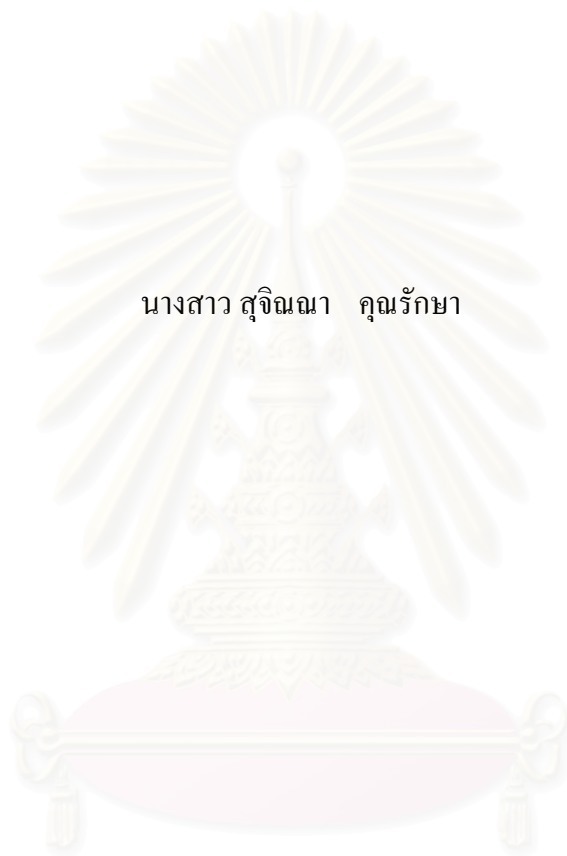


ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Rhizobium* sp. ในถั่วมะแฮะ *Cajanus cajan* (L.) Mill sp.  
ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา



นางสาว สุจินณา คุณรักษา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0517-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF *Rhizobium* sp. IN PIGEON PEA *Cajanus cajan* (L) Mill sp. AT  
THAB LAN NATIONAL PARK IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE

Miss Sujinna Khunraksa



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0517-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Rhizobium* sp. ในถั่วมะแฮะ *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา (GENETIC DIVERSITY OF *Rhizobium* sp. IN PIGEON PEA *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. AT THAB LAN NATIONAL PARK IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE)

โดย นางสาว สุจินณา คุณรักษา

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พันธุ์พิมพ์ วอนขอพร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ บุญธิดา โหมยิตทรัพย์)

สัจฉินา คุณรักษา : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Rhizobium* sp. ในถั่ว  
 มะแฮะ *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา  
 (GENETIC DIVERSITY OF *Rhizobium* sp. IN PIGEON PEA *Cajanus cajan* (L.) Mill  
 sp. AT THAB LAN NATIONAL PARK IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE)  
 อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ อรทิพา  
 เศรษฐบุตร. 113 หน้า. ISBN 974-03-0517-2

เชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตาม  
 แนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา พบว่าเชื้อ  
 ไรโซเบียมถั่วมะแฮะเป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้าทั้งหมด และเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่  
 การทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม พบว่า เชื้อไรโซเบียมมีรูปแบบการต้าน  
 ยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน 9 กลุ่ม และการศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม พบว่า เชื้อไรโซเบียม  
 มีพลาสมิด จำนวน 1 อัน ขนาดประมาณ 600 เมกะดาลตัน ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ และการทดสอบ  
 ความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียม พบว่า เชื้อไรโซเบียมมีความสามารถในการอยู่รอดลดลง  
 เมื่อระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับ 150 mM NaCl จะไม่พบการเจริญของเชื้อไร  
 โซเบียม แต่พบการเจริญของเชื้อไรโซเบียม ที่ระดับ 100 mM NaCl ซึ่งไอโซเลทที่เจริญได้สูงสุด ได้แก่ ไอ  
 โซเลท RC20 และการศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมโดยพิจารณาจากผลที่ได้  
 จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ค่า ARA) พบว่า ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ ไอ  
 โซเลท RC21 โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะนี้สามารถ  
 นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกและคัดเลือกรวมทั้งเก็บรวบรวมสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่  
 มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงฟื้นฟูสภาพป่าเสื่อมโทรมต่อไป

ภาควิชา ..... พฤกษศาสตร์ ..... ลายมือชื่อนิติ .....  
 สาขาวิชา ..... พันธุศาสตร์ ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
 ปีการศึกษา ..... 2544 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4172491523 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: *Rhizobium* / Pigeon pea / nitrogen fixation / plasmid profile / antibiotic

SUJINNA KHUNRAKSA : GENETIC DIVERSITY OF *Rhizobium* sp. IN PIGEON PEA *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. AT THAB LAN NATIONAL PARK IN NAKHON RATCHASIMA PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ORNTIPA SETHABUTR. 113 pp. ISBN 974-03-0517-2

Thirty-two soil *Bradyrhizobium* isolates from the forest-reviving at the royal suggestions and plant germplasm forest project in Tablan National Park, Nakhon ratchasima province were shown to be of a slow-growing group. They also exhibited 9 patterns of antibiotic resistance when tested with seven different antibiotics. They possessed a single 600-megadalton plasmid. All *Bradyrhizobium* growth decreased with increasing level of salt. Nine isolates survived at 100 mM NaCl, with RC20 grew best. RC21 isolate showed highest nitrogen fixation efficiency based on nitrogenase activity. The obtained genetic information will help characterize *Bradyrhizobium* host specificity for better and more efficient use in future reforestation projects.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department ..... Botany ..... Student's signature .....

Field of study ..... Genetics ..... Advisor's signature .....

Academic year ..... 2001 ..... Co-advisor's signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน ประธานคณะกรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พันธุ์พิมพ์ วอนขอพร กรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ บุญธิดา โหมยิตทรัพย์ กรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ และคณาจารย์ทุกท่านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริที่ให้พื้นที่ในการศึกษาวิจัยและให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดินและการสำรวจพื้นที่

ขอขอบพระคุณ ดร. อัจฉรา นันทกิจ นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน กรมวิชาการเกษตร (ตึกโรโซเบียม) ที่ให้การอนุเคราะห์และให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ สถาบันราชภัฏธนบุรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้การอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์การถ่ายภาพในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณวิมลรัตน์ สุกรินทร์ นักวิชาการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การอนุเคราะห์สายพันธุ์ถั่วมะแฮะสำหรับทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ให้การช่วยเหลือและให้กำลังใจ ด้วยดีตลอดมา

สถาบันวิจัยปศุสัตว์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

## หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ

## บทที่

1. บทนำ.....	1
2. ตรวจสอบเอกสาร.....	4
3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	25
4. ผลการศึกษา.....	34
5. อภิปรายผลการศึกษา.....	71
6. สรุปและข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	113

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การจำแนกเชื้อไรโซเบียม โดยใช้วิธี cross-inoculation group.....	6
2. เปรอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนว พระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา.....	36
3. ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนว พระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา.....	38
4. เปรอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนว พระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา.....	40
5. ปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนว พระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา.....	43
6. รูปแบบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท.....	49
7. ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด ของเชื้อไรโซเบียม 9 รูปแบบ.....	51
8. การทดสอบความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท.....	54
9. การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท.....	61



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แผนที่โครงการพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่า พันธุกรรมพืชในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา.....	9
2. พื้นที่ป่าในโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา.....	11
3. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	12
4. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่ไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	12
5. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีคันดินกั้นน้ำ.....	13
6. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ.....	13
7. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่มีคันดินกั้นน้ำ.....	14
8. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ.....	14
9. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่.....	15
10. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้ในการสัญจร.....	15
11. การเก็บตัวอย่างดินจากแปลงศึกษาในแนวตะแยงมุม.....	27
12. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละแปลงศึกษา.....	36
13. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละช่วงเวลา.....	37
14. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละสภาพป่า.....	37
15. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างในแต่ละแปลงที่ศึกษา.....	38
16. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างในแต่ละช่วงเวลา.....	39
17. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างในแต่ละสภาพป่า.....	39
18. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในแต่ละ แปลงที่ศึกษา.....	40
19. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในแต่ละช่วงเวลา.....	41
20. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในแต่ละสภาพป่า.....	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละแปลงที่ศึกษา.....	43
22. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละช่วงเวลา.....	44
23. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละสภาพป่า.....	44
24. ลักษณะการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะบนอาหาร YMB-congo red.....	46
25. เชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะเป็นกลุ่มเจริญช้า.....	46
26. รูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 9 กลุ่ม.....	52
27. ปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่เจริญในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของเกลือ.....	56
28. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 1.7 mM NaCl.....	57
29. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 50 mM NaCl.....	57
30. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 100 mM NaCl.....	58
31. การเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 150 mM NaCl.....	58
32. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท.....	62
33. ลักษณะการเกิดปมรากของถั่วมะแฮะแบบต่างๆ.....	63
34. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	65
35. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	66
36. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	67
37. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	68
38. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	69
39. พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.....	70

## บทที่ 1

### บทนำ

ระบบนิเวศป่าไม้จัดว่าเป็นระบบนิเวศที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมากมายและมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันภายในสิ่งมีชีวิตเองและสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อมในป่า หากระบบนิเวศขาดความสมดุลย่อมนำมาซึ่งความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศป่าไม้ในที่สุด โดยสาเหตุที่สำคัญของความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศป่าไม้ ก็คือ การกระทำของมนุษย์ เช่น การตัดไม้ทำลายป่า และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ เช่น การเกิดไฟป่า พบว่า พื้นที่ประมาณร้อยละ 40 ของประเทศไทย จัดว่าเป็นพื้นที่ป่าสงวน แต่ทว่าเพียง 1 ใน 3 ของพื้นที่ดังกล่าว เท่านั้นที่คงสภาพความเป็นป่าที่สมบูรณ์อยู่ จึงชี้ให้เห็นว่าประเทศไทยกำลังเผชิญหน้ากับวิกฤตการณ์การทำลายป่าไม้ (มณฑิ โปธิทัย, 2536) ดังนั้นจึงควรที่จะมีการวางแผนฟื้นฟูสภาพป่าที่เสื่อมโทรมลงให้กลับสู่สภาพที่สมดุลดั้งเดิม

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริของสมเด็จพระเทพฯ ร่วมกับกรมป่าไม้ มีจุดประสงค์หลักเพื่อเก็บรวบรวมพรรณไม้ และปรับปรุงดินเพื่อฟื้นฟูสภาพป่าให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตต่างๆและยังเป็นการรักษาไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยพื้นที่โครงการฯเป็นส่วนหนึ่งของอุทยานแห่งชาติทับลาน ตั้งอยู่ที่ อำเภอ นครบุรี จังหวัดนครราชสีมา แนวทางสำคัญสำหรับการฟื้นฟูสภาพป่าที่กำลังดำเนินการอยู่ ได้แก่ การปลูกป่าทดแทนโดยการเลือกชนิดพรรณไม้ที่เหมาะสมกับพื้นที่ป่า อาทิเช่น ประดู่ มะค่าโมง ราชพฤกษ์ เป็นต้น และการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินโดยการเพิ่มอินทรีวัตถุและธาตุอาหารต่างๆที่พืชต้องการโดยเฉพาะธาตุไนโตรเจนซึ่งมีอยู่ค่อนข้างน้อยในพื้นที่แห่งนี้ โดยอาศัยบทบาทของจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชตระกูลถั่ว (Zahran, 1999)

ถั่วมะแฮะ (pigeon pea) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cajanus cajan* (L.) Millsp. เป็นพืชตระกูลถั่วที่กำหนดให้ปลูกในพื้นที่โครงการฯ โดยดำเนินการปลูกไปแล้ว ตั้งแต่ปี 2539 จนถึงปัจจุบัน เป็นจำนวนทั้งสิ้น 618 ไร่ เพื่อประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์ดินและน้ำ ปรับปรุงบำรุงดิน ในพื้นที่โครงการฯ เพราะถั่วมะแฮะมีลักษณะพิเศษที่สำคัญ คือ มีความทนต่อสภาพแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น ซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมในโครงการฯได้ดี นอกจากนั้น ถั่วมะแฮะยังมีระบบรากแก้วและรากแขนงจำนวนมากที่ยังลึก จึงสามารถดูดธาตุฟอสฟอรัสในดินชั้นล่างได้ดี และบริเวณรากยังมีการสร้างปม โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย (Banejec, 1989; Arwooth,1982)

เชื้อไรโซเบียม จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว ในลักษณะได้ประโยชน์ร่วมกัน (symbiosis) โดยพืชตระกูลถั่วเป็นแหล่งให้พลังงาน และแหล่งคาร์บอนแก่ไรโซเบียม ส่วนไรโซเบียมจะให้สารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนแก่พืช (สมศักดิ์ วังใน, 2541) พบว่าเชื้อไรโซเบียมมีความจำเพาะกับชนิดของพืชตระกูลถั่ว และพืชตระกูลถั่วชนิดหนึ่งอาจเกิดปมได้โดยไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากความแปรผันทางพันธุกรรมหรือการปรับตัวของไรโซเบียมในสภาพแวดล้อมต่างๆ ซึ่งจะแสดงออกในด้านประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชตระกูลถั่วไม่เท่ากัน (Kuykendall และคณะ, 1996) โดยไรโซเบียมบางสายพันธุ์อาจมีประสิทธิภาพ (effective strain) บางสายพันธุ์อาจไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective strain) จากรายงานพบว่าไรโซเบียมที่พบในถั่วมะแฮะมีทั้งกลุ่มที่เป็น *Rhizobium sp.* (pigeon pea) และ *Bradyrhizobium sp.* (pigeon pea) (Duhan et al,1998; Poi,1990) ซึ่งจะพบมากกว่า *Rhizobium sp.* (pigeon pea) (Anand and Dogradogra,1997)

เชื้อไรโซเบียมมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชตระกูลถั่วแตกต่างกัน ตามการจัดจำแนกโดยใช้ cross- inoculation group นอกจากนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของดินด้วยซึ่งอาจทำให้เกิดสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน (Kishinevskyและคณะ, 1996; Mhamdi และคณะ, 1999)จึงควรที่จะศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมบางประการของเชื้อ เช่น ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการทนเค็ม พลาสมิดโพรไฟล์ และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวของเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะกับถั่วมะแฮะ สำหรับประเทศไทยยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของดินที่มีต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะและเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมบางประการของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกจากดินทั้ง 3 สภาพป่า ได้แก่ ป่าทุ่งหญ้า ป่าพื้นสภาพ ป่าดิบแล้ง ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียม การคัดเลือกและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงฟื้นฟูสภาพดินในพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมต่อไป

## วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมของถั่วมะแฮะในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา
2. การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมของถั่วมะแฮะในพื้นที่โครงการฯ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียม การคัดเลือกและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงฟื้นฟูสภาพดินในพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ตรวจเอกสาร

#### ความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน

กลุ่มจุลินทรีย์ในดินนับได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาดินในพื้นที่การเกษตรและพื้นที่ป่าไม้ โดยมีผลในการเพิ่มธาตุอาหารในดินทำให้พืชนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต ดังนั้นจุลินทรีย์จึงช่วยในการปรับปรุงบำรุงดินได้ ปัจจุบันมีการจำแนกจุลินทรีย์ในดินออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ฟอสเฟต (phosphate solubilizing microorganisms) กลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic microorganisms) และกลุ่มจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixing microorganisms หรือ diazotrophs) (สุมิตรา ภู่วโรดม. 2532) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้แก่ดินโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พวกที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ (free-living diazotrophs) เช่น azotobacter และพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออาศัยร่วมกับพืช (symbiotic diazotrophs) เช่น ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว (Alexander,1977; Subba Rao,1977)

#### สมบัติของไรโซเบียม

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน family Rhizobiaceae และ genus Rhizobium เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) (ดวงพร คันธโชติ. 2537) ลักษณะของไรโซเบียมจะมีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ในขณะที่ไรโซเบียมจะทำการตรึงไนโตรเจน พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากรูปท่อนมาเป็น แบคทีเรียรอยด์ (bacteroid) ซึ่งมีหลายรูปแบบ เช่น x - shape , y-shape, pear shape (ทรงกลม) ไรโซเบียมมีขนาดประมาณ 0.5 - 0.9 x 1.2 - 3.0 ไมครอน ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) เคลื่อนที่โดยใช้ flagellum ทั้งแบบ monotricus หรือ peritrichous (หลายเส้น) และไรโซเบียมไม่มีการสร้าง endospore (Helt และ Kuieg, 1994)

เชื้อไรโซเบียมเข้าไปอาศัยในพืชโดยการสร้างปมที่รากพืช family leguminosae หรือพืชตระกูลถั่วแบบได้ประโยชน์ร่วมกัน (symbiosis) โดยไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้มาอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ต้นถั่วและไรโซเบียมสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ในขณะเดียวกันไรโซเบียมก็ได้รับพลังงานและแหล่งคาร์บอนจากพืช (สมศักดิ์ วังใน. 2528)

## การจำแนกเชื้อไรโซเบียม

ในปัจจุบันได้มีการจำแนกไรโซเบียมโดยวิธีต่างๆดังนี้ (สมศักดิ์ วังใน, 2541; สุมิตรากู วโรดม, 2532)

1. จำแนกตามอัตราการเจริญเติบโตในสารอาหารที่กำหนดไว้ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเจริญเติบโตเร็ว (fast growers หรือ acid producers) ซึ่งจะผลิตกรดและมี generation time 2-4 ชั่วโมง เช่น *Rhizobium tritoli* และ *R.meliloti* และกลุ่มเจริญเติบโตช้า (slow growers หรือ non-acid producers) ซึ่งจะผลิตเบส (Irisarri และคณะ, 1996) เช่น *R. japonicum* และ *R. sp.* (cowpea group)

2. จำแนกโดยอาศัยวิธีการซีรั่มวิทยา (Serological method) โดยอาศัยปฏิกิริยาทางอิมมูโนโลยี (immunological reaction) นั่นคือ เมื่อนำ antigen ชนิดใดชนิดหนึ่งมาผสมเข้ากับ antiserum ชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด ถ้า antigen หรือเซลล์ชนิดใดสามารถรวมตัวเป็นก้อน (agglutination) หรือเกิดเป็นตะกอน (precipitation) กับ antibody หรือ antiserum ชนิดดังกล่าวก็หมายความว่า antigen หรือเซลล์ชนิดนั้นมีความสัมพันธ์หรือคล้ายคลึงกับเซลล์ที่ใช้ผลิต antiserum นั้น

3. จำแนกโดยอาศัย DNA base ratios และ DNA hybridization ใช้หลักการคือ จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันหรือคล้ายกันจะมี DNA base ratios เช่น เปรอร์เซ็นต์ G+C (guanine+cytosine) อยู่ในระดับใกล้เคียงกันและ DNA ของจุลินทรีย์ดังกล่าวจะสามารถรวมตัว (hybridization) กันได้ด้วย การศึกษา DNA base ratios พบว่าควรจะจำแนกไรโซเบียมออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ไรโซเบียมพวกที่เจริญเติบโตเร็วซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ G+C ต่ำ คือระหว่าง 58.6 - 63.1 เช่น *R. leguminosarum* และ *R. meliloti* และพวกที่เจริญเติบโตช้าและมีเปอร์เซ็นต์ G+C สูง ระหว่าง 62.8 - 65.5 ให้จัดอยู่ใน *R. japonicum* อย่างไรก็ตามปัจจุบันการจัดจำแนกโดยวิธีการนี้ยังมีการศึกษาไม่มากนัก

4. การจำแนกโดยอาศัยความสามารถในการสร้างปมในพืชตระกูลถั่วเฉพาะกลุ่ม กล่าวคือ เมื่อนำไรโซเบียมจากปมของถั่วชนิดหนึ่งไปปลูกเชื้อ (inoculate) ในถั่วอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสมาชิกในถั่วกลุ่มเดียวกันก็จะทำให้เกิดปมในถั่วชนิดหลังได้ เรียกกลุ่มพืชดังกล่าวนี้ว่า cross-inoculation group (ตารางที่ 1) ต่อมาเมื่อมีการศึกษาเชื้อไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วมากขึ้นทำให้พบว่า มีพืชตระกูลถั่วและไรโซเบียมอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถจัดเข้าใน cross-inoculation group ที่มีอยู่เดิมได้ แต่ได้มีการแก้ปัญหาโดยการใส่ชื่อถั่วกำกับไว้ เช่น ไรโซเบียมโสน ไรโซเบียมกระถิน เป็นต้น และยังพบอีกว่า ไรโซเบียมจากถั่วบางกลุ่มสามารถเกิดปมกับถั่วกลุ่มอื่นเรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า symbiotic promiscuity ดังนั้นการแบ่งเชื้อไรโซเบียม แบบ cross-inoculation group นี้ก็ยังไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุด แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างสะดวกและมีประโยชน์ในด้านการเกษตร จึงยังนิยมใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน

ตารางที่ 1 การจำแนกเชื้อไรโซเบียม โดยใช้วิธี cross-inoculation group (นันทกร บุญเกิด, 2529; FAO, 1984 )

ชนิดของไรโซเบียม	พืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย
<i>R. meliloti</i>	<u>Alfalfa group</u> <i>Medicago sativa</i> <i>M. orbicularis</i> <i>Melilotus alba</i> <i>Trigonella foenumgraceum</i>
<i>R. trifolii</i>	<u>Clover group</u> <i>Trifolium hybridum</i> <i>T.repens</i> <i>T.arvense</i> <i>T.reflexrum</i>
<i>R.leguminosarum</i>	<u>Pea and Vetch group</u> <i>Pisum arvense</i> <i>Pisum sativum</i> (ถั่วลันเตา) <i>Vicia sativa</i> <i>V. faba</i> <i>Lathyrus odoratus</i> <i>Len culinaris</i>
<i>R.phaseoli</i>	<u>Bean group</u> <i>Phaseolus vulgaric</i> (ถั่วแดงหลวง) <i>P. coccinenus</i>
<i>R.japonicum</i>	<u>Soybean group</u> <i>Glycine max</i> (ถั่วเหลือง)
<i>R.spp</i>	<u>Cowpea group</u> <i>Vigna radiata</i> (ถั่วเขียว) <i>V. sinensis</i> (ถั่วฝักยาว)



	<i>V. sesquipedalis</i> <i>Lespedez striata</i> <i>Crotalaria juncea</i> <i>Desinodium lorluosum</i> <i>Pueraria thunbergiana</i>
--	---

### ถั่วมะแสะและชนิดของไรโซเบียมในถั่วมะแสะ

ถั่วมะแสะ *Cajanus cajan* (L.) Millsp. เป็นพืชพื้นเมืองเขตร้อนหรือกึ่งร้อนซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกัน ได้แก่ ถั่วมะแสะ(ภาคเหนือ) ถั่วแระ(ภาคกลาง) ถั่วแระด(ภาคใต้) ถั่วแสะ(ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ถั่วมะแสะนอกจากนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และใช้เลี้ยงสัตว์แล้ว ถั่วมะแสะยังเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์ดินและน้ำและการปรับปรุงบำรุงดินได้เป็นอย่างดีทั้งนี้เพราะถั่วมะแสะมีลักษณะพิเศษที่สำคัญ คือมีความทนต่อสภาพแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าพืชชนิดอื่นซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมได้ดี และถั่วมะแสะมีความสามารถในการดูดธาตุฟอสฟอรัสในดินชั้นล่างได้ดีทั้งนี้เพราะมีระบบรากแก้วและรากแขนงที่ยาวและมีจำนวนมากและบริเวณรากของถั่วมะแสะยังมีการสร้างปมโดยจุลินทรีย์ไรโซเบียมอย่างจำเพาะเจาะจงอีกด้วย (วิมลรัตน์ ศุภรินทร์ และมณฑิร โสภภีร์, 2536)

จากการจำแนกโดยวิธี cross-inoculation group จึงจัดเชื้อไรโซเบียมที่พบในถั่วมะแสะไว้ในกลุ่มที่เข้าไปอาศัยในพืชตระกูลถั่วกลุ่ม Cowpea group ซึ่งไรโซเบียมดังกล่าวยังไม่อาจระบุชนิดหรือสปีชีส์ได้ โดยอาจจะเป็นเชื้อไรโซเบียม 1 ชนิดหรือมากกว่า 1 ชนิด ก็ได้ ที่จะเข้าไปอาศัยอยู่ในถั่วมะแสะได้ ซึ่งก็ต้องการศึกษาในด้านพันธุกรรมต่อไป ดังนั้นจึงระบุแต่เพียงจิ้นัส (genus) แล้วตามด้วยชื่อถั่วที่เชื้อไรโซเบียมเข้าไปอาศัยอยู่ ดังนั้น เชื้อไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยในถั่วมะแสะ จึงเรียกว่า ไรโซเบียมถั่วมะแสะ (*Rhizobium sp.*(pigeon pea))

การจำแนกตามอัตราการเจริญเติบโตในสารอาหาร โดยจากรายงานพบทั้งกลุ่มที่เจริญเร็ว เรียกว่า *Rhizobium sp.*(pigeon pea) และกลุ่มที่เจริญช้า เรียกว่า *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) (Duhan และคณะ, 1998) และพบว่าเชื้อไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยในถั่วมะแสะโดยส่วนใหญ่เป็น *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) มากกว่า *Rhizobium sp.*(pigeon pea) (Anand and Dogradogra, 1997)

## กระบวนการเข้าสู่รากและการสร้างปม

กระบวนการเข้าสู่รากของพืชของเชื้อไรโซเบียมเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ยังไม่เข้าใจอย่างแน่ชัด จากข้อมูลที่มีอยู่สามารถสรุปได้ดังนี้ (สุมิตรา ภู่วโรดม 2532; Boonkerd และคณะ, 1975)

### 1. การปลดปล่อยสารออกจากรากต้นถั่ว (Root exudation)

จะขับสาร root exudate ซึ่งเป็นสารพวก growth factor ออกมากระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม ทำให้ได้ปริมาณไรโซเบียมในดินเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และ สารพวก lectin ซึ่งเป็นสารประกอบระหว่างโปรตีนและ polysaccharide ซึ่งการกระตุ้นเป็นไปอย่างเฉพาะเจาะจง เช่น ถั่วพวก lucerne (*Medicago sativa*) จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *R. meliloti*

### 2. การเปลี่ยนรูปร่างของรากขนอ่อน (Deformation)

เชื้อไรโซเบียมจะเข้าสู่รากที่บริเวณขนอ่อน (root hair) อาจมีบ้างที่เข้าแทรกที่รากแขนง เช่น ถั่วลิสง ในขณะที่มีการเกาะตัวกันระหว่างรากพืชกับเชื้อไรโซเบียม รากขนอ่อน จะเกิดการม้วนงอ (curling) หรือเกิดการผิดปกติบางประการ (deformation) ขึ้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากสารพวก indole acetic acid (IAA) ซึ่งไรโซเบียมขับออกมา โดยเป็นการกระตุ้นแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพราะรากพืชชนิดอื่นก็เกิดอาการเช่นนี้ได้ นอกจากนั้นยังพบสารบางชนิดด้วย เช่น gibberellins, polysaccharide, ribonucleic acid (RNA) ซึ่งเชื่อกันว่า RNA เป็นตัวควบคุมเซลล์พืชให้ผลิตเอ็นไซม์บางชนิด จาก polysaccharide เช่น cellulase, pectinase, pectin methyl esterase (PME) เป็นต้น ซึ่งย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ของรากขนอ่อนซึ่งประกอบด้วย cellulase และ pectin ดังนั้นเชื้อไรโซเบียมจึงเข้าสู่รากได้

### 3. การเข้าสู่ราก (Infection)

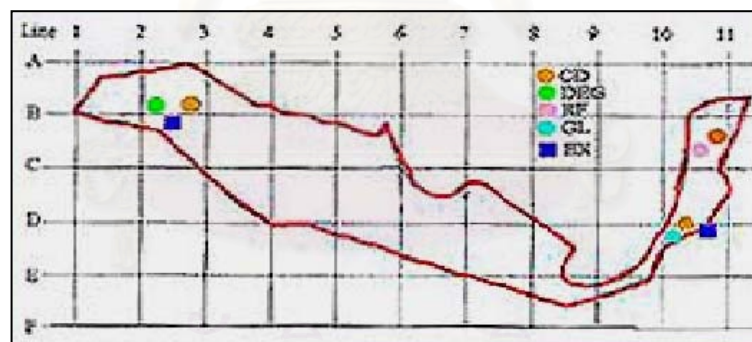
หลังจากเกิด deformation แล้วไรโซเบียมจะ penetrate รากทำให้ผนังของรากขนอ่อน เกิดเป็นรอยเว้า (invagination) และกลายเป็นท่อเล็ก ๆ เรียก infection thread ภายใน infection thread นี้ ไรโซเบียมจะถูกห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์ลูโลส ซึ่งพืชสังเคราะห์ขึ้น หลังจากนั้น infection thread จะแตกแขนงออกไปยังส่วนกลางของปมที่กำลังเจริญเติบโต ไรโซเบียมจะถูกปลดปล่อยออกไปยัง cytoplasm ของเซลล์พืชและเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น แล้วไรโซเบียมจะผลิตสารกระตุ้นพวก kinetin และสารอื่นๆ มากระตุ้นให้เซลล์รากพืชแบ่งตัวเกิดเป็นปมรากถั่วซึ่งมีโครโมโซมเป็นสองเท่าของต้นถั่วซึ่งอาจพบได้ทั้งแบบ diploid และ polyploid หลังจากทีเข้าไปอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์พืชแล้วแบคทีเรียจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ประมาณ 4-6 เซลล์ แบคทีเรียจะอยู่รวมกัน และถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นถุง (pocket) ลักษณะของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปจากที่เคยเป็นเรียกว่า bacteroid ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเดิมประมาณ 40 เท่า และอาจมีรูปร่างเป็นรูปดาว รูปแฉก หรือ

คล้ายกระบอง นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติภายในเซลล์เปลี่ยนไป มีการสังเคราะห์เอนไซม์ nitrogenase และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน เช่น leghaemoglobin เป็นต้น

