บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พื้นที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองในศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (Multiple Cropping Center) โรงเรือนทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 การคัดเลือกสูตรวัสดุเพาะกล้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มให้การเจริญเติบโตของพืชผักที่ดี

วัสดุเพาะกล้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปีครึ่ง ซึ่งได้ทำการพัฒนาสูตรวัสดุเพาะกล้าและคัดกรองจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มาได้ (อรวรรณและคณะ, 2552)

3.2.1 คัดเลือกสูตรวัสดุเพาะกล้า

วัสดุเพาะกล้าที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (อรวรรณและคณะ, 2552) ได้ทำการคัดเลือกจากข้อมูลผลการทดลองโดยเลือกสูตรที่ให้ค่าการเจริญเติบโตเฉลี่ยแล้วสูงกว่าสูตรอื่นเมื่อใช้ปลูกทดสอบกับมะเขือเทศ คะน้าฮ่องกงและพริกกะเหรี่ยง โดยมีวัสดุเพาะกล้าที่ใช้เปรียบเทียบ (Control) คือ วัสดุเพาะกล้าตามท้องตลาดคุณภาพสูง (เกรด A)

3.2.2 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (อรวรรณและคณะ, 2552) จำนวน 18 isolates มาคัดกรองต่อในการศึกษาครั้งนี้ให้เหลือเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงที่สุด 3 isolates จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย (Bacteria) และแอคทิโนมัยซีส (Actinomycetes) โดยแบคทีเรียจะทำการคัดกรองจาก 6 isolates ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Azospirillum* 75 (VAs 75), *Azospirillum* 76 (VAs 76) และ*Azospirillum* 87 (VAs 87) โดยคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole-3-acetic acid) ให้เหลือ 1 isolate กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Beijerinckia* 2 (VBe 2), *Beijerinckia* 6 (VBe 6) และ *Beijerinckia* 33 (VBe 33) คัดเลือกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ให้เหลือ 1 isolate และแอคติโนมัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซีททำการคัดกรองจาก 12 isolates ได้แก่ Actinomycetes 006 (VAc 006), Actinomycetes 017 (VAc 017), Actinomycetes 036 (VAc 036), Actinomycetes 051 (VAc 051), Actinomycetes 065 (VAc 065), Actinomycetes 067 (VAc 067), Actinomycetes 068 (VAc 068), Actinomycetes 073 (VAc 073), Actinomycetes 075 (VAc 075), Actinomycetes 077 (VAc 077), Actinomycetes 080 (VAc 080) และ Actinomycetes 081 (VAc 081) โดยคัดเลือกจากความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัส ให้เหลือ 1 isolate

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid

ทำการประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืชของเชื้อ *Azospirillum* ทั้ง 3 isolates โดยทำการวิเคราะห์การผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) การตรวจสอบการผลิต IAA จะเริ่มจากทำการเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* ในอาหาร Nutrient Broth โดยจะเติม L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ IAA ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย หลังจากนั้นจึงทำการ incubate เชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการวัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้นหลังจากการ incubate ตามระยะเวลาต่างๆที่กำหนด ซึ่งจะทำการวัด IAA ที่เกิดขึ้นในสารละลายที่สกัดจาก extra cellular suspension culture ของตัวอย่างเชื้อและตัวอย่างเปรียบเทียบ (control) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 530 nm รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing ability)

ทำการประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Beijerinckia* ทั้ง 3 isolates โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Weaver and Danso (1994) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารกึ่งแข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด เปลี่ยนฝาหลอดทดลองให้เป็นจุกยางเพื่อดูดอากาศภายในหลอดออก 5 % ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ เมื่อดูดอากาศออกแทนที่อากาศด้วยก๊าซ acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านค่าของ Ethylene (C_2H_4) ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากการ reduce ก๊าซ Acetylene (C_2H_2) โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC) ตัวอย่างเชื้อที่สามารถทำให้เกิดก๊าซ Ethylene (C_2H_4) ได้มากจะถือว่ามีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยละลายฟอสฟอรัส

ทำการประเมินศักยภาพการย่อยละลายฟอสฟอรัสในรูป Ca-P และ Al-P ของเชื้อ actinomycetes ทั้ง 12 isolates โดยการเลี้ยงเชื้อ actinomycetes บนอาหาร IMA (ตารางภาคผนวก ก) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว นำเชื้อที่ได้มาวางลงบนอาหาร Aluminum Phosphates และอาหาร Czapek's solution ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเท่ากันประมาณ 0.5 เซนติเมตร incubate เชื้อเป็นเวลา 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นนำมาวัด clear zone โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อก่อนเกิด clear zone หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อหลังเกิด clear zone ตัวอย่างเชื้อที่มีค่า clear zone ratio สูงที่สุด ถือว่ามีศักยภาพในการย่อยละลายฟอสฟอรัสได้ดีที่สุด

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุเพาะกล้าร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ทำการคัดเลือก

3.3.1 การวิเคราะห์คุณภาพของวัสดุเพาะกล้า

ทำการวิเคราะห์คุณภาพของวัสดุเพาะกล้าที่คัดเลือกมาได้ เพื่อให้ทราบคุณสมบัติทางเคมีก่อนนำวัสดุเพาะกล้าไปทดสอบร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH), เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ (%OM), ไนโตรเจนทั้งหมด (% Total N), ฟอสฟอรัสทั้งหมด (% P_2O_5), โพแทสเซียมทั้งหมด (% K_2O), แคลเซียมทั้งหมด (% Ca) และแมกนีเซียมทั้งหมด (% Mg) ของวัสดุเพาะกล้าทั้ง 4 สูตรและวัสดุเพาะกล้าตามท้องตลาด ซึ่งได้แก่

1. วัสดุเพาะกล้าตามท้องตลาด
2. สูตร 1: ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว
3. สูตร 2: ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว+ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด+แกลบดำ 5%
4. สูตร 3: ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว+ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด+Vermiculite 5%
5. สูตร 4: ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว+ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด+แกลบดำ 2.5% +Vermiculite2.5%

วิธีวิเคราะห์มีรายละเอียดโดยย่อดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติเคมีของปุ๋ยหมัก

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
pH	ปุ๋ยหมัก:น้ำ อัตราส่วน 1:10 วัดด้วย pH meter	กรมวิชาการเกษตร, 2541
EC	ปุ๋ยหมัก:น้ำ อัตราส่วน 1:10 วัดด้วยเครื่อง conductivity meter	กรมวิชาการเกษตร, 2541
Organic matter (OM)	ชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักประมาณ 0.1000 กรัม เติม 1 N $K_2Cr_2O_7$ 10 มล. และ H_2SO_4 10 มล. เพื่อเร่งปฏิกิริยา ทิ้งไว้ข้ามคืน เติมน้ำกลั่น 100 ml. ไตเตรทด้วย $FeSO_4.7H_2O$ โดยใช้ O-phenanthroline ferrous 10 หยดเป็น indicator	กรมวิชาการเกษตร, 2541

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติเคมีของปุ๋ยหมัก (ต่อ)

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
Total N	ชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักประมาณ 0.2000 กรัม ใช้ sulfuric acid เข้มข้นผสม salicylic acid ย่อยจนละลาย เติม sodiumthiosulphate และ catalyst mixture ย่อยต่อจนสารละลายใสแล้วนำไปกลั่นโดยใช้ boric acid เป็นตัวรับและ titrate ด้วย H_2SO_4 เข้มข้น 0.02 N	กรมวิชาการเกษตร, 2541
Total P	ชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักประมาณ 0.5000 กรัม เติม $HClO_4$ 10 มล. ย่อยที่อุณหภูมิ 240 °C จนใส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่ได้ โดยให้เกิดปฏิกิริยากับ molybdovanadate วัดด้วยเครื่อง UV – Spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร	กรมวิชาการเกษตร, 2541
Total K	ชั่งตัวอย่างปุ๋ยหมักประมาณ 0.5000 กรัม เติม $HClO_4$ 10 มล. ย่อยที่อุณหภูมิ 240 °C จนใส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่ได้ นำไปวัดด้วยเครื่อง *Flame photometer*	กรมวิชาการเกษตร, 2541
Total Ca	ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัด Total K ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	กรมวิชาการเกษตร, 2541
Total Mg	ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัด Total K ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	กรมวิชาการเกษตร, 2541

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 วิธีการเลี้ยงเชื้อและการเตรียมเชื้อก่อนนำไปผสมกับวัสดุเพาะกล้า

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 isolates มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยแยกเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละ isolates ลงบนอาหารเฉพาะ คือ เชื้อ *Azospirillum* เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* (ดังแสดงในภาคผนวก ก) เชื้อ *Beijerinckia* เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Beijerinckia* และเชื้อ

Actinomycetes เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA- 2 โดยวิธีการ streak plate เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 - 7 วัน หรือจนเชื้อเจริญเต็ม plate จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ มาเลี้ยงขยายเชื้อในอาหารเหลว เลี้ยงไว้ประมาณ 3 – 7 วัน ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum Beijerinckia* และ Actinomycetes ในอาหารเหลวเฉพาะจนสังเกตเห็นว่าเชื้อมีความขุ่นแล้ว จึงตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยใช้ Hemacytometer โดยต้องการให้เชื้อมีปริมาณสูงสุดที่ 10^9 เซลล์/มล. เมื่อได้เชื้อตามจำนวนที่ต้องการ (10^9 เซลล์/มล.) แล้วจึงนำไปผสมกับวัสดุเพาะกล้า

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุเพาะกล้าร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ในโรงเรือน

ทดสอบวัสดุเพาะกล้าทั้ง 4 สูตรกับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 isolates ที่คัดเลือกมาได้ โดยใช้วัสดุเพาะกล้าตามท้องตลาดเกรด A เป็นตำรับควบคุม (Control) วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) ทำการทดลองเพาะกล้ามะเขือเทศ และคะน้าฮ่องกง ระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ส่วนพริกกะเหรี่ยง ระหว่างเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ในโรงเรือนหลังคาพลาสติก ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยผสมเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกับวัสดุเพาะกล้าแต่ละสูตรตามกรรมวิธีทดลองให้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัม ใส่ลงในถาดเพาะเมล็ด ทำการเพาะเมล็ดมะเขือเทศ คะน้าฮ่องกง และพริกกะเหรี่ยง แต่ละตำรับ ๆ ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ต้น รดน้ำเช้าและเย็น เมื่อพืชงอกได้ 7 วัน ทำการ inoculate เชื้อจุลินทรีย์ลงไปในวัสดุเพาะกล้าอีกครั้งหนึ่ง ให้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัม ปลูกต่อไปจนครบ 25 วัน ทำการบันทึกความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก นำข้อมูลที่บันทึกได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปแกรม Statistic for Window Version 8 ในการทดลองครั้งนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ชุด

ชุดที่ 1 วัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ผสมเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยว 3 isolates (VAs 87 VBe 33 และ VAc 006) และวัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ที่ไม่ได้ผสมจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับวัสดุตามท้องตลาด รวมเป็น 17 ตำรับการทดลอง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ชุดที่ 2 วัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ผสมเชื้อจุลินทรีย์ผสมสองชนิด (VAs 87 + VBe 33, VBe 33 + VAc 006 และ VAs 87 + VAc 006) และวัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ที่ไม่ได้ผสมจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับวัสดุตามท้องตลาด รวมเป็น 17 ตำรับการทดลอง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ชุดที่ 3 วัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ผสมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้งสามชนิดร่วมกัน (VAs 87 + VBe 33 + VAc 006) และวัสดุเพาะกล้า 4 สูตร ที่ไม่ได้ผสมจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับวัสดุตามท้องตลาด รวมเป็น 9 ตำรับการทดลอง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 รายละเอียดสูตรวัสดุเพาะกล้าผสมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว

ตำรับ	รายละเอียดกรรมวิธี
1	วัสดุตามท้องตลาด (ตำรับควบคุม)
2	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว
3	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v)
4	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v)
5	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v)+ vermiculite 2.5%(v/v)
6	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Azospirillum*
7	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Beijerinckia*
8	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ actinomycetes
9	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v)+ เชื้อ *Azospirillum*
10	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia*
11	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ actinomycetes
12	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum*
13	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia*
14	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ actinomycetes
15	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum*
16	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia*
17	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ actinomycetes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 รายละเอียดสูตรวัสดุเพาะกล้าผสมเชื้อจุลินทรีย์ผสมสองชนิด

ตำรับ	รายละเอียดกรรมวิธี
1	วัสดุตามท้องตลาด (ตำรับควบคุม)
2	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว
3	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v)
4	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v)
5	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v)+ vermiculite 2.5%(v/v)
6	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia*
7	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
8	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ actinomycetes
9	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia*
10	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
11	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ actinomycetes
12	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia*
13	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
14	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ actinomycetes
15	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia*
16	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
17	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ actinomycetes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 รายละเอียดสูตรวัสดุเพาะกล้าผสมเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามชนิด

ตำรับ	รายละเอียดกรรมวิธี
1	วัสดุตามท้องตลาด (ตำรับควบคุม)
2	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว
3	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v)
4	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v)
5	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v)+ vermiculite 2.5%(v/v)
6	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
7	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
8	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + vermiculite 5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes
9	ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + ปุ๋ยหมักวัสดุเหลือจากการเพาะเห็ด + แกลบดำ 2.5%(v/v) + vermiculite 2.5%(v/v) + เชื้อ *Azospirillum* + เชื้อ *Beijerinckia* + เชื้อ actinomycetes

3.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุเพาะกล้าร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ในแปลง

ทำการคัดเลือกวัสดุเพาะกล้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองชุดที่ 1, 2 และ 3 มาใช้เพาะกล้าแล้วย้ายปลูกทดลองต่อในแปลง เพื่อประเมินศักยภาพของวัสดุเพาะกล้าและเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพธรรมชาติ โดยใช้คะน้าเป็นพืชทดสอบ เนื่องจากคะน้าเป็นพืชที่มีระยะเวลาการเก็บเกี่ยวสั้นกว่ามะเขือเทศและพริกกะเหรี่ยง อีกทั้งมีการจัดการดูแลรักษาได้ง่ายกว่า ดำเนินการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยใช้แปลงปลูกพืชอินทรีย์เป็นแปลงทดสอบ

3.3.4.1 การปลูกพืช

ทดสอบวัสดุเพาะกล้ากับเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาได้ วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) ผสมเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อกับวัสดุเพาะกล้าสูตรที่ให้ผลดีที่สุดจากการปลูกทดสอบต้นกล้าในโรงเรือน โดยให้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัม ใส่ลงในถาดเพาะเมล็ด ทำการเพาะเมล็ดคะน้า แต่ละตำรับ ๆ ละ 3 ซ้ำ ในถาดเพาะเมล็ด รดน้ำเช้าและเย็น เมื่อพืชงอกได้ 7 วัน ทำการ inoculate เชื้อจุลินทรีย์ลงไปในวัสดุเพาะกล้าอีกครั้งหนึ่ง ให้มีปริมาณเชื้อจำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัม ปลูกต่อไปจนครบ 25 วัน หลังจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นั้นย้ายกล้าคะน้าปลูกลงแปลงปฏิบัติการ ใน 1 แปลงใช้พื้นที่ขนาด 1.0 x 6.0 ตารางเมตร ปลูกคะน้าที่ระยะปลูก 20 x 20 เซนติเมตร โดยมีตำรับการทดลองดังนี้

1. หว่านเมล็ดโดยไม่เพาะกล้า
2. วัสดุเพาะกล้าตามท้องตลาดเกรด A (ตำรับควบคุม (Control))
3. วัสดุเพาะกล้าไม่ผสมเชื้อจุลินทรีย์
4. วัสดุเพาะกล้า + เชื้อจุลินทรีย์เดี่ยว
5. วัสดุเพาะกล้า + เชื้อจุลินทรีย์ผสมสองชนิด
6. วัสดุเพาะกล้า + เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามชนิด

3.3.4.2 การเก็บข้อมูล

1. การเก็บข้อมูลทางด้านคุณสมบัติของดิน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในแปลงก่อนปลูกพืช ที่ระดับความลึก 0 – 10 เซนติเมตร นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีโดยผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งในที่ร่ม หลังจากนั้นนำไปบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 0.5 และ 2.0 มิลลิเมตร วิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของดิน ได้แก่ ปฏิกิริยาดิน (pH) ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (electrical conductivity) ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (total N) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) โพแทสเซียมที่สกัดได้ (extractable K) แคลเซียมที่สกัดได้ (extractable Ca) และแมกนีเซียมที่สกัดได้ (extractable Mg) วิธีวิเคราะห์มีรายละเอียดโดยย่อดังตารางที่ 5

2. การเก็บข้อมูลพืช

ทำการสุ่มเก็บผลผลิตคะน้าในแปลงเมื่ออายุครบ 45 วัน จำนวน 15 ต้นต่อซ้ำต่อตำรับการทดลอง วัดความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักต้นสด น้ำหนักรากสด น้ำหนักต้นแห้ง และน้ำหนักรากแห้ง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปแกรม Statistic for Window Version 8

ตารางที่ 5 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติดิน

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
pH	ดิน:น้ำ อัตราส่วน 1:1 วัดด้วย pH meter	Rhoades, 1982
EC	ดิน:น้ำ อัตราส่วน 1:5 วัดด้วย conductivity meter	เนาวรัตน์, 2527

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติดิน (ต่อ)

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
Organic matter	ชั่งตัวอย่างดินประมาณ 0.1 – 0.5 กรัม เติม 1 N $K_2Cr_2O_7$ 10 มล. และ H_2SO_4 10 มล. เพื่อเร่งปฏิกิริยา ทิ้งไว้ข้ามคืน เติมน้ำกลั่น 100 มล. titrate ด้วย $FeSO_4.7H_2O$ โดยใช้ O – phenanthroline ferrous 10 หยด เป็น indicator	Nelson and Somners, 1980
Total N	ชั่งตัวอย่างดิน 1.00 กรัม เติม K_2SO_4 – catalyst และ H_2SO_4 97% ย่อยจนได้สารละลายใส แล้วนำไปกลั่น โดยใช้ boric acid เป็นตัวรับและ titrate ด้วย HCl เข้มข้น 0.01 N	Nelson and Somners, 1980
Available P	ชั่งตัวอย่างดิน 2.5 กรัม สกัดด้วย Bray II 25 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่กรองได้ 1 มล. พัฒนาสีด้วย Ammonium molybdate, Antinomy Potassium Tertrate, Ascorbic acid วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร	Houba *et al*.,1988
Extractable K	ชั่งตัวอย่างดิน 2.5 กรัม สกัดด้วย NH_4OAc 1 M pH 7 จำนวน 25 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายไปวัดหาปริมาณ K โดยเครื่อง *Flame photometer*	Helmke and Sparks, 1996
Extractable Ca	ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดK ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	Suarez, 1996
Extractable Mg	ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดK ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	Suarez, 1996

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของพืช

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของพืช ภายหลังจากบันทึกข้อมูลความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากในทุกการทดลองแล้ว โดยคุณสมบัติที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%Total N), ฟอสฟอรัสทั้งหมด (%Total P), โพแทสเซียมทั้งหมด (%Total K), แคลเซียมทั้งหมด (%Total Ca) และแมกนีเซียมทั้งหมด (%Total Mg) วิธีวิเคราะห์มีรายละเอียดโดยย่อดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของพืช

การวิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
Total N	ย่อยตัวอย่างพืชโดยชั่งตัวอย่าง 0.5000 กรัม ใส่กรดย่อย ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมากลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ NaOH 40% เติมลงในหลอดกลั่นที่มีสารละลายตัวอย่างอยู่ 25 มล. รองรับสารที่กลั่นได้ด้วย Boric 15 มล. แล้วนำไปไตเตรทหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ H_2SO_4	Bremner, 1965
Total P	ดูดสารละลายตัวอย่างที่ย่อยแล้วมา 5 มล. ใส่ใน volumetric flask 25 มล. เติม Mixed reagent จำนวน 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเปรียบเทียบกับ standard curve	ศรีสม, 2544
Total K	ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยจำนวน 1 มล. ลงใน volumetric flask 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น อ่านค่าด้วยเครื่อง *Flame photometer*	Kalra, 1998
Total Ca	ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยจำนวน 1มล. ลงใน volumetric flask 25 มล. ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % อ่านค่าด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	Walinga *et al*., 1989
Total Mg	ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยจำนวน 1 มล. ลงใน volumetric flask 25 มล. ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % อ่านค่าด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer*	Walinga *et al*., 1989

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved