

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน โดยในการทดลองแรกจะเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่มีประสิทธิภาพดีจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยการปลูกพืชในกระถางและใช้ดินจากพื้นที่สูงในการปลูกในกระถาง ส่วนการทดลองที่สองเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบจากขั้นตอนแรกทดลองในแปลงทดลองในพื้นที่สูง และการทดลองที่สามเป็นการศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณ N ในดินเพื่อการปลูกพืชในระบบอินทรีย์โดยการใส่ถั่วพุ่มเป็นปุ๋ยพืชสด

3.1 วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มโดยการทดลองในกระถาง

ในการทดลองปลูกพืชในกระถางได้ใช้พื้นที่ของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นพื้นที่ทดลอง และใช้ดินจากพื้นที่ของศูนย์พัฒนาเกษตรที่สูงหนองหอย ซึ่งไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในการปลูกพืชใช้ดินในอัตรา 8 กก./กระถาง ในการทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย

ก่อนการทดลองนำดินจากพื้นที่สูงศูนย์พัฒนาเกษตรที่สูงหนองหอย ไปตรวจสอบสภาพความอุดมสมบูรณ์ขั้นพื้นฐานของดินด้วยชุดตรวจสอบดินอย่างง่าย ซึ่งพัฒนาโดยคณะนักวิจัย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 1 ใช้ดินที่ไม่ได้ปรับ pH ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 5.2

การทดลองที่ 2 ใช้ดินที่ปรับ pH ให้เป็น 6.0 โดยใช้ CaCO_3 ใช้วิธีการหาปริมาณการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธีที่เสนอแนะโดย Houba และคณะ (1988)

ทั้งสองการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomized complete block (RCB) มี 8 กรรมวิธี และ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธี	รายละเอียด
1	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-PM3 ซึ่งได้จากพื้นที่ของศูนย์ฯ ป่าเมียง
2	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-PHT4 ซึ่งได้จากพื้นที่ของนายปันโปธา บ้านพระบาทห้วยด้อม
3	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-TLA3 ซึ่งได้จากพื้นที่ของศูนย์ฯ หุ้งเรา
4	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-TLA5 ซึ่งได้จากพื้นที่ของศูนย์ฯ หุ้งเรา
5	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-NK3 ซึ่งได้จากพื้นที่ของนายบุญมา ทองอยู่ บ้านหนองเจียว
6	การปลูกถั่วโดยใส่เชื้อ CP-NK6 ซึ่งได้จากพื้นที่ของศูนย์ฯ หนองเจียว
7	การปลูกถั่วโดยใส่ปุ๋ยยูเรียในอัตราที่ให้น 3 กก./ไร่
8	การปลูกถั่วโดยไม่ใส่ปุ๋ย N และไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว

เชื้อทุก isolate ที่ได้ในการทดลองเป็นเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่ม ซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากพื้นที่สูงทั้งหมด และเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดี 6 อันดับแรกจากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ (อำพรธม, 2549)

สำหรับถั่วพุ่มที่ใช้ทดลอง เป็นถั่วพุ่มที่กรมพัฒนาที่ดินส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อปรับปรุงดิน การใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว ใช้วิธีการคลุกผงเชื้อกับเมล็ดถั่วก่อนปลูก อัตราการคลุกเชื้อคือ ผงเชื้อโรโซเบียม 0.2 กรัม/ 1 เมล็ด (โรโซเบียม 2.4×10^6 เซลล์/1 เมล็ด) โดยใช้ gum arabic 30% เป็นสารเชื่อมให้ผงเชื้อเกาะติดเมล็ดได้ดีขึ้น เริ่มปลูกถั่วเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2550 ในการปลูกถั่วใช้เมล็ดถั่ว 5 เมล็ด/กระถาง และถอนแยกให้เหลือ 3 ต้น/กระถาง หลังจากเมล็ดถั่วงอกได้ 7 วันแล้วใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 3 กก./ไร่หลังปลูก 3 สัปดาห์(ในกรรมวิธีที่7) ตลอดการทดลองให้น้ำทุกวันและพ่นยากำจัดศัตรูพืชเท่าที่จำเป็น