รูปร่างของปมรากถั่วที่เกิดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของถั่วและสายพันธุ์ของไรโซเบียม ฉะนั้น รูปร่างของปมจึงเป็นลักษณะเฉพาะของถั่วแต่ละชนิด สำหรับขนาดของปมนั้นจะมีขนาดแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นถั่วต้นเดียวกัน ขนาดของปมอาจจะแตกต่างกันได้ (Poi, 1990)

### ลักษณะทั่วไปของพื้นที่

พื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช เป็นพื้นที่ที่ตั้งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอบัวชุม จังหวัดนครราชสีมา พื้นที่โดยรวมมีรูปร่างคล้ายปลาหวา ซึ่งประกอบไปด้วยพื้นที่ป่า 3 ลักษณะ ได้แก่ ป่าทุ่งหญ้า ป่าพื้นที่สภาพ และป่าดิบแล้ง (ภาพที่ 2) พื้นที่โครงการทั้งหมดจะถูกแบ่งออกตามแนวเส้นแวง รวมทั้งสิ้น 16 แนว และถูกแบ่งตามแนวเส้นรุ้งรวมทั้งสิ้น 6 แนว (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แผนที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอบัวชุม จังหวัดนครราชสีมา

ลักษณะของพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 8 แปลง ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน โดยกำหนดตามแนวเส้นแวง มีรายละเอียดดังนี้

1. ระหว่างแนวที่ 1 และ 2 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (Dry ever green forest with natural water supply; DEGW) ลักษณะทั่วไปมีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ในพื้นที่มีต้นไม้ขนาดใหญ่จำนวนมากมายังทำให้แสงสว่างส่องลงสู่พื้นดินได้ไม่มากนัก ลักษณะเนื้อดินประกอบไปด้วยดินทรายเป็นส่วนใหญ่ บริเวณพื้นที่นี้มีลำห้วยขนาดเล็กไหลผ่านซึ่งในช่วงแห้งแล้งจะมีปริมาณน้ำค่อนข้างน้อย ( ภาพที่ 4 )

2. ระหว่างแนวที่ 1 และ 2 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่ไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (Dry ever green forest; DEG) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่มีพันธุ์ไม้หลากหลายชนิดจำนวนมากและลักษณะประกอบไปด้วยดินทรายเป็นส่วนใหญ่ บริเวณพื้นที่นี้ไม่มีลำห้วยขนาดเล็กไหลผ่าน ( ภาพที่ 5 )

3. แนวที่ 3 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ (checkdam 3; CD3) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นพื้นที่ที่มีการปลูกกล้าไม้กระจายอยู่ทั่วไปขอบคันดินกั้นน้ำมีการปลูกหญ้าแฝกเพื่อป้องกันคันดินพังและลักษณะของดินเป็นดินทรายเม็ดใหญ่มีสีค่อนข้างจาง ช่วงฝนตกมีการกักเก็บน้ำได้มากจึงมีการวางไข่ของพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกระจายทั่วพื้นผิวน้ำ ( ภาพที่ 10 )

4. แนวที่ 10 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้ในการสัญจร ซึ่งเป็นเส้นทางที่ใช้ในการเดินเข้าสู่ checkdam 18 (Way) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าทุ่งหญ้าทั้งสองข้างทาง ลักษณะดินเป็นดินเหนียวเนื้อแน่นสีแดง ช่วงแห้งแล้งดินจะมีสภาพแข็งมาก ( ภาพที่ 11 )

5. แนวที่ 10 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (Glassland with checkdam 18; GLCD18) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าทุ่งหญ้า มีหญ้าแห้งทับถมกระจายทั่วพื้นที่ จึงช่วยในการดูดซับความชื้นในช่วงฝนตก ส่วนคันดินกั้นน้ำนี้มีความสามารถในการเก็บกักน้ำได้พอสมควรแต่ช่วงแห้งแล้งมีน้ำปริมาณน้อยมาก ลักษณะดินเป็นดินเหนียวเนื้อแน่นสีแดง ( ภาพที่ 6 )

6. แนวที่ 10 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ (Glassland; GL) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าทุ่งหญ้าซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหญ้าคา ลักษณะดินเป็นดินเหนียวเนื้อแน่นสีแดง ในพื้นที่ไม่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ ดังนั้นในช่วงแห้งแล้งจึงขาดความชุ่มชื้นอย่างมาก ( ภาพที่ 7 )

7. แนวที่ 11 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าฟื้นฟูสภาพที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (Regrown forest with checkdam 21; RFCD21) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติในพื้นที่ประกอบไปด้วยไม้พุ่มและไม้เลื้อยเต็มพื้นที่ มีเศษกิ่งไม้ใบไม้กระจายทั่วทับถมกันเป็นจำนวนมาก ลักษณะดินเป็นดินค่อนข้างร่วนเป็นสีดำ เม็ดดินเล็กละเอียด ช่วงแห้งแล้งมีปริมาณน้ำไม่มากนัก แต่ในช่วงฝนตกมีปริมาณน้ำมาก และความชุ่มชื้นสูงทำให้มีการวางไข่ของพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกระจายทั่วพื้นผิวน้ำ ( ภาพที่ 8 )

8. แนวที่ 11 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่ไม่มีต้นดินก้นน้ำ (Regrown forest ; RF) ลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติในพื้นที่ประกอบไปด้วยไม้พุ่มและไม้เลื้อยเต็มพื้นที่จึงทำให้ปริมาณแสงสู่พื้นดินมีปานกลางมีเศษกิ่งไม้ใบไม้กระจายทั่วทับบนกันเป็นจำนวนมาก ลักษณะดินเป็นดินค่อนข้างร่วนเป็นสีดำ เม็ดดินเล็กละเอียด ดินมีความชื้นเหมาะสม จึงทำให้ปริมาณแสงสู่พื้นดินมีปานกลาง ( ภาพที่ 8 )



ภาพที่ 2 พื้นที่ป่าโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าฟื้นฟูธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ก. ป่าทุ่งหญ้า ข. ป่าพื้นที่สภาพ และ ค. ป่าดิบแล้ง



ภาพที่ 3 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (DEGW)



ภาพที่ 4 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่ไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (DEG)



ภาพที่ 5 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLCD18)



ภาพที่ 6 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ (GL)



ภาพที่ 7 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (RFCD21)

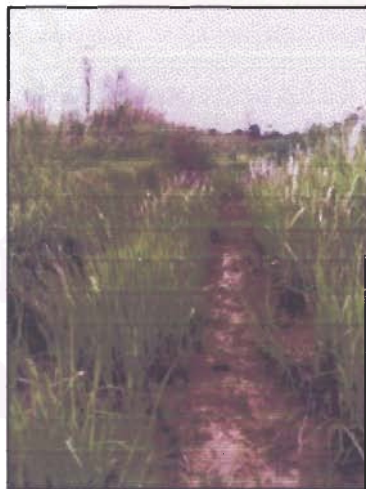


ภาพที่ 8 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ (RF)





ภาพที่ 9 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ (CD3)



ภาพที่ 10 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้ในการสัญจร (Way)

### การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและทางกายภาพของดิน

การศึกษาสมบัติทางชีวภาพ คือการประเมินหาปริมาณหรือจำนวนไรโซเบียมในดิน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปแล้ว การประเมินโดยใช้วิธี total plate count เพื่อหาปริมาณไรโซเบียมทั้งหมดทำได้ยากและให้ผลไม่ค่อยแน่นอน เพราะในดินมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อไรโซเบียม ส่วนวิธีซีรัมวิทยา (serological method) ซึ่งใช้ fluorescent antibody นั้นใช้ได้ผลดีในการแยก strain ของไรโซเบียม แต่ไม่เหมาะกับการประเมินหาปริมาณไรโซเบียมในดิน วิธีการประเมินที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันได้แก่วิธีการ plant infection count ซึ่งเป็นการนำดินมาทำให้เจือจาง (serial dilution) นำไป inoculate กับพืชตระกูลถั่ว แล้วประเมินจำนวนไรโซเบียมจากจำนวนปมที่เกิดขึ้น โดยอาศัยสมมุติฐานที่ว่า ปมที่เกิดขึ้นหนึ่งปมจะเกิดจากการที่มีไรโซเบียมเข้าสู่รากอย่างน้อยหนึ่งเซลล์ ค่าที่ได้จากการประเมินโดยวิธี plant infection count ไม่ใช่ค่าที่แท้จริงของปริมาณไรโซเบียมในดิน แต่จะเป็นค่ามากที่สุดที่เป็นไปได้ (most probable number: MPN) โดยวิธี plant infection count นี้เหมาะสำหรับถั่วที่มีขนาดเล็ก (Somasegaran et al., 1985)

การศึกษาสมบัติทางกายภาพของดิน ก็คือการศึกษาอิทธิพลทางกายภาพบางประการของดินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไรโซเบียมในดิน ดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่างของดิน ไรโซเบียมบางสายพันธุ์อาจจะชอบดินที่มีสภาพเป็นกรดหรือด่างก็ได้ ซึ่งโดยทั่วไปไรโซเบียมจะเจริญได้ดีในค่าความเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง (pH 6.5-7.5) เพราะการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุจะเกิดได้ดี โดยพบว่าดินที่มีสภาพเป็นกรดจัดมาก (pH 4.5-5.0) หรือ กรดจัด (pH 5.1-5.5) (เอิบ เขียวรัตน์, 2542) จุลินทรีย์มีกิจกรรมช้าลงในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุทำให้เกิดธาตุอาหารน้อยลงและจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนยอมทำงานช้าลงด้วย (ปลูพิชล วายอัครี, 2541)

2. ความชื้นของดิน ดินที่มีความแห้งแล้งสูงหรือมีอุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้ความชื้นในดินต่ำซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของไรโซเบียมทำให้พบปริมาณไรโซเบียมค่อนข้างต่ำซึ่งจุลินทรีย์และพืชจะดูดซับน้ำไปใช้ประโยชน์ เพราะน้ำเป็นตัวทำละลายแร่ธาตุต่างๆที่อยู่ในดิน โดยระดับน้ำในดินที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย ประมาณ 50-70% WHC (water holding capacity) (ประกิตต์สิน สีหนนท์, 2540)

3. ปริมาณธาตุไนโตรเจนในดิน เป็นสิ่งที่บ่งบอกได้ถึงประสิทธิภาพหรือปริมาณของไรโซเบียมในดิน ซึ่งโดยปกติไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนในอากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนียในดิน ดังนั้นดินบริเวณที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงก็อาจจะมีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

หรือมีปริมาณไรโซเบียมในดินสูง (ปีทมา วิตยากร , 2533) ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในดินนิยามหา total nitrogen และไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (available nitrogen) เช่น  $\text{NH}_4^+$  และ  $\text{NO}_3^-$  ซึ่งมีอยู่น้อยมาก และมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ การวิเคราะห์  $\text{NH}_4^+$  และ  $\text{NO}_3^-$  จึงบอกเพียงว่า สภาพของดินในขณะเก็บตัวอย่างนั้นมีระดับ  $\text{NH}_4^+$  และ  $\text{NO}_3^-$  ปริมาณเท่าใด แต่จะไม่สามารถใช้วัดระดับไนโตรเจนของดินสำหรับระยะเวลายาวนานได้ (Bremner,1965)

### การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ

#### 1. ความสามารถในการทนเค็ม

ดินเค็ม คือดินที่มีปริมาณเกลือ  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$  ในปริมาณที่สูงในดินจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและจุลินทรีย์ โดยปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาดินเค็ม โดยเฉพาะดินในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นที่ตั้งของพื้นที่โครงการฯ ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลานด้วย โดยความเค็มจะกระจายเป็นหย่อมๆ เนื่องจากพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นดินทราย ความเค็มจึงมีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล พบว่าดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่เป็นดินเค็มที่มีสภาพเป็นกรดจัด (เพิ่มพูน กิรติกลีกร, 2527)

*Rhizobium fredii* USDA 191 ที่เป็นมิวแทนต์ และมีความสามารถในการทนเค็มพบว่าจะเป็นไรโซเบียมที่จะชักนำให้มีการสร้างปมที่รากแขนงของต้นถั่วเหลือง โดยพบว่าเชื้อไรโซเบียมดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่ในระดับต่ำและพบว่า mutant ทำให้น้ำหนักของต้นและรากของพืชตระกูลถั่วที่เข้าไปอาศัยมีน้ำหนักของต้นและรากลดลงด้วย (Ohwada และคณะ,1998)

ในพื้นที่ที่มีสถานะความเค็มค่อนข้างสูงและเป็นพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงหรืออยู่ในสถานะแห้งแล้ง พบว่าเชื้อไรโซเบียมจะถูกจำกัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในสถานะดังกล่าว และการเข้าสร้างปมรากของเชื้อไรโซเบียมกับต้นถั่วนอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในสถานะความเค็มค่อนข้างสูงและเป็นพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงหรืออยู่ในสถานะแห้งแล้ง สามารถจำกัดการเจริญเติบโตของ *Leucaena leucocephala* ได้ (Hashem และคณะ,1998)

ต้นถั่วหัวช้าง Chickpea (*Cicer arietinum* L.) ที่ถูกสร้างปมโดยเชื้อไรโซเบียมพบว่ามีความไวต่อความเค็มมากกว่าพืชตระกูลถั่วที่เลี้ยงด้วยไนโตรเจนที่ไม่ได้เกิดจากการตรึงไนโตรเจนโดยเชื้อไรโซเบียมเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสองกลุ่มการทดลอง และพบว่าเชื้อไรโซเบียมที่เข้า

ไปอาศัยในต้นพืชตระกูลถั่วที่มีความไวต่อความเค็มมากกว่าอาจจะมีการหยุดยั้งกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของเชื้อไรโซเบียมได้ (Zurayk และคณะ,1998)

เชื้อไรโซเบียมในบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีร่วมกับพืชตระกูลถั่ว legume เมื่อไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วอยู่ภายใต้สภาวะความเค็มในระดับต่างๆ และการได้รับความร้อนหรือสภาวะแห้งแล้ง รวมทั้งสภาวะความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง พบว่าเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในสภาวะเช่นนี้จะไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อได้รับสารโลหะหนัก (Zahran ,1999)

การศึกษาความเค็มของเชื้อไรโซเบียม พบว่าระดับความเค็มที่เชื้อไรโซเบียมได้รับจะสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยในถั่ว Lentil (*Lens culinaris*) โดยเอนไซม์ nitrogenase จะถูกใช้ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย (Rai และ Singh,1999)

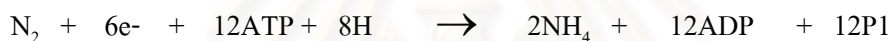
การศึกษาในถั่วฝักยาว *Vicia faba* L. และถั่วลันเตา *Pisum Sativum* L. พบว่าถั่วที่มีไรโซเบียมช่วยในการตรึงไนโตรเจนไม่ได้มีความไวต่อเกลือมากกว่าพืชที่ได้รับไนโตรเจนสังเคราะห์เสมอไป โดยไนเตรทที่เติมเข้าไปไม่ได้ลดกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ในถั่ว *Pisum Sativum* L. แต่จะลดกิจกรรมของ nitrogenase ในถั่ว *Vicia faba* L. อย่างไรก็ตามการสร้างปม จะถูกยับยั้งในถั่วทั้งสองชนิดและกิจกรรมของ nitrogenase ในพืชทั้งสองชนิดจะถูกควบคุมโดยเกลือได้ และ GS, NADH GOGAT จะถูกยับยั้งโดยเกลือในพืชทั้งสองชนิดทั้งกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้เองและกลุ่มที่เติมไนโตรเจนสังเคราะห์ (Cordovilla และคณะ ,1999)

เมื่อใส่เชื้อ *Rhizobium* sp. NBRI330 ที่รากของพืช *Prosopis juliflora* พบว่า เชื้อที่ใส่ทำให้พืชมีความสามารถทนดินเค็มได้มากกว่าพืชที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ โดยสังเกตจากน้ำหนักของต้นพืชแห้งที่มากกว่าในพืชที่ได้รับเชื้อไรโซเบียม (Rulkarni and Nautiyal, 2000)

## 2. การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม

การตรึงไนโตรเจนจากอากาศเกิดขึ้นที่บริเวณรากของถั่วซึ่งมีไรโซเบียม อาศัยอยู่ในรูปของ bacteroid ต้องอาศัยเอนไซม์ nitrogenase ( $N_2$  ase) ซึ่งจะทำหน้าที่แปรสภาพก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$ ) ไปเป็นแอมโมเนีย ( $NH_3$ ) bacteriod จะทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์นี้ประกอบไปด้วย Mo-Fe protein โดยรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่สลับซับซ้อน สำหรับโปรตีนของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นแบบที่เรียกว่า iron-sulfur type คือมีกำมะถันเป็นตัวเชื่อมระหว่างโปรตีนกับโมลิบดีนัม

และเหล็ก เนื่องจากการตรึงไนโตรเจนเป็นขบวนการที่ถูกทำลายโดยออกซิเจน แต่รากพืชต้องการออกซิเจนสำหรับใช้ในการหายใจ ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องมิกสไกในการป้องกันออกซิเจนไม่ให้เข้าไปในบริเวณที่มีการตรึงไนโตรเจน ในปมรากถั่ว leghaemoglobin จะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เอนไซม์ถูกทำลายหรือทำให้เกิดสภาพ low-oxygen ให้กับ bacteroid ทำให้ nitrogenase ไม่ถูกทำลาย ในขณะที่เดียวกัน leghamoglobin จะเป็นตัวนำออกซิเจนไปยังบริเวณที่มีการสร้าง ATP (adenosine -5 triphosphate) มีรายงานว่าปริมาณ leghaemoglobin ที่พบในปมถั่วจะ สัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วสามารถตรึงได้ในขบวนการตรึงไนโตรเจนซึ่งเป็นปฏิกิริยาการลดออกซิเจนของก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$ ) โดยเอนไซม์นั้นจะต้องอาศัย ตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) แหล่งของพลังงานได้แก่ ATP และ Divalent Metal Ion เช่น  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $CO^{++}$  และ  $Ni^{++}$  ซึ่งช่วยให้ ATP ทำหน้าที่ได้ตามปกติ ทั้งอิเล็กตรอน และ ATP จะได้มาจากระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและจะถูกถ่ายโอนมายังปม ในการตรึงไนโตรเจน 1 โมเลกุล จะต้องใช้ ATP จำนวน 12 mole จึงจะได้ แอมโมเนียม 2 โมเลกุล ดังสมการ



พบว่า Fe-nitrogenase จะทำหน้าที่จับ  $N_2$  ส่วน Mo-Fe nitrogenase จะทำหน้าที่ลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่าง bond ของไนโตรเจน ทำให้เกิดการลดออกซิเจนขึ้น ATP จะถูกนำไปใช้และเปลี่ยนรูปเป็น ADP อิเล็กตรอนจากตัวให้อิเล็กตรอน (ในรูป ferredoxin หรือ flavodoxin) จะถูกนำไป reduce  $N_2$  ให้เป็น  $NH_3$  ซึ่งเป็น stable intermediate ตัวแรกในกระบวนการตรึงไนโตรเจน พบว่าระหว่าง  $N_2$  และ  $NH_3$  อาจจะมีสารประกอบ intermediate อื่น ๆ เช่น hydrazine, diimide, hydroxylamine และ carbamyl phosphate แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์ให้เห็นชัดเจนไปได้

แอมโมเนียมที่เกิดจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียม ( $NH_4^+$ ) และถูกพืชนำไปใช้โดย GS-GOGAT pathway (Glutamine-synthase-glutamate synthase) ดังที่กล่าวมาแล้วว่า การตรึงไนโตรเจน เป็นกระบวนการที่ต้องการพลังงานจำนวนมากในรูปของ ATP ซึ่งได้มาจากการสังเคราะห์แสงของพืช ดังนั้น ปัจจัยที่จำกัดการตรึงไนโตรเจนของปมอาจเกิดจากพืชเอง นอกจากนั้นการตรึงไนโตรเจน ยังอาจถูกกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช เช่นความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณธาตุอาหาร ปริมาณเกลือ ความชื้น และสารประกอบที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (growth substance) เป็นต้น (Zahran, 1999)

### 3. การศึกษาความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์จะมีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะได้ เพราะมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ (resistant gene) ในการทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ ตาม Microbiology Essentials and Applications International edition มีการทดสอบ 3 วิธี ได้แก่ minimum inhibitory concentration (MIC), automate method และ disk diffusion method ซึ่งวิธีหลังนี้เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก และสามารถทดสอบยาปฏิชีวนะได้พร้อมกันหลายชนิดในงานเพาะเชื้อเดียวกัน (Brockman และคณะ 1989)

*Rhizobium galegae* สายพันธุ์ NBIMTC2250 ซึ่งมีพลาสมิด 2 ชนิด คือ ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ซึ่งพลาสมิดขนาดใหญ่เป็นพลาสมิดที่เกี่ยวกับชีวสัมพันธ์ (symbiotic plasmid) เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับหน้าที่ภายในเซลล์และการอยู่ร่วมกันกับพืชของพลาสมิดขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไรโซเบียมนี้กับสายพันธุ์ที่เป็น wild type พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติภายในเซลล์ ได้แก่ รูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะ การใช้สารคาร์โบไฮเดรตและกรดอินทรีย์ อุณหภูมิการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนี และรูปแบบ lipopolysaccharide (LPS) profile การเคลื่อนที่ การทนต่ออนุมูลอิสระ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหน้าที่เหล่านี้ไม่ได้ถูกควบคุมโดยยีนบนพลาสมิด และจากการศึกษาโดยวิธี hybridization แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดขนาดเล็กหายไปนสายพันธุ์ไรโซเบียมนี้ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพลาสมิดขนาดเล็กอาจจะไม่มีหน้าที่สำคัญในสายพันธุ์ไรโซเบียมนี้ (Gigova และคณะ, 1997)

ลักษณะชีวภาพและทางกายภาพของสายพันธุ์ *Bradyrhizobium* ที่ทนเค็ม (ระดับ 88 mM 264 mM 440 mM NaCl) ถูกประเมินค่าตามความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน อุณหภูมิการเจริญเติบโต ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ รูปแบบพลาสมิด โพรไฟล์ และการผลิต exopolysaccharide สายพันธุ์ที่ทนเค็มจะเพิ่มความสามารถในการออกซิไดซ์แหล่งคาร์บอน โดยการเพิ่มอุณหภูมิการเจริญเติบโต และการผลิต exopolysaccharide ผลของความสามารถในการปรับตัวเพื่อที่จะสร้างโคโลนีในสถานะที่เค็ม อย่างไรก็ตามเกลือสามารถทำหน้าที่เสมือนเป็นสารที่ช่วยในการรักษา ให้ยีนที่อยู่ในสถานะคงที่ซึ่งจะกลายเป็นอันตรายสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนซึ่งอยู่บนพลาสมิดของไรโซเบียม (Barboza และคณะ, 2000)

#### 4. การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของไรโซเบียม

พลาสมิดเป็นสารพันธุกรรมซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเออิสระและเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก (minichromosome) แบบวงแหวน เช่นเดียวกับโครโมโซมหลักของแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวนเช่นกันแต่มีขนาดใหญ่และขดม้วนตัวภายในเซลล์แบคทีเรีย จึงเรียกว่านิวคลีโอยด์ (nucleoid) โดยไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส พบว่าพลาสมิดมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ขนาดเล็กมากเพียงแค่ 2- 3 ยีน จนถึงขนาดใหญ่ประกอบด้วยยีนหลายยีน โดยเชื้อไรโซเบียมบางสายพันธุ์อาจจะมีพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับ resistance transfer function (RTF) ซึ่งเป็นยีนที่มีสมบัติการด้านยาปฏิชีวนะ (วิสุทธิ ไบไม้, 2538) และพลาสมิดของไรโซเบียมบางสายพันธุ์จะมียีนที่เกี่ยวข้องกับ symbiotic function (*sym*) (Rana และ Krishnan, 1995) ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน เรียกว่า *nif* and *fix* gene และยีนที่เกี่ยวข้องกับการจดจำและทำให้เกิดปมที่รากพืชซึ่งเป็น host เรียกว่า *nod* gene (Zhang และคณะ, 2001; Zou และคณะ, 1998) โดยพลาสมิดโพรไฟล์ (plasmid profile) เป็นการศึกษาหาขนาดและจำนวนของพลาสมิดในเชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลต พบว่าพลาสมิดในเชื้อไรโซเบียมอาจจะมีจำนวนมากกว่า 1 อัน และอาจมีขนาดของพลาสมิด มากกว่า 1000 เมกะดาลตัน (Hashem และคณะ, 1996; Long, 1984) โดยไรโซเบียมบางสายพันธุ์อาจจะมีพลาสมิดขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ (Gigova และคณะ, 1997) ซึ่งอาจจะมีการแยกหักเป็น linear fragment หลายๆอัน ซึ่งทำให้ยากในการแยกขนาดของพลาสมิดใน gel electrophoresis ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมกับการสกัดพลาสมิดขนาดใหญ่ คือ in situ lysis cell เพื่อให้ได้ขนาดของพลาสมิดที่ต้องการแม่นยำ โดยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของพลาสมิดขึ้นอยู่กับ กระแสไฟฟ้าที่ใช้ ต้องใช้ความดันไฟฟ้าต่ำ และความเข้มข้นของวุ้นถ้าสูงจะทำให้ขนาดรูพรุนของแผ่นวุ้นเล็ก และขนาดและรูปร่างของพลาสมิดเอง ถ้ามีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบที่มีรูปร่างแบบเดียวกัน ถ้ารูปร่างต่างกันจะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลเท่ากัน ตัวอย่างเช่น พลาสมิดมีรูปร่างต่าง ๆ กันได้ 3 แบบ คือ ซุปเปอร์คอยด์ (supercoiled) เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด รีแลกซ์ (relaxed) เคลื่อนที่ได้เร็วปานกลาง และ รูปปลายเปิด (open form) เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด (Eckhardt และ 1978)

เชื้อไรโซเบียมจำนวน 160 ไอโซเลตที่แยกจากปมรากของถั่ว *Phaseolus vulgaris* L. ที่เพาะปลูกโดยใช้ดินที่มาจาก 3 สภาพภูมิประเทศของประเทศตูนิเซีย โดยพลาสมิดโพรไฟล์ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้เริ่มต้นเพื่อที่จะแยกความแตกต่างอย่างรวดเร็ว ซึ่งพบโดยพลาสมิดโพรไฟล์ 38 รูปแบบ (Mhamdi และคณะ, 1999)

*Rhizobium sp.* S25 เป็นสายพันธุ์ที่แยกจากปมของ *Tephrosia candida* ในจังหวัดไหนานของจีน โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานสูง พบว่ามีพลาสมิดจำนวน 1 ชิ้น ซึ่งมีขนาดประมาณ 150 kb และเมื่อตรวจสอบโดยวิธี hybridization ด้วย nodABC และ nifHDK probe พบว่ามี nod และ nif gene อยู่บนพลาสมิด นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการหายไปของพลาสมิดจะลดความสามารถในการทนกรดและความสามารถในการต้านยาหลายชนิดของเชื้อ (Zou และคณะ, 1998)

*Sinorhizobium meliloti* (เมื่อก่อนเรียก *Rhizobium meliloti*) ซึ่งแยกจากปมของถั่ว alfalfa (*Medicago sativa* cv Europe) จำนวน 128 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์พลาสมิดโพรไฟล์ พบว่ามี 23 แบบ และเชื้อที่มีความแตกต่างของรูปแบบพลาสมิดก็แยกได้มาจากปมที่ต่างกันและดินที่ต่างกัน (Hartmann และคณะ, 1998)

*Rhizobium leguminosarum* (biovar viciae) ซึ่งแยกจากปมรากถั่ว legume ซึ่งปลูกโดยใช้ดินที่ทำ dilution โดยแยกความแตกต่างของเชื้อโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ร่วมกับการวิเคราะห์โดยใช้พลาสมิดโพรไฟล์เป็นเวลา 3 ปี (Handley และคณะ, 1998)

การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม 23 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืช *Hedysarum* หลายชนิด จากประเทศโปรตุเกส สเปน ตุรกี อินเดีย อิสราเอล และรัฐอูราสกา พบสายพันธุ์ที่แยกจาก *H. alpinum* *H. mackenzli* และ *H. pallens* เป็นไรโซเบียมกลุ่มเจอร์จูซ่าเมื่อเลี้ยงบนอาหาร YMA และไม่มีรูปแบบของพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ 23 ไอโซเลท ที่จะแสดงความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์พืชอาศัยและแหล่งของดิน (Kishinevsky และคณะ, 1996)

*Sinorhizobium fredii* พบพลาสมิดขนาดใหญ่ โดยแบ่งตามรูปของพลาสมิดโพรไฟล์ได้ 10 กลุ่ม พบพลาสมิดตั้งแต่ 1-6 ชิ้น และบางชิ้นมีขนาดใหญ่กว่า 1000 Mda โดยพบว่ารูปแบบพลาสมิดที่มีขนาดต่ำกว่า 1000 kb จะมีความเกี่ยวข้องกับความลึกของดินและจีสของพืชอาศัย (symbiont) (Hashem และคณะ, 1996)

*Rhizobium leguminosarum* 350 ไอโซเลท ที่แยกจากพื้นที่ทุ่งหญ้า 4 แห่ง ทางตะวันออกของเท็กซัส พบว่าพลาสมิดโพรไฟล์สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ โดยพบรูปแบบของพลาสมิด 66 รูปแบบ (Moennelocoz และคณะ, 1994)



ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ fragment DNA ขนาด 4.15 kb จาก พลาสมิดขนาดใหญ่ของ *Rhizobium meliloti* 2011 ซึ่งพบตำแหน่งของยีน *exoH* *exoK* และ *exoL* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 41 30 และ 44 kDa ตามลำดับ (Becker และคณะ, 1993)

สายพันธุ์ *Rhizobium sp.* BR816 ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อที่ทนร้อน และจากการตรวจสอบพบว่าสายพันธุ์ *Rhizobium sp.* BR816 เป็นเชื้อไรโซเบียมที่มียีน *nodPQ* ซึ่งมี 2 สำเนา (copy) โดย copy หนึ่งอยู่บน symbiotic plasmid หรือ พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับชีวสัมพันธ์ ซึ่งเป็นพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปมรากของพืชตระกูลถั่วโดยเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจง และอีก copy หนึ่งอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ (large plasmid) (Laeremans และคณะ, 1997)

ไรโซเบียม 50 สายพันธุ์ที่แยกจากปมของต้นพืช leguminous 2 ชนิดได้แก่ *Acacia* และ *Prosopis* โดยทำการวิเคราะห์พลาสมิดโพรไฟล์ซึ่งให้ผลที่ตรงกันข้ามกับผลการวิเคราะห์ลักษณะของฟีโนไทป์และ lipopolysaccharide (LPS) profile (Zahran, 1997)

เชื้อไรโซเบียม 522 ไอโซเลท ที่แยกได้จากถั่วพอก *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* เมื่อทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมโดยการตรวจสอบรูปแบบของพลาสมิดโพรไฟล์จึงทำให้พบว่ามีขนาดของพลาสมิดมีขนาดตั้งแต่ 3-300 kb และพบว่ามีเชื้อไรโซเบียมจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรวจพบพลาสมิดโพรไฟล์ได้ (Canteros และคณะ, 1995)

สายพันธุ์ *Rhizobium sp.* SIN-1 ซึ่งแยกได้จากปมรากของถั่ว *Sesbania aculeata* ซึ่งประกอบด้วยหลายสายพันธุ์โดยถั่วดังกล่าวเป็นถั่วเขตร้อน นอกจากนั้นยังพบว่าสายพันธุ์ *Rhizobium sp.* SIN-1 มี nodulation (*nod*) gene ซึ่งอยู่บน symbiosis (*sym*) plasmid หรือ พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับชีวสัมพันธ์ โดยพบว่าพลาสมิดของสายพันธุ์ *Rhizobium sp.* SIN-1 มีขนาดประมาณ 300 Mda (Rana และ Krishnan, 1995)

ลักษณะทางพันธุกรรมของ *Rhizobium mesquite* 14 สายพันธุ์และ *Bradyrhizobium mesquite* 9 สายพันธุ์ จากปมรากที่ผิวหน้าดิน (0-0.5 m) และระดับลึก (4-6 m) ซึ่งไรโซเบียมจะมีการปรับตัวต่างกัน โดยทำการวิเคราะห์โดยพลาสมิดโพรไฟล์ (Thomas และคณะ, 1994)

เชื้อไรโซเบียมของถั่ว alfalfa ที่แยกได้จากดินที่มีสภาวะเป็นกรด โดยมีค่าความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 5.52 - 6.2 ซึ่งดินดังกล่าวเป็นดินที่ได้มาจากประเทศอาร์เจนตินา เมื่อทำการศึกษา

ลาสมิคโพรไฟล์ พบว่าเชื้อไรโซเบียมจะให้รูปแบบลาสมิคโพรไฟล์ที่เหมือนกันและเหมือนกับผลการวิเคราะห์โดยวิธี ERIC-fingerprint (Drets และ Niehaus, 2001)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุอุปกรณ์

##### 1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างดิน ได้แก่ ถังพลาสติก เสียมขุดดิน ไม้บรรทัด ปากกา

1.2 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทดลองสมบัติของดินและพันธุกรรมของเชื้อ ได้แก่ crucible (crucibles) กระจกอบดิน kjeldahl flask volumetric flask (100 ml) erlenmeyer flask (50 ml) หลอดพลาสติกยาว ถังพลาสติก (5.5x9 นิ้ว) กระจกยา (5x8 นิ้ว) eppendorf tubes magnetic stirrer กระจกปลุกแก้ว หลอดฉีดยา (syringe) หลอดเก็บก๊าซ

1.3 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทดลองทางจุลชีววิทยา ได้แก่ กระจกดวง ปิดเปิด ขวดรูป ชมพู่ ตะเกียง จานเพาะเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ปากกิบ กระจกสไลด์

##### 2. เครื่องมือ

เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องชั่งน้ำหนัก

เครื่องเขย่า (shaker)

เครื่องนับจำนวนปม

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

ตู้อบเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker)

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)

เครื่องกำเนิดแสงยูวี (UV-transilluminator)

เครื่อง electrophoresis รุ่น BIO-RAD

เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องโครมาโตกราฟี (gas chromatography)

##### 3. สารเคมี

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast-manitol agar (YMA)

Yeast-manitol broth (YMB)

อาหารสูตรปราศจากไนโตรเจน

### 3.2 การแยกเชื้อไรโซเบียม

น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

50 % คลอโรกซ์ (clorox)

สีคองโกเรด (congo red)

สารละลายไอโอดีน (iodine)

สีย้อม ซาฟรานิน (safranin)

สีย้อม คริสตอลไวโอเลต

95 % อัลกอฮอล์

### 3.3 การทดลองสมบัติของดิน

กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ )

กรดโบริก ( $H_3BO_3$ )

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

### 3.4 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

ยาปฏิชีวนะ ampicilin

ยาปฏิชีวนะ carbenicilin

ยาปฏิชีวนะ erythromycin

ยาปฏิชีวนะ kanamycin

ยาปฏิชีวนะ penicilin

ยาปฏิชีวนะ streptomycin

ยาปฏิชีวนะ tetracyclin

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

อะกาโรสเจล (agarose gel)

ทริสไฮโดรคลอริก (Tris HCl)

ซูโครส (Sucrose)

ไลโซไซม์ (lysozyme)

เอสดีเอส (SDS)

EDTA

สีติดตาม (Tracking dye)

## เอทีเคียมโบรไมด์

4. เมล็ดพันธุ์พืช ถั่วมะแฮะสายพันธุ์ ICPL 151 อายุสั้น 130-150 กรมวิชาการเกษตร  
จังหวัดขอนแก่น

### วิธีการทดลอง

#### 1. การกำหนดแปลงศึกษาและเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจาก 3 สภาพป่าได้แก่ ป่าทุ่งหญ้า ป่าพื้นที่สภาพ และป่าดิบแล้ง โดยเก็บ  
ตัวอย่างดิน สภาพป่าละ 2 จุด คือ จุดที่มีแหล่งน้ำ และไม่มีแหล่งน้ำ จึงรวมทั้งสิ้น 6 จุด และเก็บ  
จุดพิเศษเพิ่มอีก 2 จุด คือ จุดที่ checkdam 3 (CD3) และ บริเวณทางเข้า CD18 (way) รวมจุดเก็บ  
ทั้งหมด 8 แปลง

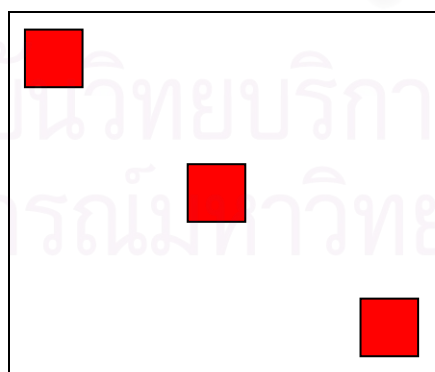
พื้นที่ทั้งหมด 8 แปลง กำหนดแปลงศึกษาขนาด 40x40 ตารางเมตร แบ่งเป็นแปลงย่อย  
ขนาด 1x1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างจาก 3 แปลงย่อยในแนวทแยงมุม (ภาพที่ 3) โดยเก็บ  
ดินที่ความลึก 6 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินจำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 เดือน ดังนี้

ครั้งที่ 1 เดือนพฤษภาคม 2543

ครั้งที่ 2 เดือนกรกฎาคม 2543

ครั้งที่ 3 เดือนกันยายน 2543

ครั้งที่ 4 เดือนพฤศจิกายน 2543



■ จุดเก็บตัวอย่าง ขนาด 1 ตารางเมตร

ภาพที่ 11 การเก็บตัวอย่างดินจากแปลงศึกษาในแนวทแยง

## 2. วิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

### 2.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

#### 2.1.1 หาความเป็นกรด-ด่างของดิน ตามวิธีของ Kim (1996)

นำดิน 25 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาหาความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

#### 2.1.2 หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน ตามวิธีของ Kim (1996)

ชั่งน้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งสนิทบันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นใส่ดินเปียกลงไปในถ้วยอลูมิเนียมโดยชั่งให้มีน้ำหนักรวมกันให้ได้ประมาณ 50 กรัม บันทึกผล นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็นและแห้งใน desicator จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก บันทึกผลและนำค่าที่บันทึกไว้มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{กำหนด} \quad A &= \text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งสนิท} \\ B &= \text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งสนิทและดินเปียก} \\ C &= \text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งสนิทและดินแห้ง} \end{aligned}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \{(B - C)/(C - A)\} \times 100$$

#### 2.1.3 หาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดิน ตามวิธีของ Bremner (1965)

2.1.3.1 การย่อยดิน: ชั่งตัวอย่างดินซึ่งผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.2-0.5 มม.หนัก 1 กรัม ใส่ใน kjeldahl flask ขนาด 100 มิลลิลิตร การเทตัวอย่างดินลงใน flask อย่าให้ดินติดที่คอขวด เติมน catalyst (ประมาณ 1 กรัม) แล้วเติม conc.  $H_2SO_4$  จำนวน 10 มิลลิลิตร และเขย่า flask เบาๆ เพื่อให้ดินและกรดผสมเข้าด้วยกัน นำไปวางบนเตา digest ต้มด้วยไฟอ่อนๆในระยะแรก แล้วเพิ่มไฟให้แรงขึ้นขณะ digest หมุน flask ไปรอบๆเป็นครั้งคราวเพื่อช่วยให้มีการคลุกเคล้ากันดีขึ้น เมื่อสีของเหลวใน flask เริ่มใสเกี่ยวข้องไปอีกประมาณ 20-30 นาที จึงยก flask ออกจากเตา digest ปลดออก flask ปล่อยให้เย็นค่อยๆ รินน้ำกลั่น 10-20 มิลลิลิตร ลงไปรอบๆคอ flask ของเหลวจะร้อนขึ้น ปลดออกของเหลวให้เย็น แล้วถ่ายใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร เมื่อของเหลวเย็นเท่า อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้จนดิน ตกตะกอนนำของเหลวใสข้างบนไปกลั่น ในการวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องทำ blank ซึ่งไม่มีตัวอย่าง ดิน รวมด้วย

2.1.3.2 การกลั่น: ริน  $H_3BO_3$  ประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางที่ใต้ก้าน condenser ของเครื่องกลั่นแล้วใช้ volumetric pipet ดูด สารละลายที่ย่อยได้ จำนวน 10-20 มิลลิลิตร ใส่ distillation flask เติมน้ำยา NaOH จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงไปกลั่น จนได้ของเหลวซึ่งมีสีเขียวประมาณ 35 มิลลิลิตร

2.1.3.3 การไทเทรต: ไทเทรตของเหลวที่กลั่นได้ด้วย standard  $H_2SO_4$  สีของของเหลวจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง ที่จุดเริ่มสีม่วงแดงนี้จะเป็น end point บันทึกปริมาณของกรดที่ใช้ไทเทรต นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

กำหนด	T = ปริมาณกรดที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง
	B = ปริมาณกรดที่ใช้ไทเทรต blank
	N = normality ของกรด
	140 = equivalent weight ของไนโตรเจน
	V = ปริมาณตัวอย่าง
	S = น้ำหนักของดิน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \{140 \times N \times (T-B)\} / (V \times S)$$

## 2.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพของดิน

การหาปริมาณของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช ในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน ใช้วิธี Plant infection count-MPN แบบ Fourfold dilution series (Somasegaran และคณะ, 1985)

2.2.1 นำค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินที่ได้ จากข้อ 2.1.2 มาคำนวณหาน้ำหนักของดินเปียกที่จะใช้ในการหาปริมาณเชื้อไรโซเบียม โดยใช้สูตร ดังนี้

กำหนด	น้ำหนักดินเปียก = 100 กรัม
	น้ำหนักดินแห้ง = 50 กรัม
	A = 100 - เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน

$$\text{น้ำหนักดินเปียกที่ใช้} = (\text{น้ำหนักดินเปียก} \times \text{น้ำหนักดินแห้ง}) / A$$

2.2.2 ซั่งตัวอย่างดินเปียกที่จะใช้ แล้วใส่ดินในน้ำกลั่นมาเชื้อแล้ว 150 มิลลิลิตร จะได้สารละลายดินที่มีสัดส่วน 1:4 จากนั้น ดูดสารละลายดิน 10 มิลลิลิตร ละลายต่อไปในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ดินที่มีสัดส่วน 1:16 แล้วทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสัดส่วนความเข้มข้นเท่ากับ  $1:4^8$  รวมความเข้มข้นของดินทั้งหมดเท่ากับ 8 ระดับความเข้มข้น ได้แก่  $1:4^1$   $1:4^2$   $1:4^3$   $1:4^4$   $1:4^5$   $1:4^6$   $1:4^7$   $1:4^8$  ระดับความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยมี ชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารละลายดิน (control) อีก 4 ซ้ำ

2.2.3 เพาะถั่วมะแฮะ ให้รากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วปลูกลงในถุงปลูกถั่ว (pouch) ซึ่งใส่อาหารสูตรปราศจากไนโตรเจน (Vincent, 1970)

2.2.4 inoculate สารละลายดินที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 8 ระดับ ที่รากล้าง แล้วนำไปไว้ที่ห้องอบฟืช ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

2.2.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยดูที่เกิดปมราก เป็น positive และดูที่ไม่เกิดปมราก เป็น negative นับจำนวนดูที่ให้ผลเฉพาะ positive ในแต่ละระดับความเข้มข้นเท่านั้น แล้วนำค่าที่ได้มาเปิดตาราง MPN (Four-fold dilution)

### 3. การคัดแยกและการจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียม

3.1 การแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากถั่วมะแฮะ (Paffetti et al.,1996)

3.1.1 นำปมรากของถั่วมะแฮะที่ได้จากข้อ 2.2.5 มาทำการแยกเชื้อไรโซเบียม โดยนำปมมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วแช่ในอัลกอฮอล์ 95% 10 วินาที แล้วเททิ้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง แล้วแช่ใน 50% clorox 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีก 5 ครั้ง เทน้ำทิ้ง นำปมมาบีบให้แตกออกแล้วใช้ที่เขี่ยเชื้อตะเชื้อแล้ว streak บน สูตรอาหาร YMA ที่ผสม congo red บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำโคโลนีเดียวมาทำการถ่ายเชื้อจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยลักษณะของโคโลนีของไรโซเบียมจะมีสีขาวขุ่น กลมมน ขอบเรียบ ไม่ดูคดสี congo red

3.1.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมแกรม (Krieg et al.,1984) โดยทำการสเตรียร์เชื้อและตรึงเซลล์ด้วยความร้อนแล้วย้อมด้วยสียคริสตอลไวโอเลต ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างสีด้วยสารละลายไอโอดีน วางไว้ 1 นาที เททิ้ง แล้วล้างด้วย อัลกอฮอล์ 95 % 30 วินาที จากนั้นล้างผ่านน้ำเบาๆ แล้วย้อมทับด้วยสียซาฟรานิน เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำ ชบน้ำให้แห้งจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยไรโซเบียมจะย้อมติดสีแกรมลบ

3.2 จำแนกตามอัตราการเจริญเติบโตในสารอาหาร (สุมิตรา ภู่วโรดม, 2532; Kishinevsky และคณะ,1996)

เชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลตที่ได้นำมา streak บนอาหารเลี้ยงสูตร Yeast- Mannitol agar (YMA) ซึ่งประกอบด้วย 0.1% bromthymol blue บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันโดยไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจะสร้างกรดทำให้เกิดสีเหลืองบนอาหารในขณะที่ไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้าจะสร้างเบสทำให้เกิดสีน้ำเงินบนอาหาร

### 4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียม

4.1 การทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ (Bauer และคณะ , 1966)

4.1.1 เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว YMB บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาวัดค่า absorbance ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.45 ซึ่งจะมีจำนวน  $10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Somasegaran และ Hoben,1994)



4.1.2 นำอาหารแข็งที่ใส่ในหลอดทดลองจำนวน 10 มิลลิลิตร มาหลอมเหลว ร่อนอาหารเย็นลงแต่ยังไม่แข็งตัวแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้นที่เตรียมในข้อ 1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วกระจายเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ร่อนอาหารแข็ง วาง antibiotic disc ลงบนอาหาร แล้วบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 7 วัน วัดความกว้างของ clear zone ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จำนวนค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้ไปแปลผลตามตารางของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (1990) (ตารางภาคผนวก)

4.2 การทดสอบความสามารถในการทนเค็ม (พัชรี เจริญนัยกุล, 2528 ; Steinborn and Roughley, 1975)

4.2.1 เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว YMB บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาวัดค่า absorbance ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.45 ซึ่งจะมีจำนวน  $10^9$  เซลล์ต่อ มิลลิลิตร (Somasegaran และ Hoben, 1994)

4.2.2 เตรียมอาหารเหลว YMB ที่มีความเข้มข้นของ NaCl เป็น 1.7 mM , 50 mM , 100 mM และ 150 mM ใส่ในหลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร แล้วใส่เชื้อเริ่มต้นที่เตรียมในข้อ 1 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 7 วัน แล้วนับจำนวนเชื้อไรโซเบียมที่มีชีวิต โดยวิธี Total plate count

4.2.3 นำเชื้อที่สามารถทนได้ในระดับความเข้มข้นสูงสุด ( 150 mM NaCl ) มาทำการเลี้ยงเชื้อและทดสอบความเค็มที่ 150 mM NaCl เป็นจำนวน 3 generation ทำการนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิต โดยวิธี Total plate count

4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ (Boonkerd et al., 1987)

4.3.1 เพาะถั่วมะแฮะ เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาปลูกใน Leonard jar ที่นึ่งฆ่าเชื้อและมีทรายปลอดเชื้อบรรจุอยู่ จากนั้นใส่กล้าเชื้อ (inoculant) ของ ไอโซเลทต่างๆ ในระยะ late log phase 1 มิลลิลิตร ( $10^8$  -  $10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนโดยวางแผนการทดลอง การปลูกแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replicates) เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (uninoculated control) ปลูกในเรือนทดลอง เป็นเวลาประมาณ 6 สัปดาห์ แล้วนำมาประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยนับจำนวนปมและหาน้ำหนักแห้งของต้นพืช โดยเก็บตัวอย่างพืชตัดเฉพาะส่วนต้นและใบมาอบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้งของต้นพืช

4.3.2 หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดย วิธี อะเซทิลีน รีดักชัน มีขั้นตอนดังนี้

นำส่วนรากที่มีปมติดอยู่ในข้อ 4.3.1 ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง (double stopper) ให้แน่น หลังจากนั้นใช้หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 50 มิลลิลิตร ดูดอากาศ

ภายใน flask ออก 25 มิลลิลิตร (ซึ่งเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอากาศใน flask) แล้วจึงฉีดก๊าซอะเซทิลีน 25 มิลลิลิตร ลงไปใน flask แล้วจับเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูด reduced gas ออกมา (ซึ่งมีทั้งก๊าซอะเซทิลีนและเอทิลีน รวมกัน) 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสูญญากาศ แล้วกิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีเนส โดยวัดอะเซทิลีนรีดักชัน หาพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน (standard ethylene) โดยฉีดก๊าซเอทิลีนบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร ที่เก็บอยู่ใน flask ขนาด 2200 มิลลิลิตร แล้วจึงฉีดก๊าซตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph : GC) ใช้เครื่อง GC ของ Perkin Elmer Model F17 ซึ่งมี Detector เป็นแบบ Hydrogen Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์บรรจุสาร Porapak N ขนาดของคอลัมน์ 0.6 x 4.5 เซนติเมตร และใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซนำพา (Carrier gas) ด้วยความเร็ว 55 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector 100 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ Detector 100 องศาเซลเซียส ก๊าซที่ต้องการวิเคราะห์เป็นก๊าซเอทิลีนที่เกิดจากการรีดิวส์อะเซทิลีน ซึ่งเกิดขึ้นจากผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ในโตรจีเนส คำนวณหาปริมาณเอทิลีนได้โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐาน จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{กำหนด} \quad B &= \text{พื้นที่ใต้กราฟของพีคตัวอย่าง} \\ V &= \text{ปริมาตรของพลาสติกที่ใช้เก็บตัวอย่าง (มิลลิเมตร)} \\ \text{Std} &= \text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน} \\ A &= \text{เวลาที่ใช้ในการรีดิวส์ก๊าซอะเซทิลีน (ชั่วโมง)} \end{aligned}$$

$$\text{อัตราการตรึงไนโตรเจน} = (10^3 \times B \times V) / (2200 \text{ std.} \times A \times 22.4)$$

#### 4.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โดยใช้แผนการทดลองแบบ completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติดังนี้ น้ำหนักแห้งของพืช (มิลลิกรัม) และค่า Acetylene Reduction Activity หรือ ARA (ไมโครโมล/ต้นพืช/ ชั่วโมง) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างถั่วมะแฮะที่ใส่เชื้อไรโซเบียมไอโซเลตต่างๆ และถั่วมะแฮะที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม

#### 4.4 การศึกษาพลาสมิดโดยวิธี lysis cell (Harrison และคณะ, 1989; Pandya และ Desai, 1998)

4.4.1 เลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหาร LB 3 วัน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ 10 นาที

4.4.2 นำตะกอนมาเติมสารละลายไลโซไซม์ 150 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ 10 นาที

4.4.3 นำตะกอนมาเติม TEN buffer 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ 10 นาที

4.4.4 นำส่วนใสด้านบนมา 20 ไมโครลิตร ผสมกับสีติดตาม (tracking dye) แล้วหยอดลงบนช่องหวีของอะกาโรสเจล 0.8% ซึ่งแช่อยู่ในแชมเบอร์ที่บรรจุ Tris-Borate buffer (TBE) ใช้ความต่างศักย์ 55 โวลต์ 26 ชั่วโมง แล้วข้อมด้วย เอทีเคียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำกลั่น 15 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต แล้วบันทึกภาพ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของดินและการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมและการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมของถั่วมะแฮะ ในพื้นที่โครงการฯในพื้นที่ป่าดิบแล้ง ป่าพื้นที่สภาพและป่าทุ่งหญ้า ในพื้นที่โครงการสร้างป่าและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ. นครราชสีมา โดยการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของดิน

1.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน

1.2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของดิน

ตอนที่ 2 ผลการแยกเชื้อไรโซเบียมและการจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียม

3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการด้านยาของเชื้อ

3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนเค็มของเชื้อ

3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ

3.4 ผลการศึกษาพลาสมิด โพลีไพล์ของเชื้อ

กำหนดสัญลักษณ์จุดที่เก็บดินในพื้นที่โครงการฯ ดังนี้

DEGW แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ

DEG แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่ไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ

RFCD 21 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่มีคันดินกั้นน้ำ

RF แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าพื้นที่สภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ

GLCD 18 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีคันดินกั้นน้ำ

GL แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ

WAY แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้ในการสัญจร

CD3 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่

## **ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของดิน**

### 1.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของดิน

#### 1.1.1 เปอร์เซ็นต์ความชื้น

การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการ พบว่าแปลงศึกษาที่เป็นป่าฟื้นฟูสภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ (RF) มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยสูงสุด คือ ร้อยละ 25.63 โดยแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (DEGW) มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยต่ำสุด คือ ร้อยละ 12.941 (ดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 12 ) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละช่วงเวลามีค่าสูงสุดในช่วงเดือนพฤศจิกายน (ดังภาพที่ 13) สำหรับการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยของดินในป่าแต่ละชนิด พบว่า ป่าดิบแล้งมีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยต่ำกว่าป่าทุ่งหญ้าและป่าฟื้นฟูสภาพ (ดังภาพที่ 14 )

#### 1.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการ พบว่าแปลงศึกษาที่เป็นทางเดินเข้าป่าทุ่งหญ้า (WAY) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยสูงสุด คือ 5.556 โดยแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่มีแหล่งน้ำธรรมชาติ (DEGW) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยต่ำสุด คือ 4.396 (ดังตารางที่ 3 และ ภาพที่ 15 ) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย ในแต่ละช่วงเวลามีค่าสูงสุดในช่วงเดือนกันยายน (ดังภาพที่ 16 ) สำหรับการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยของดินในป่าแต่ละชนิด พบว่า ป่าดิบแล้ง ป่าทุ่งหญ้าและป่าฟื้นฟูสภาพมีแนวโน้มค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย ใกล้เคียงกัน (ดังภาพที่ 17 )

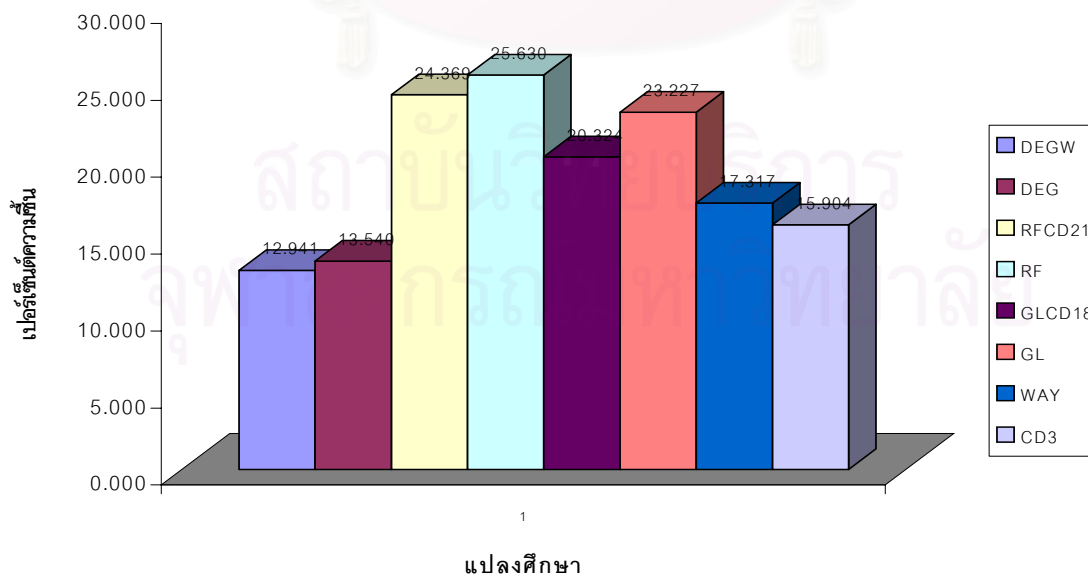
#### 1.1.3 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

การหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของดินในพื้นที่โครงการ พบว่าแปลงศึกษาที่เป็นป่าฟื้นฟูสภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ (RF) มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์ไนโตรเจนเฉลี่ยสูงสุด คือ ร้อยละ 0.229 โดยแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้ามี่คันดินกั้นน้ำ (GLCD18) มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.127 (ดังตารางที่ 4 และ ภาพที่ 18) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเฉลี่ย ในแต่ละช่วงเวลามีค่าสูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคม (ดังภาพที่ 19) สำหรับการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเฉลี่ยของดินในป่าแต่ละชนิด พบว่า ป่าทุ่งหญ้า ป่าดิบแล้งและป่าฟื้นฟูสภาพมีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (ดังภาพที่ 20)

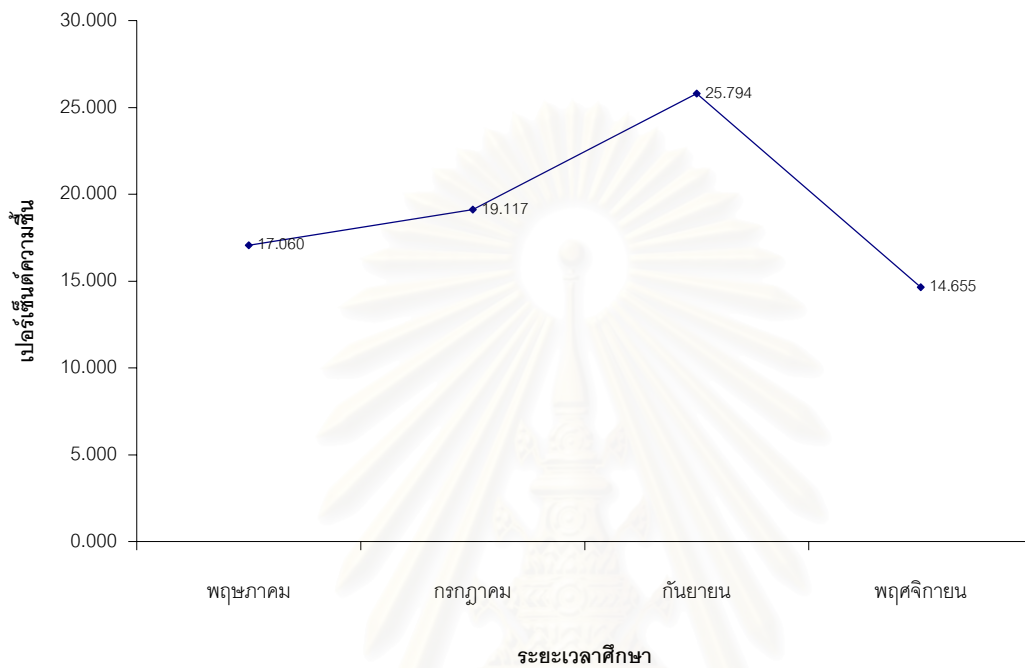
ตารางที่ 2 เปรอ์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ  
และป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซ็นต์ความชื้น				
	พฤษภาคม	กรกฎาคม	กันยายน	พฤศจิกายน	เฉลี่ย
1 DEGW	8.206	13.714	20.363	9.481	12.941
2 DEG	8.961	10.870	24.797	9.532	13.540
3 RFCD21	20.750	27.375	32.060	17.292	24.369
4 RF	25.718	27.503	33.631	15.667	25.630
5 GLCD18	17.567	17.174	25.426	21.128	20.324
6 GL	23.226	23.503	29.626	16.552	23.227
7 WAY	14.455	20.427	20.164	14.221	17.317
8 CD3	17.595	12.373	20.284	13.363	15.904
เฉลี่ย	17.060	19.117	25.794	14.655	

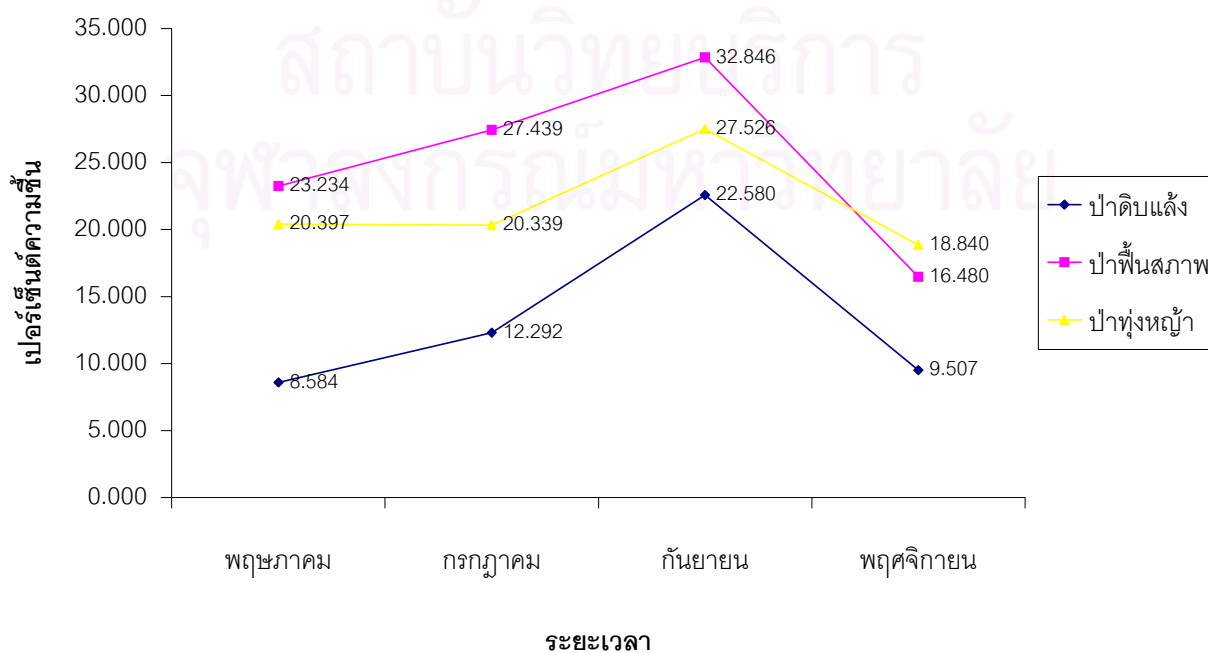
ภาพที่ 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละแปลงที่ศึกษา



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละช่วงเวลา



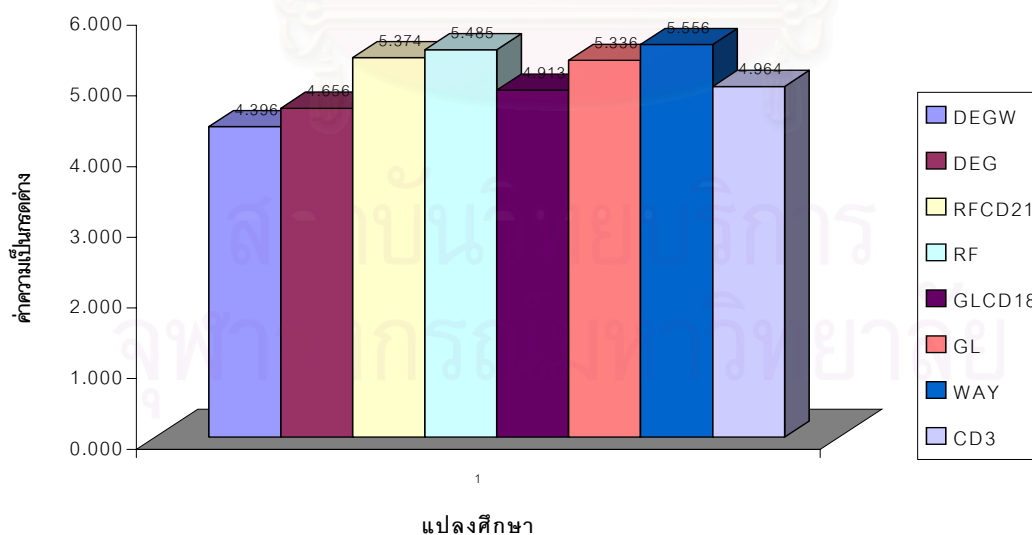
ภาพที่ 14 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในแต่ละสภาพป่า



ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา

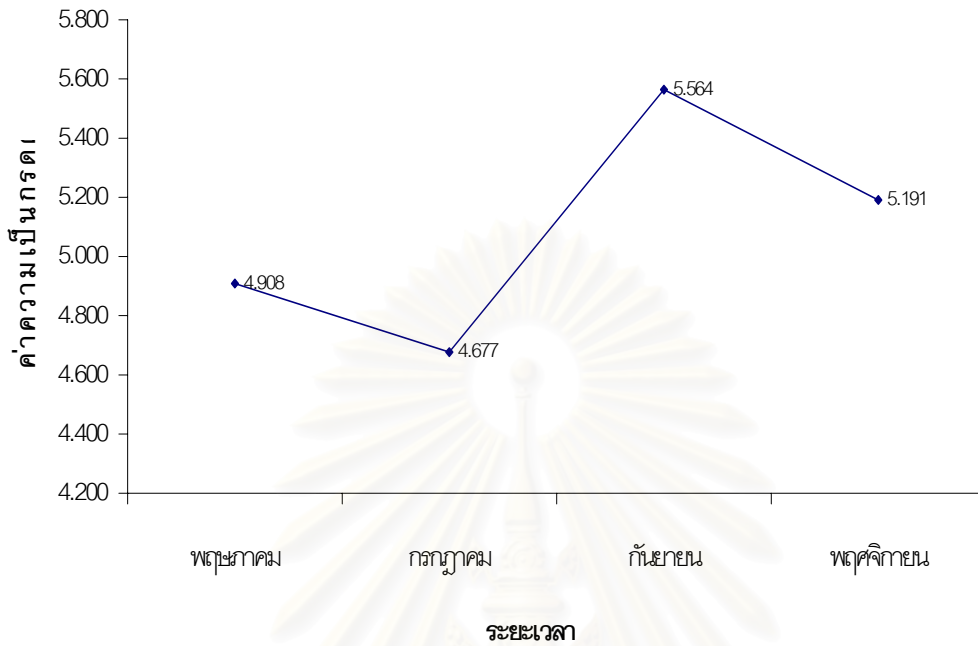
แปลงทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง				
	พฤษภาคม	กรกฎาคม	กันยายน	พฤศจิกายน	เฉลี่ย
1 DEGW	4.350	4.235	4.520	4.480	4.396
2 DEG	4.320	4.315	5.080	4.910	4.656
3 RFCD21	4.965	4.910	6.280	5.340	5.374
4 RF	5.460	4.900	6.000	5.580	5.485
5 GLCD18	4.685	4.565	5.870	4.530	4.913
6 GL	5.410	4.295	5.900	5.740	5.336
7 WAY	5.320	5.315	5.950	5.640	5.556
8 CD3	4.755	4.880	4.910	5.310	4.964
เฉลี่ย	4.908	4.677	5.564	5.191	

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่าง ในแต่ละแปลงที่ศึกษา

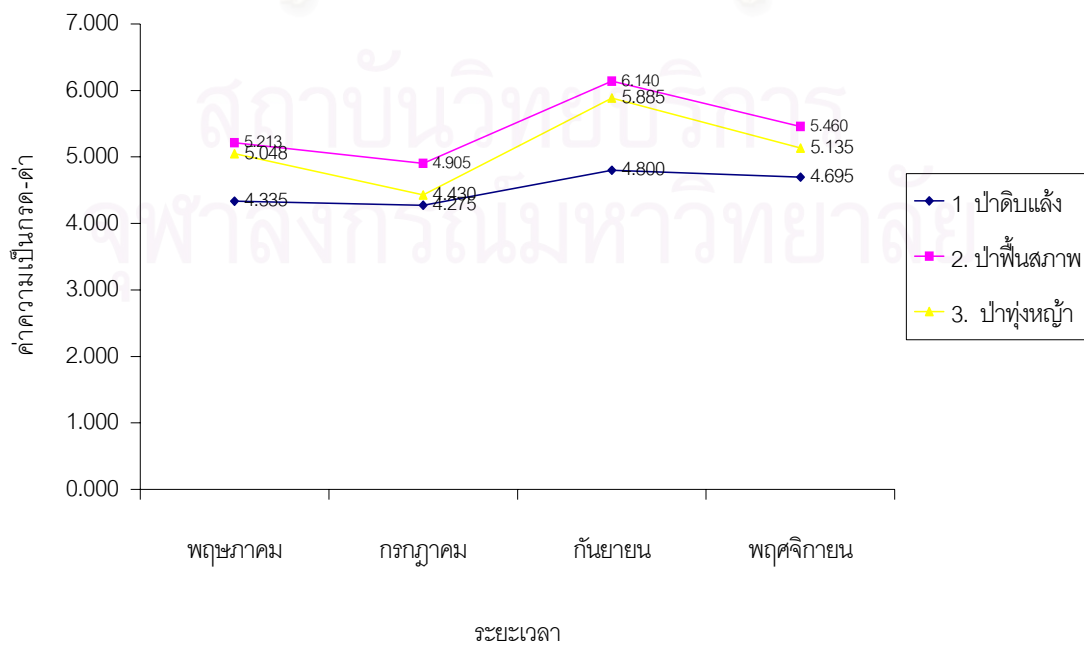




ภาพที่ 16 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่าง ในแต่ละช่วงเวลา



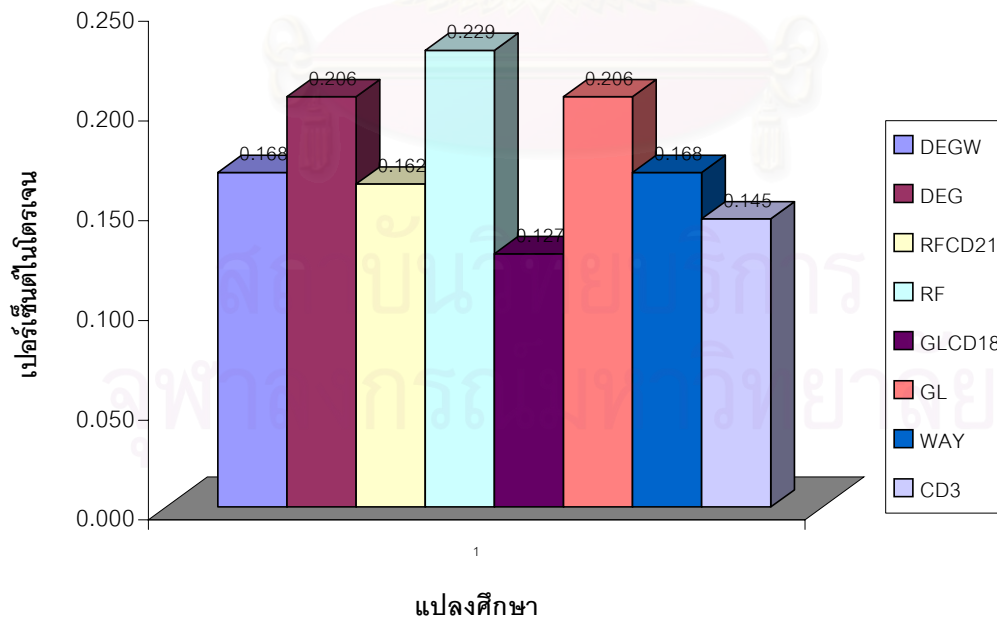
ภาพที่ 17 เปรียบเทียบความเป็นกรด-ด่างในแต่ละสภาพป่า



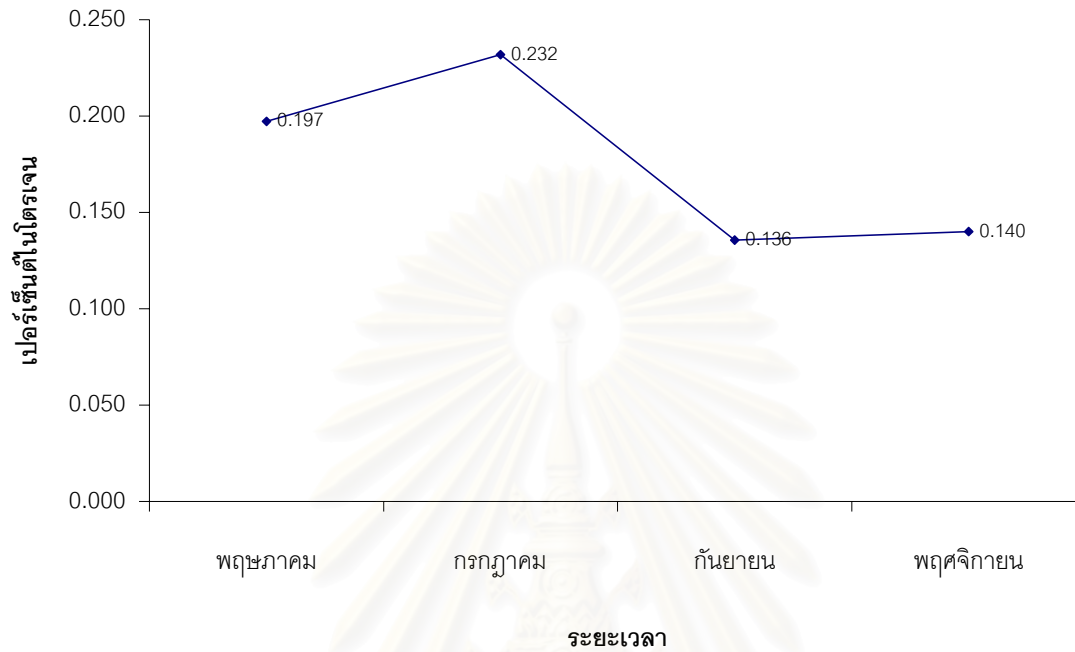
ตารางที่ 4 เปรอร์เซ็นต์ในโตรเจนของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซ็นต์ในโตรเจน				
	พฤษภาคม	กรกฎาคม	กันยายน	พฤศจิกายน	เฉลี่ย
1 DEGW	0.146	0.280	0.140	0.105	<b>0.168</b>
2 DEG	0.158	0.350	0.210	0.105	<b>0.206</b>
3 RFCD21	0.193	0.175	0.105	0.175	<b>0.162</b>
4 RF	0.286	0.315	0.140	0.175	<b>0.229</b>
5 GLCD18	0.158	0.105	0.105	0.140	<b>0.127</b>
6 GL	0.263	0.175	0.175	0.210	<b>0.206</b>
7 WAY	0.216	0.210	0.140	0.105	<b>0.168</b>
8 CD3	0.158	0.245	0.070	0.105	<b>0.145</b>
เฉลี่ย	<b>0.197</b>	<b>0.232</b>	<b>0.136</b>	<b>0.140</b>	

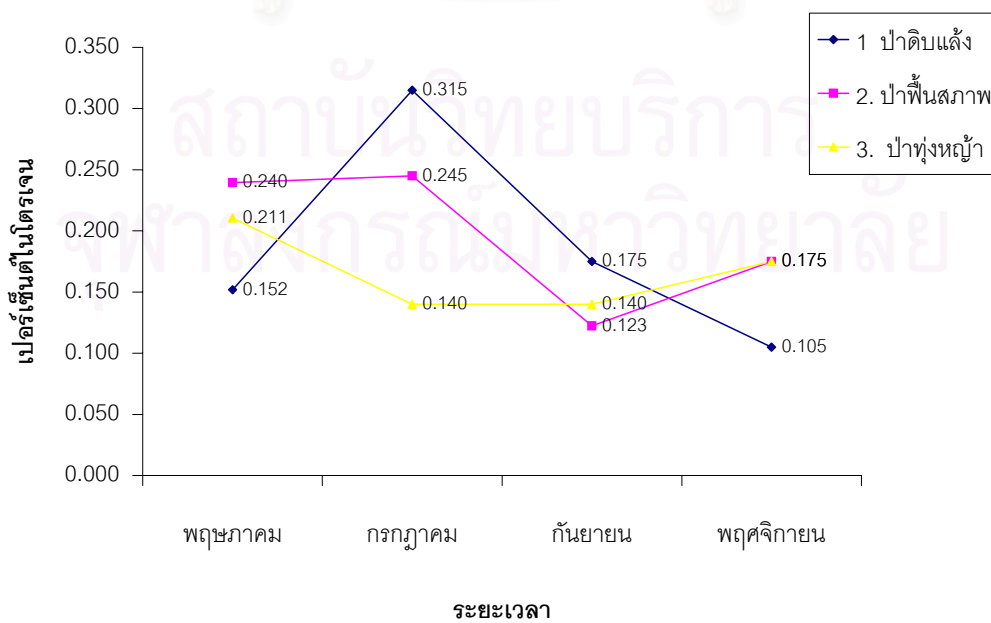
ภาพที่ 18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ในโตรเจนในแต่ละแปลงที่ศึกษา



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในแต่ละช่วงเวลา



ภาพที่ 20 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในแต่ละสภาพป่า



1.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพของดิน ได้แก่ การหาจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะในดิน ผลการนับจำนวนของไรโซเบียมของถั่วมะแฮะในแต่ละแปลงศึกษาโดยใช้วิธี MPN-Plant infection count (ดังตารางที่ 5) พบว่าแปลงศึกษาที่เป็นป่าดิบแล้งไม่มีคั้นดินก้นน้ำขนาดใหญ่ (DEG) มีจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเฉลี่ยสูงสุด คือ 205.84 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง โดยแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีคั้นดินก้นน้ำ (GLCD 18) มีจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเฉลี่ยต่ำสุด คือ 40.84 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง (ดังภาพที่ 21) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเฉลี่ย ในแต่ละช่วงเวลามีจำนวนสูงสุดในช่วงเดือนกันยายน (ดังภาพที่ 22) สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเฉลี่ยของดินในป่าแต่ละชนิด พบว่า ป่าดิบแล้ง ป่าทุ่งหญ้าและป่าพื้นที่สภาพมีแนวโน้มจำนวนไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (ดังภาพที่ 23 )

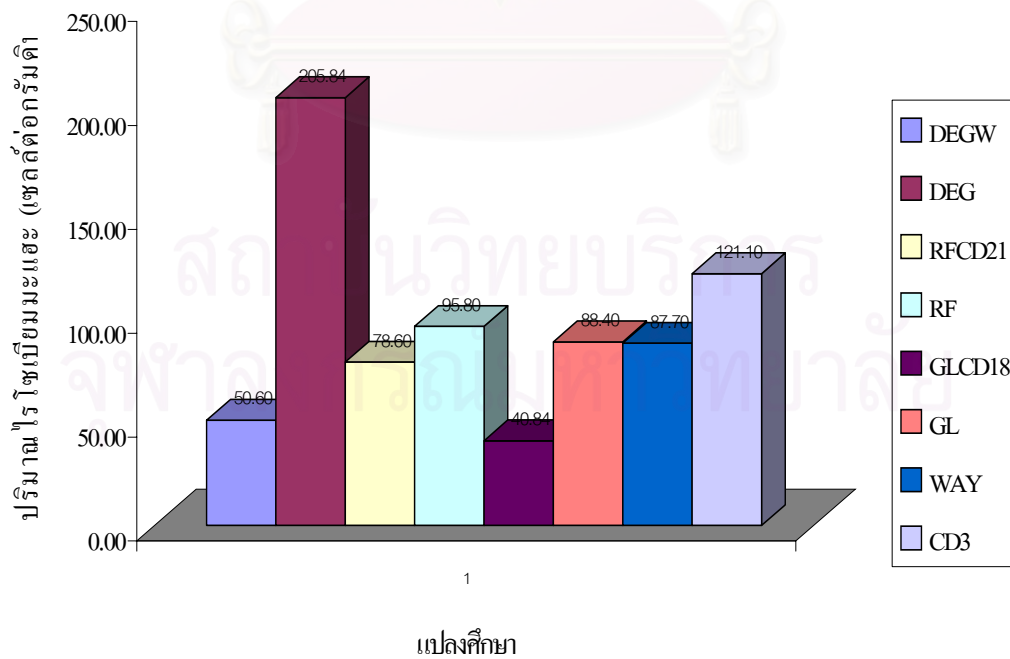


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

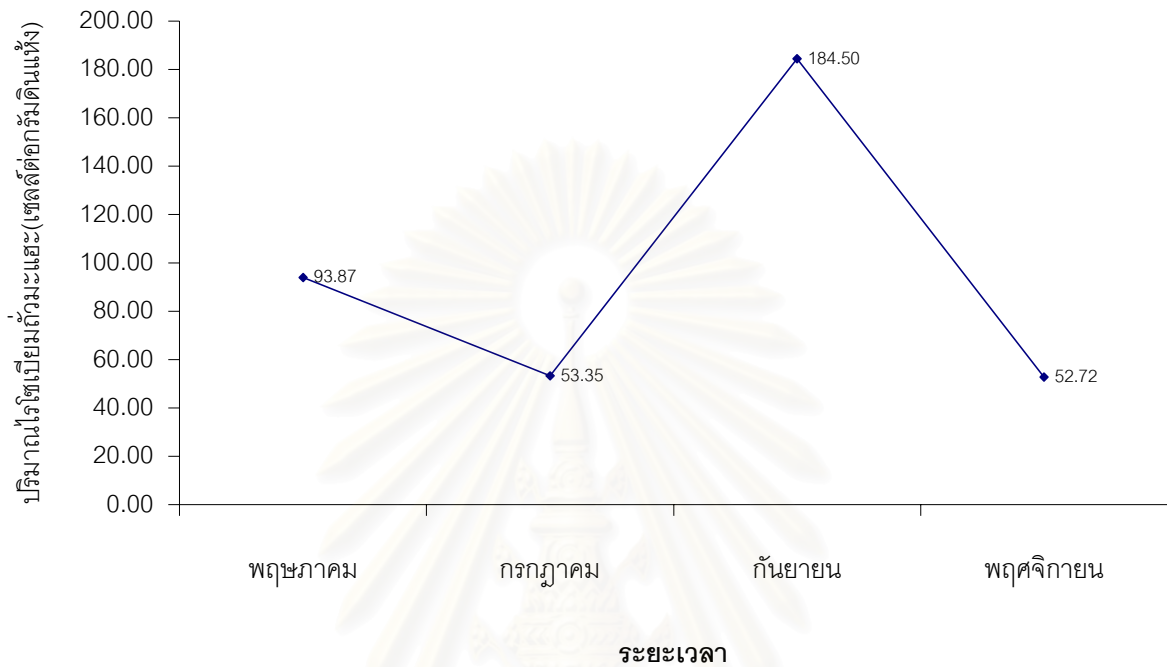
ตารางที่ 5 ปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะของดินในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา

แปลงทดลอง	ปริมาณ Rhizobium ของถั่วมะแฮะ (เซลล์ ต่อ กรัมดินแห้ง)				
	พฤษภาคม	กรกฎาคม	กันยายน	พฤศจิกายน	เฉลี่ย
1 DEGW	8.80	18.00	140.00	35.60	50.60
2 DEG	1.76	12.80	800.00	8.80	205.84
3 RFCD21	284.00	8.80	12.80	8.80	78.60
4 RF	140.00	18.00	25.20	200.00	95.80
5 GLCD18	8.80	12.80	140.00	1.76	40.84
6 GL	35.60	100.00	200.00	18.00	88.40
7 WAY	72.00	252.00	18.00	8.80	87.70
8 CD3	200.00	4.40	140.00	140.00	121.10
เฉลี่ย	93.87	53.35	184.50	52.72	

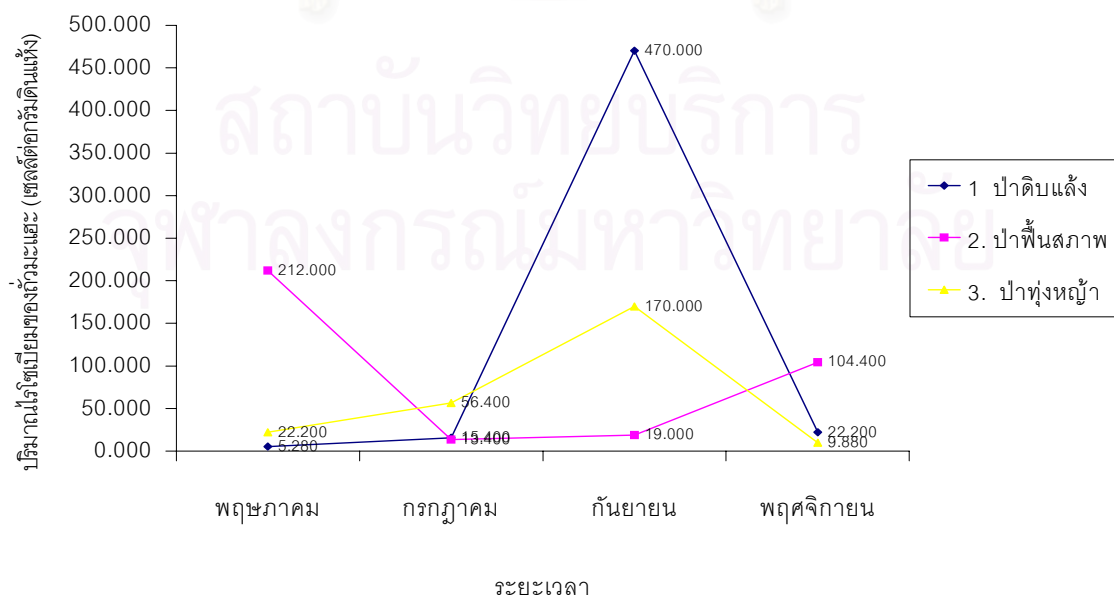
ภาพที่ 21 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละแปลงที่ศึกษา



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละช่วงเวลา



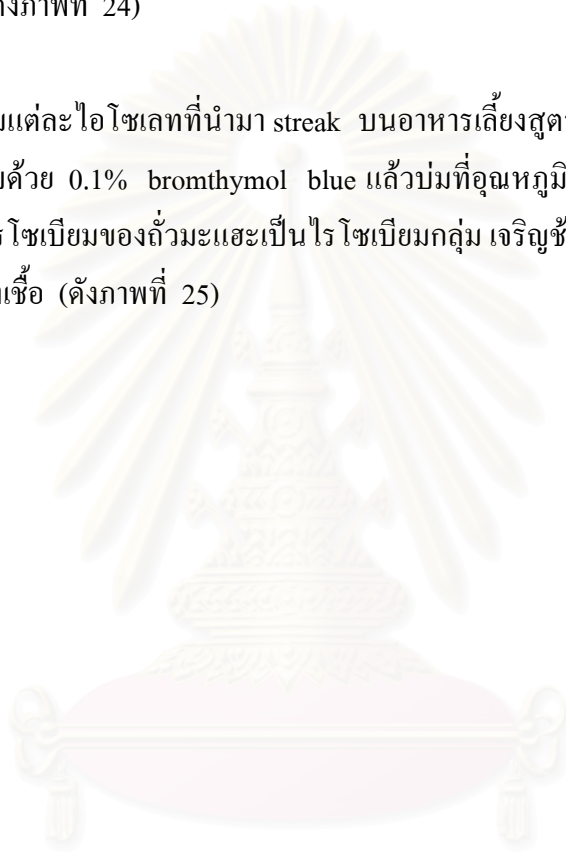
ภาพที่ 23 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮะในแต่ละสภาพป่า



## **ตอนที่2 ผลการแยกเชื้อไรโซเบียมและการจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม**

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของไรโซเบียมจากปมรากถั่วมะแฮะ โดยเลือกปมที่มีขนาดใหญ่ เมื่อผ่าออกจะมีสีแดง โดยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท พบว่ามีการเจริญเป็นระยะเวลา 5-7 วัน ซึ่งโคโคไคมีลักษณะกลมมนใสและมีเมือกปกคลุมปริมาณมากและไม่ดูคลิ่นคลีแดงของ congo red (ดังภาพที่ 24)

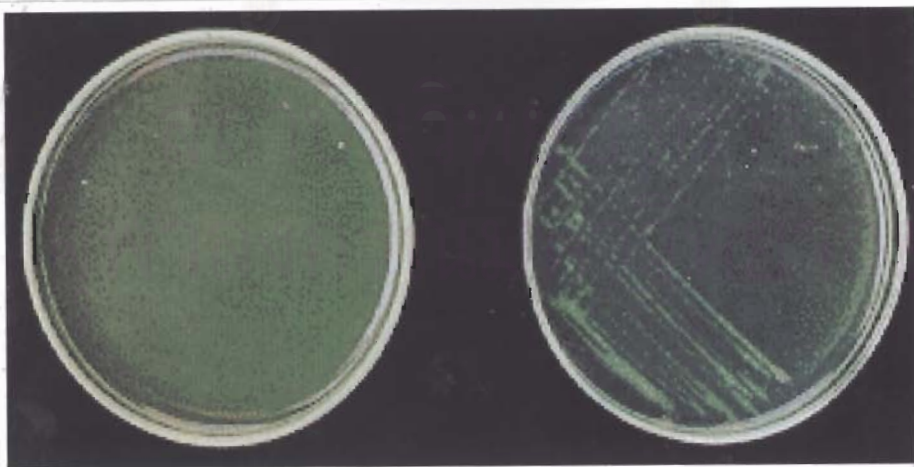
เชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลทที่นำมา streak บนอาหารเลี้ยงสูตร Yeast- manitol agar (YMA) ซึ่งประกอบด้วย 0.1% bromthymol blue แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน พบว่าไรโซเบียมของถั่วมะแฮะเป็นไรโซเบียมกลุ่ม เจริญช้าซึ่งจะสร้างเบสทำให้เกิดสีน้ำเงินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดังภาพที่ 25)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 24 ลักษณะการเจริญของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮบนอาหาร YMA Congo-red



ภาพที่ 25 เชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮเป็นกลุ่มเจริญช้า



### ตอนที่ 3 ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมของถั่วมะแฮะ

#### 3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่โครงการฯ โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin (A) , tetracycline (Te), streptomycin (S), penicillin (P), kanamycin (K), carbenicilin (CB) และ erythromycin (E) แล้วตรวจวัดความกว้างของ inhibition zone จากนั้นแปลผลเทียบกับตาราง National Committee for Clinical Laboratory Standards (1990) (ตารางภาคผนวก ก) โดยแสดงผลเป็น resistant (R) intermediate (I) และ susceptible (S) จากผลการทดสอบสามารถจำแนกเชื้อไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลทตามรูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน ได้ 9 กลุ่ม (ตารางที่ 7 ภาพที่ 26 )

ผลการต้านยาปฏิชีวนะทั้ง 32 ไอโซเลทให้ผลการต้าน erythromycin tetracycline และ penicillin เหมือนกันหมด (ตารางที่ 6 และ ภาคผนวก ง และจ) และพบว่า กลุ่มที่ 1 ให้ผลการต้านยาปฏิชีวนะทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลท RC02 RC03 แยกได้จากป่าดิบแล้งมีลำห้วย ไอโซเลท RC07 RC08 แยกได้จากป่าดิบแล้งไม่มีลำห้วย ไอโซเลท RC09 RC12 แยกได้จากป่าพื้นที่สภาพที่มีคันดินกั้นน้ำ ไอโซเลท RC19 แยกได้จากป่าพื้นที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ ไอโซเลท RC25 RC27 แยกได้จากทางเดินเข้าป่าทุ่งหญ้า และ ไอโซเลท RC30 RC31 แยกได้จากคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ กลุ่มที่ 2 ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin ได้แก่ ไอโซเลท RC01 RC04 แยกได้จากป่าดิบแล้งที่มีลำห้วย ไอโซเลท RC05 RC06 แยกได้จากป่าดิบแล้งที่ไม่มีลำห้วย ไอโซเลท RC13 RC14 แยกได้จากป่าพื้นที่สภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ ไอโซเลท RC17 แยกได้จากป่าทุ่งหญ้าที่มีคันดินกั้นน้ำ ไอโซเลท RC21 RC24 แยกได้จากป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ ไอโซเลท RC26 RC28 แยกได้จากทางเดินเข้าป่าทุ่งหญ้า และ ไอโซเลท RC29 RC32 แยกได้จากคันดินกั้นน้ำขนาดใหญ่ กลุ่มที่ 3 ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin และ carbenicilin ได้แก่ ไอโซเลท RC10 แยกได้จากป่าพื้นที่สภาพที่มีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 4 ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ ampicillin และ carbenicilin ได้แก่ ไอโซเลท RC11 แยกได้จากป่าพื้นที่สภาพที่มีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 5 ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin และ ampicillin ได้แก่ ไอโซเลท RC18 ป่าทุ่งหญ้าที่มีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 6 ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin ampicillin และ carbenicilin ได้แก่ ไอโซเลท RC22 แยกจากป่าทุ่งหญ้าที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 7 ให้ผลการตอบสนองต่อ ampicillin และให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ cabenicilin ได้แก่ ไอโซเลท RC23 แยกได้จากป่าทุ่งหญ้าไม่มีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 8 ให้ผลการตอบสนองต่อ kanamycin และ ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ streptomycin

ได้แก่ ไอโซเลท RC15 แยกได้จากป่าพื้นสภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ และไอโซเลท RC20 แยกได้จากป่าทุ่งหญ้ามีคันดินกั้นน้ำ กลุ่มที่ 9 ให้ผลการตอบสนองต่อ kanamycin ได้แก่ ไอโซเลท RC16 แยกได้จากป่าพื้นสภาพที่ไม่มีคันดินกั้นน้ำ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate	ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ						
	K	S	Am	Cb	Te	E	P
RC01	I	R	R	R	R	R	R
RC02	R	R	R	R	R	R	R
RC03	R	R	R	R	R	R	R
RC04	I	R	R	R	R	R	R
RC05	I	R	R	R	R	R	R
RC06	I	R	R	R	R	R	R
RC07	R	R	R	R	R	R	R
RC08	R	R	R	R	R	R	R
RC09	R	R	R	R	R	R	R
RC10	I	R	R	I	R	R	R
RC11	R	R	I	I	R	R	R
RC12	R	R	R	R	R	R	R
RC13	I	R	R	R	R	R	R
RC14	I	R	R	R	R	R	R
RC15	S	I	R	R	R	R	R
RC16	S	R	R	R	R	R	R
RC17	I	R	R	R	R	R	R
RC18	I	R	I	R	R	R	R
RC19	R	R	R	R	R	R	R
RC20	S	I	R	R	R	R	R
RC21	I	R	R	R	R	R	R
RC22	I	R	I	I	R	R	R
RC23	R	R	S	I	R	R	R
RC24	I	R	R	R	R	R	R
RC25	R	R	R	R	R	R	R
RC26	I	R	R	R	R	R	R
RC27	R	R	R	R	R	R	R

RC28	I	R	R	R	R	R	R
RC29	I	R	R	R	R	R	R
RC30	R	R	R	R	R	R	R
RC31	R	R	R	R	R	R	R
RC32	I	R	R	R	R	R	R

**หมายเหตุ**

R=Resistant

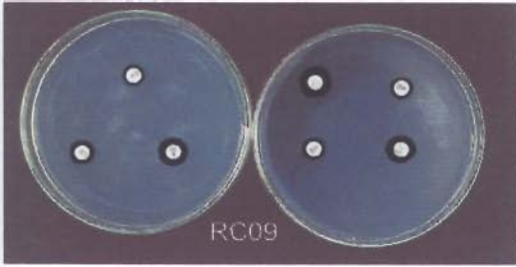
I=Intermediate

S=Susceptible



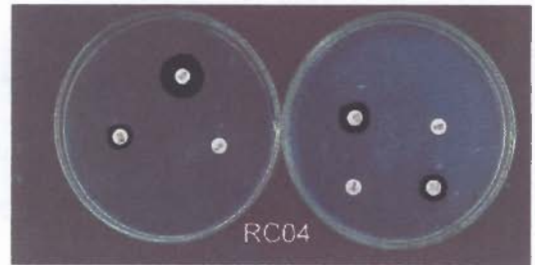
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





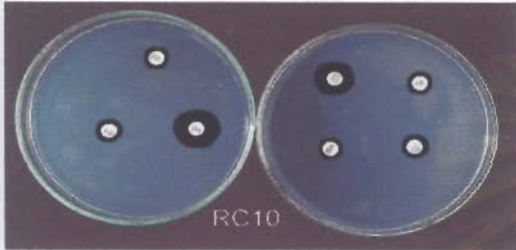
RC09

กลุ่มที่ 1



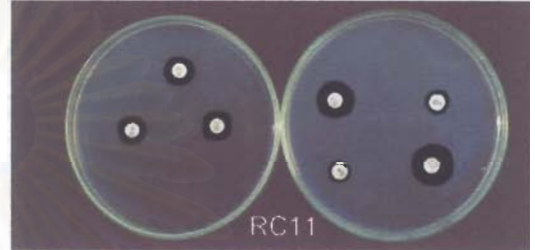
RC04

กลุ่มที่ 2



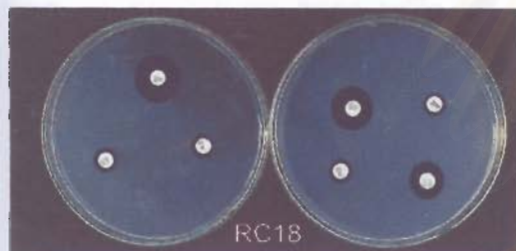
RC10

กลุ่มที่ 3



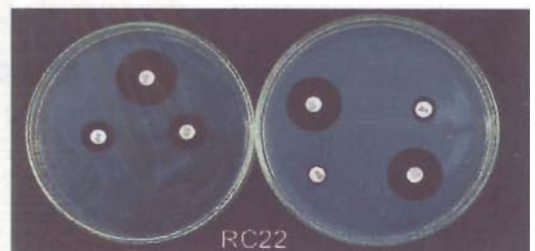
RC11

กลุ่มที่ 4



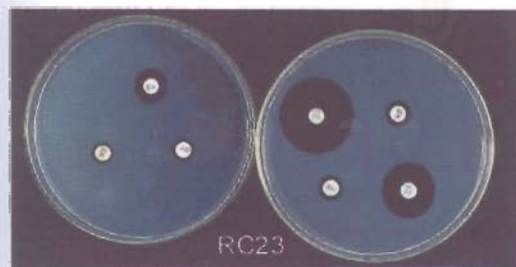
RC18

กลุ่มที่ 5



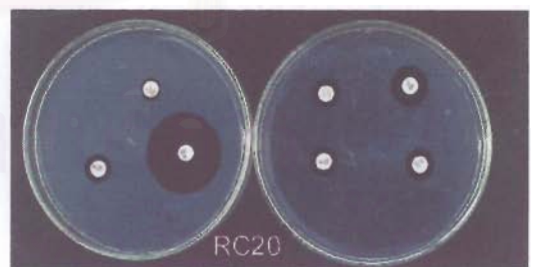
RC22

กลุ่มที่ 6



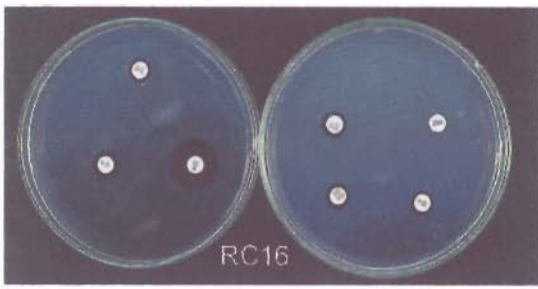
RC23

กลุ่มที่ 7



RC20

กลุ่มที่ 8



RC16

กลุ่มที่ 9

ภาพที่ 26 รูปแบบการด้านยาปฏิชีวนะของเชื้อโรโซเบียม 9 กลุ่ม

### 3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนเค็ม

การทดสอบความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่โครงการฯ ที่ความเข้มข้นของ NaCl 1.7 mM 50mM 100 mM และ 150 mM โดยกำหนดให้ทุกไอโซเลทมีเซลล์เริ่มต้นจำนวน  $10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (คำนวณได้จากค่า absorbance ที่ 600 เท่ากับ 0.45 มีจำนวน  $10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากผลการทดสอบพบว่า (ตารางที่ 8 ) อาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 1.7 mM พบไอโซเลทที่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียม มากที่สุด คือ RC23 มีปริมาณ  $8.5 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไอโซเลทที่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียม น้อยที่สุด คือ RC08 มีปริมาณ  $4.5 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร อาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 50 mM พบไอโซเลทที่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียม มากที่สุด คือ RC20 มีปริมาณ  $5.2 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไอโซเลทที่ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 50 mM ได้แก่ RC08 RC10 RC12 RC17 RC19 RC21 RC23 และ RC25 อาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 100 mM พบไอโซเลทที่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียม มากที่สุด คือ RC20 มีปริมาณ  $2.1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไอโซเลทที่ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 100 mM ได้แก่ RC01 RC02 RC03 RC04 RC05 RC06 RC07 RC08 RC10 RC11 RC12 RC15 RC17 RC18 RC19 RC21 RC22 RC23 RC25 RC27 RC28 RC30 และ RC31 อาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 150 mM เชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 150 mM ได้

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

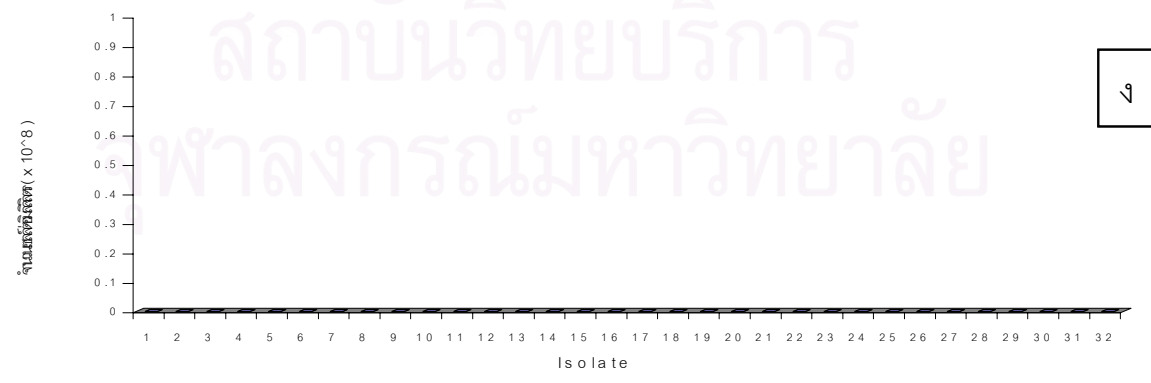
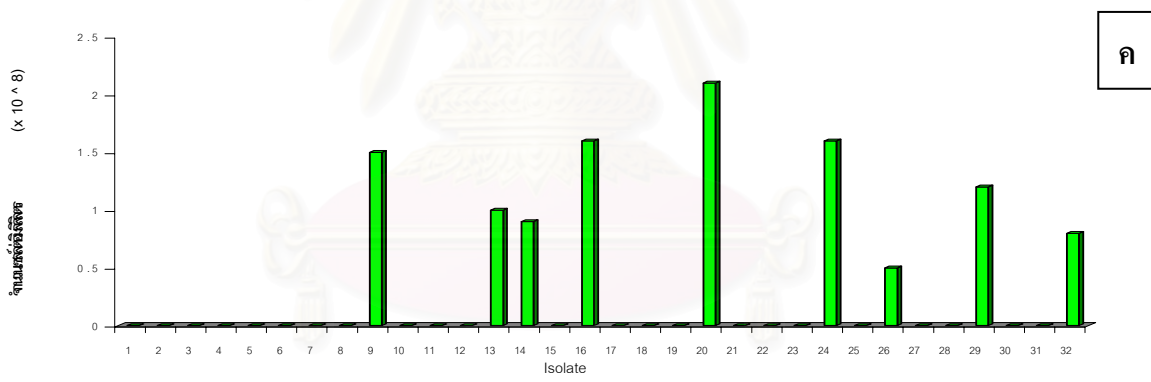
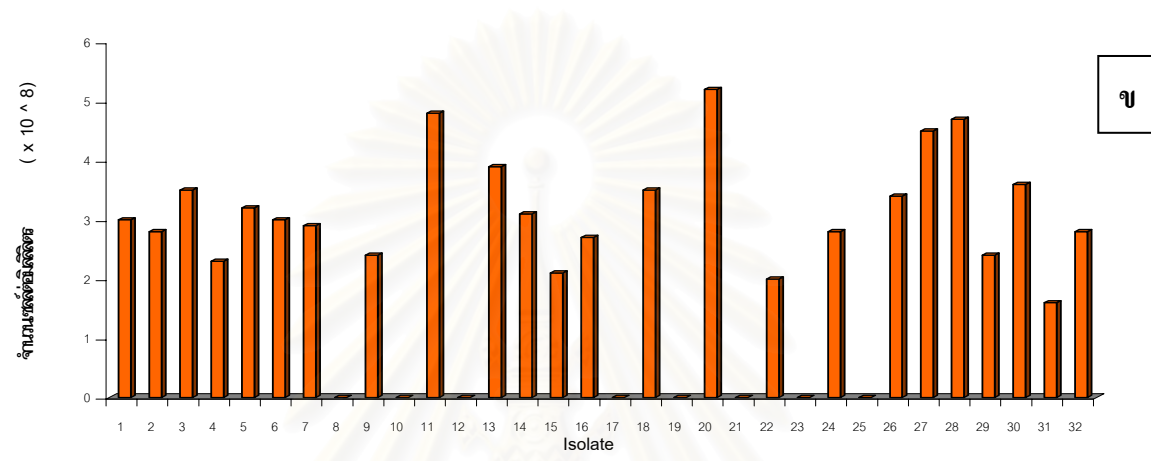
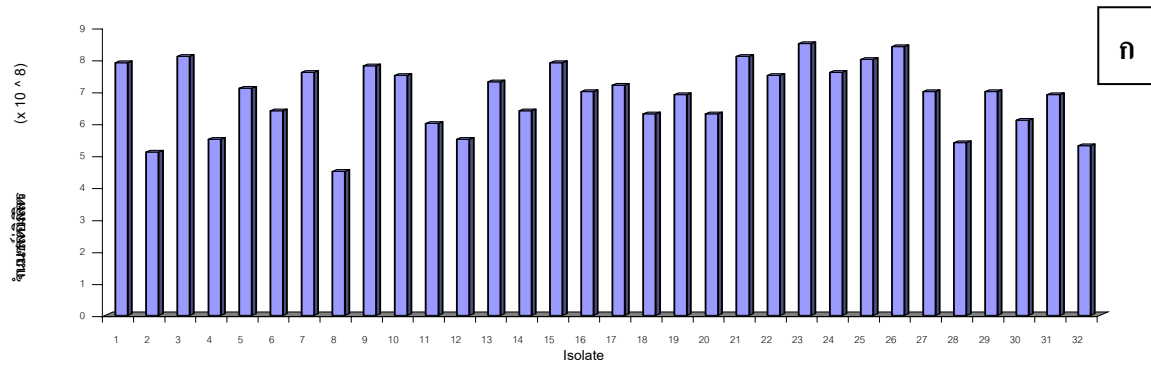
Isolate		จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ( $\times 10^6$ )			
		0.17mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
1	RC01	7.9	3	0	0
2	RC02	5.1	2.8	0	0
3	RC03	8.1	3.5	0	0
4	RC04	5.5	2.3	0	0
5	RC05	7.1	3.2	0	0
6	RC06	6.4	3	0	0
7	RC07	7.6	2.9	0	0
8	RC08	4.5	0	0	0
9	RC09	7.8	2.4	1.5	0
10	RC10	7.5	0	0	0
11	RC11	6	4.8	0	0
12	RC12	5.5	0	0	0
13	RC13	7.3	3.9	1	0
14	RC14	6.4	3.1	0.9	0
15	RC15	7.9	2.1	0	0
16	RC16	7	2.7	1.6	0
17	RC17	7.2	0	0	0
18	RC18	6.3	3.5	0	0
19	RC19	6.9	0	0	0
20	RC20	6.3	5.2	2.1	0
21	RC21	8.1	0	0	0
22	RC22	7.5	2	0	0
23	RC23	8.5	0	0	0
24	RC24	7.6	2.8	1.6	0
25	RC25	8	0	0	0
26	RC26	8.4	3.4	0.5	0
27	RC27	7	4.5	0	0



28	RC28	5.4	4.7	0	0
29	RC29	7	2.4	1.2	0
30	RC30	6.1	3.6	0	0
31	RC31	6.9	1.6	0	0
32	RC32	5.3	2.8	0.8	0



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



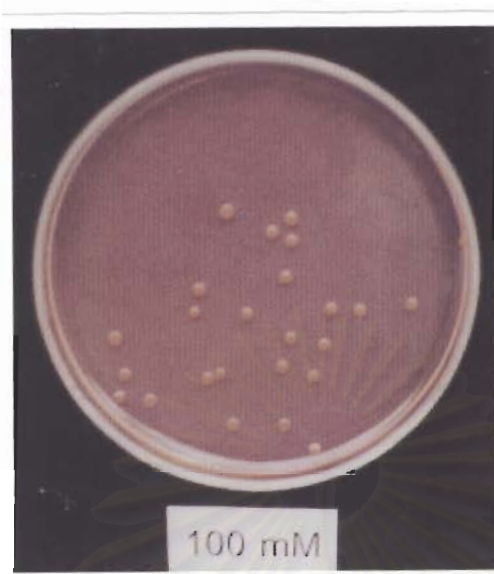
ภาพที่ 27 ปริมาณเชื้อโรโซเบียมที่เจริญในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ  
 (ก) 1.7 mM NaCl (ข) 50 mM NaCl (ค) 100 mM NaCl (ง) 150 mM NaCl



ภาพที่ 28 ภาพแสดงการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 1.7 mM NaCl



ภาพที่ 29 ภาพแสดงการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 50 mM NaCl



ภาพที่ 30 การเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 100 mM NaCl



ภาพที่ 31 ไม่พบการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารที่ความเข้มข้น 150 mM NaCl

### 3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ โดยทำการหาน้ำหนักต้นพืชแห้ง น้ำหนักปมแห้ง จำนวนปม และการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากปมรากของถั่วมะแฮะ แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ดังตารางที่ 9 และตารางภาคผนวก จ) และจากการทดลอง พบว่าไม่มีการสร้างปมรากในต้นถั่วที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ(control) (ดังภาพที่ 33 ง) โดยข้อมูลที่ได้จากการทดสอบจะทำให้ทราบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ใดที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด

จากข้อมูล พบว่า ไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นพืชแห้งมากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC04 มีน้ำหนัก 2.06 กรัมต่อต้น และไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นพืชแห้งต่ำที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC02 มีน้ำหนัก 0.34 กรัมต่อต้น ไอโซเลทที่ให้น้ำหนักปมแห้งมากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC04 มีน้ำหนัก 89.8 มิลลิกรัมต่อต้น และไอโซเลทที่ให้น้ำหนักปมแห้งต่ำที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC16 มีน้ำหนัก 20.20 มิลลิกรัมต่อต้น ไอโซเลทที่ให้จำนวนปมมากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC32 มีจำนวน 51 ปม และไอโซเลทที่ให้จำนวนปมต่ำที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC14 มีจำนวน 3 ปม ไอโซเลทที่ให้ค่า ARA มากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC21 มีค่า 2.32 ไมโครโมลต่อต้นต่อชั่วโมง และไอโซเลทที่ให้ค่า ARA ต่ำที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท RC02 มีค่า 0.233 ไมโครโมลต่อต้นต่อชั่วโมง

ความสัมพันธ์ของน้ำหนักต้นแห้งกับน้ำหนักปมแห้ง (ดังภาพที่ 32 ก-ค) พบว่า ไอโซเลทที่มีน้ำหนักต้นแห้งสูงกับน้ำหนักปมแห้งสูงด้วย ได้แก่ ไอโซเลท RC01 และ RC12 และความสัมพันธ์ของน้ำหนักต้นแห้งกับจำนวนปม พบว่า ไอโซเลทที่มีน้ำหนักต้นแห้งสูงกับจำนวนปมสูงด้วย ได้แก่ ไอโซเลท RC04 RC12 และ RC21

ค่าที่แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) (ดังภาพที่ 32 ง) ได้แก่ ค่า ARA ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า ค่า ARA มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักต้นแห้งและน้ำหนักปมแห้ง จะเห็นว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่มีน้ำหนักต้นแห้งและน้ำหนักปมแห้งสูงจะมีแนวโน้มให้ค่า ARA สูง แต่อย่างไรก็ตามอาจพบว่ามียางไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท RC21 ซึ่งให้ค่า ARA สูงสุดและสูงกว่า ไอโซเลท RC04 แต่เมื่อคูน้ำหนักต้นแห้ง พบว่ามีค่าน้อยกว่าไอโซเลท RC04 ซึ่งมีน้ำหนักต้นพืชแห้งสูงสุด

จากการศึกษาตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท (ภาคผนวก ข) พบลักษณะการเกิดปม 3 รูปแบบ (ดังภาพที่ 33 ก-ค) ดังนี้ แบบที่ 1 ปมรากอยู่ที่ส่วนของรากแก้ว ได้แก่ ไอโซเลท RC01 RC06 และ RC16 แบบที่ 2 ปมรากอยู่ที่ส่วนของรากแขนง ได้แก่ ไอโซเลท RC02 RC03 RC09 RC14 RC24 RC27 RC28 RC29 แบบที่ 3 ปมรากอยู่ทั้งที่ส่วนของรากแก้วและรากแขนง ได้แก่ ไอโซเลท RC04 RC05 RC07 RC08 RC10 RC11 RC12 RC13 RC15 RC17 RC18 RC19 RC20 RC21 RC22 RC23 RC25 RC26 RC30 RC31 RC32 และพบว่า ไอโซเลทที่มีปมรากอยู่ทั้งที่ส่วนของรากแก้วและรากแขนงจะมีแนวโน้มให้ค่า ARA ค่อนข้างสูงกว่าไอโซเลทที่มีปมเกิดที่รากแก้ว



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลต

NO.	Isolate	ตำแหน่งที่ติดปม	น้ำหนักต้นพืช (กรัม/ต้น)	น้ำหนักปมแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	จำนวนปม	ARA umol/plant/hr
1	RC01	รากแก้ว	0.6 ef	25.3 b	14 cf	0.333 cde
2	RC02	รากแขนง	0.34 f	34.7 b	7 ef	0.233 de
3	RC03	รากแขนง	0.87 cf	30.1 b	32 ae	0.838 be
4	RC04	รากแก้ว/แขนง	2.06 a	89.8 a	39 ab	0.649 be
5	RC05	รากแก้ว/แขนง	1.6 ad	33.8 b	29 af	0.497 be
6	RC06	รากแก้ว	1.41 ae	31.43 b	43 ab	0.294 cde
7	RC07	รากแก้ว/แขนง	1.3 ae	47.8 ab	34 ae	0.287 cde
8	RC08	รากแก้ว/แขนง	1.74 abc	28.7 b	18 bf	0.767 be
9	RC09	รากแขนง	1.33 ae	38.43 b	26 af	0.564 be
10	RC10	รากแก้ว/แขนง	1.58 ad	45.57 ab	22 bf	1.032 be
11	RC11	รากแก้ว/แขนง	1.98 ab	43.03 b	34 ad	1.46 ab
12	RC12	รากแก้ว/แขนง	1.77 abc	57.7 ab	39 ab	1.001 be
13	RC13	รากแก้ว/แขนง	1.1 bf	39.27 b	24 bf	0.977 be
14	RC14	รากแขนง	1.06 bf	20.6 b	3 f	0.451 be
15	RC15	รากแก้ว/แขนง	1.51 ae	46.93 ab	25 af	0.361 cde
16	RC16	รากแก้ว	0.95 cf	20.2 b	15 cf	0.771 be
17	RC17	รากแก้ว/แขนง	1.65 abc	47.23 ab	18 bf	1.29 bc
18	RC18	รากแก้ว/แขนง	0.94 cf	54.87 ab	23 bf	0.577 be
19	RC19	รากแก้ว/แขนง	1.13 af	38.63 b	19 bf	0.826 be
20	RC20	รากแก้ว/แขนง	1.65 abc	63.67 ab	29 af	0.611 be
21	RC21	รากแก้ว/แขนง	1.6 ad	57.73 ab	32 ae	2.32 a
22	RC22	รากแก้ว/แขนง	1.14 af	42.8 b	28 af	0.873 be
23	RC23	รากแก้ว/แขนง	0.97 cf	42.7 b	40 ab	0.827 be
24	RC24	รากแขนง	1.22 af	51.03 ab	31 ae	0.652 be
25	RC25	รากแก้ว/แขนง	1.33 ae	55.07 ab	32 ae	0.465 be
26	RC26	รากแก้ว/แขนง	1.18 af	47.87 ab	36 ad	1.107 be
27	RC27	รากแขนง	0.86 cf	28.93 b	19 bf	0.484 be
28	RC28	รากแขนง	1.46 ae	47.47 ab	27 af	0.573 be
29	RC29	รากแขนง	1.11 bf	36.1 b	24 bf	1.259 bcd
30	RC30	รากแก้ว/แขนง	0.68 def	25.4 b	10 de	0.408 cde
31	RC31	รากแก้ว/แขนง	0.96 cf	23.37 b	18 bf	0.795 be
32	RC32	รากแก้ว/แขนง	1.5 ae	57.97 ab	51 a	1.475 ab
33	Control	-	0.36 f	-	-	0.188 e

**หมายเหตุ**

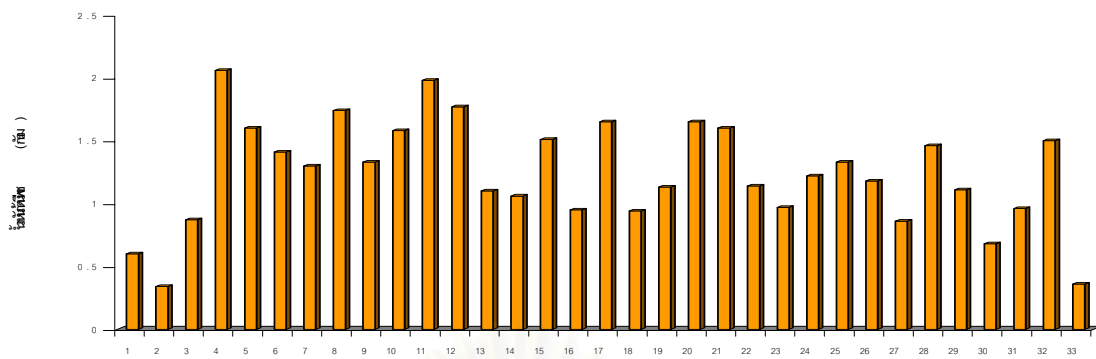
ARA = nitrogenase activity ( $\mu\text{mol} / \text{plant} / \text{hr}$ )

Plant dry weight (g/plant) = น้ำหนักแห้งต้นพืช (กรัม/ต้น)

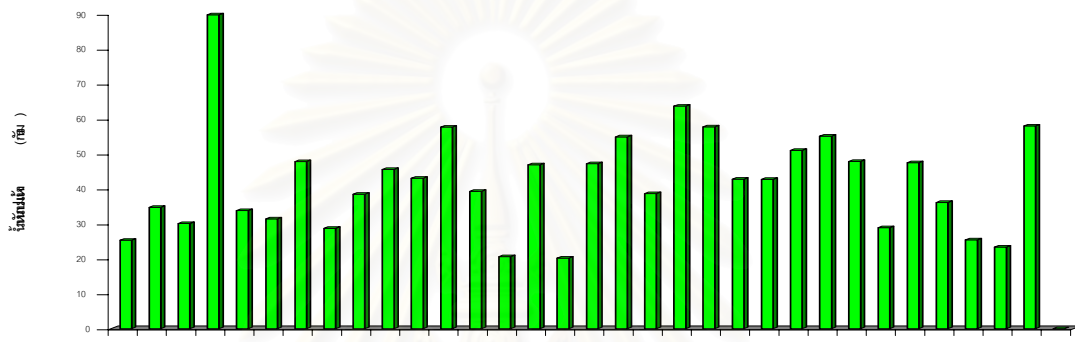
Nodule dry weight (mg/plant) = น้ำหนักปมแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)

Nodule no. = จำนวนปมต่อต้น

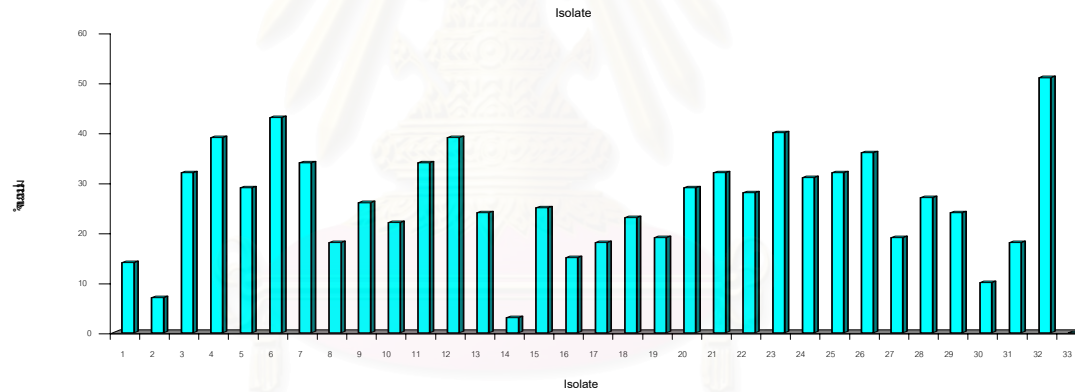
\*ตัวอักษร แสดงการจัดกลุ่มโดยใช้สถิติ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



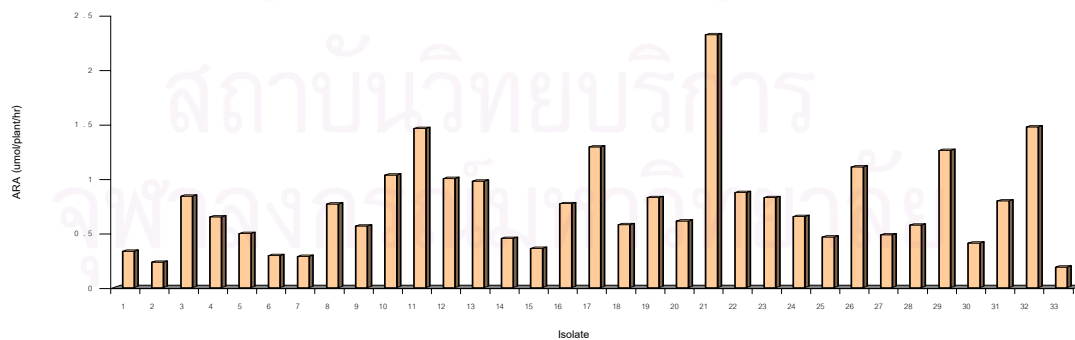
ก



ข



ค

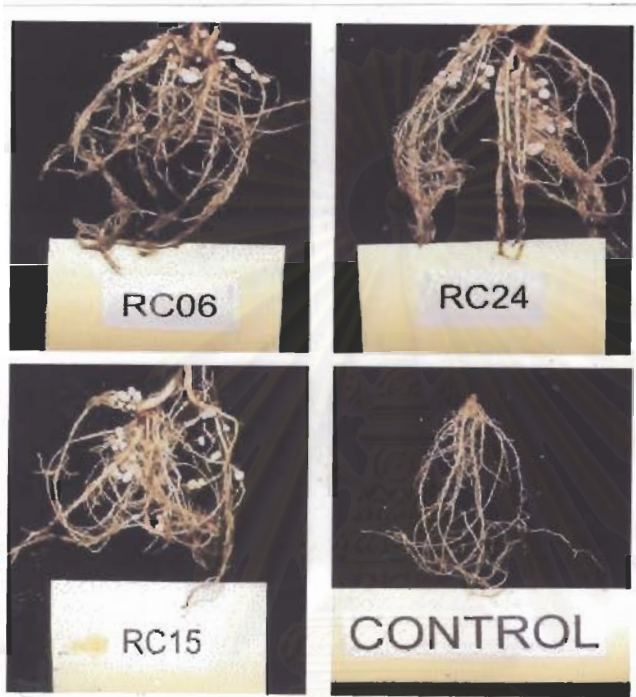


ง

ภาพที่ 32 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลต

ก) น้ำหนักต้นพืช ข) น้ำหนักปมแห้ง ค) จำนวนปม ง) ค่า ARA





ภาพที่ 33 ลักษณะการเกิดปมแบบต่างๆ

- ก) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแก้ว ได้แก่ ไอโซเลท RC06  
 ข) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแขนง ได้แก่ ไอโซเลท RC24  
 ค) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแก้วและแขนง ได้แก่ ไอโซเลท RC15  
 ง) รากของต้นถั่วที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียม (control) ไม่ปรากฏตำแหน่งการเกิดปม

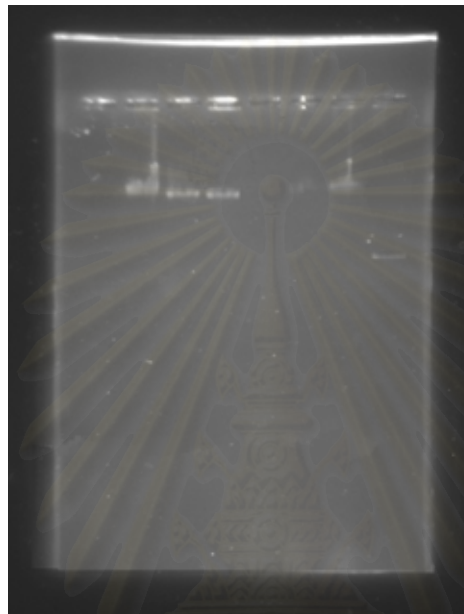
### 3.4 ผลการศึกษาพลาสติกโพลีไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

จากการตรวจหาพลาสติกของเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี cell lysis ตามวิธีของ Pandya และ Desai (1998) และ Harrison และคณะ (1989) โดยเปรียบเทียบกับพลาสติกขนาดใหญ่ของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 193 (Masterson และคณะ, 1985) ซึ่งพบว่า มีพลาสติกขนาด 600 เมกะดาลตัน และ *E.coli* NO.2 ซึ่งพบว่า มีพลาสติกขนาด 140 เมกะดาลตัน ซึ่งสกัดตามวิธีการของ Birnboim and Doly (1979) โดยผลการสกัดแยกพลาสติกของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท พบว่ามีทั้งไรโซเบียมที่ตรวจพบพลาสติกและไรโซเบียมที่ตรวจไม่พบพลาสติก (ดังภาพที่ 34-39 )

เชื้อไรโซเบียมที่ตรวจพบพลาสติก มีจำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ RC02 RC03 RC04 RC06 RC13 RC14 RC17 RC19 RC20 RC21 RC22 RC23 RC24 และ RC27 โดยพลาสติกเพียง 1 ชั้น ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 เมกะดาลตัน ดังนี้

เชื้อไรโซเบียมที่ตรวจไม่พบพลาสติก มีจำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ RC01 RC05 RC07 RC08 RC09 RC10 RC11 RC12 RC15 RC16 RC18 RC25 RC26 RC28 RC29 RC30 RC31 และ RC32

1 2 3 4 5 6 B E



-600 Md

-140 Md

ภาพที่ 34 พลาสมิดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

lane1 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 1

lane2 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 2

lane3 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 3

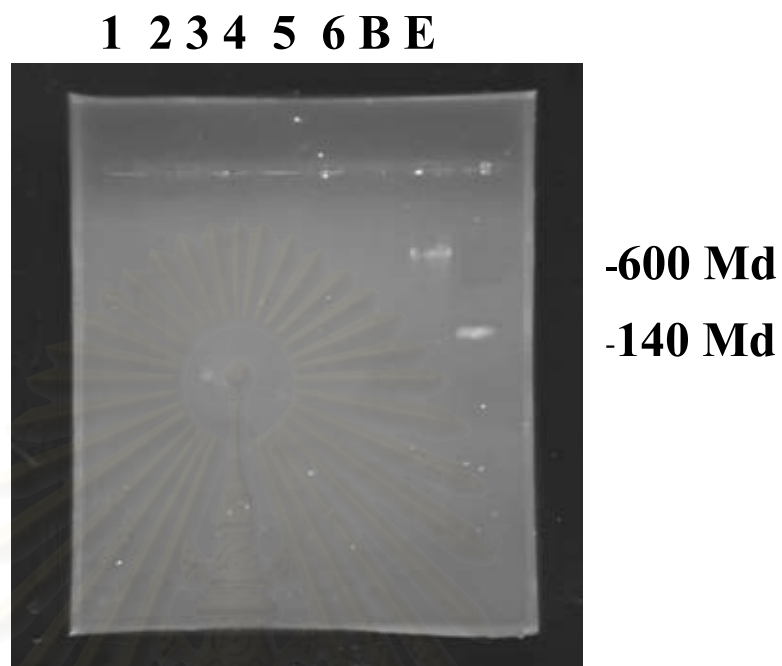
lane4 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 4

lane5 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 5

lane6 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 6

lane7 พลาสมิดของ *B. japonicum* USDA 193

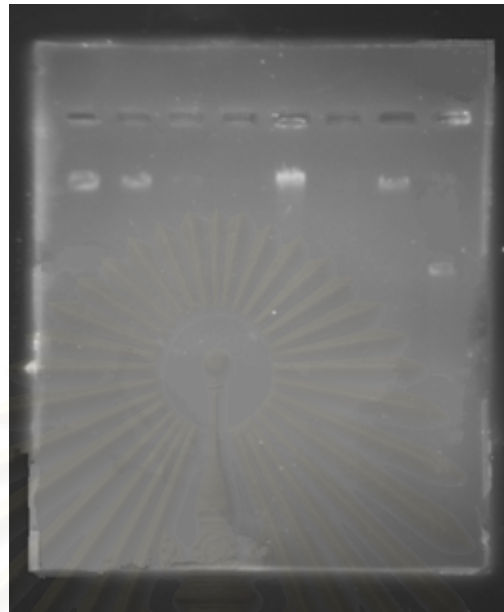
lane8 พลาสมิดของ *E.coli* NO.2



ภาพที่ 35 พลาสมิดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

- |       |   |
|-------|---|
| lane1 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 7                   |
| lane2 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 8                   |
| lane3 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 9                   |
| lane4 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 10                  |
| lane5 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 11                  |
| lane6 | ไรโซเบียมไอโซเลขที่ 12                  |
| lane7 | พลาสมิดของ <i>B. japonicum</i> USDA 193 |
| lane8 | พลาสมิดของ <i>E.coli</i> NO.2           |

**1 2 3 4 5 6 B**

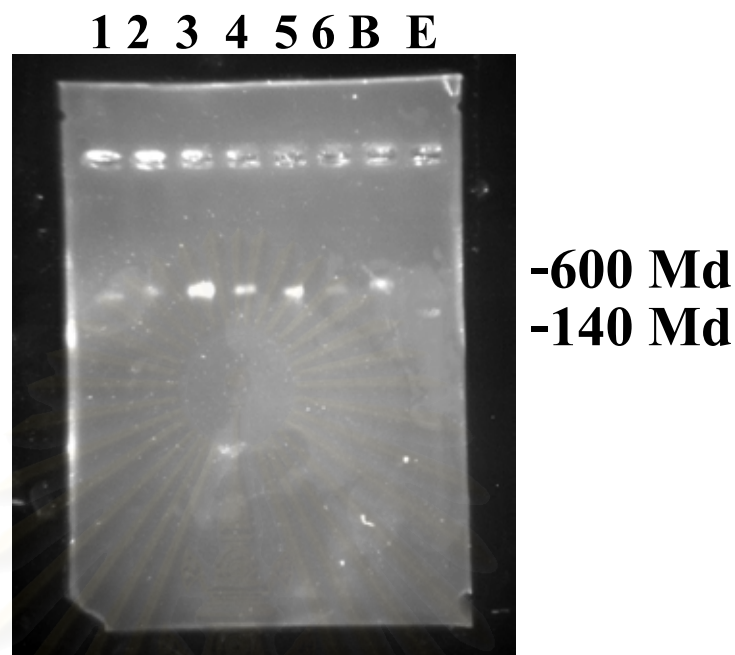


**-600 Md**

**-140 Md**

ภาพที่ 36 พลาสมิดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

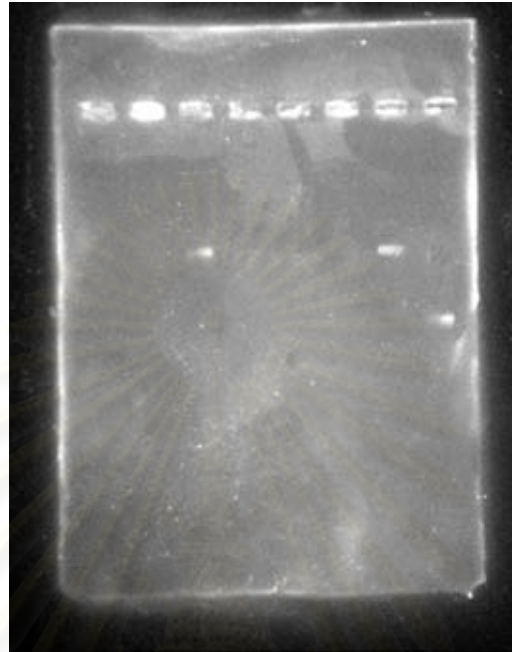
- |       |   |
|-------|---|
| lane1 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 13                  |
| lane2 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 14                  |
| lane3 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 15                  |
| lane4 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 16                  |
| lane5 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 17                  |
| lane6 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 18                  |
| lane7 | พลาสมิดของ <i>B. japonicum</i> USDA 193 |
| lane8 | พลาสมิดของ <i>E.coli</i> NO.2           |



ภาพที่ 37 พลาสมิดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

- |       |   |
|-------|---|
| lane1 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 19                  |
| lane2 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 20                  |
| lane3 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 21                  |
| lane4 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 22                  |
| lane5 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 23                  |
| lane6 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 24                  |
| lane7 | พลาสมิดของ <i>B. japonicum</i> USDA 193 |
| lane8 | พลาสมิดของ <i>E.coli</i> NO.2           |

1 2 3 4 5 6 B E



**-600 Md**  
**-140 Md**

ภาพที่ 38 พลาสมิดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

- |       |   |
|-------|---|
| lane1 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 25                  |
| lane2 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 26                  |
| lane3 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 27                  |
| lane4 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 28                  |
| lane5 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 29                  |
| lane6 | ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 30                  |
| lane7 | พลาสมิดของ <i>B. japonicum</i> USDA 193 |
| lane8 | พลาสมิดของ <i>E.coli</i> NO.2           |

**E B 3 4 5 6 B E****-600 Md****-140 Md**

ภาพที่ 39 แสดงผลของไมโครไบโอมที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ

lane1 พลาสมิดของ *E.coli* NO.2

lane2 พลาสมิดของ *B. japonicum* USDA 193

lane3 ไม่ได้ใส่เชื้อ

lane4 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 31

lane5 ไรโซเบียมไอโซเลทที่ 32

lane6 ไม่ได้ใส่เชื้อ

lane7 พลาสมิดของ *B. japonicum* USDA 193

lane8 พลาสมิดของ *E.coli* NO.2



## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

#### ตอนที่ 1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของดิน

##### 1.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของดิน

จากผลการวัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยในพื้นที่โครงการฯ ทั้ง 3 สภาพป่า ได้แก่ ป่าทุ่งหญ้า ป่าพื้นที่สภาพ และป่าดิบแล้ง พบว่า ป่าพื้นที่สภาพจะมีแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงที่สุด ทั้งบริเวณที่มีคันดินกั้นน้ำและไม่มีคันดินกั้นน้ำอาจเป็นเพราะลักษณะทั่วไปของพื้นที่เป็นป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติซึ่งในพื้นที่ประกอบด้วยไม้พุ่มและไม้เลื้อยกระจายเต็มบริเวณพื้นที่รวมทั้งมีเศษกิ่งไม้ทับถมกันเป็นจำนวนมากส่งผลให้ปริมาณแสงอาทิตย์สู่พื้นดินมีปานกลางรวมทั้งลักษณะของพื้นดินเป็นดินค่อนข้างร่วนเม็ดดินเล็กละเอียดจึงส่งผลให้ป่าพื้นที่สภาพมีความชื้นค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับป่าทุ่งหญ้า และป่าดิบแล้ง (มณฑิ โปธ์ทัย, 2536; เพิ่มพูน กิรติกลีกร, 2527) เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างดินพบว่า เดือนกันยายน จะมีความชื้นค่อนข้างสูงที่สุดซึ่งอาจมีสาเหตุจากเป็นช่วงฤดูฝนและมีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูง

ค่าความเป็นกรดต่างของดินในพื้นที่โครงการฯ ทั้ง 3 สภาพป่า พบว่า สภาพดินค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 4.39-5.56 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน จะเกี่ยวข้องกับระดับของธาตุอาหารพืชในดินและเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินด้วย โดยเฉพาะแบคทีเรียจะมีกิจกรรมสูงที่สุดหรือทำงานเต็มประสิทธิภาพเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของดินใกล้เคียงปานกลางหรือเป็นกรดอ่อน (เอิบ เขียวรัตน์, 2542) พบว่า เมื่อดินเป็นกรดจุลินทรีย์ดินจะทำงานได้ช้าลงตามลำดับ ส่วนเชื้อราจะทำงานได้ดีกว่าแบคทีเรียไม่ว่าจะเป็นกรดหรือด่างก็ตาม (Batzli และคณะ, 1992) แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วยที่จะส่งผลต่อปริมาณของเชื้อรา โสไซเบียมถั่วมะแฮ โดยจะสังเกตจากการที่ปริมาณเชื้อรา โสไซเบียมในแปลงศึกษาที่เป็น ป่าดิบแล้งไม่มีคันดินกั้นน้ำ (DEG) ซึ่งมีจำนวนสูงสุดแต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในพื้นที่ศึกษานี้กลับเป็นกรดแก่จัด แต่เมื่อสังเกตเดือนกันยายนซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินค่อนข้างสูงที่สุดหรือเป็นกรดปานกลาง พบว่ามีปริมาณไรโซเบียมถั่วมะแฮมากที่สุดแต่ถึงอย่างไรก็ไม่อาจกล่าวได้ว่าการศึกษาปริมาณไรโซเบียมมีปริมาณสูงนี้มีสาเหตุมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมแต่เพียงอย่างเดียวทั้งนี้อาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้องกับปริมาณไรโซเบียมด้วย

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของดินในพื้นที่โครงการฯ ทั้ง 3 สภาพป่า อยู่ในช่วงประมาณ 0.127-0.229 เปอร์เซ็นต์ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินจะควบคุมระดับไนโตรเจนที่พืชจะนำไปใช้ประโยชน์ เมื่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินดำเนินไปได้ด้วยดี ปริมาณไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืชก็จะสูงตามไปด้วย (ปีทมา วิทยากร, 2533) ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์ดินโดยเฉพาะแบคทีเรียมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการปลดปล่อยธาตุไนโตรเจนและธาตุอื่นๆ ออกจากอินทรีย์วัตถุ (mineralization) (Martin, 1993) โดยจากผลการทดลองจะเห็นว่าแปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีคันดินกั้นน้ำ (GLCD18) มีไรโซเบียมถั่วมะแฮะต่ำสุด ในขณะที่เดียวกันก็พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่ำสุดด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางกายภาพของดิน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน ความเป็นกรดต่างของดินและเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของดิน ที่มีต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ โดยใช้ correlation test ( r ) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข) โดยปัจจัยเหล่านี้ยังไม่ใช่ปัจจัยทั้งหมดที่จะมีผลต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียม ทั้งนี้อาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณหรือกิจกรรมของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ เช่น ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณธาตุอาหารอื่นๆ อุณหภูมิของดิน เป็นต้น (ถวิล ครุฑกุล, 2529)

## 1.2 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพของดิน

การตรวจนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะในดินจากพื้นที่โครงการฯ ทั้ง 3 สภาพป่า โดยอาศัยหลักการที่เชื้อไรโซเบียมจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชทดสอบซึ่งก็คือถั่วมะแฮะ โดยเชื้อไรโซเบียมจะสร้างปมรากที่รากของถั่วมะแฮะ แล้วทำการวิเคราะห์ออกมาเป็นจำนวนเชื้อไรโซเบียมสูงสุดที่อาจเป็นไปได้ (most probable number : MPN) โดยวิธีการที่ใช้หลักการดังกล่าว เรียกว่า plant-infection technique ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมในปัจจุบัน โดยจากการทดลองพบว่าแปลงศึกษาที่เป็นป่าดิบแล้งไม่มีแหล่งน้ำ (DEG) มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพื้นที่ดังกล่าวมีลักษณะโดยทั่วไปเป็นพื้นที่ที่มีพันธุ์ไม้หลากหลายชนิดจำนวนมาก และประกอบไปด้วยดินทรายเป็นส่วนใหญ่ซึ่งอากาศและน้ำถ่ายเทได้ดีและเป็นบริเวณที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนในดินค่อนข้างสูง จึงอาจมีส่วนช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเชื้อไรโซเบียม (Buttery, 1992 ;Hardy และคณะ, 1973 ) เปรียบเทียบกับแปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLCD18) ซึ่งลักษณะทั่วไปเป็นป่าทุ่งหญ้าไม่พบความหลากหลายของพันธุ์ไม้มากนัก เพราะพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นหญ้าคาเต็มพื้นที่และมีหญ้าแห้งทับถมกระจายทั่วพื้นที่จึงดูดซับความชื้นในช่วงฝนตกไว้ค่อนข้างมากและลักษณะของดินเป็นดินเหนียวเนื้อละเอียดและเนื้อแน่น สีแดง ซึ่งไม่เหมาะต่อการดำเนินกิจกรรมของเชื้อไรโซเบียม จึงมีส่วนทำให้ไรโซเบียมมีปริมาณน้อย (ปลูพิชล วายุ อัครี, 2541)

## **ตอนที่ 2 การคัดแยกเชื้อไรโซเบียม และจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามอัตราการเจริญในอาหาร**

เมื่อทำการแยกเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะออกจากปมรากถั่วมะแฮะโดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหาร YMA ที่ผสม congo red ปรากฏลักษณะของโคโลนีไม่ดุคสีของ congo red ลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม (circular) มีลักษณะโปร่งแสงเล็กน้อย สีขาวขุ่น เซลล์ติดสีแกรมลบ มีลักษณะ rod shape ซึ่งตรงตาม Bergey 's manual of determinative bacteriology (ดวงพร คันธโชติ, 2537; Helt และ Kuieg, 1994) โดยพบว่าไรโซเบียมที่พบในถั่วมะแฮะมีทั้งกลุ่มที่เป็น *Rhizobium sp.*(pigeon pea) และ *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) ซึ่งเป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้า เมื่อทดสอบการเจริญในอาหาร YMA ที่ผสม bromthymol blue (Duhan และคณะ, 1998) โดย *Rhizobium sp.*(pigeon pea) เป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว ซึ่งสามารถผลิตสารที่เป็นกรดจึงเรียกว่าเป็น acid-producer โดยปกติจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 3-5 วัน มี generation time ประมาณ 2-4 ชั่วโมง และลักษณะโคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 มิลลิเมตร และ *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) เป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้าซึ่งสามารถผลิตสารที่เป็นเบสจึงเรียกว่าเป็น alkaline-producer โดยปกติจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 5-10 วัน มี generation time ประมาณ 6-8 ชั่วโมง และลักษณะโคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร (Pandya และ Desai, 1998) โดยจากการทดลองพบว่าไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่แยกได้จากดินในพื้นที่โครงการฯ เป็นไรโซเบียมกลุ่ม *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) ซึ่งเป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้า ซึ่งก็เป็นไปตามที่ Anand และ Dogradogra (1997) ที่พบว่า *Bradyrhizobium sp.*(pigeon pea) จะพบมากกว่า *Rhizobium sp.*(pigeon pea)

## **ตอนที่ 3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ**

### **3.1 การทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ**

จากการตรวจสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท กับยาปฏิชีวนะทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin tetracyclin streptomycin penicillin kanamycin cabenicillin และ erythromycin แล้วทำการวัด inhibition zone ที่ได้ จากนั้นแปลผลเป็น 3 แบบ ได้แก่ เชื้อที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะ (Resistant : R) เชื้อที่ตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนอง (Intermediate : I) และเชื้อไม่ต้านต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptible : S) หลังจากแปลผลแล้วทำการจัดกลุ่มไรโซเบียมถั่วมะแฮะ 32 ไอโซเลท ตามรูปแบบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ ทั้ง 7 ชนิด พบความแตกต่างของรูปแบบ 9 รูปแบบ ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่า เชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะทั้ง 32 ไอโซเลท มีความสามารถต้านยา erythromycin tetracycline และ penicillin ได้เหมือนกัน หรือ แปลผลออกมาเป็น R ทั้งหมด ซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงว่าเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะมียีน

ที่เกี่ยวข้องต่อการต้านยา ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาความสามารถของเชื้อ 32 ไอโซเลทต่อการต้านยา ampicillin มี 28 ไอโซเลท (87.5 %) ต่อการต้านยา streptomycin มี 30 ไอโซเลท (93.75 %) ต่อการต้านยา kanamycin มี 17 ไอโซเลท (53.13 %) ต่อการต้านยา cabenicillin มี 28 ไอโซเลท (87.5 %) โดยจากความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะที่ต่างกันตามรูปแบบการต้านยาปฏิชีวนะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียมได้เช่นเดียวกับจำแนกความแตกต่างของ *Rhizobium japonicum* เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากร (Meyer และ Pueppke, 1980 ; Cezary และคณะ, 1995)

### 3.2 การทดสอบความสามารถในการทนเค็ม

จากการทดสอบความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียมถั่วแระสะทั้ง 32 ไอโซเลท ในอาหาร YM ที่มีระดับความเค็มต่างกัน ได้แก่ 1.7 mM 50 mM 100 mM และ 150 mM NaCl พบว่าเชื้อไรโซเบียมมีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน โดยเชื้อไรโซเบียมทนได้ในระดับความเค็มที่สูงที่สุด คือ 100 mM (ระดับความเค็มที่ 150 mM ไม่พบการเจริญของเชื้อไรโซเบียม) สามารถทนได้เพียง 9 ไอโซเลท เท่านั้น แสดงว่าเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลท นี้มีวิวัฒนาการทางด้านกลไกการปรับตัวให้เข้ากับความเค็ม เช่น ความสามารถในการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้ ซึ่งถ้าเซลล์ของเชื้อไรโซเบียมสามารถปรับตัวได้ก็จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพที่มีความเค็มสูง โดยเฉพาะไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจะมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีในสภาวะเค็ม (Danial และ Therophile, 1986; Zahran, 1997) เนื่องจากความสามารถในการทนเค็มเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดได้จากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ดังนั้นจากการทดลองจึงทำการเลี้ยงเชื้อในสภาพทนเค็มต่อเนื่อง 3 รุ่นเพื่อให้แน่ใจว่าลักษณะทนเค็มที่ได้เป็นลักษณะที่เสถียรซึ่งก็เป็นเช่นเดียวกับการทดสอบในเชื้อไรโซเบียมของถั่วเหลืองด้วยซึ่งสามารถทนสภาพที่เค็มได้ในทุกรุ่น (Singleton และ Bohlool, 1984) โดยความเค็มมีผลต่อการรักษาสภาพสมดุลของน้ำระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ของเชื้อไรโซเบียมด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ไรโซเบียม ส่งผลให้ไรโซเบียมไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ (Steinborn และ Roughley, 1975) และพบว่าในธรรมชาติพืชตระกูลถั่วที่กำลังเจริญเติบโตจะมีการปล่อยสารประกอบอินทรีย์ที่บริเวณรอบๆราก เช่น เอ็นไซม์บางชนิด (Egeraat, 1972) ซึ่งมีส่วนช่วยในการอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมได้ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการทดสอบความสามารถในการสร้างปมรากของเชื้อไรโซเบียมในสภาพดินที่เค็มต่อไป นอกจากนั้นในบางกรณีสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนเค็มส่วนมากก็มักจะพบว่ามีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วย (Rai, 1983 ; Surange และคณะ, 1997) ซึ่งจากการทดลองจะสังเกตได้จากบางไอโซเลท ได้แก่ RC29 และ RC32 ซึ่งมีความสามารถในการทนเค็มที่ระดับ 100 mM และก็พบว่ามีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงด้วยโดยพิจารณาจากค่า ARA จะ

ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นแต่ถึงกระนั้นก็ยังมียาจากกล่าวได้อย่างแน่ชัดถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดผลดังกล่าวได้

### 3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม

การแสดงผลในด้านประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะนั้นไม่เท่ากัน ไรโซเบียมถั่วมะแฮ่บางสายพันธุ์อาจมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แต่บางสายพันธุ์อาจไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งในการประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมจะพิจารณาจาก น้ำหนักต้นพืช น้ำหนักปม และการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสในปมรากถั่ว (acetylene reduction assay: ARA) ซึ่งใช้บ่งบอกความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม ซึ่งจะริควิเคราะห์ไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วมะแฮ่นำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเจริญเติบโตได้ (Lennox และคณะ, 1984) โดยทั่วไปการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเริ่มออกดอกจนถึงระยะสิ้นสุดการออกดอกหรือถั่วเริ่มติดฝักก่อนเพราะพืชต้องการนำอินทรีย์วัตถุไนโตรเจนไปใช้ในการสร้างฝักและดอกของต้นถั่วจึงต้องเพิ่มการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจน (Herridge, 1982)

จากการทดลองจะเห็นว่า ปมที่เกิดกระจายทั้งที่รากแก้วและรากแขนงจะมีน้ำหนักของต้นพืชแห้งและน้ำหนักปมแห้งค่อนข้างสูงและปมรากที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนก็มีความจำเป็นที่จะต้องอยู่ที่รากแก้วเสมอไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์พืชและชนิดของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เข้าสร้างปม (Chandler และคณะ, 1982) ซึ่งจะสังเกตได้จากไอโซเลท RC01 ที่มีปมเกิดที่รากแก้วแต่มีค่า ARA ค่อนข้างต่ำ

บางกรณีปมที่มีจำนวนมากแต่ก็อาจจะไม่ใช่ปมที่มีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพก็ได้ ดังนั้นในการตัดสินใจความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม เราจึงไม่อาจพิจารณาแต่เพียงจำนวนปมอย่างเดียวได้ (ศุภมาส พนิชศักดิ์, 2529; Buttery, 1992) ซึ่งจะสังเกตจากไอโซเลทที่ RC06 ซึ่งมีจำนวนปมถึง 43 ปม แต่เมื่อวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสในปมรากถั่วหรือค่า ARA พบว่ามีเพียง 0.294 ไมโครโมลต่อต้นต่อชั่วโมง และหากพิจารณาบางกรณีถึงน้ำหนักปมแห้งและค่า ARA ก็จะพบในลักษณะเดียวกัน นั่นคือ เมื่อน้ำหนักปมมากขึ้นแต่ค่า ARA อยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งจะสังเกตได้จากไอโซเลทที่ RC18 ซึ่งมีน้ำหนักปม 54.87 มิลลิกรัม แต่กลับมีค่า ARA เพียง 0.577 ไมโครโมลต่อต้นต่อชั่วโมง ในบางกรณีหากพิจารณาถึงน้ำหนักต้นพืชแห้งและค่า ARA ก็จะพบในลักษณะเดียวกัน นั่นคือ เมื่อน้ำหนักต้นพืชแห้งมากขึ้นแต่ค่า ARA อยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งจะสังเกตได้จากไอโซเลทที่ RC04 ซึ่งมีน้ำหนักต้นพืชแห้ง 2.06 กรัมต่อ

ต้น แต่กลับมีค่า ARA เพียง 0.649 ไมโครโมลต่อต้นต่อชั่วโมง โดยจากผลการทดลองเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของต้นพืช น้ำหนักปม จำนวนปม กับ ค่า ARA พบว่า เมื่อสังเกตจากไอโซเลททั้ง 32 ไอโซเลท จะเห็นว่า ไอโซเลทส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักของต้นสัมพันธ์กับค่า ARA มากกว่าน้ำหนักปม และจำนวนปม

### 3.4 การศึกษาพลาสมิดโครโมโซมของเชื้อไรโซเบียม

การศึกษาลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมเป็นแนวทางหนึ่งที่เป็นพื้นฐานในการจัดจำแนกไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ โดยเฉพาะการศึกษาพลาสมิดของเชื้อไรโซเบียม เพราะพลาสมิดเป็นพันธุกรรมนอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) ซึ่งมีการแสดงออกทางพันธุกรรม เช่น คุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะบางชนิด และคุณสมบัติในการจำลองตัวเองอย่างอิสระ (Autonomous replication) ภายในเซลล์แบคทีเรียและสามารถถ่ายโอนไปยังเซลล์แบคทีเรียอื่นๆ ได้ (Beynon และคณะ, 1980 ;Eckhardt, 1978) ไรโซเบียมต่างสายพันธุ์กันในประชากรเดียวกันอาจจะมีจำนวนและขนาดของพลาสมิดไม่เท่ากันจึงต้องมีการศึกษาพลาสมิดโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบขนาดและจำนวนของพลาสมิดเช่นเดียวกับการศึกษารูปแบบพลาสมิดโครโมโซม *Rhizobium leguminosarum* (Gisele และคณะ 1992)

ในการนำพลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะออกจากเซลล์นั้นต้องอาศัยวิธีการทำให้เซลล์แตกโดยวิธี lysis cell เพื่อเป็นการป้องกันการแตกหักของพลาสมิดขนาดใหญ่ (large plasmid) ของไรโซเบียมถั่วมะแฮะ (Pandya และ Desai, 1998; Udupa และคณะ, 1991) โดยจากการทดลองผลที่ได้ทำให้ทราบว่าพลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ เช่นกันแต่พบพลาสมิดขนาดใหญ่เพียงชิ้นเดียวและบางไอโซเลทก็ตรวจไม่พบพลาสมิด ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการที่พลาสมิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะนั้นมีการสูญหาย (loss of plasmid) และจากการศึกษา *Rhizobium sp.* S25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากปมของ *Tephrosia candida* ในจังหวัดไหนาน ของจีน โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานสูง พบว่ามีพลาสมิดจำนวน 1 ชิ้น ซึ่งมีขนาดประมาณ 150 kb และเมื่อตรวจสอบโดยวิธี hybridization ด้วย nodABC และ nifHDK probe พบว่ามี nod และ nif gene อยู่บนพลาสมิดด้วย นอกจากนั้นยังพบอีกว่าการหายไปของพลาสมิดจะลดความสามารถในการทนกรดและความสามารถในการต้านยาหลายชนิดของเชื้อ (Zou และคณะ 1998) และการที่เชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะเป็นพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่จึงอาจเกิดการแตกหักหรืออาจจะมาจากการที่เชื้อไรโซเบียมอยู่ในสภาวะที่ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องใช้พลาสมิดเหมือนเช่นที่อยู่ในปมธรรมชาติจึงอาจมีการกำจัดพลาสมิดออกจากเซลล์หรืออาจจะมีการกำจัดส่วนของ nod-nif ใน symbiotic plasmid ดังเช่นที่พบใน *Rhizobium phaseoli* และ *Rhizobium leguminosarum* (David และคณะ, 1991; Hombrecher และคณะ, 1981) และอีกสาเหตุหนึ่งอาจจะ

มาจาก พลาสติดของไรโซเบียมถั่วมะแฮะบางไอโซเลทที่แยกได้มีปริมาณน้อยมากซึ่งอาจจะมาจากบางขั้นตอนในการสกัด โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบผลของพลาสติดกับผลของความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมก็เป็นสิ่งยืนยันได้ว่าความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมอาจจะควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสติดแต่ถึงอย่างไรก็ตามควรที่จะมีการตรวจสอบยืนยันผลให้แน่ชัดมากยิ่งขึ้น ดังนั้นในการแยกสกัดพลาสติดเพื่อให้ได้จำนวนและขนาดของพลาสติดที่ชัดเจนยิ่งขึ้นควรที่จะทำการแยกพลาสติดจากเชื้อที่อยู่ในปมรากธรรมชาติ ดังเช่นการสกัดพลาสติดของ *Rhizobium frifolii* (Brewin และคณะ, 1982; Djordjevic และคณะ, 1982) หรือจากปมรากที่เลี้ยงในอาหารสูตรปราศจากไนโตรเจน ตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben, 1994) หรือ อาจจะมีการเติมสารปฏิชีวนะบางประเภทซึ่งอาจจะเป็นการกระตุ้นให้เกิดการสร้างพลาสติดในเซลล์ไรโซเบียม เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสมบัติทางกายภาพของดินในพื้นที่ป่า 3 สภาพ ได้แก่ ป่าทุ่งหญ้า ป่าพื้นที่สภาพ ป่าดิบแล้ง ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช โดยพื้นที่ป่าพื้นที่สภาพจะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นและความค่าเป็นกรด-ด่าง สูงที่สุด สำหรับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนจะมีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละสภาพป่า

การศึกษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแสะ ในพื้นที่โครงการฯ พบว่า มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมใกล้เคียงกันในทั้ง 3 สภาพป่า เมื่อพิจารณาแต่ละช่วงเวลาพบว่าจะมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะเดือนกันยายน ซึ่งมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมสูงที่สุด โดยมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์ของดินและมีผลต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียม ซึ่งไม่เพียงสมบัติของดินในด้านความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดิน

การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากถั่วมะแสะได้ทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท ซึ่งเป็นไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้า (slow grower) ซึ่งสร้างเบสบนอาหารที่ผสม 0.1 % bromthymol blue และใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 5-10 วัน

การศึกษาความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแสะ 32 ไอโซเลท ต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด พบรูปแบบของการต้านยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน 9 กลุ่ม โดยเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแสะทั้ง 32 ไอโซเลท มีความสามารถในการต้านยา erythromycin tetracycline และ penicillin ได้เหมือนกัน

การศึกษาความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแสะ 32 ไอโซเลท พบว่าเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นความสามารถในการทนเค็มของเชื้อไรโซเบียมจะลดต่ำลงและเชื้อแต่ละไอโซเลทก็มีความสามารถในการทนเค็มต่างกันด้วย โดยที่ระดับ 1.7 mM NaCl เชื้อไรโซเบียมสามารถทนได้ทั้ง 32 ไอโซเลท ที่ระดับ 50 mM NaCl เชื้อไรโซเบียมสามารถทนได้ทั้ง 24 ไอโซเลท ที่ระดับ 100 mM NaCl เชื้อไรโซเบียมสามารถทนได้ทั้ง 9 ไอโซเลท ที่ระดับ 150 mM NaCl เชื้อไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท ไม่สามารถทนได้ ดังนั้นเมื่อพิจารณาเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแสะที่สามารถเจริญได้มากที่สุดในระดับความเค็มสูงสุด (100 mM NaCl) ได้แก่ ไอโซเลท RC20



การศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ 32 ไอโซเลท โดยพิจารณาจากน้ำหนักต้นพืช น้ำหนักปม จำนวนปม และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ค่า ARA) พบว่า ตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียมอาจเกิดได้ทั้งบริเวณที่เป็นรากแก้ว และรากแขนง และน้ำหนักต้นพืชจะมีความสัมพันธ์กับค่า ARA มากกว่าน้ำหนักปม จำนวนปม โดยเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะที่มีค่า ARA สูงสุด ได้แก่ ไอโซเลท RC21

การศึกษาพลาสติกโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ 32 ไอโซเลท พบว่า ไรโซเบียมมีพลาสติกจำนวน 1 อัน มีขนาดประมาณ 600 เมกะดาลตัน และมีไรโซเบียมของถั่วมะแฮะบางไอโซเลทที่ตรวจไม่พบพลาสติก

### ข้อเสนอแนะ

1. ในการเก็บตัวอย่างดินควรเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาให้มากขึ้นเพราะดินในธรรมชาติมีความแปรปรวนอยู่ตลอดเวลา
2. การทดสอบความสามารถในการทนเค็มเป็นการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้นสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์จึงควรทำการทดสอบจริงในสภาพดินเค็มธรรมชาติต่อไป
3. การศึกษาพลาสติกโพรไฟล์ของเชื้อควรทำการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มียาปฏิชีวนะก่อนที่จะนำเชื้อไปสกัดพลาสติก เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างพลาสติก เพื่อเป็นการยืนยันผลของความสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านยาปฏิชีวนะและผลของความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ. พิมพ์ที่ โอเอส พรินต์ติ้งเฮาส์. พิมพ์ครั้งที่ 1. 62 หน้า
- มณฑิ โปธิทัย. 2536. การปลูกสร้างป่า. พิมพ์ที่เมื่อดทรายพรินต์ติ้ง. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 4. 295 หน้า
- นันทกร บุญเกิด. 2529. คู่มือการใช้ไรโซเบียมกลุ่มงานวิจัยการใช้จุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 55 หน้า.
- ถวิล ครุฑกุล. 2529. หลักการประเมินระดับความอุดมสมบูรณ์ของดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 336 หน้า.
- เพิ่มพูน กิรติกสิกร. 2527. ดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. พิมพ์ที่ หจก. ฟีนี พับบลิชซิง. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.
- พัชรี เจียรนัยกูร. 2528. การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาคุณสมบัติของ *Rhizobium phaseoli* ที่ทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปลูพิชล วายุอัคคี. 2541. ดินและปุ๋ย. พิมพ์ที่ บริษัทเอเชียแปซิฟิค พรินต์ติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 5. 135 หน้า.
- ประกิตต์สิน สีहनนท์. 2540. จุลินทรีย์ดิน. เอกสารไม่ตีพิมพ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปีพมา วิตยากร. 2533. ดิน: แหล่งธาตุอาหารของพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 215 หน้า.
- วิมลรัตน์ สุกรินทร์ และมณฑิเยธ โสมภีร์. 2536. การศึกษาการเจริญเติบโตระยะเวลาต่าง ๆ กันของ ถั่วมะแฮะ 3 พันธุ์ เพื่อใช้เป็นปุ๋ยพืชสด. ในรายงานผลการวิจัยปี 2536 (เล่มที่ 3) พืชเศรษฐกิจ. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2538. พันธุศาสตร์. พิมพ์ที่เอ็นพีซัพพลายพรินต์ติ้ง. กรุงเทพฯ. 640 หน้า
- ศุภมาส พณิชศักดิ์พัฒนา. 2529. จุลชีววิทยาของดินเพื่อผลิตผลทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 335 หน้า.
- สมศักดิ์ วังใน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. พิมพ์ที่โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1. 193 หน้า.
- สมศักดิ์ วังใน. 2541. การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม-พืชสกุลถั่ว. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุมิตรา ภู่วโรดม, 2532. ปรัชญาภาพเพื่อการเกษตร. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน  
เทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอิบ เขียวรีนรมณ์, 2542. การสำรวจดิน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ  
พิมพ์ครั้งที่ 1. 733 หน้า.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Alexander , M. 1977. Introduction to soil Microbiology. John Wiley and sons. Inc, New York, 472 pp
- Anand, R.C. and Dogradogra, R.C.1997. Comparative efficiency of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium spp.* Strain in nodulating *Cajanus cajan* in relation to characteristic metabvolic enzyme activities. Biology and fertility of soil 24:283-287
- Arwooth Na Lampong. 1982. Agronomic Aspects of the grain legumes Farming. In:Proc Symp on grain legumes production in Asia. Hong Kong: Nordica international limited symposium.550 p.
- Banejec, A.K. 1989. Shrubs in tropical forest ecosystems, World bank technology paper number 103,The World bank, Washington, D.C.P.45.
- Barboza F, Correa NS, Rosas SB. 2000. Metabolic and physiological characterstics of salt-tolerant strains of *Bradyrhizobium spp.* Biology and fertility of soils. 32:368-373.
- Batzli J.M., Gravbes W.R.,van Berkum P.1992. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia*.APL ENIVIRON.MICROBIOL vol.58 no.7 pp.2437-2143.
- Bauer,A.W.,W.M.M.Kirby,J.C. Sherris and M.Turck.1966. Antibiotic susceptbility testing by a standardized single disk method. Am.J.Clin.Pathol. 43:493-496.
- Becker A, Kleickmann A, Arnold W, Puhler A. 1993. Analysis of the rhizobium-meliloti exoh exok exol fragment-exok shows homology to excreted endo-beta-1,3-1,4-glucanases and exoh resembles membrane-protein. Molecular & general genetics. 238:145-154.
- Berry,J.O.,and A.G Atherly. 1984.Induced plasmidgenome rearrangement in *Rhizobium japonicum*.J. Bacteriol. 157:218-224.
- Beynon, J.L.,J.E. Beringer, and A.W.B.Johnston. 1980. Plasmid and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. J.Gen.Microbiol.120:421-429.
- Boonkerd, N.,D.F. Bezdicek and D.F. Weber.1987. Comparative evaluation of Rhizobium japonicum strains by acetylene reduction and other methods. legume research 2: 1-10
- Boonkerd, N., W. Roongrata nakasin, and Y.Vasuvat. 1975. Influence of inoculum levels and method on nodulation and yield of soybeans. Symposium in Rhizobium research and facilities of Thailand. Department of agriculture and Kasetsart university, Bangkok,Thailand. 7 p.
- Bremner, J.M. 1965. Total nitrogen .In C.A. Black (ed). "Method of soil analysis,part 2". Agronomy no.9 Am. Soc. Agron. Madison,Wisconsin,USA. pp.1149-1237.

- Brewin ,N.J.,J.E.Beringer, and A.W.B. Johnston .1980. Plasmid mediated transfer of host range specificity between two strain of *Rhizobium leguminosarum*. J.Gen, Microbiol 120 :413-420.
- Brewin ,N.J.,E.A. Wood, A.W.B. Johnston ,N.J.Dibb, and G.Hombreachter.1982. Recombinant modulation plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. J.Gen, Microbiol. 128: 1817-1827.
- Brinboim. H.C. and Doly, J.1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic.Acid.Res. 7:1513-1523.
- Broadbent,,E.F. and B.F. Stojanovic. 1952. The effect of partial pressure of oxygen on some soil nitrogen tranformation. Proceeding of soil science society of America.16: 359-363
- Buttery , -B.R.,Park, -S.J.,Hume,-D.J. 1992. Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes.Can-J.-Plant-Sci.-Rev-Can.-Phytotech . Vol.72 no.2 ,pp. 323-349.
- Cezary J. Madzak,Barbara Golinska, Joanna Kroliczak, Krzysztof Pudelko,Dorota Lazewska, Bozena Lampka,and Michael J. Sadowsky.1995. Diversity among Field Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. Applied and Environmental Microbiology Apr p.1194-1200.
- Chandler ,M.R., R.A. Date and R.J. Roughley. 1982. Infection and root-nodule development on stylosanthes species by Rhizolbium.J.Exp.Bot 3:47-57.
- Chong,K.,J.C. Wynne,G.H.Elkan,and T.J.Schuweis.1987. Effectsof soil acidity and aluminum content on Rhizobium inoculation growth and nitrogen fixation of peanuts and other grain legumes, Tropical Agriculture(64): 97-104.
- Cordovilla-MDP,Ligero-F, Lluch-C.1999. Effect of NaCl on growth and nitrogen-fixation and assimilation of inoculated and KNO<sub>3</sub> Fertilized vicia faba L. and Pisum-Sativum L.plants. Plant science. Vol. 140 pp.127-136.
- Daniel Le Rudulier and Theophile Bernard. 1986. Salt tolerance in *Rhizobium* : a possible role for betaines. FEMS Microbiology Reviews 39 67-72
- David Romero , Susana Brom , Jaime Martinez-Salazar, maria De Lourdes Girard,Rafael Palacios ,and Guillermo Davila. 1991. Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*. Journal of Bacteriology , Apr.1991 p.2435-2441.

- Djordjevic, M.A., Wurkowski, and B.G. Rolfe. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium frifolii*. J. Bacteriol. 159:560-568.
- Duhan, J.S., Dudeja, S.S., Khurana, A.L., 1998. Siderophore reproduction in relation to N-2 fixation and iron uptake in pigeon pea *Rhizobium* symbiosis. Folia Microbiologica 43 : 421-426
- Egeraat, A.W.S.M. Van 1972. Pea-root exudates and their effect upon root nodule bacteria. Meded Land Bouwhoges, Wageningen.
- Eckhardt, J. 1978. A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria. Plasmid. 1:584-588.
- Evans, H.J. 1975. Enhancing biological nitrogen fixation. Proceedings of a workshop. The national science foundation, Washington, D.C., U.S.A. 52 p.
- FAO. 1984. Legume inoculant and a pocket manual jointly prepared by NifTAL and FAO. FAO Crop and grassland product service. 64p.
- George, A.W. and M.D., Lechtmon. 1988. Laboratory exercise in microbiology. 6<sup>th</sup>. Macmillan publishing company
- Gigova L, Petrova N, Vassileva V, Ignatov G. 1997. Free-living and symbiotic characteristics of plasmid-cured derivatives of *Rhizobium galegae*. Plant science, 125:87-96.
- Gisèle Laguerre, Sylvie Isabelle Mazurier, and Noëlle Amarger. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. FEMS Microbiology Ecology 101 17-26.
- Handley, B. A.; Hedges, A. J. and Beringer, J. E. 1998. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. Soil Biol. Biochem. 30: 241-249.
- Handley BA, Hedges AJ, Beringer JE. 1998. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. Soil biology & biochemistry 30:241-249.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.C. and Holsten, R.D. 1973. Application of the acetylene-thylene assay for measurement of nitrogen-fixation. Soil Biol. Biochem 5 :47-81.
- Harrison, S.P., J.P.W. Young and D.G. Jones, 1989 *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse localities, J. Gen. Microbiol. 135: 1061-1069.

- Hartmann A, Giraud JJ, Catroux G, 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) meliloti strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. FEMS Microbiology Ecology 25:107-116.
- Hashem.-FM , Swelim-DH, Kuykendall-LD, Mohamed-AI Abdelwahad-SM, Hegazi-NI. 1998. Identification and characterization of salt-tolerant and thermo-tolerant *Leucaena*-Nodulating *Rhizobium* strains. Vol27. pp.335-341, Biology and fertility of soils.
- Hashem FM, Kuykendall LD, Udell SE, Thomas PM. 1996. Phage susceptibility and plasmid profile analysis of *Sinorhizobium fredii*. Plant and soil 186:127-134.
- Helt, G.J. and K.N., Kuieg. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkin.
- Henn, M., J.P. Murphy and T.D. Phillips. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avana Sterillis* L. accessions. Theor. Appl. Genet. 87:689-696.
- Herridge, D.F. 1982. Assesment of nitrogen fixation in nitrogen fixation legumes (vincent, J.M. ed.) pp.123-136. Academic Press, Australia.
- Hoelzel, A.R, and A.Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR –amplified DNA , pp.159-186, *In* Hoelzel , A.R (ed). Molecular genetic analysis of populations: a practical approach . Oxford University Press, New York
- Hombrecher, G., N.J. Brewin and A.W.B. Johnston. 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. Mol. Gen. Genet. 182:133-136.
- Irisarri P, Milnitsky F, Monza J, Bedmar EJ. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. Plant and soil. 180:39-47.
- Kim, H. Tan. 1996. Soil sampling, preparation and analysis. New York: Maral Dekk, Inc
- Kishinevsky BD, Sen D, Yang G. 1996. Diversity of rhizobia isolated from various *Hedysarum* species. Plant and soil 186:21-28.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey 's manual of systematic bacteriology. vol. 1 Wilkins, Baltimore, MD.
- Kulkarni, S., Nautiyal, C.S.. 2000. Effect of salt and pH stress on temperature- tolerant *Rhizobium sp.* Nbri330 nodulating *prosopis juliflora*. Current Microbiology. 40:221-226.

- Kuykendall LD, Swelim DM, Hashem FM, AbdelWahab SM, Hegazi NI. 1996. Symbiotic competence, genetic diversity and plasmid profiles of Egyptian isolates of a *Rhizobium* species from *Leucaena leucocephala* (Lam) Dewit. Letters in applied microbiology. 22:347-352.
- Lamb, J.W., G.Hombrecher, and A.W.B. Johnston .1982. Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. Mol. Gen. Genet. 186:449-452.
- Laeremans T, Coolsaet N, Verreth C, Snoeck C, Hellings N, Vanderleyden J, Martiniz-Romero E. 1997. Functional redundancy of genes for sulphate activation enzymes in *Rhizobium Sp. BR816*. Microbiology-UK. 143:3933-3942.
- Lennox A. Graham, Larry EW. Stults, and R.J. Maier. 1984. Nitrogenase-hydrogenase relationship in *Rhizobium japonicum*. Arch Microbiol 140 :243-246.
- Masterson, R.V., Prakash, R.K. and Atherly, A.G. 1985. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 163(1):21-26.
- Martin .R. Carter. 1993. Soil sampling and methods of analysis. Canadian society of soil science Lewis Publisher, Boca Raton, Florida.
- Meyer, M.C., and S.G. Pueppke. 1980. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strain derivatives by antibiotic sensitivity pattern, Lectin binding and utilization of biochemical. Can. J. Microbiol. 26:606-612.
- Maniatis, T. Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mhamdi R, Jebara M, Aouani ME, Ghir R, Mars M. 1999. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisia soil. Biology and fertility of soils 28:313-320.
- Moennelocoz Y, Sen D, Krause ES, Weaver RW. 1994. Plasmid profiles of rhizobia used in inoculants and isolated from clover fields. Agronomy Journal. 86:117-121.
- National committee for clinical laboratory standards. 1992. Fourth informational supplement: M100-S4. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS, Villanova, Pa.
- Ohwada-T Sasaki-Y Koike-H Igawa Sato-T. 1998. Correlation between NaCl sensitivity of Rhizobium bacteria and ineffective modulation of leguminous plants. Bioscience biotechnology and biochemistry. 62 :2086-2090.



- Paffetti, D.; Scotti, C.; Gnocchi, S.; Fancelli, S.; and Bazzicalupo, M. 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. American Society for Microbiology 62: 2279-2285.
- Poi, S.C. 1990. Selection of agronomically superior strains of Rhizobium as inoculants for improvement of cultivation of pigeon pea, *cajanus cajan*. Environ.Ecol 8:623-642.
- Pandya, S, Desai A.. 1998. Localization of nod, nif and acidic exopolysaccharide Determinants on a large plasmid in slow-growing cowpea *Rhizobium sp.* Curr. Microbiol. 36:36-40
- Rai, R.1983. "The salt tolerance of Rhizobium strains and lentil genotypes and the effect of salinity on aspects of symbiotic nitrogen fixation". Journal of agricultural science 100:81-86.
- Rai-R,Singh-RP.1999. Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens-Culinaris*) Genotypes and Rhizobium spp. Strain symbiotic nitrogen-fixation in normal and sodic soils. Biology and fertility of soils. 29 :187-195.
- Rana D, Krishnan HB. 1995. A new root-nodulating symbiont of the tropical legume sesbania, *Rhizobium sp sin-1*, is closely related to R-galegae, a species that nodulates temperate legumes. FEMS Microbiology letters. 134:19-25.
- Richaume,A.,J.S. Angle, and M.J. Sadowsky.1989. Influence soil variable on insitu plasmid transfer from *Escherichia Coli* to *Rhizobium fredii* Appl. Environ. Microbiol. 55 :1730-1734.
- Santamaria M. Corzo J, LeonBarrios M, GutierrezNavarro AM. 1997. Characterisation and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. Plant and soil 190:143-152.
- Singleton,P.W. and Bohloo;,B.B. 1984. Effect of salinity on nodule formation by soybean. Plant Physiol. 74:72-76
- Sinanuwong,S. and Takaya,Y. 1974. "Saline soil in northeast Thailand. Southeast asian studies.12(1):105-120.
- Sodowsky.M.J. and Bohlool,B.B. 1987.Possible involvement of a megaplasmid in nodulation of soybean by fast-growing rhizobia from china. Appl. Environ. Microbiol. 53:2942-2947.

- Somasegaran,P.and Hoben, H.J. 1985. Handbook for Rhizobia method in legume Rhizobium technology.Springer Verlag, New York.
- Somasegaran,P. and H.J. Hoben ,H.J. 1994. Method in legume Rhizobium technology. NifTAL,Project university of Hawaii.,Hawaii.
- Steinborn,J.and Roughley,R.J. “Toxicity of sodium chloride ions to Rhizobium spp. In broth and peat culture.J.Appl. Bacteriol 39:133-138.
- Subba Rao,N.S. 1977. Soil Microorganism and plant growth . Oxford & IBH Publishing CO., New Delhi, 189 pp.
- Surange S. Wollum AG, Kumar N., Nautiyal CS.1997. Characterization of Rhizobium from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. Canadian Journal of Microbiology Vol.43, Iss0 pp.891-894.
- Thomas PM, Golly KF, Zyskind JW, Virginia RA. 1994. Variation of clonal , mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction-fragment-length-polymorphism and plasmid profile analysis. Applied and environmental microbiology. 60:1146-1153.
- Teaumroong ,N.,Boonkerd,N.and Murooka,Y. 1996. Use of PCR technology in conjunction with antibiotic resistance profile to differentiate Bradyrhizobium applied in Thailand. Report of Monbusho International scientific research program.
- Udapa.R,Shan. S, Modi. V.V, Desui A..1991. Large plasmid from cowpea *Rhizobium sp.*: correlation between expolysaccharide content explanta nitrogenase activity and presense of plasmid. Indian. J. exp. Biol. 29: 430-433
- Vanrossum,D., F.P.Schunrmans, M.Gillis, A.Muyotcha. H.W. Van Verseveld, A.H.Stouthmer, and F.C. Boonkerd.1995. Genetic and phenetics analyses of Bradyrhizobium strain nodulation peanut (*Arachis by Pogaea L.*) roots.Appl.Environ. Microbiol.61:1599-1609.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the pratical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wegener C, Schroder S,Kapp D,Puhker A,Lopez ES, Martinez-Abarca F, Toro N, Del Papa MF, Balague LJ, Larares A, Martinez-Drets G, Niehaus K. 2001. Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa-nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. Symbiosis. 30:141-162.

- Wilson,K.1995. PCR reactons for genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* using primer RP01 in laboratory manual on “Recent advance in nitrogen fixation research : role of gas reporter gene” . p.S,13,14.
- Young, C.C.and Cheng, K. T. 1998. Genetic diversity of fast and slow-growing *soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis*. *Biology and Fertility of Soils* 26: 254-256
- Zurayk-P,Adlan-M,Baalbaki-R, Saxena-MC. 1998. Interaction effects of salinity and biological nitrogen fixation on chickpea (*Cicer-Arietinum L.*) Growth. *Journal of agronomy and crop science-zeitschrift fur acker und pflanzenban*. Vol 180 pp. 249-258.
- Zahran HH.1997. Diversity , adaptationand activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and fertility of soils*,Vol25. Iss 3 pp.211-223.
- Zahran HH. 1997. Chemotaxonomic characterization of some fast-growing rhizobia nodulating leguminous trees. *Folia Microbiology*. 1997. 42:367-380.
- Zahran HH.1999. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severre conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular biology reviews*. Vol 63 pp.968.
- Zhang XX, Kosier B, Priefer UB. 2001. Symbiotic plasmid rearrangement in *Rhizobium leguminosarum bv, viciae VF39SM*. *Journal of bacteriology*. 183:2141-2144.
- Zou XH, Feng XL, Chen WX,Li FD. 1998. Biological behavior of plasmid in *Rhizobium* sp. Strain S25 from *Teprosia candida*. *Plasmid* 40:158-163.



# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และต้นพืช

### 1.1 Yeast extract Manitol (YMA)

Manitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Yeast extract	1 g
น้ำกลั่น	1000 ml
Agar	15 g

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที  
ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0

### 1.2 YMA-Congo red

Manitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Yeast extract	1 g
น้ำกลั่น	1000 ml
Agar	15 g
1 % congo red	2.5 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 1.3 LB-broth

Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Lactose	5 g
Bromthymal blue indicator	1 ml
น้ำกลั่น	1000 ml

## 2. Plant nutrient solution (Vincent,1970)

## N-free nutrient solution

Stock Solution	Element	uM	Form	M
1	Ca	1000	CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	2
2	P	500	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
3	Fe	10	Fe citrate	0.02
	Mg	250	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5
	K	250	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
	Mn	1		
4	B	2	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.002
	Zn	0.5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.004
	Cu	0.2	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.001
	Cp	0.1	CuSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0004
	Mo	0.1	CoSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.0002
			Na <sub>2</sub> MOO 2H <sub>2</sub> O	0.0002

การเตรียม N-free nutrient solution ผสม stock solution 1 ถึง 4 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 5 ลิตร แล้วเจือจางให้มีปริมาณ 10 ลิตร

สำหรับ treatment ที่ใส่ไนโตรเจน 70 ส่วนในล้าน เตรียมโดยการละลายแอมโมเนียมไนเตรทใน N-free nutrient solution ให้มีความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

ตารางประมาณจำนวน Rhizobium โดยเทคนิค MPN (plant infection method) สำหรับ Four-fold dilution (A=4)(Somasegaran et.al.,1985)

Positive tubes			Dilution step (s)		
n=4	n=2	s=10			
40	20				
39		$>2.0 \times 10^5$			
38	19	$2.0 \times 10^5$			
37		1.2			
36	18	$8.1 \times 10^4$			
35		5.5			
34	17	3.8			
33		2.6			
32	16	1.8	S=8		
31		1.3	$>1.3 \times 10^4$		
30	15	$9.1 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$		
29		6.3	$7.9 \times 10^3$		
28	14	4.5	5.1		
27		3.5	3.5		
26	13	2.2	2.4		
25		1.6	1.7	S=6	
24	12	1.1	1.1	$>7.9 \times 10^2$	
23		$8.0 \times 10^2$	$8.0 \times 10^2$		
22	11	5.6	5.6	$7.9 \times 10^2$	
21		4	4	5	
20	10	2.8	2.8	3.2	
19		2	2	2.2	
18	9	1.4	1.4	1.5	

17		1	1	1	S=4
16	8	$7.1 \times 10^1$	$7.1 \times 10^1$	$7.2 \times 10^1$	$>5.0 \times 10^1$
15		5	5	5.1	
14	7	3.5	3.5	3.5	$5.0 \times 10^1$
13		2.5	2.5	2.5	3.2
12	6	1.8	1.8	1.8	2
11		1.3	1.3	1.3	1.4
10	5	$8.9 \times 10^0$	$8.9 \times 10^0$	$8.9 \times 10^0$	$9.6 \times 10^0$
9		6.3	6.3	6.3	6.6
8	4	4.5	4.5	4.5	4.6
7		3.2	3.2	3.2	3.2
6	3	2.2	2.2	2.2	2.2
5		1.6	1.6	1.6	1.6
4	2	1.1	1.1	1.1	1.1
3		$7.2 \times 10^{-1}$	$7.2 \times 10^{-1}$	$7.2 \times 10^{-1}$	$7.2 \times 10^{-1}$
2	1	4.4	4.4	4.4	4.4
1		<4.4	<4.4	<4.4	<4.4
0	0				
<b>Approx range</b>		$5 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
<b>Factor 95 %</b>					
<b>Fiducial limits</b> n=2			4		
<b>(x, /)</b> n=4			2.7		

Calculated from Table VIII2 of Fisher and Yates (1963)

สำนักงานอธิบดีบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

ตาราง National committee for clinical laboratory standard (1992)

Antibiotic	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		
	Resistance (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
1 Kanamycin (30mcg)	0-13	14-17	มากกว่า 18
2 Streptomycin (10mcg)	0-11	12-14	มากกว่า 15
3 Ampicillin (10mcg)	0-13	14-16	มากกว่า 17
4 Cabenicillin (100 mcg)	0-14	15-21	มากกว่า 22
5 Tetracycline (30 mcg)	0-14	15-18	มากกว่า 19
6 Erythromycin (15 mcg)	0-13	14-22	มากกว่า 23
7 Pennicillin (10 IU)	0-19	20-27	มากกว่า 28

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ง

ความสามารถในการต้านยา Kanamycin (30mcg) ของ เชื้อโรโซเบียม 32 ไตรโคเลท

Isolate		inhibition zone ต่อ Kanamycin 30 mcg (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	17.00	15.00	16.00	16.00	I
2	RC02	13.00	13.00	13.00	13.00	R
3	RC03	9.00	9.00	9.00	9.00	R
4	RC04	17.00	17.40	17.00	17.13	I
5	RC05	14.00	14.00	14.00	14.00	I
6	RC06	17.00	14.00	15.00	15.33	I
7	RC07	12.00	12.00	12.00	12.00	R
8	RC08	12.00	12.00	12.00	12.00	R
9	RC09	12.00	12.00	12.00	12.00	R
10	RC10	17.00	17.00	17.00	17.00	I
11	RC11	13.00	13.00	13.00	13.00	R
12	RC12	13.00	13.00	13.00	13.00	R
13	RC13	17.00	17.00	17.00	17.00	I
14	RC14	15.00	16.10	15.00	15.37	I
15	RC15	19.00	21.00	23.00	21.00	S
16	RC16	23.00	18.70	18.00	19.90	S
17	RC17	14.00	14.00	14.00	14.00	I
18	RC18	15.00	14.00	14.00	14.33	I
19	RC19	11.00	11.00	11.00	11.00	R
20	RC20	24.00	22.00	23.00	23.00	S
21	RC21	17.00	16.00	17.00	16.67	I
22	RC22	17.00	15.00	16.00	16.00	I
23	RC23	13.00	13.00	13.00	13.00	R
24	RC24	14.00	16.00	16.10	15.37	I
25	RC25	12.00	12.00	12.00	12.00	R
26	RC26	14.00	14.00	14.00	14.00	I
27	RC27	13.00	13.00	13.00	13.00	R
28	RC28	15.00	14.00	15.00	14.67	I
29	RC29	14.00	15.00	14.00	14.33	I
30	RC30	13.00	13.00	13.00	13.00	R
31	RC31	11.00	11.00	11.00	11.00	R
32	RC32	14.00	14.00	14.00	14.00	I

ความสามารถในการต้านยา Streptomycin (10mcg) ของ เชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate		inhibition zone ต่อ Streptomycin 10 mcg (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	11.00	10.00	11.00	10.67	R
3	RC03	0.00	0.00	0.00	0.00	R
4	RC04	0.00	0.00	0.00	0.00	R
5	RC05	10.00	10.00	10.00	10.00	R
6	RC06	0.00	0.00	0.00	0.00	R
7	RC07	0.00	0.00	0.00	0.00	R
8	RC08	0.00	0.00	0.00	0.00	R
9	RC09	9.00	9.00	9.00	9.00	R
10	RC10	9.00	9.00	9.00	9.00	R
11	RC11	9.00	9.00	9.00	9.00	R
12	RC12	0.00	0.00	0.00	0.00	R
13	RC13	9.00	9.00	9.00	9.00	R
14	RC14	0.00	0.00	0.00	0.00	R
15	RC15	13.00	12.50	13.00	12.83	I
16	RC16	9.00	9.00	9.00	9.00	R
17	RC17	10.00	10.00	10.00	10.00	R
18	RC18	9.00	9.00	9.00	9.00	R
19	RC19	9.00	9.00	9.00	9.00	R
20	RC20	14.00	12.00	13.00	13.00	I
21	RC21	9.00	9.00	9.00	9.00	R
22	RC22	8.00	8.30	9.00	8.43	R
23	RC23	9.00	9.00	9.00	9.00	R
24	RC24	10.00	10.00	10.00	10.00	R
25	RC25	9.00	9.00	9.00	9.00	R
26	RC26	10.00	10.00	10.00	10.00	R
27	RC27	9.00	9.00	9.00	9.00	R
28	RC28	10.00	10.00	10.00	10.00	R
29	RC29	9.00	9.00	9.00	9.00	R
30	RC30	0.00	0.00	0.00	0.00	R
31	RC31	9.00	9.00	9.00	9.00	R
32	RC32	9.00	9.00	9.00	9.00	R

ความสามารถในการต้านยา Ampicillin (10mcg) ของ เชื้อโรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate		inhibition zone ต่อ Ampicillin 10 mcg (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	0.00	0.00	0.00	0.00	R
3	RC03	0.00	0.00	0.00	0.00	R
4	RC04	13.00	13.00	13.00	13.00	R
5	RC05	0.00	0.00	0.00	0.00	R
6	RC06	0.00	0.00	0.00	0.00	R
7	RC07	0.00	0.00	0.00	0.00	R
8	RC08	0.00	0.00	0.00	0.00	R
9	RC09	11.00	12.00	11.00	11.33	R
10	RC10	9.20	9.00	8.90	9.03	R
11	RC11	15.30	14.00	17.00	15.43	I
12	RC12	9.00	9.00	9.00	9.00	R
13	RC13	12.00	12.00	12.00	12.00	R
14	RC14	8.50	8.00	8.20	8.23	R
15	RC15	10.00	10.00	10.00	10.00	R
16	RC16	9.00	9.00	9.00	9.00	R
17	RC17	8.70	9.00	9.00	8.90	R
18	RC18	14.00	15.00	15.10	14.70	I
19	RC19	10.00	10.00	10.00	10.00	R
20	RC20	11.00	11.00	11.00	11.00	R
21	RC21	11.00	11.00	14.00	12.00	R
22	RC22	15.00	15.50	15.00	15.17	I
23	RC23	17.00	17.00	17.00	17.00	S
24	RC24	10.00	10.00	10.00	10.00	R
25	RC25	8.00	8.00	8.00	8.00	R
26	RC26	9.00	9.00	9.00	9.00	R
27	RC27	9.00	9.00	9.00	9.00	R
28	RC28	0.00	0.00	0.00	0.00	R
29	RC29	10.00	10.00	10.00	10.00	R
30	RC30	0.00	0.00	0.00	0.00	R
31	RC31	10.00	10.00	10.00	10.00	R
32	RC32	10.00	10.00	10.00	10.00	R

ความสามารถในการต้านยา Carbenicillin (100mcg) ของ เชื้อโรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate		inhibition zone ต่อ Carbenicillin 100 mc(mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	0.00	0.00	0.00	0.00	R
3	RC03	10.00	11.00	11.00	10.67	R
4	RC04	12.00	12.00	12.00	12.00	R
5	RC05	9.00	9.00	9.00	9.00	R
6	RC06	12.00	12.00	11.50	11.83	R
7	RC07	0.00	0.00	0.00	0.00	R
8	RC08	0.00	0.00	0.00	0.00	R
9	RC09	13.00	13.00	13.00	13.00	R
10	RC10	16.00	16.30	16.10	16.13	I
11	RC11	18.20	15.00	16.00	16.40	I
12	RC12	0.00	0.00	0.00	0.00	R
13	RC13	13.30	13.00	14.00	13.43	R
14	RC14	0.00	0.00	0.00	0.00	R
15	RC15	10.00	10.00	12.00	10.67	R
16	RC16	9.00	9.00	9.00	9.00	R
17	RC17	9.00	9.00	9.00	9.00	R
18	RC18	15.00	13.00	13.50	13.83	R
19	RC19	9.00	9.00	9.00	9.00	R
20	RC20	9.00	11.00	10.00	10.00	R
21	RC21	13.00	13.00	13.00	13.00	R
22	RC22	16.00	15.00	15.50	15.50	I
23	RC23	19.00	20.00	20.00	19.67	I
24	RC24	9.00	9.00	9.00	9.00	R
25	RC25	9.00	9.00	9.00	9.00	R
26	RC26	9.50	9.70	8.60	9.27	R
27	RC27	10.00	11.20	10.00	10.40	R
28	RC28	10.00	10.00	10.00	10.00	R
29	RC29	10.00	10.00	10.00	10.00	R
30	RC30	0.00	0.00	0.00	0.00	R
31	RC31	10.00	10.00	10.00	10.00	R
32	RC32	9.00	9.00	9.00	9.00	R

ความสามารถในการต้านยา Tetracycline (30mcg) ของ เชื้อโรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate		Inhibition zone ต่อ Tetracycline 30 mcg (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	10.00	11.00	11.00	10.67	R
3	RC03	8.60	9.00	8.50	8.70	R
4	RC04	10.00	10.00	10.00	10.00	R
5	RC05	10.00	10.00	10.00	10.00	R
6	RC06	0.00	0.00	0.00	0.00	R
7	RC07	10.10	10.00	10.00	10.03	R
8	RC08	9.00	9.00	9.00	9.00	R
9	RC09	11.00	11.00	11.00	11.00	R
10	RC10	9.00	9.00	9.00	9.00	R
11	RC11	13.00	13.00	13.00	13.00	R
12	RC12	9.00	9.00	9.00	9.00	R
13	RC13	9.00	9.00	9.00	9.00	R
14	RC14	0.00	0.00	0.00	0.00	R
15	RC15	9.00	9.00	9.00	9.00	R
16	RC16	9.00	9.00	9.00	9.00	R
17	RC17	10.00	10.00	10.00	10.00	R
18	RC18	10.00	10.00	10.00	10.00	R
19	RC19	9.00	9.00	9.00	9.00	R
20	RC20	8.50	8.60	9.00	8.70	R
21	RC21	14.00	12.00	13.00	13.00	R
22	RC22	13.50	14.00	13.00	13.50	R
23	RC23	9.00	10.00	9.00	9.33	R
24	RC24	10.00	10.00	10.00	10.00	R
25	RC25	13.00	11.00	12.00	12.00	R
26	RC26	10.00	10.00	10.00	10.00	R
27	RC27	10.00	10.00	10.00	10.00	R
28	RC28	13.00	13.00	13.00	13.00	R
29	RC29	10.00	10.00	10.00	10.00	R
30	RC30	10.00	11.00	8.70	9.90	R
31	RC31	11.00	11.00	11.00	11.00	R
32	RC32	10.00	10.00	10.00	10.00	R

ความสามารถในการต้านยา Erythromycin (15mcg) ของ เชื้อโรโซเปียม 32 ไอโซเลท

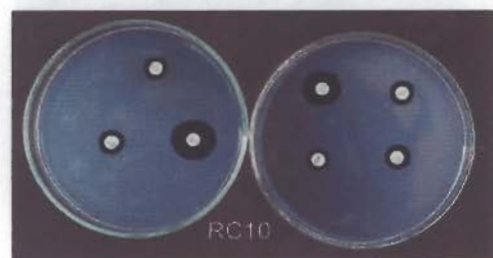
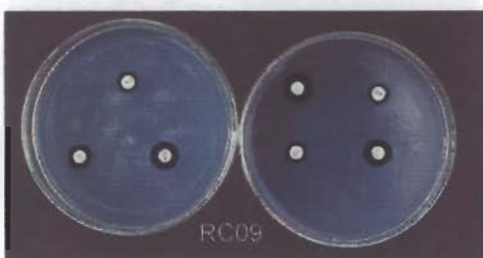
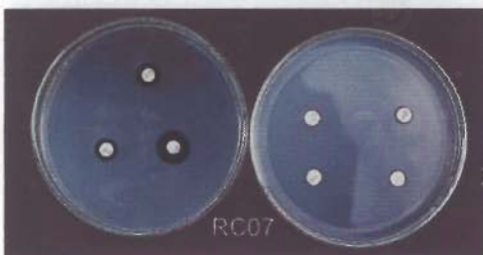
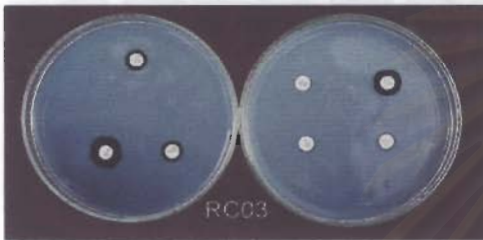
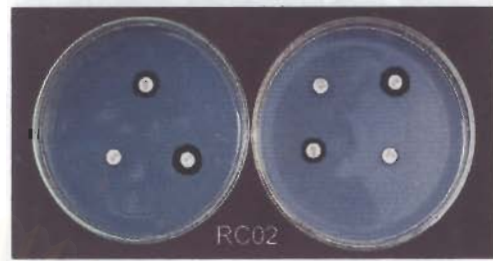
Isolate		inhibition zone ต่อ Erythromycin 15 mcg (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	9.00	9.00	9.00	9.00	R
3	RC03	0.00	0.00	0.00	0.00	R
4	RC04	0.00	0.00	0.00	0.00	R
5	RC05	0.00	0.00	0.00	0.00	R
6	RC06	8.00	8.00	8.00	8.00	R
7	RC07	0.00	0.00	0.00	0.00	R
8	RC08	0.00	0.00	0.00	0.00	R
9	RC09	9.00	9.00	9.00	9.00	R
10	RC10	9.00	9.00	9.00	9.00	R
11	RC11	9.00	9.00	9.00	9.00	R
12	RC12	9.00	9.00	9.00	9.00	R
13	RC13	10.00	10.00	10.00	10.00	R
14	RC14	0.00	0.00	0.00	0.00	R
15	RC15	9.00	9.00	9.00	9.00	R
16	RC16	0.00	0.00	0.00	0.00	R
17	RC17	9.00	9.00	9.00	9.00	R
18	RC18	9.00	9.00	9.00	9.00	R
19	RC19	10.00	10.00	10.00	10.00	R
20	RC20	9.90	10.00	10.70	10.20	R
21	RC21	9.00	9.00	9.00	9.00	R
22	RC22	8.10	10.00	9.00	9.03	R
23	RC23	10.00	10.00	10.00	10.00	R
24	RC24	9.00	9.00	9.00	9.00	R
25	RC25	9.00	9.00	9.00	9.00	R
26	RC26	0.00	0.00	0.00	0.00	R
27	RC27	9.00	9.00	9.00	9.00	R
28	RC28	9.00	9.00	9.00	9.00	R
29	RC29	10.00	10.00	10.00	10.00	R
30	RC30	9.00	9.00	9.00	9.00	R
31	RC31	10.00	10.00	10.00	10.00	R
32	RC32	10.00	10.00	10.00	10.00	R

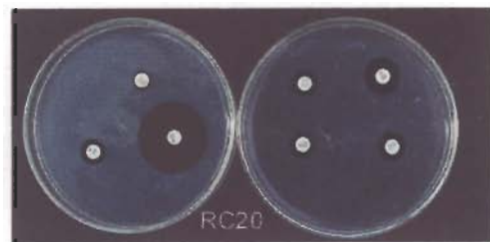
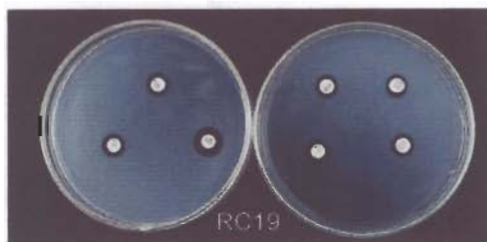
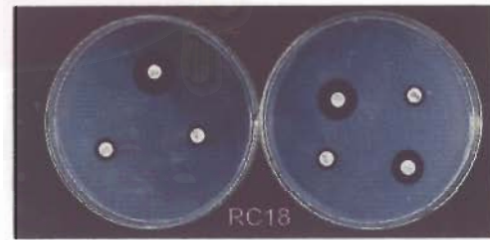
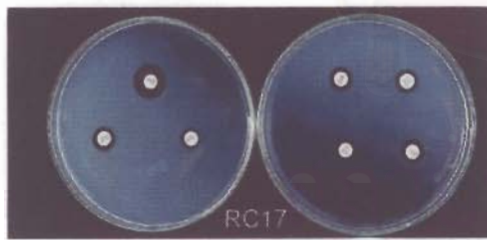
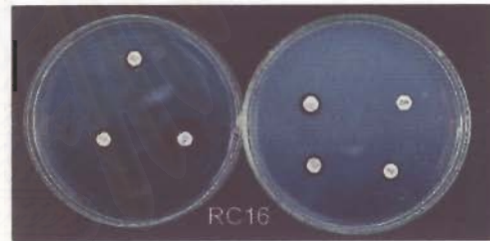
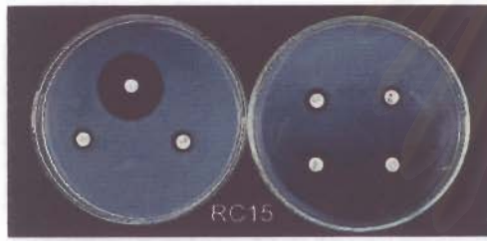
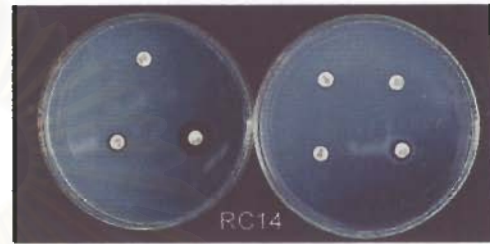
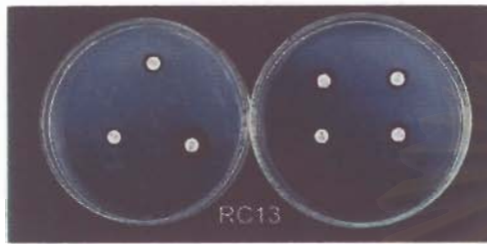
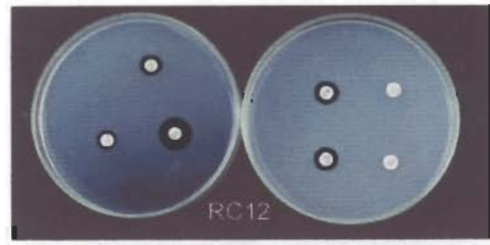
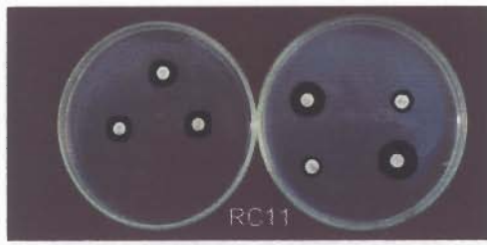
ความสามารถในการต้านยา Penicillin (10 IU) ของ เชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

Isolate		inhibition zone ต่อ Penicillin 10 IU (mm)				R/I/S
		R1	R2	R3	เฉลี่ย	
1	RC01	0.00	0.00	0.00	0.00	R
2	RC02	0.00	0.00	0.00	0.00	R
3	RC03	14.00	14.50	13.80	14.10	R
4	RC04	0.00	0.00	0.00	0.00	R
5	RC05	9.00	9.00	9.00	9.00	R
6	RC06	0.00	0.00	0.00	0.00	R
7	RC07	9.00	9.00	9.00	9.00	R
8	RC08	10.00	10.00	10.00	10.00	R
9	RC09	9.00	9.00	9.00	9.00	R
10	RC10	9.00	9.00	9.00	9.00	R
11	RC11	13.00	13.00	13.00	13.00	R
12	RC12	9.00	9.00	9.00	9.00	R
13	RC13	9.00	9.00	9.00	9.00	R
14	RC14	8.00	8.00	8.00	8.00	R
15	RC15	9.00	9.00	9.00	9.00	R
16	RC16	10.00	10.00	10.00	10.00	R
17	RC17	9.00	9.00	9.00	9.00	R
18	RC18	10.00	10.00	10.00	10.00	R
19	RC19	9.00	9.00	9.00	9.00	R
20	RC20	10.00	10.00	10.00	10.00	R
21	RC21	10.00	9.60	9.00	9.53	R
22	RC22	11.80	12.00	12.00	11.93	R
23	RC23	9.00	10.00	10.00	9.67	R
24	RC24	9.00	9.00	9.00	9.00	R
25	RC25	12.00	12.00	11.00	11.67	R
26	RC26	10.00	10.00	10.00	10.00	R
27	RC27	10.00	10.00	10.00	10.00	R
28	RC28	0.00	0.00	0.00	0.00	R
29	RC29	10.00	10.00	10.00	10.00	R
30	RC30	9.00	9.00	9.00	9.00	R
31	RC31	9.00	9.00	9.00	9.00	R
32	RC32	10.00	10.00	10.00	10.00	R



ภาคผนวก จ  
ผลการต้านยาปฏิชีวนะ 32 ไอโซเดท





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRISTAT ทาค่า ANALYSIS OF VARIANCE และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST (DMRT)

ตารางผนวกที่ 1 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักรากต้นพืชของถั่วมะแฮะ

Source of variation	SS	DF	MS	Observed F
Treatment	32.00	17.11	0.53	2.49**
Error	66.00	14.17	0.21	
Total	98.00			

ตารางผนวกที่ 2 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักปมของถั่วมะแฮะ

Source of variation	SS	DF	MS	Observed F
Treatment	31.00	20115.23	648.88	1.22*
Error	64.00	34160.30	533.75	
Total	95.00			

ตารางผนวกที่ 3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของจำนวนปมของถั่วมะแฮะ

Source of variation	SS	DF	MS	Observed F
Treatment	31.00	10608.24	342.20	1.92*
Error	64.00	11400.00	178.13	
Total	95.00	22008.24		

ตารางผนวกที่ 4 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีเนส (ค่า ARA)

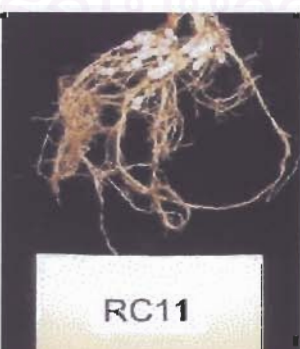
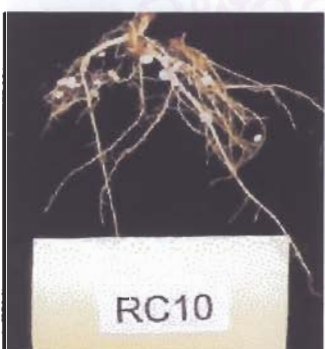
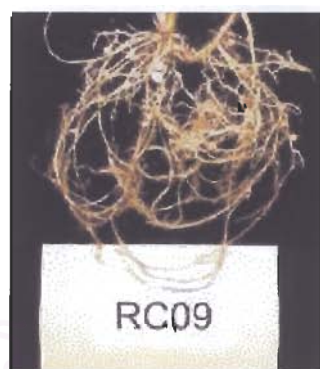
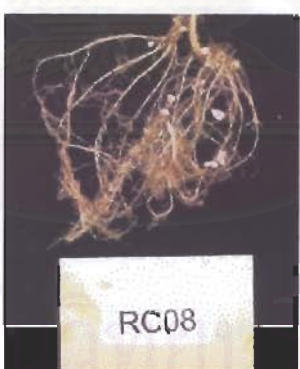
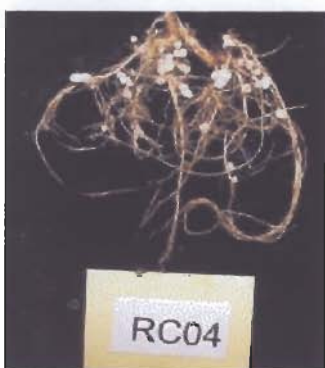
Source of variation	SS	DF	MS	Observed F
Treatment	18.85	32.00	0.59	2.16**
Error	17.98	66.00	0.27	
Total	36.83	98.00		

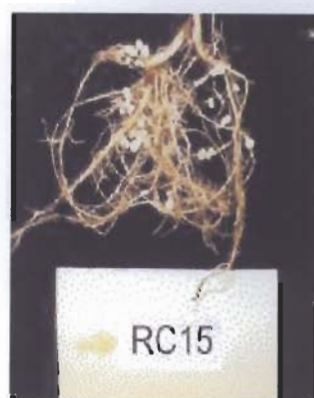


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

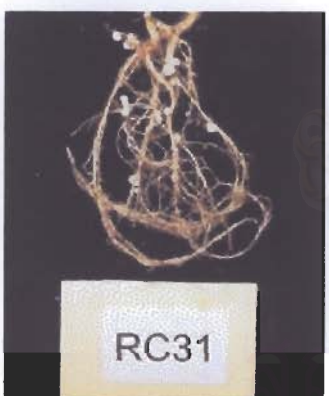
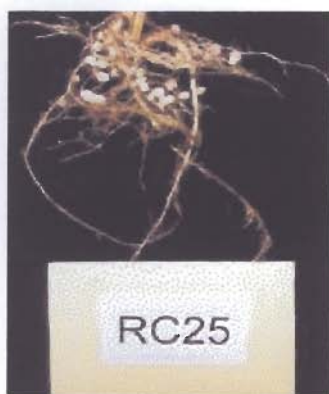
## ภาคผนวก ข

ภาพแสดงปมรากของถั่วมะแะทั้ง 32 ไอโซเลต









### ภาคผนวก ข

ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficients : r) ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ

	MOIS	NITRO	PH	Rhizobium
MOIS	1.0000	.3467	.8087*	-.3266
NITRO	.3467	1.0000	.4969	.4592
PH	.8087*	.4969	1.0000	-.1164
Rhizobium	-.3266	.4592	-.1164	1.0000

\* - Signif. LE .05    \*\* - Signif. LE .01    (2-tailed)

ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นกับปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ  $r = -0.3266$

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-เบสกับปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ  $r = -0.1164$

ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนกับปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วมะแฮะ  $r = 0.4592$

หมายเหตุ การหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลโดยใช้ correlation coefficients (r) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ 2 รูปแบบ โดยพิจารณาจากค่า r ดังนี้

ความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ค่า r จะเท่ากับ -1 หรือเกือบเท่า -1

ความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกัน ค่า r จะเท่ากับ +1 หรือเกือบเท่า +1

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุจินดา คุณรักษา เกิดวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2519 ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร ในปี พ.ศ.2541 และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2541



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย