บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองดำเนินการ ณ ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ และสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนโดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนตามธรรมชาติบริเวณรอบรากพืชจากแหล่งปลูกข้าว ข้าวโพด และ อ้อย บริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งการเกษตรกรรมที่สำคัญของประเทศ

3.1.2 การแยกเชื้อและศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาแยกหาเชื้อโดยวิธีเจือจาง (dilution plating technique) โดยชั่งตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 95 มล. เป็น dilution ที่ 1 (10^{-1}) เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเจือจางโดยใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายดิน 1 มล. ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มล. เป็น dilution ที่ 2 (10^{-2}) ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} จากนั้นดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 0.2 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร สำหรับ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* medium (N-free medium) (Atlas,1993) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วลนไฟ รอให้แท่งแก้วเย็น แล้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate) ส่วนเชื้อ *Azospirillum* sp. ใช้รากที่ล้างดินออกแล้ววางบนอาหารสำหรับ *Azospirillum* medium (Atlas,1993) ซึ่งเป็นอาหาร semi-solid หาปริมาณเชื้อด้วยวิธี Most Probable Number : MPN (Hall,1996) โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนับปริมาณและเก็บรวบรวมเชื้อที่เจริญบนอาหารแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate แล้วเก็บไว้บนอาหารเอียง (slant agar) เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Azotobacter Modified II medium (Atlas,1993)

Sucrose	20.0 g
KH_2PO_4	0.15 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20 g
K_2HPO_4	0.05 g
Na_2MoO_4	2.0 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1.0 mg
$FeCl_3$	1.0 mg
$CaCl_2$	0.02 g

pH 6.2 $\pm$ 0.2

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.2 $\pm$ 0.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ในการเตรียมอาหารวุ้นให้ใส่ agar 15 g หลังจากปรับ pH)

2. *Beijerinckia* medium (Atlas,1993)

Glucose	10.0 g
KH_2PO_4	0.45 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20 g
K_2HPO_4	0.05 g

pH 5.0 $\pm$ 0.2

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.0 $\pm$ 0.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ในการเตรียมอาหารวุ้นให้ใส่ agar 15 g หลังจากปรับ pH)

3. Azospirillum medium (Atlas,1993)

DL-malic acid	5.0 g
Yeast extract	0.1 g
KH_2PO_4	0.1 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
NaOH	4.7 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$FeCl_3.6H_2O$	1.0 g
$CaCl_2$	0.02 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.002 g

pH 6.8 $\pm$ 0.2

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 $\pm$ 0.2 ใส่ 0.5% alcoholic bromthymol blue 2 ml เพื่อเป็น indicator ใส่ agar 1.75 g ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.1.3 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

3.1.3.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml. ในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ในอาหารชนิดนี้จะได้ไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น การเปรียบเทียบใช้วิธีวัดความขุ่น (optical density) โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ wave length 550 nm

3.1.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 3.1.3.1 อีกครั้งโดยการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Weaver and Danso (1994) โดยชื้อแบคทีเรียในอาหารเอียงบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดึงอากาศในหลอดออก 10% แล้วใส่ก๊าซ acetylene (C_2H_2) เข้าไปแทนที่ บ่มก๊าซไว้นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านค่าของ ethylene (C_2H_4) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา reduction โดยใช้ Gas Chromatography (GC) ยี่ห้อ Shimadza รุ่น GC-14B ที่ใช้ flame ionization detector (FID) เป็นเครื่องวิเคราะห์ โดยคัดเลือกจากเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนก๊าซ acetylene (C_2H_2) ให้เป็น ethylene (C_2H_4) โดยดูจากพื้นที่ใต้กราฟของข้อมูลที่อ่านได้จากเครื่อง GC เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในแต่ละกลุ่ม

