บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการศึกษาปริมาณเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียและกิจกรรมการย่อยสลายแร่ซิลิเกต

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการทดลองในกระถางเพื่อศึกษาผลการตอบสนองของสตรอเบอรี่ที่ปลูกในดินที่มีแร่ไมก้าเป็นองค์ประกอบต่อการใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย

3.1 การหาปริมาณและกิจกรรมของเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียในดินจากแหล่งปลูกสตรอเบอรี่และในหัวเชื้อ

หาปริมาณเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียในดินจากแหล่งปลูกสตรอเบอรี่ในอำเภอสะเมิง โดยใช้ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลองปลูกพืชในกระถาง และใช้การหาปริมาณเชื้อแบบ spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฟลด์สปาร์เป็นแหล่งของธาตุโพแทสเซียมซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ yeast extract 0.5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, sucrose 5 g, $CaCO_3$ 0.1 g, Na_2HPO_4 2 g, $FeCl_3.6H_2O$ 0.005 g, feldspar 3 g และ agar 15 g ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.2 และผสมสี Bromthymol blue 5 ml ;ใช้ Bromothymol blue 0.5 g ละลายใน ethanol 50 ml (Hebei Academy of Science, 1996) เพื่อใช้เป็นดัชนีในการวัดความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อจุลินทรีย์โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองเมื่อมีสภาพเป็นกรด เนื่องจากเฟลด์สปาร์เป็นสินแร่ที่ไม่ละลายน้ำดังนั้นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการเท plate จึงใช้วิธีการชั่งเฟลด์สปาร์ในปริมาณที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน เพื่อให้อาหารในจานเพาะเชื้อแต่ละจาน มีปริมาณเฟลด์สปาร์เท่ากัน และในการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นต้องปรับ pH ก่อนการใส่วุ้น (agar) และก่อนปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากใส่วุ้นแล้วต้มวุ้นให้ละลาย เทอาหารใส่ flask ขนาด 50 ml จำนวน 15 ml ที่มีแร่เฟลด์สปาร์ใส่เตรียมไว้ ปิดจุกให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^0C ภายใต้ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปเทใส่จานเพาะเชื้อ ที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 180 ^0C นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 1 flask ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณเชื้อแบบ spread plate (Supanwong และคณะ,1994)

ชั่งตัวอย่างดิน 10 g ใส่ในขวดที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 95 ml เขย่าเป็นเวลา 15 นาที เจือจาง soil suspension ที่ได้ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ $10^{-2} – 10^{-6}$ ในการหาปริมาณเชื้อแบบ spread plate ใช้ soil suspension ที่มีความเข้มข้น $10^{-3} – 10^{-6}$ dilution ละ 0.1 ml ต่อจานเพาะเชื้อ 1 จาน โดยหยด soil suspension แต่ละความเข้มข้นลงบนอาหาร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล รอให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ ใช้ paraffin film ปิดทับที่ขอบจานเพาะเชื้อให้เรียบร้อย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน นับปริมาณซิลิเกตแบคทีเรียที่ละลายแร่เฟลด์สปาร์ โดยนับปริมาณโคโลนีทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฟลด์สปาร์เป็นส่วนผสม และแยกเชื้อแบคทีเรียจากขนาด สี และลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน และนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้ loop แตะเชื้อในโคโลนีแต่ละโคโลนีมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ KH_2PO_4 2 g แทนแร่เฟลด์สปาร์ แล้วจึงเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ไว้ใน slant agar medium เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการปลดปล่อยโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์หรือไมก้าต่อไป

จากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อคำนวณปริมาณเชื้อจากสูตรดังนี้

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินแห้ง 1 g ที่สามารถละลายแร่เฟลด์สปาร์ (cfu /g)

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนี x dilution factor}}{0.1}$$

3.1.2 การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์และไมก้าของเชื้อจุลินทรีย์ silicate bacteria

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์และไมก้าของเชื้อแบคทีเรีย isolate ต่างๆ ประกอบด้วยการทดลอง 4 การทดลองแต่ละการทดลองใช้แร่เพียง 1 ชนิด การทดลองแรกใช้แร่เฟลด์สปาร์ที่ได้จากบริษัทเชอร์มาท การทดลองที่สองใช้แร่เฟลด์สปาร์ที่ได้จากจังหวัดลำปางเป็นแหล่งของโพแทสเซียม ส่วนการทดลองที่สามและสี่ใช้แร่ไมก้าที่ได้จากอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับปริมาณของ K ในสินแร่แต่ละชนิดมีดังนี้ แร่เฟลด์สปาร์ของบริษัทเชอร์มาท 5.33 % แร่เฟลด์สปาร์จากจังหวัดลำปาง 6.75 % แร่ไมก้าที่ได้จากอำเภอแม่แจ่ม ตัวอย่างที่ 1 9.52 % และแร่ไมก้าที่ได้จากอำเภอแม่แจ่ม ตัวอย่างที่ 2 4.43 % อาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 การทดลองมีองค์ประกอบเหมือนกัน (และเป็นอาหารเหลวที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่แนะนำโดย Institute of Microbiology Hebei Academy of Sciences ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน) ในการใส่แร่ซิลิเกตแต่ละประเภทลงในอาหารเหลวจะใช้สินแร่แต่ละชนิดในอัตราที่ให้ K 570 μg/ml ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองแต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ สุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 3 ซ้ำ และ 7 ตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1 เชื้อพื้นเมืองบ้านบ่อแก้ว อ.สะเมิง 1

ตำรับที่ 2 เชื้อพื้นเมืองบ้านบ่อแก้ว อ.สะเมิง 2

ตำรับที่ 3 เชื้อพื้นเมืองบ้านบ่อแก้ว อ.สะเมิง 3

ตำรับที่ 4 เชื้อประเทศจีนที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเป็นการค้า 1

ตำรับที่ 5 เชื้อประเทศจีนที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเป็นการค้า 2

ตำรับที่ 6 เชื้อห้วยจุมปา อ. ฮอด 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีประสิทธิภาพดีและใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

ตำรับที่ 7 control ไม่มีการใส่เชื้อ

ในการทดลองแต่ละตำรับจะใช้อาหารเหลวที่ใส่สินแร่ซิลิเกตแต่ละชนิดเป็นแหล่งของโพแทสเซียม จำนวน 25 ml/flask และชั่งสินแร่ใส่ลงไปใน flask แต่ละใบในปริมาณที่ให้ K 0.57 gK/L เตรียม stock ของเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละ isolate ใน nutrient broth (Atlas, 1993) จนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10^9 cfu/ml ก่อนการใส่หัวเชื้อลงไปในอาหารเหลวที่มีสินแร่ซิลิเกตเป็นองค์ประกอบ ปรับความเข้มข้นของเซลล์ใน stock ให้เป็น 10^7 cfu/ml โดยการเจือจางด้วย nutrient broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้ stock ที่เจือจางแล้วใส่ลงไปในอาหารเหลวที่มีสินแร่ซิลิเกตแต่ละชนิดในปริมาณ 1 ml ตลอดช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว จะเขย่า flask ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 rpm เก็บข้อมูลด้าน pH ปริมาณเชื้อในอาหารเหลว และปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้ ที่ระยะ 3 , 6 และ 9 วัน หลังการใส่เชื้อ และปริมาณ (Si) ในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังหาปริมาณซิลิกอน (Si) ที่ละลายได้ในอาหารเหลวที่ระยะ 9 วันหลังการใส่เชื้ออีกด้วย ในการหาปริมาณเชื้อใช้วิธีการ drop plate (Supanwong และคณะ, 1994) และหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้ใช้ flame photometer และใช้วิธีการหา Si โดยวิธี yellow silicomolybdic acid (Govett, 1961 อ้างโดย Jones และคณะ, 1996) โดยใช้ Light absorption spectrometry ใช้กับสารละลายที่มี Si เข้มข้น 2 – 8 mg/L และทำการวิเคราะห์หา Indole-3-acetic acid (IAA) (Gordon และคณะ, 1951) โดยการเลี้ยงเชื้อ silicate bacteria ในอาหารเหลวเช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ใช้วิธีการเขี่ยเชื้อมา 1 loop แล้วใส่ flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่เฟลด์สปาร์และไมก้าอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำ stock เชื้อก่อน และอาหารเลี้ยงเชื้อมีการใส่ tryptophan 0.102 g/L เพิ่มลงไป โดยเลี้ยงเชื้อไว้ประมาณ 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำมา drop plate แล้ว centrifuge โดยใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หา IAA โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

การหาปริมาณเชื้อโดยวิธีการ drop plate (Supanwong และคณะ,1994)

ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายจากอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อจนครบกำหนด 3, 6 และ 9 วัน มา 1 ml ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml เพื่อเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^{-1} หลังจากนั้นเจือจางต่อโดยวิธีการเดียวกันจนถึง 10^{-7} ดูดสารละลายจาก dilution ที่ 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} และ 10^{-4} มา dilution ละ 0.02 ml หยดลงบนอาหารและใช้ dilution ละ 2 ซ้ำ รอให้สารละลายซึมลงในอาหารแข็งจนหมดจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ ปิด paraffin film ที่ขอบจานเพาะเชื้อ แล้ว incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีโคโลนีของเชื้อปรากฏอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงหาปริมาณเชื้อจากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแล้วบันทึกผล

การหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้โดยใช้ flame photometer

เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจนครบกำหนด 3, 6 และ 9 วัน เมื่อนำไปทำ drop plate แล้วจึงนำไป centrifuge หรือกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายส่วนที่ใสมา 1 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร แล้วจึงนำไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้โดยใช้ flame photometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 nm

ความเข้มข้นของโพแทสเซียมจะเตรียม standard K ที่มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 μgK/ml โดยใช้ volumetric pipette ดูด standard 100 μgK/ml จำนวน 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่แร่ซิลิเกตหรือ KH_2PO_4 เพื่อเป็นแหล่งของโพแทสเซียมจำนวน 1 ml สำหรับทุกความเข้มข้น ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง flame photometer ความยาวคลื่น 766.5 nm ที่ slit width เท่ากับ 0.7 nm และที่ energy อยู่ในช่วง 66-70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การทดลองปลูกพืชในกระถาง

ทดลองปลูกพืชในกระถางในช่วงเดือนตุลาคม 2545 - มีนาคม 2546 โดยใช้พื้นที่ของ นายวิรัตน์ ศรีสุภา ซึ่งเป็นเกษตรกรที่ปลูกสตรอเบอรี่ บ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นพื้นที่ทดลอง สตรอเบอรี่ที่ใช้ปลูกเป็นสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 50 กระถางที่ใช้ปลูก มีขนาดบรรจุดินได้ 10 kg/pot ใช้ดินจากพื้นที่ของ นายวิรัตน์ ในการปลูก โดยเก็บดินจากพื้นที่ ซึ่งไม่เคยปลูกสตรอเบอรี่มาก่อนในระดับความลึก 0 - 25 cm ก่อนการทดลองคลุกเคล้าดินให้เข้า กันดี ใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block ประกอบด้วยตำรับการทดลอง 3 ตำรับ ตำรับละ 25 ซ้ำ ในแต่ละ block ใช้ไหลสตรอเบอรี่ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน ตำรับการทดลองแรกเป็นตำรับควบคุมซึ่งไม่มีการใส่ปุ๋ยและไม่ใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย ตำรับการทดลองที่สองมีการใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียในอัตราแนะนำ คือ 1.5 g/pot (50 kg/rai) ตำรับการทดลองที่สามมีการใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียในอัตราแนะนำร่วมกับการใส่ปุ๋ยหมักใน อัตรา 2 T/rai ทุกตำรับได้รับการใส่ปุ๋ยยูเรียตลอดฤดูปลูกในอัตรา 12 kg/rai โดยใส่ปุ๋ยยูเรีย เดือนละ 1 ครั้ง มีการให้น้ำแบบ sprinkle สำหรับหัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็น หัวเชื้อที่ Institute of Microbiology, Hebei Academy of Science ประเทศสาธารณรัฐ ประชาชนจีนผลิตเป็นการค้า โดยมีเชื้อ *Bacillus circulans* ในปริมาณไม่ต่ำกว่า 10^8 cfu/g ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวใช้ peat ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุรองรับเชื้อ เก็บข้อมูลสมบัติบางประการของ ดินก่อนปลูก ได้แก่ pH ปริมาณอินทรีย์วัตถุ available P exchangeable K และปริมาณของ เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียในดิน ส่วนข้อมูลด้านพืชที่บันทึกได้แก่ จำนวนใบ ขนาดทรงพุ่ม จำนวนดอก และจำนวนผล คุณภาพความหวาน น้ำหนักแห้งและการสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม (ในส่วนเหนือดินที่ระยะ 2 เดือนหลังปลูก) และความเข้มข้นของ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในใบอ่อนที่คลี่เต็มที่ และผลผลิตผลสดในช่วง 3 เดือนหลังปลูกซึ่ง เป็นช่วงที่สตรอเบอรี่ให้ผลผลิตสูงสุด

วิธีการวิเคราะห์ดินและพืชแสดงไว้ในตารางที่ 6, 7 และในภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 วิธีวิเคราะห์สมบัติบางประการของดินก่อนปลูก

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
pH	ดิน : น้ำ 1 : 1 pH วัดด้วย meter	เนาวรัตน์, 2527
Organic matter	Walkley & Black	Nelson และ Somners, 1996
Available P	สกัดด้วย Bray II พัฒนาสีด้วย ammonium molybdate,antimony potassium tartrate, ascorbic acid วัดด้วยเครื่องspectrophotometer	Houba *et* al., 1988b
Exchangeable K	สกัดด้วย 1 M NH_4OAc pH 7.0 วัดโดย Flame photometer	Helmke และ Sparks, 1996

ตารางที่ 7 วิธีการวิเคราะห์พืช

วิเคราะห์	วิธีการหาความเข้มข้น	เอกสารอ้างอิง
total N	โดยการกลั่นด้วย NaOH 40%	Bremner, 1996
tatal P	พัฒนาสีด้วย ammonium vanado phospho molybdateวัดด้วยเครื่องspectrophotometer	ศรีสม, 2544
total K	Flame photometer	Helmke และ Sparke, 1996
คุณภาพความหวาน	วัดด้วยเครื่อง hand refract meter	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved