บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองดำเนินการ ณ ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิจัยแบ่งงานออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

3.1 รวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินความลึกประมาณ 0 - 15 เซนติเมตรในบริเวณรากพืชจากพื้นที่เพาะปลูกข้าว ข้าวโพด และอ้อย บริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อแยกเชื้อ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายหินฟอสเฟตแยกจากดินที่เก็บจากบริเวณจังหวัดเชียงรายและเพชรบูรณ์

3.1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีเจือจาง (dilution plating technique) โดยชั่งตัวอย่างดิน 10.0 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 95.0 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเจือจางโดยดูดสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสำหรับ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* medium (N-free medium) (Atlas, 1993) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ เกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร (spread plate) ส่วนเชื้อ *Azospirillum* sp. ใช้รากที่ล้างดินออกแล้ววางบนอาหาร *Azospirillum* medium (Atlas, 1993) ซึ่งเป็นอาหาร semi-solid หาปริมาณด้วยวิธี most probable number (MPN) (Hall, 1996) เลี้ยงเชื้อไว้ประมาณ 5 - 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนับปริมาณและเก็บรวบรวมเชื้อที่เติบโตบนอาหาร แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate แล้วเก็บไว้บนอาหารเอียง (Czapek agar slant) เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

3.1.3 การหากิจกรรมการตรึงไนโตรเจน

เลี้ยงจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจนและเลี้ยงให้เจริญเป็นโคโลนีในหลอด วัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Weaver และ Danso (1994) โดยดึงอากาศในหลอดออก 10% จากนั้นใส่ก๊าซ acetylene (C_2H_2) เข้าไปแทนที่ซึ่งมีปริมาตร 10% เท่ากับที่ดึงออก จากนั้นบ่มก๊าซไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ก๊าซ ethylene (C_2H_4) ที่เกิดจากปฏิกิริยา reduction ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) โดยใช้ hydrogen – flame ionization detector (FID) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-14B

3.2 รวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต

3.2.1 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างดินจากข้อ 3.1.1 มาหาปริมาณโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 โดยชั่งตัวอย่างดิน 10.0 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 95.0 มิลลิลิตร เขย่า 15 นาที แล้วนำมาเจือจางโดยดูดสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} ดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่จานอาหารแข็ง Czapek medium (Atlas, 1993) ปรับปรุงโดยใส่ $CaHPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ เกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร (spread plate) เลี้ยงเชื้อประมาณ 3 - 5 วัน เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์เฉพาะที่ทำให้เกิด clear zone

3.2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

การสังเกต clear zone ที่เกิดรอบ colony ของจุลินทรีย์ เลี้ยงจุลินทรีย์ที่เก็บได้ทั้งหมดไว้กลางจานอาหารแข็งที่มี $CaHPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส และใส่ rose bangal เล็กน้อยเพื่อให้เห็นการเจริญเติบโตและ clear zone ได้ชัดเจน โดยทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้เป็นเวลา 6 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony และ clear zone ตัวอย่างละ 2 ตำแหน่ง ทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 6 แล้วนำมาหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony และ clear zone คัดเลือกประสิทธิภาพในการย่อยสลายเบื้องต้นโดยคัดเลือกค่าอัตราส่วนที่มีค่าน้อยเพื่อนำไปหาความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสจาก $Ca_3(PO_4)_2$ ในอาหารเหลวต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนแรก (3.2.2) เลี้ยงในอาหาร Czapek Agar จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer (Ø 8 mm) เจาะอาหารแล้วจึงนำชิ้นอาหารที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว

30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยมี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน โดยมีการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดแต่ละระยะ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วนำสารละลายที่ได้วัด pH ทันที โดยใช้ pH meter และวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสด้วยวิธี Molybdenum-blue โดยพัฒนาสีด้วย ascorbic acid (Murphy and Riley, 1962 ปรับปรุงโดย Watanabe and Olsen, 1969 อ้างโดย นิวัฒน์, 2538)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณ acid phosphatase enzyme (ดัดแปลงจาก Tabatabai, 1994) โดยดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวชุดเดียวกับการทดลองข้างต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม modified universal buffer (MUB pH 6.5) 4 มิลลิลิตร และ *p* – nitrophenyl phosphate solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปาก flask แล้วนำไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบกำหนด เติม $CaCl_2$ 1 มิลลิลิตร และ NaOH 4 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาและพัฒนาสีให้เป็นสีเหลือง เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 (Whatman) สารละลายที่ได้จึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟตในปุ๋ยหมัก

ทดสอบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟตในปุ๋ยหมักที่ทำจากกากตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล จำนวน 3 ซ้ำ มีตำรับการทดลองดังนี้

1. Filter cake (control)
2. Filter cake + จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน
3. Filter cake + จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต + หินฟอสเฟต (RP)
4. Filter cake + จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน + จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต + RP
5. Treatment 4 + กากน้ำตาล (molasses)

ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ผ่านขั้นตอนการคัดเลือกประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในหลอดอาหาร ได้แก่จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารทั้ง 3 กลุ่ม คือ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* เลี้ยงในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนเลี้ยงจนได้ปริมาณมาก จากนั้นใส่ลงในปุ๋ยหมักในอัตรา 10^8 cfu / กรัมปุ๋ยหมัก

ในตำรับการทดลองที่ใส่จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต ใส่จุลินทรีย์ในอัตรา 10^8 สปอร์/กรัมปุ๋ยหมัก และใส่หินฟอสเฟต (total P = 16%) ในอัตรา 250 กรัม/กิโลกรัม

วิธีการหมักปุ๋ยอินทรีย์จะใช้ปุ๋ย 1 กิโลกรัม ใส่ตำรับการทดลองที่ต้องการ จากนั้นแบ่งออกเป็น 3 ส่วน แล้วบ่มไว้เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ สำหรับตำรับการทดลองที่เป็น control ไม่มีการใส่เชื้อจุลินทรีย์

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมัก นำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี micro-Kjeldahl และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยวิธี Molybdenum-blue โดยพัฒนาสีด้วย ascorbic acid (Murphy and Riley, 1962 ปรับปรุงโดย Watanabe and Olsen, 1969 อ้างโดย นิวัฒน์, 2538) หลังจากบ่มไว้นาน 2 และ 4 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University