัม

ชั่งน้ำหนักดินแห้ง (หลังอบ) = 19.28 กรัม

% ความชื้นดินเขาหินซ้อน = (20 - 19.28/19.28) x 100

∴ ดินเขาหินซ้อนมีความชื้น = 8.92 %

6. ดังนั้น ดินเปียก 100+8.92 กรัม คิดเป็นดินแห้ง 100 กรัม

ดินเปียก 1 กรัม คิดเป็นดินแห้ง (100 x 1) / (100+8.92) กรัม

= 0.92 กรัม

∴ ดินเปียก 1 กรัมมีปริมาณดินแห้ง 0.92 กรัม

7. ปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่คำนวณได้ในดินเขาหินซ้อนเปียก 1 กรัม คือ 2.3×10^4 เซล ซึ่งมีค่าเท่ากับในดินแห้ง 0.92 กรัม แต่ถ้าคิดปริมาณเชื้อไรโซเบียมต่อกรัมดินแห้ง ก็จะคำนวณ ได้เป็น

น้ำหนักดินแห้ง 0.92 กรัม มีเชื้อไรโซเบียม 2.3×10^4 เซล

น้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม มีเชื้อไรโซเบียม $2.3 \times 10^4 / 0.92$ เซล

∴ ใน 1 กรัมดินแห้งมีปริมาณเชื้อไรโซเบียม = 2.5×10^4 เซล

ดังนั้น ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินเขาหินซ้อนจะเท่ากับ 2.5×10^4 เซล / กรัมดินแห้ง