รายงานผลงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : 1. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : 1.3 การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : 1.3.3 การวิจัยพัฒนาเทคนิคการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Research and development on Sterilization Technique of Contaminated Microbe in Carrier for PGPRs Biofetilizer Production

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการวิจัย : ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง : ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : กัลยกร โปร่งจันทึก กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ประไพ ทองระอา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

สุธารัตน์ ประภารัตน์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

พันธ์ศักดิ์ สุขทัศน์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

สุริยะ ปัจฉา สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์การมหาชน)

5. บทคัดย่อ

การวิจัยพัฒนาเทคนิคการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพา เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมวัสดุพาให้ปลอดเชื้อปนเปื้อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาที่ฆ่าเชื้อแบบต่างๆ 4 แบบกับวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย กรรมวิธีที่ 1 วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ กรรมวิธีที่ 2 วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 3 วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 4 วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีอิเลคตรอนบีม (electron beam) 25 KGy. กรรมวิธีที่ 5 วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation) 25 KGy.โดยแบ่งวัสดุพาที่เตรียมจากปุ๋ยหมักเปลือกไม้ผสมดินเหนียวชุดองครักษ์บดละเอียด 5/1 ใส่ถุงพลาสติกถุงละ 150 กรัม แล้วฆ่าเชื้อตามวิธีที่กำหนด เก็บที่อุณหภูมิห้อง แล้วนับปริมาณเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคทีโนมัยซีท ด้วยอาหาร Rose Bengal agar และNutrient agar ตามลำดับ โดยวิธี dilution plate count เมื่อครบ 0 30 90 180 และ 360 วัน ผลการทดลองพบว่า การฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีม 25 KGy. และรังสีแกมมา 25 KGy. ปลอดเชื้อปนเปื้อนที่สุดจนถึง 0-360 วัน ส่วนการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อได้ในช่วงแรก จนถึง 30 วัน แต่หลังจากนั้นก็พบว่ามีเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าว ส่วนการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ

110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ผลจากการทดลองนี้ทำให้ได้เทคนิคการทำให้วัสดุพาปลอดเชื้อ 2 วิธี คือ การฉายรังสีอิเลคตรอนบีม 25 KGy. และรังสีแกมมา 25 KGy เพื่อใช้ในการวิจัยพัฒนาปุ๋ยชีวภาพปลอดเชื้อปนเปื้อนต่อไป

Abstract

The research and development on carrier sterilization techniques for produce free contaminated microbe carrier for PGPRs biofertilizer production was investigated in this experiment. The comparison treatments were contained 1. Non sterile carrier, 2. Autoclave at 121 °C for 1 hour, 3. Autoclave at 110 °C for 1 hour, 4. Electron beam 25 KGy., and 5. Gamma ray 25 KGy. The fine compost carrier was put in plastic bag 150 g/bag and closed by heat sealing before sterile by above method and kept at room temperature. The dilution plate count technique was enumerated fungi by using Rose Bengal agar bacteria and actinomycyte by using Nutrient agar at 0, 30, 90, 180 and 360 days after kept at room temperature. The result showed that the electron beam and gamma irradiation methods were showed highest respond techniques in carrier sterilization until 360 days of keeping. The result indicated that Gamma irradiation is the best method should be selected for use in next carrier sterilization method in free from contamination PGPRs biofertilizer experiment in Thailand.

6. คำนำ

การศึกษาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อใช้ในการผลิตพืช ปัจจุบันมีได้รับความสนใจศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Diem. 1978; Bashan and Levanony 1990) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการใช้ปุ๋ยชีวภาพแต่ละพื้นที่นั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สกุลและสายพันธุ์แบคทีเรีย ชนิดของพืช สมบัติของดิน ประชากรจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ และเงื่อนไขทางสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้นในดิน โดยทั่วไปหลังการใส่ปุ๋ยชีวภาพปริมาณแบคทีเรียจะลดอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ จึงมักพบว่าผลการทดลองในสภาพปลอดเชื้อกับในสภาพธรรมชาติมักมีความแตกต่างกันมาก (Bashan and Levanony, 1988)

ปัญหาการใช้วัสดุพาไม่ปลอดเชื้อทำให้แบคทีเรียสำคัญที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆ การผลิตปุ๋ยชีวภาพภายใต้การควบคุมกำกับตาม พรบ.ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นั้น การฆ่าเชื้อวัสดุพาเพื่อลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนนั้นจึงเป็นประเด็นแก้ไขปัญหาที่เป็นทางเลือกที่สำคัญ การฆ่าเชื้อวัสดุเชิงอุตสาหกรรมนั้นส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีนึ่งฆ่าเชื้อ เนื่องจากในอดีตยังไม่มีวิธีอื่นที่เหมาะสม แต่ในปัจจุบันการฉายรังสี เริ่มนิยมนำมาใช้

ในการฆ่าเชื้อในวัสดุต่างๆเพิ่มมากขึ้น (Barend et al. 1985) โดยนิยมใช้ฆ่าเชื้อวัตถุดิบ เพื่อการถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรม แหล่งของไออนที่นิยมในการฉายรังสีมาจากลำแสงอิเลคตรอน (electron beam หรือ E-beam) หรือเอ็ก-เรย์ (X-rays) ที่กำเนิดจากเครื่องเร่งที่เป็นระบบไฟฟ้า หรือ ^{60}Co ^{137}Cs E-beam ใช้ไฟฟ้าเป็นต้นกำเนิดพลังงานไม่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีและเครื่องกำเนิดอิเลคตรอนสามารถปิด เมื่อไม่มีการใช้รังสี ซึ่งแตกต่างจากวิธีการที่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีเป็นต้นกำเนิดพลังงานที่สารกำมันตะภาพรังสีทำงานตลอดเวลา ในการฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีมจะไม่ทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ความสัมพันธ์ในการทนทานของจุลินทรีย์ต่อรังสีนั้น พบว่าเซลล์แบคทีเรียตอบสนองต่อไอออนไวมาก ซึ่งผลงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของการวิจัยการใช้รังสีแกมม่า แต่การใช้ e-beam ยังมีน้อย และในประเทศไทยโดยทั่วไปยังไม่มีการบริการฉายรังสี e-beam

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุพาที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพา เพื่อการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อปนเปื้อน

7. วิธีการดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1.วัสดุพา ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดผสมดินเหนียว
2.เครื่องฉายรังสีแบบ Electron beam (E-beam) และรังสีแกมมา (Gamma)
3.อาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ Rose Bengal agar
4, ตู้เขี่ยเชื้อ
5. สารเคมีและเครื่องแก้ว

การวางแผนการทดลอง

เป็นการเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อวัสดุพา 5 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ (control) 2. วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 3. วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 4. วัสดุพาฉายรังสี อิเลคตรอนบีม (electron beam) 25 KGy. 5. วัสดุพาฉายรังสีแกมมา (gamma ray) 25 KGy.มีทั้งหมด 4 ซ้ำ นับปริมาณด้วยการทำเป็น Composite samples จาก 4 ซ้ำเพื่อลดตัวอย่างวิเคราะห์ให้เหลือ 2 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อปนเปื้อนเฉลี่ยจากค่าเฉลี่ยของ Composite samples ดังกล่าว

วิธีการดำเนินงาน

1. การเตรียมวัสดุพา

วัสดุพาที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมกับดินเหนียวชุดองค์รักษ์ อัตราส่วน 5:1 โดยน้ำหนักแห้ง ที่มีค่าการย่อยสลายสมบูรณ์โดยวิธี germination index มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งวัสดุพาใส่ถุงพลาสติก (PP) ขนาด 6x9 นิ้ว ถุงละ 150 กรัม ปิดปากถุงให้แน่นด้วยเครื่องซีนปิดปากถุง

2. การฆ่าเชื้อวัสดุพา

การนึ่งฆ่าเชื้อ นำถุงวัสดุพาใส่ถุงพลาสติกถุงละ 20 ถุงเล็ก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง การฉายรังสีอิเลคตรอนบีม (Electron beam) นำถุงวัสดุพาใส่ในถาดสำหรับฉายรังสี เข้าเครื่องฉายรังสี อิเลคตรอนบีม โดยใช้พลังงานไฟฟ้า 8 MeV ที่ 25 KGy. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง การฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation) นำถุงวัสดุพาใส่ในกล่องสำหรับฉายรังสี เข้าเครื่องฉายรังสีแกมมา 25 KGy. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3. การนับปริมาณจุลินทรีย์ในวัสดุพา

การนับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัสดุพาดำเนินการในอาหาร 2 ชนิด คือ แบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีท ใช้อาหาร Nutrient agar (NA) ส่วนเชื้อรานับโดยใช้อาหาร Rose Bengal agar ขั้นตอนการนับเชื้อในตัวอย่างวัสดุพา ดำเนินการโดยการเจือจางวัสดุพา 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่า 180 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เกลี่ยตัวอย่างสารละลายเจือจางจากตัวอย่างวัสดุพาตามกรรมวิธีการทดลองที่ระดับเจือจางต่างๆ บนผิวหน้าอาหารแล้วนับปริมาณด้วยวิธี plate counting (**ไพโรจน์**, 2545, Zuberer. 1994) ดำเนินการนับปริมาณเชื้อรา แบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีท เมื่ออายุ 0 30 90 180 และ 360 วัน

- **ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)** : 1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2557

- **สถานที่ทำการทดลอง** กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจนับแบคทีเรีย รา และแอคทีโนมัยซีท พบว่า วิธีการฆ่าเชื้อด้วยรังสี E-beam 25 KGy. และ Gamma 25 KGy. ไม่พบมีเชื้อปนเปื้อนที่ <100 CFU/g วัสดุพา ที่อายุ 1 30 90 180 และ 360 วัน แต่กรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ 121 °C นาน 60 นาที พบเชื้อรา $4.3x10^4$ $2.4x10^4$ และ $5.6x10^3$ CFU/g เมื่ออายุ 90 180 และ 360 วันตามลำดับ แต่ไม่พบแบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีท (<100 CFU/g) กรรมวิธีวัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ 110 ° C 60 นาที ยังพบการปนเปื้อนแบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีท $2.2x10^5$ $7.1x10^5$ $3.1x10^5$ $4.9x10^5$ และ$2.6x10^5$ CFU/g และรา $6.0x10^2$ $1.9x10^5$ $1.6x10^5$ $2.8x10^5$ และ $2.4x10^5$ CFU/g ที่ 1 30 90 180 และ 360 วันตามลำดับ ในขณะที่วัสดุพาที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากที่สุด โดยมีแบคทีเรียและแอคทีโนมัยซีท $4.4x10^7$ $3.8x10^6$ $7.9x10^6$ $8.6x10^6$ และ$5.6x10^6$ CFU/g และ รา $4.4x10^6$ $3.2x10^5$ $4.6x10^6$ $3.4x10^7$และ$3.8x10^7$ CFU/g ที่ 1 30 90 180 และ 360 วันตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าในวัสดุพาที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนจำนวนมาก ซึ่งอาจมีผลต่อการมีชีวิตรอดของพีจีพีอาร์ที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ การหาวิธีการฆ่าเชื้อวัสดุพาที่ทำให้ปลอดเชื้อปนเปื้อนอย่างสมบูรณ์จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อให้วัสดุพาปลอดเชื้อ ในการทดลองนี้ปรากฏว่าวิธีการฆ่าเชื้อแบบฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีม (E-beam) 25 KGy. และ แกมมา (Gamma) 25 KGy. เป็นวิธีที่ปลอดเชื้อปนเปื้อนที่สุด ตามด้วย

กรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ส่วนวิธีอื่นๆที่ใช้เปรียบเทียบไม่สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการดำเนินการทดลองยืนยันผลในตารางที่ 2 ชี้ให้เห็นชัดเจนว่า ไม่มีเชื้อปนเปื้อนแม้เก็บวัสดุที่ฉายรังสีแกรมมา นานถึง 120 วัน

ดังนั้นเพื่อให้ทราบผลการใช้วัสดุพาปลอดเชื้อปนเปื้อนในการผลิตปุ๋ยชีวภาพตามวัตถุประสงค์ในกิจกรรมนี้นั้น จึงเลือกวิธีการฆ่าเชื้อวัสดุพาแบบ นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง และการฉายรังสีแกมมา 25 KGy. ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Azospirillum* spp. เพื่อให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อปนเปื้อนในการทดลองต่อเนื่องในปี 2557-2558 .ในการทดลองการผลิตเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อปนเปื้อนในวัสดุฆ่าเชื้อแบบต่างๆ หลังฆ่าเชื้อ 1 30 90 180 และ 360 วัน (CFU/g)

การฆ่าเชื้อปนเปื้อน	1 วัน		30 วัน		90 วัน		180 วัน		360 วัน	
	แบคทีเรียและแอคทีโนมัยชีท	รา	แบคทีเรียและแอคทีโนมัยชีท	รา	แบคทีเรียและแอคทีโนมัยชีท	รา	แบคทีเรียและแอคทีโนมัยชีท	รา	แบคทีเรียและแอคทีโนมัยชีท	รา
ไม่ฆ่าเชื้อ	$4.4x10^7$	$4.4x10^6$	$3.8x10^6$	$3.2x10^5$	$7.9x10^6$	$4.6x10^7$	$8.6x10^6$	$3.4x10^7$	$5.6x10^6$	$2.8x10^7$
นึ่งฆ่าเชื้อ 121 °C 60 นาที	<100	<100	<100	<100	<100	$4.32x10^4$	<100	$2.4x10^4$	<100	$5.6x10^3$
นึ่งฆ่าเชื้อ 110 °C 60 นาที	$2.2x10^5$	$6.0x10^2$	$7.1x10^5$	$1.9x10^5$	$3.1x10^5$	$1.6x10^5$	$4.9x10^5$	$2.8x10^5$	$2.6x10^5$	$3.1x10^5$
E-beam 25 KGy.	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Gamma 25 KGy.	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาฆ่าเชื้อแบบ Gamma 25 KGy. และในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เมื่ออายุ 1 และ120 วัน

กรรมวิธี	**1 วัน**			**120 วัน**		
	แบคทีเรีย (log_{10})	**แอคทีโนมัยซีท (log_{10})**	**รา (log_{10})**	**แบคทีเรีย (log_{10})**	**แอคทีโนมัยซีท (log_{10})**	**รา (log_{10})**
ไม่ฆ่าเชื้อ	7.67±0.53	7.59±0.47	4.59±0.50	6.05±0.37	7.07±0.10	4.45±0.45
Gamma 25 KGy.	**<100**	**<100**	**<100**	**<100**	**<100**	**<100**

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n= 5)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองหาวิธีการฆ่าเชื้อวัสดุพาที่ผลิตจากปุ๋ยหมักเปลือกไม้พบว่าวิธีการฆ่าเชื้อแบบฉายรังสีเป็นวิธีการที่มีการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพทั้งรังสีอิเลคตรอนบีม และรังสีแกมมา ที่ 25 KGy. ซึ่งมีความเหมาะสมในพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อให้ได้มาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนดตาม พรบ.ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการทดลองนี้สามารถนำไปต่อยอดในการทดลองการมีชีวิตรอดของเชื้อพีจีพีอาร์ในวัสดุพาที่ฆ่าเชื้อแบบต่างๆ และการทดลองการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เชิงอุตสาหกรรมต่อไปในปี 2557-2558

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Barend, W.S. and Henri, J. R. 1985. Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of Rhizobium inoculants. *Applied and Environmental Microbiology* 41(6): 1344-1347

Bashan, Y, and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36, 591-608.

Bashan, Y, and H. Levanony. 1988. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. J.Gen. Microbiol. 134: 1811-1820

Diem, G. 1978. Colonization of rice roots by diazotroph bacteria. In Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. Edited by U.Granhall. Ecol. Bull. (Stockholm) 26, 305-311.

Zuberer D. 1994. Recovery and numeration of viable bacteria pp.118-144. In R.W. Weaver et al., eds. Method of Soil Analysis Part 2 Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI. USA.