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในกระบวนการผลิตปุ๋ย

ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วจากการทดลอง 3.1.3 โดยการบ่มด้วยเชื้อ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Azospirillu*m มาอย่างละ 1 isolate ปลูกเชื้อลงในปุ๋ยหมักที่ปรับความชื้นเป็น 2 ระดับ คือ 60% และ 80% WHC โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารใส่เชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 cfu/g dwtของปุ๋ยหมัก แบ่งออกเป็น ใส่เชื้อเดี่ยว ใส่รวมกัน 2 เชื้อ และใส่รวมกัน 3 เชื้อ บ่มทิ้งไว้แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาไนโตรเจน การเปลี่ยนแปลง pH และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณการตรึงไนโตรเจนทุก 2 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ โดยการการทดลองประกอบด้วย 8 ตำรับการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองตำรับละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับที่1. ปุ๋ยหมัก + NAB012

ตำรับที่2. ปุ๋ยหมัก + NBJ007

ตำรับที่3. ปุ๋ยหมัก + CAZS022

ตำรับที่4. ปุ๋ยหมัก + NAB012 + NBJ007

ตำรับที่5. ปุ๋ยหมัก + NAB012 + CAZS022

ตำรับที่6. ปุ๋ยหมัก + NBJ007 + CAZS022

ตำรับที่7. ปุ๋ยหมัก + NAB012 + NBJ007 + CAZS022

ตำรับที่8. ปุ๋ยหมัก

โดย NAB , NBJ และ CAZS เป็นจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนกลุ่ม *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Azospirillu*m ตามลำดับ

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ในกระบวนการผลิตปุ๋ย

การทดลองนี้เป็นการทดสอบปุ๋ยที่มีการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดเข้าด้วยกันคือ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสฟอรัส และ จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโพแทสเซียม ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในการปลดปล่อยธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช จากผลการศึกษาความอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในปุ๋ยหมักมีปริมาณน้อย (การทดลอง 3.2) ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากปริมาณสารประกอบคาร์บอนที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยหมักไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการเพิ่มกากน้ำตาล (molasses) ลงไปในปุ๋ยหมัก เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของปุ๋ยหมักและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลังบ่มเป็นระยะๆ รวมทั้งทำการวิจัยเพิ่มเติมในส่วนของการเพิ่มธาตุโพแทสเซียม โดยใช้แร่เฟลด์สปาร์และจุลินทรีย์ย่อยละลายแร่เพื่อปลดปล่อยโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ที่ได้จากงานวิจัยในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยละลายแร่เพื่อปลดปล่อยโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ของปิยะมาศ (2546) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำไปใช้หมักปุ๋ยในปริมาณมากในการใช้ศึกษาการตอบสนองของพืชกับปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ที่ผลิตได้ต่อไป โดยทำการทดลองเพื่อศึกษา ผลของน้ำตาลในปุ๋ยหมักที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจากการบ่มจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1) จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนประกอบด้วย *Azotobacter* , *Azospirillum* และ *Beijerinckia*

2) จุลินทรีย์ย่อยสลายหินฟอสเฟต

3) จุลินทรีย์ย่อยสลายแร่เฟลด์สปาร์

ในปุ๋ยหมักที่มี N = 0.47 % , P = 0.26 % , K = 0.09 % และ pH = 6.13 โดยใส่ molasses 30 กรัมต่อกิโลกรัม (อัตราที่เทียบได้กับการใช้น้ำตาล sucrose ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป) แบ่งวัสดุออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}C นาน 60 นาที ก่อนใส่เชื้อจุลิน ทรีย์ลงไปบ่ม ส่วนที่ 2 ไม่นึ่งฆ่าเชื้อโดยมีตำรับการทดลองตามตารางที่ 39 ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากบ่มนาน 2 และ 4 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์หาอัตราการตรึงไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ พร้อมทั้งตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม โดยการทดลองประกอบด้วย 14 ตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1 ปุ๋ยหมัก+molasses+NAB012+NBJ007+CAZS022

ตำรับที่ 2. ปุ๋ยหมัก+molasses+NEPS033+NEPS065

ตำรับที่ 3. ปุ๋ยหมัก+molasses+NAB012+NBJ007+CAZS022 +NEPS033+NEPS065

ตำรับที่ 4. ปุ๋ยหมัก+*molasses*+*bacillus*

ตำรับที่ 5. ปุ๋ยหมัก+*molasses*+*bacillus*+$NaNO_3$

ตำรับที่ 6. ปุ๋ยหมัก+molasses+$NaNO_3$

ตำรับที่ 7. ปุ๋ยหมัก+ molasses

ตำรับที่ 8. ปุ๋ยหมัก+NAB012+NBJ007+CAZS022

ตำรับที่ 9. ปุ๋ยหมัก+NEPS033+NEPS065

ตำรับที่ 10. ปุ๋ยหมัก+NAB012+NBJ007+CAZS022 +NEPS033+NEPS065

ตำรับที่ 11. ปุ๋ยหมัก+*bacillus*

ตำรับที่ 12. ปุ๋ยหมัก+*bacillus*+$NaNO_3$

ตำรับที่ 13. ปุ๋ยหมัก+$NaNO_3$

ตำรับที่ 14. ปุ๋ยหมัก

โดย NAB012, NBJ007 และ CAZS022 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน , NEPS033 และ NEPS065 เป็นเชื้อราย่อยหินฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 ทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยต่อการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจได้แก่ ข้าว ข้าวโพด และอ้อย ในกระถาง

หลังจากได้ตำรับที่ดีที่สุดในการทดลอง 3.3 แล้ว นำตำรับการทดลองดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยต่อการเจริญเติบโตของพืช 3 ชนิดคือ ข้าว ข้าวโพด และอ้อย โดยทำการทดลอง ณ สถานีทดลองและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในโรงเรือนพลาสติก โดยใช้ดินที่มีคุณสมบัติของดินก่อนปลูกคือ P = 3.59 ppm และ K = 35.17 ppm โดยออกแบบการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) มี 3 ซ้ำ โดยการทดลองประกอบด้วย 10 ตำรับการทดลองดังนี้

3.4.1 ข้าว

ปลูกข้าวในกระถางทดลอง โดยใช้ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ปลูกในกระถางที่บรรจุดิน 15 กิโลกรัม ประกอบด้วยตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 2 ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 3. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 4. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 5. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 6.ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 7. ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 16 – 16 – 8

ตำรับที่ 8. ปุ๋ยแกลบ

ตำรับที่ 9. แหนแดง+ปุ๋ยเคมี

ตำรับที่ 10. Control

โดยปุ๋ยเคมีที่ใส่ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ ใส่ให้มีปริมาณ N–P–K เท่าปุ๋ยเคมีเกรด 16–16–8 กิโลกรัม $N–P_2O_5–K_2O$ / ไร่ อัตรา 35 กิโลกรัมต่อไร่ โดยคำนวณร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์

3.4.2 ข้าวโพด

ปลูกข้าวโพดในกระถางทดลอง โดยใช้ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 ปลูกในกระถางที่บรรจุดิน 20 กิโลกรัม ประกอบด้วยตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 2 ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 3. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตำรับที่ 4. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 5. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 6.ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 7. ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 10 – 10 – 5

ตำรับที่ 8. ปุ๋ยแกลบ

ตำรับที่ 9. แหนแดง+ปุ๋ยเคมี

ตำรับที่ 10. Control

โดยปุ๋ยเคมีที่ใส่ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ ใส่ให้มีปริมาณ N–P–K เท่าปุ๋ยเคมีเกรด 10–10–5 กิโลกรัม $N – P_2O_5 – K_2O$ / ไร่ อัตรา 35 กิโลกรัมต่อไร่ โดยคำนวณร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์

3.4.3 อ้อย

ปลูกอ้อยในกระถางทดลอง โดยปลูกอ้อยในกระถางที่บรรจุดิน 20 กิโลกรัม ประกอบด้วยตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 2 ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 3. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 4. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 5. ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่+ปุ๋ยเคมี N – P – K

ตำรับที่ 6.ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1,500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับที่ 7. ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 12 – 12 – 12

ตำรับที่ 8. ปุ๋ยแกลบ

ตำรับที่ 9. แหนแดง+ปุ๋ยเคมี

ตำรับที่ 10. Control

โดยปุ๋ยเคมีที่ใส่ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ ใส่ให้มีปริมาณ N–P–K เท่าปุ๋ยเคมีเกรด 12–12–12 กิโลกรัม $N – P_2O_5 – K_2O$ / ไร่ อัตรา 35 กิโลกรัมต่อไร่ โดยคำนวณร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชด้านการเจริญเติบโต ปริมาณธาตุอาหารพืช และคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของดินดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเจริญเติบโต

1. ความสูง วัดจากโคนต้นถึงคอใบ
2. น้ำหนักสด
3. น้ำหนักแห้ง

ปริมาณธาตุอาหารพืช

นำตัวอย่างพืชอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช นำตัวอย่างที่บดได้ไปหาปริมาณธาตุอาหารหลักคือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

การย่อยตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างพืชจำนวน 0.5000 กรัม ใส่ในหลอดย่อย เติมกรดย่อยพืช 7 มิลลิลิตร โดยกรดย่อยเตรียมได้จาก ละลาย Na_2SO 100 กรัม กับผง selenium 1 กรัม ในกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปตั้งบนเตาแผ่นความร้อน ที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนสารละลายใส นำสารละลายที่ได้มาหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นพืช

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

วิธีการ

1. ชั่งดินที่ร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร จำนวน 20 กรัมใส่ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
3. ใช้แท่งแก้วคน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

การหาปริมาณเชื้อในดินหลังปลูก

หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี dilution plating technique ใช้อาหารสำหรับ *Azotobacter* , *Beijerinckia* medium (N-free medium) และ *Azospirillum* medium (Atlas,1993) ทำ dilution โดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 95 มล. เป็น dilution ที่ 1 (10^{-1}) เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเจือจางโดยใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายดิน 1 มล. ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มล. เป็น dilution ที่ 2 (10^{-2}) ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 1 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อแล้วแทอาหารที่อุ่นพอประมาณลงไปประมาณ 15 มล. แล้วหมุนจานเพาะเชื้อเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายที่ใส่ลงไปเข้ากันได้ดี ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งจึงปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำมานับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* medium (N-free medium) ส่วนเชื้อ *Azospirillum* sp. ทำโดยดูดสารละลายดินที่ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 1 มล. ใส่ในอาหารสำหรับ *Azospirillum* medium ซึ่งเป็นอาหาร semi-solid ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 9 มล. ใส่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) (Hall,1996) (ภาคผนวก) โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหาร semi-solid จากสีเขียวเป็นสีฟ้า และมีวงแหวนเกิดขึ้นภายในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

การดูแลรักษาระหว่างการทำการทดลอง

1. ให้น้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น
2. กำจัดวัชพืชที่ขึ้นในกระถางทดลอง และบริเวณรอบโรงเรือน

3.5 เปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในปุ๋ยหมัก 2 ชนิด คือ ชนิดผงและชนิดอัดเม็ด

เนื่องมาจากการอัดเม็ดโดยใช้เครื่องอัดเม็ดนั้นจะเกิดความร้อนค่อนข้างสูง ซึ่งอาจมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ จึงได้ทำการทดสอบเพื่อหาความเหมาะสมของการคลุกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพลงในปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ โดยทำการคลุกเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดได้แก่ *Azotobacter*, *Beijerinckia, Azospirillum*, *Bacillus* และ Phosphate solubilizer ลงในปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพในอัตราประมาณ 10^{7} cfu / g dry wt. ก่อนอัดเม็ดและหลังอัดเม็ด เปรียบเทียบกับปุ๋ยที่ไม่ได้อัดเม็ด โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ การทดลองประกอบด้วย 5 ตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1 ปุ๋ยผงไม่คลุกเชื้อ
ตำรับที่ 2 ปุ๋ยอัดเม็ดไม่คลุกเชื้อ
ตำรับที่ 3 ปุ๋ยผงคลุกเชื้อ
ตำรับที่ 4 คลุกเชื้อก่อนอัดเม็ด
ตำรับที่ 5 คลุกเชื้อหลังอัดเม็ด

คลุกเชื้อไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างปุ๋ยหลังคลุกเชื้อทันที และหลังคลุกเชื้อเป็นเวลา 1 , 2 , 3 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved