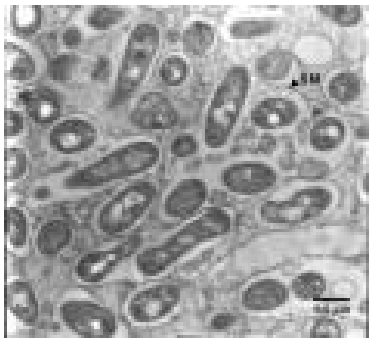
ไรโซเบียม [1]

ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้กลไกของการตรึงธาตุไนโตรเจนที่มีอยู่ในอากาศ มาเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย หรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ความพิเศษของเชื้อกลุ่มไรโซเบียมก็คือ ความสามารถในการเข้าสร้างปมที่รากหรือที่ลำต้นของพืชตระกูลถั่ว ดังแสดงในรูปที่ 1 ทำให้พืชเหล่านั้นได้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนโดยตรงซึ่งจำเป็นจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่ว และไรโซเบียมที่สัมพันธ์กัน

รูปที่ 1 ภาพแสดงปมของรากและลำต้นที่พบในพืชตระกูลถั่ว ซึ่งเกิดจากการเข้าอาศัยของเชื้อไรโซเบียม
ที่มา: http://www.doae.go.th/ni/nut/riso2.htm

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าจะมีรูปร่างเป็นแท่งยาว (rod shape) เมื่อถูกเลี้ยงในสภาพปกติ แต่เมื่อเชื้อไรโซเบียมเข้าสู่ระบบรากของพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป โดยเชื้อไรโซเบียม ที่พบในปมรากของพืชตระกูลถั่วจะมีรูปร่างไม่แน่นอน เช่น มีรูปร่างเป็นลักษณะ X-, Y- หรือ Star-shape ไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยอยู่ในปมแล้วนี้จะเรียกว่าแบคทีรอยด์ (bacteroid) (Alexander, 1977) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ลักษณะของเชื้อแบคทีรอยด์ที่พบในปมของรากพืชตระกูลถั่ว
ที่มา: www.agr.kuleuven.ac.be/ dtp/cmpg/research/symb...

---

[1] เรียบเรียงโดย รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซเบียมสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่ม เมื่อจำแนกโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล แต่อย่างไรก็ดีในอดีตนักวิทยาศาสตร์ได้จัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามชนิดของพืชตระกูลถั่วที่เชื้อไรโซเบียมนั้น ๆ สามารถเข้าไปสร้างปมได้ เช่น เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง เชื้อไรโซเบียมถั่วแดง เป็นต้น (Sahgal and Johri, 2003) จึงแสดงให้เห็นว่า มีความเฉพาะเจาะจงระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด (host specificity) ดังนั้น การเลือกใช้เชื้อ ไรโซเบียมเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ จึงต้องคำนึงถึงพืชตระกูลถั่วที่จะใช้ปลูกด้วย

เชื้อไรโซเบียมนี้จะสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้ก็ต่อเมื่อเชื้อจะต้องเข้าอาศัยอยู่ร่วมกันในปมราก หรือลำต้นในภาวะพึ่งพาซึ่งกันและกัน หรือเรียกว่า symbiosis กลไกของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสู่รากพืชได้นั้น จะเริ่มจากการที่รากพืชจะปล่อยสารจำพวก flavonoid หรือ isoflavonoid ออกมา จากนั้นสารนี้จะไปกระตุ้นให้ไรโซเบียมเคลื่อนตัวสู่รากพืช ดังแสดงในรูปที่ 3 และกระตุ้นกลุ่มของยีนส์ในเชื้อไรโซเบียม ที่ควบคุมการสร้างปม (nodulation genes หรือ nod) ให้มีการแสดงออกเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง กับการสร้างสารพวก lipopolysaccharide หรือเรียกว่า nod factor เชื้อไรโซเบียมจะปลดปล่อยสารนี้ ออกสู่ภายนอกเซลล์ จากนั้น nod factor ก็จะทำให้รากของพืชตระกูลถั่วนั้นโค้งงอ และเปลี่ยนเป็นโครงสร้างของปมต่อไป ในช่วงนี้เชื้อไรโซเบียมก็จะเคลื่อนตัว เข้าสู่รากของพืช ไปตามโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread ซึ่งยีนส์ในเซลล์ของรากพืชเป็นตัวแสดงออก เพื่อให้เกิดโครงสร้างนี้ และโครงสร้างที่จะขยายตัวออกมาเป็นปมต่อไป (หนึ่ง และ นันทกร, 2539)

รูปที่ 3 การเกาะติดของเชื้อไรโซเบียมบริเวณรากของพืชตระกูลถั่วก่อนเข้าสร้างปม

ที่มา: www.arc.agric.za/.../ rhizobium.htm

เมื่อเชื้อไรโซเบียมสามารถเข้าไปสร้างปมได้แล้ว ก็จะเริ่มกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้กับพืช โดยสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในการควบคุมกลไกที่จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย กลุ่มของยีนส์ในไรโซเบียมที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนนี้เรียกว่า nif ซึ่งจะแสดงออกเพื่อทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) นอกจากนี้ยังพบยีนส์ในกลุ่ม fix ซึ่งทำหน้าที่เกียวข้องกับการขนถ่ายอิเลคตรอน และพลังงานในกระบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย (Moat and Foster, 1995) ในขณะเดียวกันยังมีโปรตีนที่ชื่อว่า เลกฮีโมโกลบิน (leghemoglobin)

จากองค์ประกอบที่กล่าวมาข้างต้น เชื้อไรโซเบียมจึงมีคุณสมบัติในการนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อเป็นแหล่งผลิตธาตุไนโตรเจนให้กับพืช ซึ่งการนำเชื้อไรโซเบียมไปใช้ในสภาพไร่นั้นจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

การบ่งชี้และการจำแนกเชื้อไรโซเบียม

ในอดีตเชื้อไรโซเบียมจะถูกจัดจำแนกตามพืชตระกูลถั่วที่เชื้อนั้นๆ สามารถเข้าสร้างปมได้ ซึ่งรวมเรียกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า *Rhizobium* ซึ่งถูกจำแนกออกเป็นกลุ่ม ดังนี้

1. *Rhizobium japonicum* ซึ่งจะสร้างปมกับถั่วในกลุ่ม *Glycine max* (ถั่วเหลือง)
2. *Rhizobium lupine* จะสร้างปมกับถั่ว *Lupinus, Ornithopus*
3. *Rhizobium meliloti* สร้างปมกับถั่วในกลุ่ม *Melilotus, Medicago* (ถั่วอัลฟัลฟา), และ *Trigonella*
4. *Rhizobium leguminosarum* สร้างปมกับถั่วในกลุ่ม *Pisum* (ถั่วลันเตา), *Vicia* (ถั่วปากอ้า), *Lens* และ *Lathyrus*
5. *Rhizobium phaseoli* สร้างปมกับถั่วในกลุ่ม *Phaseolus* (ถั่วแดงหลวง)
6. *Rhizobium trifolii* สร้างปมกับถั่ว *Trifolium* (ถั่วโคลเวอร์)

นอกจากนี้การจำแนกกลุ่มไรโซเบียมยังถูกจัดจำแนกตามอัตราการเจริญอีกด้วย โดย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ไรโซเบียมชนิดโตเร็ว (Fast grower) ซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวทุกๆ 1 - 3 ชั่วโมง ซึ่งจะพบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลังจากเลี้ยงไปภายใน 2 - 4 วัน สำหรับเชื้อไรโซเบียม อีกกลุ่ม คือ ไรโซเบียมชนิดโตช้า (Slow grower) ซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวทุกๆ 4 - 8 ชั่วโมง โดยจะพบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลังจากเลี้ยงไปภายใน 5 – 8 วัน ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้ยังคงถูกเรียกว่า *Rhizobium* อยู่เช่นเดิม จนกระทั่งมีการตั้งชื่อกลุ่มไรโซเบียมอีกกลุ่มหนึ่ง ขึ้นมาใหม่เรียกว่า *Bradyrhizobium* ซึ่งใช้เรียกเฉพาะเชื้อไรโซเบียมที่เจริญช้า และแยกออกมาได้จากปมถั่วเหลือง (*Glycine max)* เท่านั้น โดยเรียกว่า *Bradyrhizobium japonicum* อย่างไรก็ดีต่อมาได้มีการค้นพบเชื้อไรโซเบียมชนิดเจริญเร็วซึ่งถูกคัดแยกออกมาจากถั่วเหลืองได้เช่นกัน ปัจจุบันเชื้อไรโซเบียมกลุ่มนี้ได้ชื่อว่า *Sinorhizobium fredii* ดังนั้นในปัจจุบันการจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมตาม พืชตระกูลถั่วเพียงลักษณะเดียวจึงไม่สามารถใช้ได้

จนกระทั่งเมื่อเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลถูกพัฒนาขึ้นมา จึงได้มีการนำเทคโนโลยีด้านนี้มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับลักษณะทางสรีรวิทยา และทางชีวเคมี ซึ่งสามารถจำแนกไรโซเบียม ออกได้เป็น 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่อย่างไรก็ดี

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียม

จีนัส	สปีชีส์	พืชตระกูลถั่ว
Allorhizobium	*A. undicola*	*Neptunia natans*
Azorhizibium	*Az. caulinodans*	*Sesbania rostrata*
Bradyrhizobium	*B. elkanii* *B. japonicum* *B. liaoningense*	*Glycine max* *G. max* *G. max*
Mesothizobium	*M. amorphae* *M.chacoense* *M. ciceri* *M. huakuii* *M. loti* *M. mediterraneum* *M. plurifarium* *M. tianshanense*	*Amorpha fruticosa* *Prosopis alba* *Cicer arietinum* *Astragalus* *Loti* *Cicer arietinum* *Acacia, Leucaena* *Glycyrrhiza,* *Sophora and* *Glycine*
Methylobacterium	*M. nodulans*	*Crotalaria pedocarpa*

Rhizobium	*R. etli*	*Phaseolus vulgaris*
	R. galegae	*Galege*
	R. gallicum	*P. vulgaris*
	R. giardinii	*P. vulgaris*
	R. hainanense	*Centrosema, Desmodium* *Stylosanthes, Tephrosia*
	R. huautlense	*Sesbania herbacea*
	R. leguminosarum	*Trifolium, Vicia*
	R. mongolense	*Medicago ruthenica*
	R. phaseoli	*P. vulgaris*
	R. sullae	*Hedysarum hedysari*
	R. tropici	*Leuceana, P. vulgaris*
	R. trifolii	*Trifolium*
	R. yanglingense	*Amphicarpaea, Trisperma, Corollina varia and Gueldenstaedtia multiflora*
Sinorhizobium	*S. arboris*	*Acacia senegal* *Prosposis chilensis*
	S. fredii	*G. max*
	S. kostiense	*A. senegal, P. chilensis*
	S. medicae	*Medicago spp.*
	S. meliloti	*M. sativa*
	S. saheli	*Sesbania*
	S. terangae	*Acacia, Sesbania*
	S. xinjiangense	*G. max*

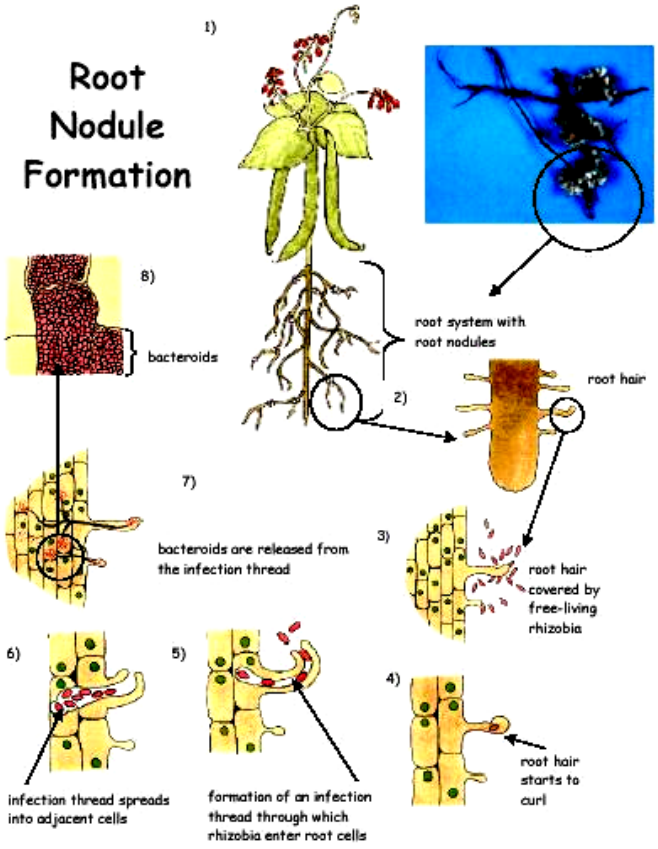
ที่มา: Sahgal and Johri, 2003

กลไกการให้ธาตุอาหาร

1. กระบวนการเข้าสู่รากพืชและลำต้นพืชโดยไรโซเบียม (Rhizobial Infection Process)

การปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์จากรากพืช (Plant root exudation)

ระหว่างที่พืชกำลังเจริญเติบโตรากพืชจะปลดปล่อยสารประกอบอินทรีย์ (root exudates) ชนิดต่าง ๆ ออกมาบริเวณรอบ ๆ ราก (rhizosphere) สารประกอบอินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ กรดอะมิโน น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นแหล่งของพลังงาน และ growth factor



รูปที่ 4 แสดงกระบวนการเข้าสู่รากพืชและสร้างปมโดยแบคทีเรียไรโซเบียม

ที่มา: www.microbiologyonline.org.uk

การสร้างท่อสำหรับเคลื่อนเข้าสู่รากพืช (Formation of infection thread)

หลังจากนั้นเซลล์รากพืชก็จะเกิดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นท่อเล็กๆขึ้นมาเรียกว่า Infection thread ซึ่งเกิดจากการยืดหดตัวของผนังเซลล์ (infolded and extended plasma membrane)

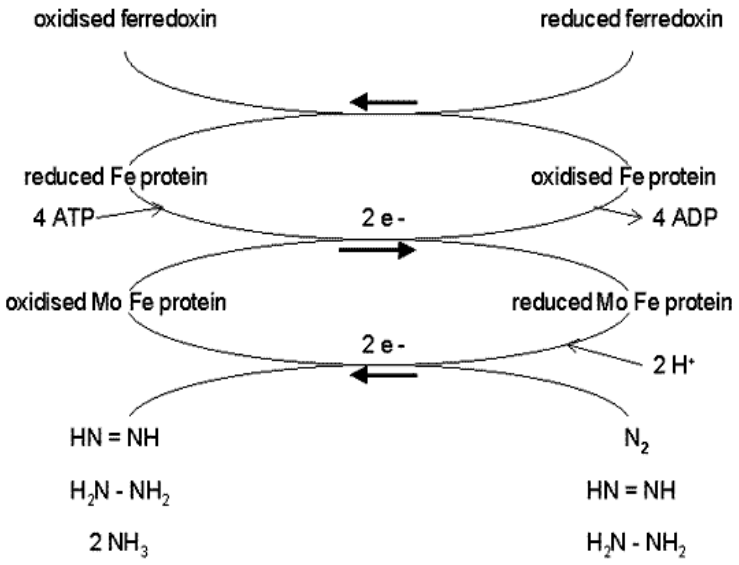
2. วงจรไนโตรเจน (Nitrogen cycle)

2.1 Biological Nitrogen fixation

การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมนั้น แบคทีเรียในรูปของแบคทีรอยด์ (Bacteroid) มีความสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ (N_2) ไปอยู่ในรูปของแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบอิทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนได้เนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสแสดงดังนี้

$$N_2 + 8H+ + 8e^- + 16\ ATP \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16\ Pi$$

เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ โปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein หรือ Fe-protein) และโปรตีนที่มีโมลิบดีนัมและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein) ซึ่งในขั้นแรก Fe-protein จะถูกรีดิวส์โดย ferredoxin ต่อมา Fe-protein ที่ถูกรีดิวส์จะเข้าจับกับ ATP และไปรีดิวส์ molybdenum-iron protein และให้อิเล็กตรอนกับ N_2 และเกิดเป็น NH=NH และถูกรีดิวส์ต่อไปเรื่อยๆ โดยรับอิเล็กตอนจาก ferredoxin จนกลายเป็น $2NH_3$ โดยกลไกลปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่5 แสดงปฏิกิริยารีดักชันระหว่างกระบวน การตรึงไนโตรเจนโดยไนโตรจีเนสเอนไซม์

ที่มา: http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/nitrogen.htm

2.2 Ammonification หรือ Mineralization

Ammonification เป็นกระบวนการที่ NH_4^+ ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในดิน ซึ่งอาจมาจากซากพืชซากสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น จากโปรตีน กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) น้ำตาลที่ทีหมู่อะมิโน (amino sugar) เป็นต้น โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินส่วนใหญ่ ตัวอย่างของปฏิกิริยามีดังนี้

1) Direct Removal

$$R\text{-}CH_2\ CH\text{-}NH_2\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH + NH_3$$

2) Deamination (oxidative - aerobic, reductive - anaerobic)

$$\text{Oxidative: } R\text{-}CH_2CH\text{-}NH_2COOH + 1/2\ O_2 \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3$$

$$\text{Reductive: } R\text{-}CH_2CH\text{-}NH_2COOH + 2H^+ \longrightarrow R\text{-}CH_2CH\text{-}COOH + NH_3$$

3) Decarboxylation

$$\text{Reductive: } R\text{-}CH_2CH\text{-}NH_2COOH + H_2 \longrightarrow RCH_3 + CO_2 + NH_3$$

$$\text{Oxidative: } R\text{-}CH_2CH\text{-}NH_2COOH + O_2 \longrightarrow R\text{-}COOH + CO_2 + NH_3$$

หลังจากนั้นแอมโมเนีย (NH_3) ในดินจะถูกเปลี่ยนไปเป็น แอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ซึ่งเป็นรูปที่มีประจุจึงสามารถถูกดูดซับอยู่ในดิน และพืชสามารถนำไปใช้ได้

หลังจากที่ไนโตรเจนจากบรรยากาศถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและแอมโมเนียมอิออนแล้ว ปฏิกิริยาต่อมาที่สามารถเกิดขึ้นได้แก่ Nitrification และ Assimilation (หรือ Immobilization)

2.3 Ammonium Assimilation

$$NH_4^+ \longrightarrow \text{Organic N}$$

Ammonium assimilation เป็นกระบวนการที่แอมโมเนียถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนหรือสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆ (organic nitrogen compounds) ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งจากกิจกรรมของพืชเอง และกิจกรรมของจุลินทรีย์ อาทิเช่น *E. coli, Synechocystis* sp., *Aspergillus nidulans, Candida utilis* เป็นต้น โดยโปรตีนหลักที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาได้แก่ glutamate, alanine และ aspartate และเอนไซม์ที่มีบทบาทได้แก่ glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthesis (GS) และ NADPH-dependent glutamine:2-oxoglutarate amidotransferase (GOGAT) หรือ glutamate synthetase

1) แสดงปฏิกิริยาที่ควบคุมโดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH)

$$NH_4^+ + \text{2-oxoglutarate} + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{glutamate} + NADP^+$$

2) แสดงปฏิกิริยาที่ควบคุมการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) และเอนไซม์ glutamate synthetase (GOGAT)

$$NH_4^+ + \text{glutamate} + ATP \xrightarrow[\text{GOGAT}]{\text{GS}} \text{glutamine} + ADP + Pi$$

$$\text{glutamine} + \text{2-oxoglutarate} + \text{NADPH} + H^{+} \longrightarrow 2\ \text{glutamate} + NADP^{+}$$

ซึ่งกระบวนการนี้จะถูกควบคุมโดยปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ ถ้าในสภาวะที่มีแอมโมเนียมากเกินพอ จะเป็นสภาวะที่ไปกระตุ้นการทำงานของทั้งปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 คือเร่งการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นกรดอะมิโน ส่วนในสภาวะที่ขาดแคลนแอมโมเนีย (ความเข้มข้นของแอมโมเนียน้อยกว่า 1 mM) ปฏิกิริยาของ glutamine synthetase (GS) จะถูกกระตุ้น ส่วนปฏิกิริยาของ glutamate synthetase (GOGAT) จะถูกยับยั้ง ซึ่งทั้งสองปฏิกิริยาจะผลิต 1 โมลของ glutamate จาก 1 โมลของแอมโมเนีย แต่ในระบบของ GS-GOGAT จะใช้พลังงาน 1 ATP

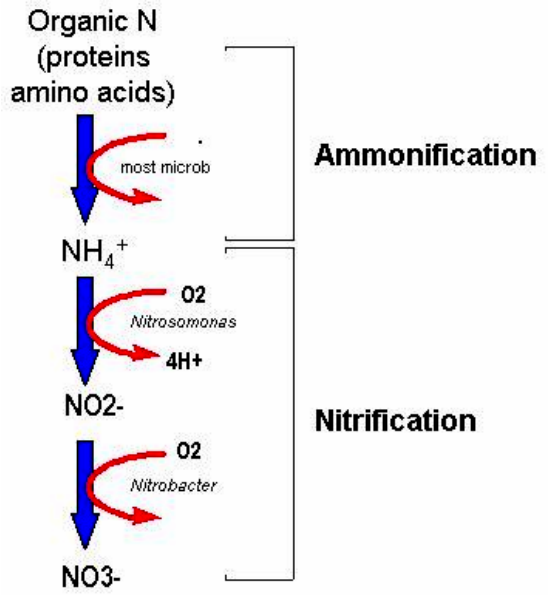
นอกจากนั้นยังมีปฏิกิริยาของเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้อง อาทิเช่น Alanine dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็น alanine

$$NH_4^{+} + \text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^{+} \longrightarrow \text{Alanine} + NADH^{+}$$

2.4 Nitrification

หลังจากที่ไนโตรเจนจากบรรยากาศถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียแล้ว พืชหรือจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงในกระบวนการ assimilation ที่กล่าวไปแล้วข้างต้นนั้น แอมโมเนียยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ (Nitrite; NO_2^-) และเปลี่ยนไปเป็นไนเตรท (Nitrate;NO_3^-) ซึ่งอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation)

โดยในปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากกิจกรรมของแบคทีเรียในกลุ่มที่เรียกว่า Chemoautotrophic bacteria หรือเรียกว่า nitrifying bacteria ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มแรกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแอมโมเนียมไปเป็นไนไตรท์คือ แบคทีเรีย กลุ่ม Nitrosomonas ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่สองที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทส่วนใหญ่คือ Nitrobacter ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงปฏิกิริยาของ Ammonification และ Nitrification

ที่มา: http://www.esf.edu/efb/course/EFB530/lectures/nitrogen.htm

2.5 Nitrate Assimilation

เป็นกระบวนการที่พืชและจุลินทรีย์นำไนโตรเจนในรูปของไนเตรทไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยขั้น แรกจะต้องมีการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นแอมโมเนียก่อนโดยปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction) และหลังจากนั้น จะผ่านกระบวนการรีดักชั่นไปเรื่อยๆ โดยจำเป็นต้องใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ (Coifactor) และจำเป็นต้องใช้พลังงานในแต่ละกระบวนการ ดังแสดงตัวอย่างของปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา 1 : การรีดิวส์ไนเตรตไปเป็นไนไตรท์ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Assimilatory Nitrate Reductase

$2\ HNO_3 \longrightarrow 2HNO_2$

$2\ NADH\text{-}H \longrightarrow 2NAD$

ปฏิกิริยา 2 : การรีดิวส์ไนไตรท์ไปเป็นไฮดรอกซีเอมีน (hydroxylamine) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Assimilatory Nitrite Reductase

$2\ HNO_2 \longrightarrow 2NH_2OH$

$NADH\text{-}H \longrightarrow NAD$

ปฏิกิริยา 3 : การรีดิวส์ไฮดรอกซีเอมีนไปเป็นแอมโมเนีย เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Assimilatory Hydroxylamine Reductase

$2\ NH_2OH \longrightarrow 2NH_3$

$NADH\text{-}H \longrightarrow NAD$

ปฏิกิริยา 4 : Protein synthesis

$2NH_3$ + Organic Acids $\longrightarrow$ Amino Acids ---> Proteins

(ที่มา : http://soils1.cses.vt.edu/ch/biol_4684/Cycles/Denit.html)

2.6 Denitrification

Denitrification เป็นปฏิกิริยาที่ไนโตรเจนในรูปออกซิไดซ์ เช่น ไนไตรท์ และไนเตรทถูกเปลี่ยนไปเป็นไนโตรเจน (N_2) และก๊าซไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide gas) กลับสู่บรรยากาศโดยผ่านกระบวนการรีดักชั่น (reduction) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทได้แก่ denitrifying bacteria ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ *E. coli, Pseudomonas* และ *Bacillus* ซึ่งสามารถทำให้เกิดกระบวนการ Denitrification ดังนี้

ปฏิกิริยา 1 : การรีดิวส์ไนเตรตไปเป็นไนไตรท์ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Dissimilatory Nitrate Reductase

$2HNO_3 \longrightarrow 2HNO_2 + 4e$

$2NADH\text{-}H \longrightarrow 2NAD$

ปฏิกิริยา 2 : การรีดิวส์ไนไตรท์ไปเป็นไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Dissimilatory Nitrite Reductase

$2HNO_2$ $2NO$ $+2e$

NADH-H NAD

ปฏิกิริยา 3 : การรีดิวส์ไนตริกออกไซด์ไปเป็นไนไตรท์ออกไซด์ (Nitrous Oxide) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Dissimilatory Nitric Oxide Reductase

$2NO$ N_2O $+2e$

NADH-H NAD

ปฏิกิริยา 4 : การรีดิวส์ไนไตรท์ออกไซด์ไนโตรเจน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ Dissimilatory Nitrous Oxide Reductase

N_2O N_2 $+2e$

NADH-H NAD

รวมปฏิกิริยาทั้งหมด

Nitrate	Nitrite	Nitric Oxide	Nitrous Oxide	Dinitrogen
(NO_3)	(NO_2)	(NO)	(N_2O)	(N_2)

ผลต่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม (Agricultural and Environmental Impact)

- **ลดหรือหลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยเคมี**

เนื่องจากไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพจึงมีความสำคัญ นอกจากนี้การใช้ไรโซเบียมร่วมกับไมโคไรซ่า (Mycorrhiza) ยังสามารถให้แร่ธาตุอีกชนิดหนึ่งแก่พืช อันได้แก่ ฟอสฟอรัส ซึ่งส่วนใหญ่มีอยู่ในดิน แต่ความเป็นประโยชน์ต่อพืชมีจำกัด และเชื้อราดินไมโคไรซ่าสามารถช่วยให้ฟอสฟอรัส เป็นประโยชน์ต่อพืชได้มากขึ้น การใช้ไรโซเบียมนอกจากจะทำให้สามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมี ยังผลทำให้มีต้นทุนการผลิตลดลงอีกด้วย จึงลดปัญหาจากการใช้ปุ๋ยเคมีอันได้แก่ การสะสมตกค้างของสารเคมีเนื่องจากพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งหมดซึ่งการใช้ ทำให้เกิดการปนเปื้อน ไปยังแหล่งน้ำได้

- **การอนุรักษ์ธาตุอาหารในดิน** การใช้ไรโซเบียมร่วมกับการใช้ปุ๋ยพืชสด สามารถช่วยในการอนุรักษ์ธาตุอาหารในดิน พืชที่ปลูกเป็นพืชปุ๋ยสด (พืชตระกูลถั่ว) จะดูดกินหรือใช้ประโยชน์จากปุ๋ยซึ่งตกค้างจากการใส่ให้พืชเศรษฐกิจ อันเป็นพืชหลักเป็นการป้องกันการสูญเสียธาตุอาหารไม่ให้ถูกชะล้างไป นอกจากนั้น ในพืชตระกูลถั่ว ที่มีระบบรากลึกก็สามารถดูดดึงธาตุอาหารที่อยู่ในดินชั้นล่างขึ้นมาในลำต้น กิ่งก้าน และใบได้ เมื่อทำการไถกลบพืชปุ๋ยสด และสลายตัวแล้วธาตุอาหารเหล่านั้นก็จะตกอยู่ในดินชั้นบน เป็นประโยชน์แก่พืชเศรษฐกิจอันเป็นพืชหลักต่อไป นอกจากนั้นยังเป็นการการหมุนเวียน ใช้ทรัพยากรในไร่นา ให้เกิดประโยชน์สูงประหยัดสุด

- การศึกษาไรโซเบียมที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม อันได้แก่ ดินที่เป็นกรดหรือดินที่มีความเค็ม จะทำให้สามารถนำไรโซเบียมไปประยุกต์ใช้ในสภาพดินที่ไม่เหมาะสมนั้นได้ ทำให้สามารถลดต้นทุนและกระบวนการในการปรับปรุงดิน
- การใช้ไรโซเบียมในเกษตรอินทรีย์เป็นการใช้หลักการพึ่งพิงความสมดุลตามธรรมชาติ เพื่อสร้างสรรค์ ให้เกิดระบบนิเวศ การเกษตรที่ยั่งยืน เป็นการผสมผสานระบบการเกษตรทุกระบบที่ส่งเสริม และปรับปรุงสิ่งแวดล้อม เพื่อการผลิตอาหาร และปัจจัยพื้นฐาน การดำรงชีพที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค
- นอกจากลดการทำลายสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังช่วยให้เกษตรกรและผู้บริโภคลดการเสื่อมโทรมของสุขภาพลงเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมี
- ช่วยลดปัญหาสินค้าเกษตรถูกกีดกันจากประเทศนำเข้าเพราะมีสารเคมีตกค้างในสินค้า การเกษตร

การประยุกต์ใช้ในสภาพไร่และประโยชน์อื่น ๆ

เชื้อไรโซเบียมสามารถนำไปใช้ในสภาพไร่ได้ โดยนำเชื้อไรโซเบียมนี้ไปผสมกับ วัสดุพาหะ (carrier) เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมเกาะอยู่ และสะดวกในการนำไปใช้กับถั่ว โดยวัสดุพาหะที่นิยมใช้ในปัจจุบันนี้ คือ พีท (peat) ซึ่งช่วยให้ไรโซเบียมมีชีวิตอยู่ได้นาน และเพิ่มปริมาณ.ในขณะ เก็บรักษาได้ ดังนั้น เมื่อนำหัวเชื้อไรโซเบียมนี้ไปใช้กับถั่ว ก็จะทำให้แน่ใจได้ว่ามีปริมาณเชื้อไรโซเบียมเพียงพอที่จะเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืช อย่างไรก็ดีในการเลือกซื้อหัวเชื้อไรโซเบียม จะต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อไรโซเบียมที่ตรงกับถั่วที่เกษตรกรต้องการปลูก เพราะเชื้อไรโซเบียมมีความจำเพาะเจาะจงต่อถั่วแต่ละชนิดมาก นอกจากนี้ ยังควรตรวจสอบวันหมดอายุของหัวเชื้อไรโซเบียมที่ติดอยู่บนฉลากด้วย เพื่อให้แน่ใจว่า ยังมีปริมาณไรโซเบียมที่มีชีวิตมากเพียงพอ ที่จะเกิดปมกับพืชตระกูลถั่วได้ (ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8)

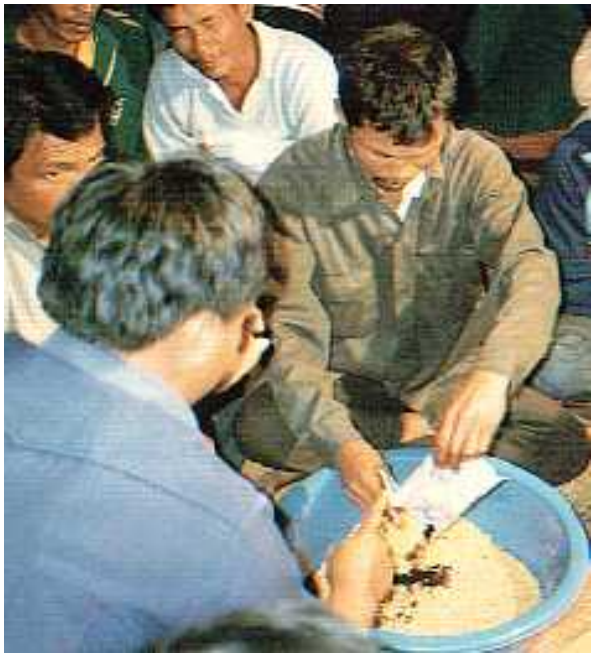
รูปที่ 7 ภาพแสดงบรรจุภัณฑ์ของหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปที่ผสมกับวัสดุพาหะ (พีท)

ที่มา: http://www.doae.go.th/ni/nut/riso2.htm

รูปที่ 8 กำหนดวันหมดอายุของหัวเชื้อไรโซเบียม ควรแสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดบนบรรจุภัณฑ์ ซึ่งเกษตรกรควรสังเกตวันหมดอายุนี้ก่อนนำไปใช้กับถั่ว

ที่มา: http://www.doae.go.th/ni/nut/riso2.htm

วิธีการใช้เชื้อไรโซเบียมในสภาพไร่มี 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ การคลุกหัวเชื้อไรโซเบียม กับเมล็ดถั่ว และอีกวิธีคือ การใส่หัวเชื้อไรโซเบียมลงไปในดิน สำหรับวิธีการแรกนั้น หัวเชื้อไรโซเบียมจะถูกผสมกับเมล็ดโดยใช้สารที่ช่วยให้เชื้อติดเมล็ด เช่น แป้งเปียกชนิดเหลว สารละลายน้ำตาล 30% หรือน้ำมันพืช (ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10) โดยอัตราการใช้ที่พอเหมาะ เช่น เมื่อใช้กับถั่วเหลือง 10 กิโลกรัม หรือถั่วลิสง 15 กิโลกรัม หรือถั่วเขียว 5 กิโลกรัม กับหัวเชื้อไรโซเบียม 200 กรัม จะใช้ปริมาณของสารที่ช่วยให้ติดเมล็ด 300 มิลลิลิตร (นันทกร, 2529) สำหรับขั้นตอนการผสมนั้น จะเริ่มจากการนำเมล็ดถั่วที่ต้องการปลูกใส่ลงในภาชนะเช่น ถังน้ำ จากนั้นใส่สารที่ช่วยให้หัวเชื้อติดกับเมล็ดลงไปในอัตราที่พอเหมาะ แล้วกวนเบา ๆ ให้เมล็ดเปียกทั่วกันหมด แล้วใส่หัวเชื้อไรโซเบียมลงไป คนให้เข้ากันเบา ๆ เพื่อไม่ให้เมล็ดได้รับ ความเสียหาย เมื่อคลุกเชื้อกับเมล็ด เสร็จแล้วควรจะนำไปปลูกทันทีในดินที่มีความชื้น โดยใช้ดินกลบเพื่อให้ดินรักษาความชื้นไว้ อย่างไรก็ดีในกรณีที่ดินเป็นกรดมากๆอาจใส่หินปูน หรือหินฟอสเฟตลงไปเคลือบเมล็ดถั่วที่คลุก เชื้อแล้วอีกชั้นหนึ่งเพื่อลดความเป็นกรดของดิน บริเวณรอบ ๆ เมล็ด ซึ่งจะทำให้ไรโซเบียมมีชีวิต อยู่รอดได้โดยไม่ถูกทำลายไปในสภาวะที่เป็นกรด



รูปที่ 9 ภาพแสดงการคลุกผสมหัวเชื้อไรโซเบียมกับเมล็ดถั่วเหลือง

ที่มา: http://www.doae.go.th/ni/nut/riso2.htm

รูปที่ 10 แสดงภาพของเมล็ดถั่วที่ทำการคลุกด้วยหัวเชื้อไรโซเบียมแล้ว

ที่มา: http://www.doae.go.th/ni/nut/riso2.htm

การใช้เชื้อไรโซเบียมในสภาพไร่อีกวิธีหนึ่ง คือ การใส่หัวเชื้อไรโซเบียมลงไปในดินก่อนทำการปลูก เกษตรกรสามารถเลือกใช้วิธีนี้ได้ เมื่อเมล็ดถั่วที่ต้องการจะปลูกคลุกด้วยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เป็นอันตรายต่อเชื้อไรโซเบียม เช่น สารฆ่าเชื้อรา เป็นต้น หรือเมื่อต้องการเชื้อไรโซเบียมปริมาณมากเพื่อเอาชนะเชื้อที่มีอยู่ในดิน ซึ่งอาจเป็นไรโซเบียมที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน การใส่เชื้อไรโซเบียมลงไปในดินโดยตรงนี้สามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ ใส่ในรูปของแข็ง เช่น ผสมหัวเชื้อไรโซเบียมกับดิน ทราย หรือขี้เถ้าแกลบ แล้วหยอดลงไปใน หลุมปลูก หรือใส่ในรูปของเหลวโดยนำหัวเชื้อที่อยู่ในรูปผงมาละลายกับน้ำ ผสมให้เข้ากัน

แล้วจึงนำไปฉีดพ่นลงบนดินที่ต้องการจะปลูก โดยต้องระมัดระวังว่าเมื่อผสมน้ำแล้ว อัตราส่วนของเชื้อที่จะใช้กับเมล็ดจะต้องไม่น้อยกว่าที่กำหนดไว้

นอกจากนี้การใช้เชื้อไรโซเบียมในสภาพไร่ยังจะต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมอื่นๆที่จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนต่ำลงด้วย เช่น ค่าพีเอช หรือค่าความเป็นกรดด่างของดิน เนื่องจากในสภาพดินที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไปนี้จะส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม นอกจากนี้ธาตุอาหารในดินยังมีบทบาทสำคัญที่จะส่งผลกระทบต่อการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจน โดยดินที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนต่ำ ถั่วจะสร้างปมกับเชื้อไรโซเบียมได้ดีมาก และสามารถตรึงธาตุไนโตรเจนจากอากาศได้เพียงพอต่อความต้องการของพืช ในขณะที่ดินซึ่งมีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูงจะทำให้ถั่วสร้างปมกับไรโซเบียมได้ช้า หรือไม่สร้างปมเลย แต่ ถ้าสามารถสร้างปมได้ ปมนั้นก็อาจจะไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ในทางตรงกันข้าม ถ้าดินที่จะทำการปลูก ขาดธาตุอาหารเหล่านี้ คือ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โมลิบดินัม เหล็ก โบรอน ก็จะทำให้ปมถั่วมีขนาดเล็กลง และส่งผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการ ตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมอีกด้วย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการใช้เชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วนั้น สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ประโยชน์ที่ได้รับจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน และพืชตระกูลถั่วโดยตรง และประโยชน์ที่ได้รับทางอ้อม จากการที่เชื้อไรโซเบียมเมื่อใช้ร่วมกับพืชตระกูลถั่วแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นธาตุอาหารให้กับพืชได้ ทำให้เกษตรกรลดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยไนโตรเจน โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ให้เปลี่ยนไปเป็นโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ยอด ใบ ลำต้น หรือเมล็ด ทำให้ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ของพืชตระกูลถั่วมีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็น อาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนที่สะสมอยู่ใน พืชตระกูลถั่วยังมีประโยชน์ในด้านการนำมาใช้เป็น ปุ๋ยพืชสดเพื่อนำไปใช้กับพืชชนิดอื่นได้โดย การไถกลบลงในดิน ทำให้ธาตุไนโตรเจนจากถั่ว ถูกปลดปล่อยลงสู่ดิน เพื่อให้พืชอื่นนำธาตุ ไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ได้ โดยพืชตระกูลถั่วที่นิยม ในการทำเป็นปุ๋ยพืชสด เช่น โสน ปอเทือง สำหรับประโยชน์ในทางอ้อมนั้น พืชตระกูลถั่วยังใช้ไปในการอนุรักษ์ดิน เช่น ป้องกันการกร่อนของดิน โดยการปลูกพืชคลุมดิน การปลูกพืชแซม หรือการปลูกพืชหมุนเวียน เพื่อบำรุงดิน (สมศักดิ์, 2541)

การผลิตเป็นหัวเชื้อเชิงการค้า

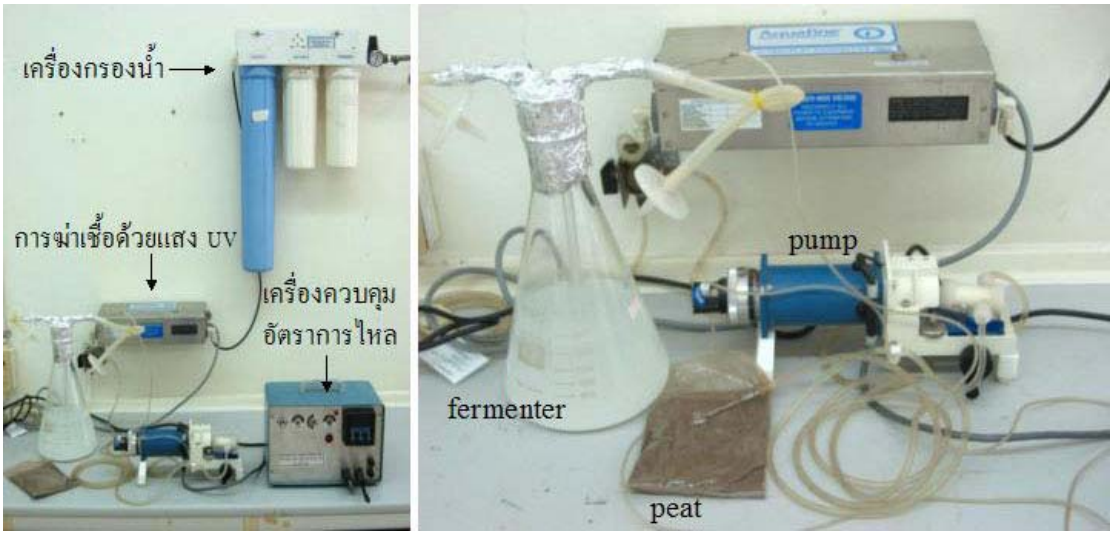
หัวเชื้อไรโซเบียมในปัจจุบันได้จัดทำขึ้นในหลายรูปแบบเพื่อเชิงการค้า เช่น ในรูปแบบของเชื้อไรโซเบียมที่มีอินทรียวัตถุเป็นพาหะ เช่น พีท (peat), ถ่านหินลิกไนท์ หรือ ปุ๋ยหมัก หรือใช้ในรูปของเชื้อไรโซเบียมผงแห้ง เชื้อไรโซเบียมในรูปของเหลว หรือเชื้อไรโซเบียม ผสมสารสังเคราะห์ แต่รูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียมที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบันคือ ในรูปแบบของเชื้อที่ผสมอยู่กับพีท (Brick, 1999) อย่างไรก็ดีแม้รูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียม จะมีหลายชนิด

เชื้อไรโซเบียมเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญที่สุดในการผลิตหัวเชื้อเชิงการค้า เชื้อไรโซเบียมที่จะนำมาผลิตนี้จะต้องมีการคัดเลือก และทดสอบความสามารถ ในการสร้างปมกับถั่ว ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน รวมไปถึงความสามารถในการแข่งขัน กับเชื้อที่พบอยู่ในดิน ตามธรรมชาติ หรือมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญ และการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียม เช่น ภาวะดินเปรี้ยว ดินเค็ม หรือสภาวะแล้ง เป็นต้น

สำหรับองค์ประกอบที่สองของหัวเชื้อไรโซเบียม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม เนื่องจากการผลิตหัวเชื้อในเชิงการค้านั้น จำเป็นจะต้องมีการผลิตเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ในปริมาณมาก ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะต้องคำนึงถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับเชื้อไรโซเบียมที่ต้องการผลิตด้วย เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมต่างสายพันธุ์ ก็จะมีความสามารถในการใช้องค์ประกอบ หรือแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันไปด้วย ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบ หลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมด้วย ดังนั้นจึงได้มีการพยายามนำวัสดุราคาถูกหรือวัสดุเหลือใช้ มาทดแทนแหล่งอาหารเดิมที่ใช้อยู่ เช่น มันสำปะหลัง นำมาผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเปลี่ยนแป้งที่มีอยู่ในมันสำปะหลัง ให้เป็นน้ำตาลที่เชื้อไรโซเบียมสามารถนำไปใช้ต่อได้ สำหรับองค์ประกอบที่สำคัญของหัวเชื้อไรโซเบียมอีกสองอย่างก็คือ วัสดุพาหะและสารเติมแต่งที่เอื้อประโยชน์ต่อไรโซเบียมนั้น มีความสำคัญในการช่วยให้เชื้อไรโซเบียมยึดเกาะกับเมล็ดถั่วได้ดี ป้องกันเชื้อไรโซเบียม จากสภาวะในดินที่ไม่เหมาะสม และช่วยยืดอายุของเชื้อไรโซเบียมให้มีชีวิตอยู่ได้นานยิ่งขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุพาหะ หรือสารเติมแต่งอื่นๆ ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม จะต้องพิจารณาให้มีคุณสมบัติ เหล่านี้ คือ ไม่เป็นพิษต่อไรโซเบียม มีการเก็บกักความชื้นได้ดีและยึดเกาะกับเมล็ดได้ดี เช่น พีท (Somasegaran and Hoben, 1994) หรือสารสังเคราะห์ Polyvinylpyrrolidone (PVP) ในหัวเชื้อไรโซเบียมรูปของเหลว (ดังแสดงในรูปที่ 11) ซึ่งช่วยป้องกันเชื้อไรโซเบียม จากสารพิษ ซึ่งหลั่งออกจากเมล็ดถั่วบางชนิดขณะงอก (Singleton, 2001)

รูปที่ 11 แสดงภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปของเหลว

ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อีกวิธีหนึ่งคือ การใช้เทคนิคการเจือจางปริมาณเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ก่อนที่จะผสมกับวัสดุพาหะ (Dilution technique) เช่น พีทแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณสองอาทิตย์ก่อนการจำหน่าย เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาอยู่ในระดับที่กำหนดตามเกณฑ์ เทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมได้ก็ต่อเมื่อวัสดุพาหะที่จะนำมาผสมกับเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์นั้นจะต้องมีธาตุอาหารหรืออินทรีย์วัตถุเพียงพอที่จะให้เชื้อไรโซเบียมเจริญต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง การเจือจางของเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์นี้ ในระดับอุตสาหกรรมสามารถทำได้โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Micro production unit (MPU) โดยมีหลักการทำงานคือ น้ำที่ใช้ในการเจือจางเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์จะ ผ่านเครื่องกรองน้ำแล้วผ่านแสงอุลตราไวโอเลตเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำแล้วจึงผ่านมาผสมกับหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ก่อนการฉีดเข้าวัสดุพาหะแล้ว ผสมให้เข้ากับวัสดุพาหะจากนั้นจึงนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีกระยะหนึ่งเพื่อให้เชื้อเจริญเพิ่มขึ้น



รูปที่ 12 แสดงองค์ประกอบของอุปกรณ์ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ ก่อนผสมกับวัสดุพาหะ (Micro production unit)

นอกจากนี้สิ่งสำคัญในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมคือ จะต้องมีการควบคุมคุณภาพของหัวเชื้อเพื่อให้ได้ประโยชน์และประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเกษตรกรนำไปใช้ การควบคุมคุณภาพจะต้องคำนึงถึงปริมาณของเชื้อไรโซเบียมที่มีชีวิตอยู่ และไม่ต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ เช่น จะต้องมีปริมาณเชื้อในพีทที่เมื่อนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วแล้วจะต้องมีปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 10^3 เซลล์สำหรับถั่วขนาดเล็ก เช่น ถั่วอาหารสัตว์ หรือมีไม่ต่ำกว่า 10^4 เซลล์ สำหรับถั่วขนาดกลาง เช่น ถั่วเขียว และจะต้องมีปริมาณเชื้อไม่ต่ำกว่า 10^5 เซลล์ สำหรับถั่วขนาดใหญ่ เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น (Deaker et al., 2004) นอกจากนี้จะต้องควบคุมคุณภาพไม่ให้มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่เป็นอันตรายต่อไรโซเบียมหรือเป็นโรคพืชปนเปื้อนอยู่ในหัวเชื้อ และที่สำคัญจะต้องมีการบอกถึงวันหมดอายุบนถุงที่ใช้บรรจุด้วย

เอกสารอ้างอิง

นันทกร บุญเกิด. 2529. **คู่มือการใช้เชื้อไรโซเบียม**. กรมวิชาการการเกษตร. กรุงเทพมหานคร.

สมศักดิ์ วังใน. 2541. **การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม – พืชตระกูลถั่ว.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

หนึ่ง เตียอำรุง และ นันทกร บุญเกิด. 2539. ความสัมพนธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วในเชิงพันธุกรรมระดับโมเลกุล. **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี**. 3: 15-20.

Alexander, M. 1977**. Introduction to soil microbiology**. John Wiley and Son, Inc., NY.

Brick, M.A. 1999. Legume seed inoculants. Colorado State Cooperative Extension. http://gopher.colostate.edu/Depts/CoopExt/PUBS/CROPS/00305.html

Chenn, P. 1999. Micro-organisms in Agriculture. **Biological Sciences Review**, (11): 2-4.

Deaker, R., Roughley, R.J. and Kennedy, I.R. 2004. Legume seed inoculation Technology – a review. **Soil Biology & Biochemistry**. 36: 1275-1288.

Indge, B. 2000. The Nitrogen Cycle**. Biological Sciences Review**. 13: 25-27.

Moat, A.G. and Foster, J.W. 1995. **Microbial physiology**. Wiley – Liss, Inc., NY.

Moran, R. 1997. The Little Nitrogen Factories. **Biological Sciences Review**. 10: 2-6.

Sahgal, M. and Johri, B.N. 2003. The changing face of rhizobial systematics. **Current Science**. 84(1): 43-48.

Singleton, P., Keyser, H. and Sande, E. 2001. Development and evaluation of liquid inoculants. *In* **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Herridge, D. (ed.), Vietnam.

Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1994. **Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Edwards Brothers, Inc., USA.

www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/publicat/gutt-shel/x5556e0g.

www.microbiologyonline.org.uk

www.microbiologyonline.org.uk