รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย:** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล

2. **โครงการวิจัย:** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ย พืช ดิน และน้ำ

กิจกรรม: พัฒนาเทคนิคระบบการวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): The validation of quantity and efficiency analysis for rhizobium in rhizobium biofertilizer.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง: นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน:

1. นางสาวจิตรา เกาะแก้ว
2. นายมนต์ชัย มนัสสิลา
3. นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง
4. นางสาวอมรรัตน์ ใจยะเสน

สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ: การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมอ้างอิงเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสงทำโดยวัดการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) และการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) โดยคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุดของถั่วแต่ละชนิดอย่างละ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 01023 01001 01014 02009 02008 02002 03069 03071 และ 03018 ซึ่งนำมาใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของเชื้ออย่างน้อย 1.0×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถก่อให้เกิดปมในรากถั่วทั้ง 3 ชนิด อย่างไรก็ตามมีเพียงไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01001 01014 01023 ที่จำเพาะต่อถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว เมื่อตรวจสอบความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) โดยศึกษาความจำเพาะสัมพัทธ์และค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง มีค่าความจำเพาะสัมพัทธ์ เท่ากับ 100 56.94 และ 54.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ เท่ากับ 100 71.30 และ 69.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ค่าความไวสัมพัทธ์มีค่าเท่ากัน คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไร

โซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงได้อย่างได้อย่างเหมาะสมในการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

Abstract: Acetylene Reduction Assay (ARA) and the Most Probable Number (MPN) are the methods for analyzing the efficiency and quantity of rhizobium in rhizobium biofertilizer. Three of each rhizobium strains from soybean mung bean and ground nut (DASA 01023 01001 01014 02009 02008 02002 03069 03071 and 03018) that provide the highest nitrogen fixing rate were used as reference strains in this experiment. For inoculation method, the minimum concentration of 1.0 x 10^6 cfu/ml of these strains could produce nodules in their hosts. However, only DASA 01001 01014 01023 had specific to soybean. Method validation was performed to analyze the specificity of rhizobium strains in rhizobium biofertilizer. The result showed that the relative specificity of this method were 100 56.94 54.16%, which resulted in 100 71.30 69.44% relative accuracy respectively. Whereas, all strains had 100% relative sensitivity. Therefore, 9 rhizobium strains in this study can be used to analyze the quantity and efficiency of rhizobium in rhizobium biofertilizer.

6. คำนำ:

ปัจจุบันเอกชนมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเพื่อจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้านั้น มีการควบคุมคุณภาพโดยต้องขอขึ้นทะเบียนปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ. ศ. 2550 ซึ่งได้กำหนดมาตรฐานปุ๋ยชีวภาพ ไรโซเบียม จะต้องมีจุลินทรีย์ไรโซเบียม อย่างน้อย 1 x 10^6 หรือ 1 ล้านเซลล์ต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเข้าสร้างปมรากกับพืชตระกูลถั่วและเจริญอยู่ภายในปมรากแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยปมรากพืชตระกูลถั่วที่มีไรโซเบียมอาศัยอยู่เปรียบ เสมือนโรงงานปุ๋ยไนโตรเจนทางชีวภาพ เนื่องจากไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนเพื่อให้พืชใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์จะมีความเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลเช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง ที่แตกต่างกันและมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่างกัน จาการทดสอบการตรึงไนโตรเจนได้ตั้งแต่ 7.096 ถึง 28.099 (ไมโครโมลเอทธิลีน/พืช/ชม.) ของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่อาศัยอยู่กับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation) เป็นกระบวนการผลิตแอมโมเนียจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรแคริโอต (prokaryote) ที่สามารถใช้แก๊สไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ (หนึ่ง, 2554) โดยสามารถแบ่งตามความสัมพันธ์ระหว่างโปรแคริโอตและพืช เป็น 2 ประเภท ได้แก่ การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Free-Living Heterotrophs) และแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiotic Nitrogen Fixation) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแบบ

พึ่งพาอาศัย คือแบคทีเรียที่ต้องอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (จำเพาะเจาะจง) จึงจะสามารถตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศได้ เช่น ไรโซเบียม แฟรงเคีย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาด 0.5-0.9 x 1.2-3.0 ไมครอน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) เคลื่อนที่ด้วย flagella มีทั้งแบบ single polar และ peritrichous เซลล์มีการสะสมอาหารใน granule ที่ภายในบรรจุ Polymeric beta-hydroxybutaric acid (PHB) ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด อุณหภูมิที่ 25-30 องศาเซลเซียส และค่า pH 6-7 เป็นช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ

การประยุกต์ใช้ไรโซเบียมในการเกษตรสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของปุ๋ยพืชสด (พืชตระกูลถั่ว) โดยไถกลบพืชตระกูลถั่ว จะสลายตัวและปล่อยธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนในชั้นดิน มีรายงานว่าโสนแอฟริกัน (Sesbania ostrate) และ โสน (S. canabina) สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 190 และ 149 กิโลกรัม/ไร่/ปี (นันทกร บุญเกิด, 2529) ซึ่งเป็นประโยชน์แก่พืชเศรษฐกิจที่เป็นพืชหลักต่อไป และการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมร่วมกับพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจ โดยมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ เชื้อไรโซเบียมดั้งเดิมที่มีอยู่ในดิน (indigenous rhizobia) เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างปมต่ำ ปริมาณไนโตรเจนในดิน และหัวเชื้อควรมีจำนวนเซลล์ของไรโซเบียมในปริมาณที่มากพอที่จะแข่งขันกับเชื้อไรโซเบียมดั้งเดิม ทั้งนี้ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากกลไกการตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในอากาศ มาเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เชื้อ ไรโซเบียมมีความสามารถในการสร้างปมที่รากหรือที่ลำต้นของพืชตระกูลถั่ว ทำให้พืชได้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนโดยตรง ซึ่งต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วกับไรโซเบียม ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพจึงมีความสำคัญในการช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในการผลิตพืชตระกูลถั่ว ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตลดลง และช่วยลดปัญหาจากการใช้ปุ๋ยเคมี เช่น การสะสม ตกค้างของปุ๋ยเคมี เนื่องจากพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งหมด รวมถึงการชะล้างปุ๋ยเคมีทำให้เกิดการปนเปื้อนไปยังแหล่งน้ำอุปโภคบริโภคได้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมโดยวิธีการตรวจสอบการเข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว (plant infection method) เป็นวิธีการตรวจนับจำนวนไรโซเบียมที่มีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม เริ่มด้วยการเตรียมสารละลายปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมให้มีระดับความเจือจางที่แตกต่างกัน และนำไปปลูกใส่ให้กับผิวรากของถั่วซึ่งปลูกในถุงปลูก โดยทั่วไปนิยมใช้ถั่วเซอราโตร (siratro) และถั่วที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับชนิดถั่วที่ระบุในฉลากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ตรวจนับจำนวนถุงปลูกที่มีการสร้างปมเกิดขึ้นที่รากถั่วแล้วนำไปเปิดตารางหาค่า Most Probable Number (MPN) เพื่อประเมินปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

ใน ค.ศ. 1994 ได้เริ่มมีการจำแนกไรโซเบียมโดยใช้การสร้างปมในพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดเป็นเกณฑ์ แต่ผลที่ได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกได้อย่างชัดเจน ในปัจจุบันหลักเกณฑ์ทั่วๆ ไปที่ใช้ในการจัดจำแนกไรโซเบียม เช่น การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี ชนิดของพืชตระกูลถั่วที่สามารถสร้างปม ความสามารถในการทนเกลือ และความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะต่างๆ (หนึ่ง, 2554)

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมโดยวิธีการตรวจสอบการเข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว (plant infection method) เป็นวิธีการตรวจนับจำนวนไรโซเบียมที่มีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม (nodule) ทำโดยเริ่มด้วยการเตรียมสารละลายปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมให้มีระดับความเจือจางที่แตกต่างกัน และนำไปปลูกใส่ให้กับผิวรากของถั่วซึ่งปลูกในถุงปลูก โดยทั่วไปนิยมใช้ถั่วเซอราโตรและถั่วที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับชนิดถั่วที่ระบุในฉลากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ตรวจนับจำนวนถุงปลูกที่มีการสร้างปมเกิดขึ้นที่รากถั่ว แล้วนำไปเปิดตารางหาค่า Most Probable Number (MPN) เพื่อประเมินปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม โดยวิธีที่ปฏิบัติอยู่ยังซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขาดเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์อ้าง (reference strain) ในการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมต่อพืชอาศัย เป็นต้น

ดังนั้น จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม เพื่อรองรับการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

7. วิธีดำเนินการ:

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง สายพันธุ์บริสุทธิ์ จากห้องปฏิบัติการวิจัยไรโซเบียม กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง
3. ถั่วเหลือง (พันธุ์เชียงใหม่ 60) เมล็ดถั่วเขียว (พันธุ์ชัยนาท 84-1) และถั่วลิสง (พันธุ์ไทนาน 9)
4. เมล็ดถั่วเซอราโตร
5. อาหาร yeast mannitol broth (YMB)
6. สารละลายธาตุอาหาร N-free plant nutrient
7. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้บ่มเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องเขย่าสาร เป็นต้น
8. เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ DASA 01001 01007 01013 01014 01015 01022 01023 01034 01054 และ 01059 เชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02001 02002 02006 02007 02008 02009 02010 02020 02062 และ 02080 เชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03018 03026 03027 03028 03043 03069 03071 03083 03084 และ 03094 (Table 1) ซึ่งเป็นเชื้อไรโซเบียมที่แยกมาจากปมรากถั่วและมีความจำเพาะกับการสร้างปมรากในต้นถั่วแต่ละชนิดเท่านั้น โดยได้รับมาจากห้องปฏิบัติการวิจัยไรโซเบียม กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร นำเชื้อทั้ง 30 สายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast mannitol broth นับจำนวนเชื้อไรโซเบียมด้วยวิธี standard plate count จากนั้นทำการปลูกเชื้อไรโซเบียมดังกล่าวให้กับต้นถั่วที่ปลูกใน Leonard jar (Leonard, 1943) โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete randomized design จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อต้นถั่วมีอายุประมาณ 32 วันหลังจากปลูกเชื้อ ทำการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมในปมรากถั่ว ด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีการของ Hardy et al. (1973) แล้วนำตัวอย่างแก๊สที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) คำนวณหาปริมาณแก๊สเอทิลีน โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐานจากสูตรดังนี้

อัตราการตรึงไนโตรเจน = (103 x B x V)/(250 x Std. x A x 22.4)

B = พื้นที่ใต้กราฟของพืชตัวอย่าง

V = ปริมาตรของขวดกรวยแก้วที่ใช้เก็บตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

Std. = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแก๊สอะเซทิลีนมาตรฐาน

A = เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีนเป็นชั่วโมง

อัตราการตรึงไนโตรเจน มีหน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C2H4) ต่อต้นพืชต่อชั่วโมง เมื่อใช้ เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน (250 มิลลิลิตร) นำข้อมูลอัตราการตรึงไนโตรเจนของถั่วแต่ละชนิดที่ได้รับการปลูกเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไปการบันทึกข้อมูล

2. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม โดยวิธีการหาค่า MPN (Most Probable Number)

1) การเตรียมถุงปลูก

ถุงปลูกพืชทำจากถุงพลาสติกอย่างหนาขนาด 5 x 8 นิ้ว ภายในบรรจุกระดาษฟางพับขอบด้านหนึ่งของถุงปลูกใส่หลอดพลาสติกเพื่อสะดวกในการเติมธาตุอาหารพืชปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ถุงปลูก นำถุงปลูกที่เตรียมเรียบร้อยแล้วไปผ่านการฆ่าเชื้อปนเปื้อน แล้วนำไปจัดวางในชั้นวางถุงปลูกที่ทำจากลวดสแตนเลสตัดเป็นกรอบสี่เหลี่ยมตอกลงบนแผ่นไม้โดยมีช่องห่างระหว่างกรอบลวด 1 เซนติเมตร

2) การเพาะเมล็ดถั่ว

นำเมล็ดถั่วเซอราโตร ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง มาฆ่าเชื้อปนเปื้อนที่ผิวหุ้มเมล็ด จากนั้นแช่เมล็ดถั่วและเพาะบนสำลีที่มีความชื้นเหมาะสมในสภาวะปลอดเชื้อบนจานเพาะเมล็ดพร้อมฝาปิด เกลี่ยเมล็ดให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียสทิ้งไว้จนเมล็ดงอกรากมีความยาวประมาณ 0.5 – 1.0 เซนติเมตร

3) การเตรียมสารละลายเจือจางของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องสารเป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็ว 30 รอบ/นาที จะได้สารละลายปุ๋ยชีวภาพที่มีความเจือจาง 10^{-1} เท่า จากนั้นทำสารละลายดังกล่าวให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้นตามลำดับ (serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวละลายเจือจาง (diluent)

4) การปลูกถั่วในถุงปลูก

นำถุงปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อวางในชั้นวางถุงปลูก เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free plant nutrient) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อถุงละ 100 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบเจาะรูบนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ 2 รู โดยมีระยะห่างประมาณ 5 เซนติเมตร สอดรากเมล็ดถั่วเซอราโตรที่รากงอกแล้วลงในรูที่เจาะไว้ด้านใดด้านหนึ่ง

ของถุงปลูกโดยเมล็ดถั่วจะอยู่บนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ ส่วนรูที่เหลือให้ปลูกถั่วที่ต้องการทดสอบ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน ดูดสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่มีระดับของความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} โดยเริ่มจากระดับความเจือจางมากที่สุดไปถึงน้อยที่สุดคือ เริ่มจาก 10^{-8} ถึง 10^{-1} ทำกาหยดสารละลายเจือจางปุ๋ยชีวภาพจำนวน 1 มิลลิลิตร/ถุงปลูก บริเวณรากถั่ว ทำ 4 ซ้ำต่อระดับความเจือจาง โดยใช้ถุงที่ปลูกถั่วอย่างเดียวที่มีการเติมน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมชนิดลบ (negative control) และถุงที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วแต่ละชนิดที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงเป็นชุดควบคุมชนิดบวก (positive control) จากนั้นนำชั้นวางถุงปลูกไปวางบนชั้นแสง ให้แสงสว่างแก่พืช 12 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูแลให้ธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจนเมื่อพืชต้องการ จนครบกำหนด 3 สัปดาห์ ทำการทดลองในข้อ 4 ซ้ำ โดยเปลี่ยนจากเมล็ดถั่วเหลืองเป็นเมล็ดถั่วเขียว และถั่วลิสง ตามลำดับ โดยทุกถุงที่ปลูกจะต้องมีถั่วเซอราโตรเป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive sample) ทุกถุง เนื่องจากถั่วเซอราโตรสามารถเกิดปมรากได้กับเชื้อไรโซเบียมทุกชนิด

5) การคำนวณจำนวนไรโซเบียมต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

เมื่อครบกำหนดเวลา 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนถุงที่ต้นถั่วติดปม และนำไปเปิดตาราง MPN (Somasegaran and Hoben, 1994) เพื่อหาค่าประเมินของจำนวนไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว (m) จากนั้นคำนวณจำนวนไรโซเบียมต่อกรัมของปุ๋ยชีวภาพดังนี้

$$X = \frac{m \times d}{V}$$

X = จำนวนไรโซเบียมต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

m = ตัวเลขที่ได้จากการเปิดตาราง MPN

d = ระดับความเจือจางต่ำสุดของสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ใส่ให้กับต้นถั่ว (101)

v = ปริมาตรสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ใส่ให้กับต้นถั่ว (1 มิลลิลิตร) เวลาและสถานที่

6) การตรวจสอบความถูกต้องของของสายพันธุ์ไรโซเบียมวิธีวิเคราะห์ปริมาณในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง และสมาคม เอ โอ เอ ซี ประเทศไทย, 2558)

โดยการหาค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative Accuracy) ความจำเพาะสัมพัทธ์ (Relative Specificity) และความไวสัมพัทธ์ (Relative sensitivity)

Responses	Reference method positive (R+)	Reference method negative (R-)
Test kit positive (A+)	+/+ Positive Agreement (PA)	+/- Positive Deviation (PD)
Test kit negative (A-)	-/+ Negative Deviation (ND)	-/- Negative Agreement (NA)

ความถูกต้องสัมพัทธ์ = (PA+NA)/N x100%

ความจำเพาะสัมพัทธ์ = NA/N- x100%

ความไวสัมพัทธ์ = PA/N+ x100%

โดย N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (PA + PD + NA + ND)

N- คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมดของวิธีอ้างอิง (NA + PD)

N+ คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดของวิธีอ้างอิง (PA + ND)

การบันทึกข้อมูล

1. ประสิทธิภาพการตรึงในโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์

2. การเกิดปมที่รากของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วลิสง

ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค. 2558 สิ้นสุด ก.ย. 2561

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ผลการวิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วลิสงสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า สายพันธุ์ DASA 01023 01014 01001 02009 02008 02002 03069 03071 และ 03018 มีค่าการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกของถั่วแต่ละชนิด ตามลำดับ (Table 1) จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์ไปใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการวิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมด้วยวิธี MPN โดยทำการปลูกเชื้อไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์ดังกล่าวให้กับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง เพื่อทดสอบความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมต่อการสร้างปมรากในถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสงต่อไป

Table 1 Number of cell and nitrogen fixation efficiency of each rhizobium strain for 3 kinds of bean

Order	Rhizobium strain	Specificity to the beans	Nitrogen fixing rate* (µmoles ethylene/plant/hour)
1	DASA 01001	Soybean	21.809
2	DASA 01007	Soybean	14.503
3	DASA 01013	Soybean	16.814
4	DASA 01014	Soybean	20.934
5	DASA 01015	Soybean	8.824
6	DASA 01022	Soybean	15.182
7	DASA 01023	Soybean	25.124
8	DASA 01034	Soybean	16.926
9	DASA 01054	Soybean	20.036
10	DASA 01059	Soybean	14.741

Order	Rhizobium strain	Specificity to the beans	Nitrogen fixing rate* (μmoles ethylene/plant/hour)
11	DASA 02001	Mung bean	6.524
12	DASA 02002	Mung bean	7.858
13	DASA 02006	Mung bean	7.704
14	DASA 02007	Mung bean	2.843
15	DASA 02008	Mung bean	8.891
16	DASA 02009	Mung bean	13.456
17	DASA 02010	Mung bean	4.90
18	DASA 02020	Mung bean	6.466
19	DASA 02062	Mung bean	6.409
20	DASA 02080	Mung bean	5.493
21	DASA 03018	Ground nut	11.013
22	DASA 03026	Ground nut	14.118
23	DASA 03027	Ground nut	17.945
24	DASA 03028	Ground nut	13.109
25	DASA 03043	Ground nut	23.740
26	DASA 03069	Ground nut	23.601
27	DASA 03071	Ground nut	18.647
28	DASA 03083	Ground nut	18.181
29	DASA 03084	Ground nut	13.316
30	DASA 03094	Ground nut	7.096

* Mean of three replicates of each strain.

2. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม โดยวิธีการหาค่า MPN (Most Probable Number) และการตรวจสอบความถูกต้องของเชื้อไรโซเบียมในวิธีวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสงด้วยวิธี MPN พบว่า เชื้อไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นของเชื้ออย่างน้อย 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถก่อให้เกิดปมในรากทั้ง 3 ชนิดได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับถุงที่ปลูกถั่วอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมสารละลายปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม (negative control) (Table 2-4) โดยพบว่าถั่วเซอราโตรที่ตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive sample) มีการสร้างปมในทุกถุงที่มีการปลูกเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง เนื่องจากถั่วเซอราโตรจัดเป็นพืชตระกูลถั่วที่ใช้เป็นพืชกับดัก (trap host) สำหรับเชื้อไรโซเบียม ถั่วเซอราโตรจึงสามารถเกิดปมรากได้กับเชื้อไรโซเบียมทุกชนิด (Somasegaran and Hoben, 1994)

Table 2 Most probable number of rhizobium for soybean strains: DASA 01001 01014 and 01023

Concentration of serial dilution	Number of growth pouch that have nodule		
	01001	01014	01023
10^{-1}	4	4	4
10^{-2}	4	4	4
10^{-3}	4	4	4
10^{-4}	4	4	4
10^{-5}	4	4	4
10^{-6}	4	4	4
10^{-7}	4	3	4
10^{-8}	1	0	0
Total	29	27	28
Number of cell (cells per gram biofertilizer)	3.4×10^{7}	1.0×10^{7}	1.8×10^{7}
Positive Sample*	4	4	4
Negative Control*	0	0	0

* Positive sample means siratro beans grown with rhizobial inoculant. Negative control means soy beans grown without rhizobial inoculant

Table 3 Most probable number of rhizobium for mung bean strains: DASA 02002 02008 and 02009

Concentration of serial dilution	Number of growth pouch that have nodule		
	02002	02008	02009
10^{-1}	4	4	4
10^{-2}	4	4	4
10^{-3}	4	4	4
10^{-4}	4	4	4
10^{-5}	3	4	4
10^{-6}	3	3	3
10^{-7}	1	1	2
10^{-8}	0	0	0
Total	23	24	25
Number of cell (cells per gram biofertilizer)	1.0×10^{6}	1.7×10^{6}	3.1×10^{6}
Positive Sample*	4	4	4
Negative Control*	0	0	0

* Positive sample means siratro beans grown with rhizobial inoculant. Negative control means mung beans grown without rhizobial inoculant

Table 4 Most probable number of rhizobium for ground nut strains: DASA 0 30 18 0 30 69 and 03071

Concentration of serial dilution	Number of growth pouch that have nodule		
	03018	03069	03071
10^{-1}	4	4	4
10^{-2}	4	4	4
10^{-3}	4	4	4
10^{-4}	4	4	4
10^{-5}	4	4	3
10^{-6}	3	2	4
10^{-7}	1	1	1
10^{-8}	0	0	0
Total	24	23	24
Number of cell (cells per gram biofertilizer)	1.7×10^{6}	1.0×10^{6}	1.7×10^{6}
Positive Sample*	4	4	4
Negative Control*	0	0	0

* Positive sample means siratro beans grown with rhizobial inoculant. Negative control means ground nuts grown without rhizobial inoculant

ผลการทดสอบความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองสายพันธุ์ DASA 01014 01001 และ 01023 ต่อการสร้างปมรากกับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง พบว่าเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะสำหรับถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างปมรากในถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียวเท่านั้น (Table 5) ส่วนผลการทดสอบความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002 02008 และ 02009 ต่อการสร้างปมรากกับถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง พบว่าเชื้อไรโซเบียมทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างปมรากในถั่วเขียวและถั่วเหลืองได้ แต่ไม่สามารถสร้างปมรากในถั่วลิสง (Table 6) โดยที่ผลการทดสอบความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03018 03069 และ 03071 ต่อการสร้างปมรากของถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง พบว่าเชื้อไรโซเบียมทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างปมรากในถั่วเขียวและถั่วเหลือง ในขณะขณะที่สายพันธุ์ DASA 03071 ไม่สามารถสร้างปมรากในถั่วเหลือง (Table 7) ซึ่งตามสมมุติฐานเชื้อไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์จะมีความจะเพาะเจาะจงกับถั่วที่เป็นพืชอาศัยเพียงอย่างเดียว เช่น เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง เท่านั้น (Wang *et al*., 2012) ยกเว้นเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวและถั่วลิสงดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมทางสถิติเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ ไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์

Table 5 Specificity of rhizobium for soybean strains: DASA 01001 01014 and 01023 on nodulation with soybean and other non-host plants as mung bean and ground nut*

Replicate	Hypothetical result**	Negative Control***	DASA 01001		DASA 01014		DASA 01023	
			mung bean	ground nut	mung bean	ground nut	mung bean	ground nut
1	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-
Total	12	0	0	0	0	0	0	0

* + means nodule, - means without nodule

** Hypothetical result means soybeans grown with rhizobial inoculant and produce nodules.

*** Negative control means soybeans grown without rhizobial inoculant.

Table 6 Specificity of rhizobium for mung bean strain: DASA 02002 02008 and 02009 on nodulation with mung bean and other non-host plants as soybean and groundnut*

Replicate	Hypothetical result**	Negative Control***	DASA 02002		DASA 02008		DASA 02009	
			soybean	groundnut	soybean	groundnut	soybean	groundnut
1	+	-	+	-	+	-	+	-
2	+	-	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	-	+	-	+	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	+	-	+	-
7	+	-	+	-	+	-	+	-
8	+	-	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-	+	-

10	+	-	+	-	+	-	+	-
11	+	-	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-
Total	12	0	11	0	10	0	10	0

* + means nodule, - means without nodule

** Hypothetical result means mung beans grown with rhizobial inoculant and produce nodules.

*** Negative control means mung beans grown without rhizobial inoculant

Table 7 Specificity of rhizobium for ground nut strains: DASA 0 30 18 0 30 69 and 0 3071 on nodulation with ground nut and other non-host plants as soybean and mung bean*

Replicate	Hypothetical result**	Negative Control***	DASA 03018		DASA 03069		DASA 03071	
			soybean	mung bean	soybean	mung bean	soybean	mung bean
1	+	-	+	+	+	+	-	+
2	+	-	+	+	+	+	-	+
3	+	-	+	+	+	+	-	+
4	+	-	+	+	+	+	-	+
5	+	-	+	+	-	+	-	+
6	+	-	+	+	-	+	-	+
7	+	-	+	+	-	+	-	+
8	+	-	+	+	-	+	-	+
9	+	-	+	+	-	+	-	+
10	+	-	+	+	-	+	-	+
11	+	-	+	+	-	-	-	+
12	+	-	-	-	-	-	-	+
Total	12	0	11	11	4	10	0	12

* + means nodule, - means without nodule

** Hypothetical result means ground nuts grown with rhizobial inoculant and produce nodules.

*** Negative control means ground nuts grown without rhizobial inoculant

เมื่อนำผลทดสอบความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) (Table 8-10) พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง มีค่าความจำเพาะสัมพัทธ์ เท่ากับ 100 56.94 และ 54.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ เท่ากับ 100 71.30 และ 69.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าความไวสัมพัทธ์มีค่าเท่ากันคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 01014 01001 และ 01023 มีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากสร้างปมรากเฉพาะกับถั่วเหลืองทำให้ค่าความจำเพาะสัมพัทธ์เท่า 100 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ค่าค่าความถูกต้องสัมพัทธ์และค่าความไวสัมพัทธ์สูงด้วย ส่วนเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว (DASA 02002 02008 และ 02009) และถั่วลิสง (DASA 03018 03069 และ 03071) ไม่มีความจำเพาะต่อถั่วเขียว และถั่วลิสง

เพราะสามารถก่อให้เกิดปมรากกับถั่วทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่าความจำเพาะสัมพัทธ์ต่ำ และส่งผลให้ค่าค่าความถูกต้องสัมพัทธ์และค่าความไวสัมพัทธ์ต่ำ

Table 8 Validation of quantity and efficiency method for rhizobium in soybean's rhizobium biofertilizer

Responses	Reference method positive (R+)	Reference method negative (R-)
Test kit positive (A+)	+/+ Positive Agreement (PA) = 36	-/+ Positive Deviation (PD) = 0
Test kit negative (A-)	+/- Negative Deviation (ND) = 0	-/- Negative Agreement (NA) = 72

when N = total number of samples (NA + PA + PD + ND) = 72+36+0+0 = 108

N- = total number of samples which had negative result (NA + PD) = 72+0 = 72

N+ = total number of samples which had positive result (PA + ND) = 36+0 = 36

Relative Accuracy = (PA+NA)/N x100 = (36+72)/108 x 100 = 100.00

Relative Specificity = (NA/N-) x100 = 72/(0+72) x 100 = 100.00

Relative sensitivity = (PA/N+) x100 = 36/(36+0) x 100 = 100.00

Table 9 Validation of quantity and efficiency method for rhizobium in mung bean's rhizobium biofertilizer

Responses	Reference method positive (R+)	Reference method negative (R-)
Test kit positive (A+)	+/+ Positive Agreement (PA) = 36	-/+ Positive Deviation (PD) = 31
Test kit negative (A-)	+/- Negative Deviation (ND) = 0	-/- Negative Agreement (NA) = 41

when N means total number of samples (NA + PA + PD + ND) = 36+31+0+41 = 108

N- means total number of samples which had negative result (NA + PD) = 31+41 = 72

N+ means total number of samples which had positive result (PA + ND) = 36+0 = 36

Relative Accuracy means (PA+NA)/N x100 = (36+41)/108 x 100 = 71.30

Relative Specificity means (NA/N-) x100 = (41/72) x 100 = 56.94

Relative sensitivity means (PA/N+) x100 = (36/36) x 100 = 100.00

Table 10 Validation of quantity and efficiency method for rhizobium in ground nut's rhizobium biofertilizer

Responses	Reference method positive (R+)	Reference method negative (R-)
Test kit positive (A+)	+/+ Positive Agreement (PA) = 36	-/+ Positive Deviation (PD) = 33
Test kit negative (A-)	+/- Negative Deviation (ND) = 0	-/- Negative Agreement (NA) = 39

when N means total number of samples (NA + PA + PD + ND) = 39+36+33+0 = 108

N- means total number of samples which had negative result (NA + PD) = 39+33 = 72

N+ means total number of samples which had positive result (PA + ND) = 36+0 = 36

Relative Accuracy means (PA+NA)/N x100 = (36+39)/108 x 100 = 69.44

Relative Specificity means (NA/N-) x100 = 39/(33+39) x 100 = 54.16

Relative sensitivity means (PA/N+) x100 = 36/(36+0) x 100 = 100.00

จากผลการติดปมรากของเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะต่อถั่วชนิดนั้นๆ จากตาราง 8-10 แสดงให้เห็นว่าเชื้อไรโซเบียมเป็นตัวอย่างประเภทบวก (positive sample) คือ จะพิจารณาผลบวกเฉพาะปมรากที่เกิดขึ้นตามชนิดของถั่วที่ได้ระบุไว้บนฉลากปุ๋ยเท่านั้น ซึ่งเชื้อไรโซเบียมทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถทำให้เกิดปมกับถั่วที่จำเพาะ และจากรายงาน ใน ค.ศ. 1994 มีการจำแนกไรโซเบียมโดยใช้การสร้างปมในพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดเป็นเกณฑ์ แต่ผลที่ได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกได้อย่างชัดเจน (หนึ่ง, 2554) จึงได้พิจารณาผลบวกเฉพาะปมรากที่เกิดกับถั่วชนิดนั้นๆ เท่านั้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมนี้จึงสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมได้อย่างเหมาะสม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกของถั่วแต่ละชนิด คือ DASA 01023 01001 01014 02009 02008 02002 03069 03071 และ 03018 ซึ่งความเข้มข้นของเชื้อไรโซเบียมอย่างน้อย 1.0 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถก่อให้เกิดปมในรากถั่วทั้ง 3 ชนิด โดยที่การตรวจสอบความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียม พบว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองมีความจำเพาะเจาะต่อการสร้างปมรากต่อพืชอาศัยเท่านั้น ทำให้มีค่าความจำเพาะสัมพัทธ์และค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวและถั่วลิสง มีค่าความจำเพาะสัมพัทธ์ และค่าความถูกต้องสัมพัทธ์เท่ากับ 56.94 54.16 71.30 และ 69.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความไวสัมพัทธ์ของเชื้อไรโซเบียมของถั่วทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากันคือ 100 เปอร์เซ็นต์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้สายพันธุ์ไรโซเบียมที่สามารถใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลือง

2. ได้วิธีการการวิเคราะห์ปริมาณ ประสิทธิภาพ และจัดจำแนกชนิดของไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพ ไรโซเบียมที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับในการรับรองการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมตาม พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) -

12. เอกสารอ้างอิง

นันทกร บุญเกิด. 2529. *คู่มือการใช้ไรโซเบียม.* อรุณการพิมพ์ กรุงเทพมหานคร

หนึ่ง เตียอำรุง. 2554. *แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing bacteria).* สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง และสมาคม เอ โอ เอ ซี ประเทศไทย. 2558. *หลักการตรวจสอบความถูกต้องของชุดทดสอบทางจุลชีววิทยา (วิธีทางเลือก) และขั้นตอนการรับรอง*. บริษัท พริ้นท์เอเบิ้ล จำกัด กรุงเทพฯ. 40 หน้า.

Hardy, R.W.F.; R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Application of the acetylene–ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 47-81.

Leonard, L.T. 1943. A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. *Journal of Bacteriology* 45: 523-525.

Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology. Springer-Verlag, New York. 367 p.

Wang, D.; S. Yang; F. Tang and H. Zhu. 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* 14(3): 334-342.

13. ภาคผนวก : -