การบันทึกข้อมูล

ความสูงของดัมถั่วพุ่มที่ระยะ V6 V9 และ R2 สืบของใบโดยใช้ 502 SPAD Chlorophyll meter ที่ระยะ V9 (30 วันหลังปลูก) น้ำหนักแห้งของปมและส่วนเหนือดิน ดัชนียูรีโอไซด์สัมพัทธ์ % N และปริมาณ N ที่ได้จากการตรึงและการสะสม N ในส่วนเหนือดินของถั่วพุ่มที่ระยะ R2 (38 วันหลังปลูก) ในการเก็บข้อมูลด้านยูรีโอไซด์สัมพัทธ์ ใช้วิธีการศึกษาวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของ น้ำเลี้ยงจากตอราก (Ureide Technique) ซึ่งเสนอแนะโดย Peoples และคณะ (1989) และประเมิน % N ที่ได้จากการตรึงโดยใช้สมการที่เสนอแนะโดย Heridge and Peoples (2002) ดังนี้

$$y = 8.6 + 0.75x$$

เมื่อ y คือ ดัชนี ยูริโอต์ สัมพัทธ์(%)

x คือ % N ที่ได้จากการตรึง

ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ N ในตัวอย่างพืช ใช้ตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C จนตัวอย่างแห้งสนิท และผ่านการบดด้วยเครื่องบด Willey Mill ใช้วิธีการย่อยตัวอย่างด้วยกรดผสมที่ประกอบด้วย กรด sulfuric ผง selenium กรด salicylic และ hydrogen peroxide ซึ่งคัดแปลงโดย Walinga และคณะ (1989) ย่อยตัวอย่างด้วย digestion block โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 100 °C และค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 350 °C หลังจากตัวอย่างพืชผ่านการย่อยจนสมบูรณ์แล้วจะได้สารละลายใส่ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ตามวิธีการที่ระบุไว้ในภาคผนวก ก

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่ม โดยการทดลองในแปลงทดลอง

ในขั้นตอนนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่มีประสิทธิภาพดีจากการทดลองในกระถางจำนวน 3 isolate ใช้พื้นที่แปลงปลูกผักอินทรีย์ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอยซึ่งมีลักษณะพื้นที่เป็นพื้นที่สูง ภูเขา ลูกคลื่นลอนลาดและที่ราบตามหุบเขาและแนวลำห้วย ความสูงของพื้นที่อยู่ระหว่าง 1,000-1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง สำหรับสภาพภูมิอากาศ นั้นมีอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 23.8 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 18.7 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนรวม 1,416.8 มิลลิเมตร และสภาพพื้นที่ส่วนใหญ่ของพื้นที่ศูนย์มีความลาดชันระหว่างร้อยละ 35 – 50 คิดเป็นร้อยละ 26.40 ลักษณะโครงสร้างทางธรณีวิทยาของพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอยเป็นหินอัคนี (igneous Rock) หินชั้นและหินแปร (sedimentary and metamorphic rocks) ได้แก่ หินทราย หินแกรนิต หินดินดาน หินเชิร์ต หินกรวดมน หินปูน กรวดทรายและทราย (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน), 2548) สำหรับแปลงที่ใช้ในการทดลองศูนย์ฯ ได้ปรับสภาพดินโดยการใส่ปุ๋ยเรียบร้อยแล้ว ก่อนการทดลอง และดินมี pH 6.6-6.8 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีเฉพาะการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในดินที่มีการใส่ปุ๋ยเท่านั้น ในการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block มี 4 ซ้ำและ 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี	รายละเอียด
1	การปลูกถั่วโดยใช้เชื้อ CP-PHT4
2	การปลูกถั่วโดยใช้เชื้อ CP-TCA5
3	การปลูกถั่วโดยใช้เชื้อ CP-NK3
4	การปลูกถั่วโดยไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วและไม่ใส่ปุ๋ย N

สำหรับถั่วพุ่มที่ใช้ทดลอง เป็นถั่วพุ่มชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองในกระถาง ใช้วิธีการคลุกผงเชื้อกับเมล็ดถั่วก่อนปลูกในอัตรา และวิธีเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองปลูกพืชในกระถาง ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2550 ใช้ระยะปลูก 30x30 ซม. ซึ่งเป็นระยะปลูกตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร และใช้ขนาดแปลงทดลอง 3x3 ต.ร.ม. หยอดเมล็ด 5 เมล็ด/หลุม และถอนแยกให้เหลือต้นถั่ว 3 ต้น/หลุม หลังจากเมล็ดถั่วงอกได้ 7 วัน การปลูกถั่วพุ่มด้วยวิธีการดังกล่าวใช้เมล็ดพันธุ์ 7 กก./ไร่ ตลอดการทดลองมีการให้น้ำตามความจำเป็นและไม่มีการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เพราะพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ใช้ผลิตผักอินทรีย์ของศูนย์หนองหอย

การบันทึกข้อมูลมีดังนี้ น้ำหนักแห้งของปมและส่วนเหนือดิน ดัชนียูรีโอคัสสัมพัทธ์ % และปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมส่วนเหนือดิน ที่ระยะ V9 (45วันหลังปลูก) และ R2 (60วันหลังปลูก) ใช้วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเลี้ยงและตัวอย่างพืชเหมือนกับที่ใช้ในการทดลองปลูกพืชในกระถาง ในการเก็บข้อมูลน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินที่ระยะ V9 ใช้พื้นที่เก็บเกี่ยว 1 ต.ร.ม. ส่วนที่ระยะ R3.5 ใช้พื้นที่เก็บเกี่ยว 2 ต.ร.ม.

3.3 การศึกษาวิธีการจัดการดินที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ N สำหรับการปลูกพืชในระบบอินทรีย์บนที่สูง

ในขั้นตอนนี้ได้ใช้แนวทางในการเพิ่มปริมาณ N สำหรับการปลูกพืชในระบบอินทรีย์บนที่สูง โดยการใช้ถั่วพุ่มไถกลบลงไปดินเพื่อเป็นปุ๋ยพืชสดและใช้ระบบการปลูกผักคะน้าอินทรีย์ในการทดสอบ เพราะผักคะน้าเป็นพืชอายุสั้น และเป็นพืชผักที่ใช้สำหรับการบริโภค อีกทั้งเป็นพืชที่ต้องการ N สูงเพื่อการสร้างผลผลิต จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นพืชทดสอบสำหรับการทดลองนี้

ในการทดลองได้ปลูกถั่วพุ่มจนถึงระยะ R3.5 เก็บเกี่ยวส่วนเหนือดิน แล้วฝังให้แห้งในที่ร่ม เพื่อใช้ไถกลบลงไปดิน ในช่วงที่มีการทดลองปลูกผัก

ในการทดลองศึกษาวิธีการจัดการดินเพื่อเพิ่มปริมาณ N สำหรับการปลูกคะน้าอินทรีย์ ใช้พื้นที่ปลูกผักอินทรีย์ของศูนย์ฯหนองหอยเป็นพื้นที่ทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block (RCB) มี 4 ซ้ำและ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี	รายละเอียด
1	ปลูกผักด้วยวิธีการที่นิยมใช้ในการผลิตผักอินทรีย์บนที่สูงซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุม (control)
2	ปลูกผักโดยการไถกลบถั่วพุ่มในอัตราที่ให้น้ำหนักแห้ง 667 กก./ไร่ (น้ำหนักสด 3 ตัน/ไร่) ก่อนการปลูก 1 เดือน (CP-1M)
3	ปลูกผักโดยการไถกลบถั่วพุ่มในอัตราเดียวกับกรรมวิธีที่ 2 ก่อนการปลูกผัก 1 สัปดาห์ (CP-1W)
4	เหมือนกรรมวิธีที่ 2 แต่เพิ่มการใส่มูลวัวในอัตรา 1,600 กก./ไร่ (น้ำหนักแห้ง) ก่อนการปลูก 1 วัน (CP-1M+M)
5	เหมือนกับกรรมวิธีที่ 3 แต่เพิ่มการใส่มูลวัวในอัตรา 1,600 กก./ไร่ (น้ำหนักแห้ง) ก่อนการปลูก 1 วัน (CP-1W+M)
6	ปลูกผักโดยการไถกลบถั่วพุ่มในอัตราที่ให้น้ำหนักแห้ง 1,334 กก./ไร่ (น้ำหนักสด 6 ตัน/ไร่) (2xCP)

สำหรับปริมาณถั่วพุ่มที่ใช้ไถกลบในกรรมวิธีที่ 2-5 เป็นน้ำหนักถั่วพุ่มที่ระบุได้ตามเอกสารแนะนำของกรมพัฒนาที่ดิน (ปุ๋ยพืชสด, 2550) ส่วนปริมาณถั่วพุ่มที่ใช้ในกรรมวิธีที่ 6 เป็นผลผลิตของน้ำหนักสดของส่วนเหนือดินของถั่วพุ่มที่ระยะ R3.5 ที่ได้จากการปลูกในพื้นที่ของศูนย์ฯหนองหอย โดยการปลูกใช้วิธีโรยเมล็ดให้เป็นแถว ระยะห่างระหว่างแถว 30 ซม. ซึ่งวิธีการปลูกดังกล่าวใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วพุ่ม 10 กก./ไร่

ผักที่ใช้ทดลองคือผักคะน้าพันธุ์ดอยคำ ซึ่งย้ายกล้าลงปลูกในแปลงเมื่อต้นกล้ามีอายุ 15 วัน ใช้ระยะปลูก 15x15 ซม. แปลงทดลองมีขนาด 2x2 ตร.ม.

สำหรับการปลูกผักในกรรมวิธีที่ 1 ใช้มูลวัวใส่ลงไปในดิน 2 ครั้ง โดยใส่ครั้งแรก 4,000กก./ไร่ (10 กก./4 ตร.ม.) ในระยะก่อนปลูก และหลังปลูก 3 สัปดาห์ นอกจากนี้หลังการย้ายกล้าได้ 2 สัปดาห์ ใช้ปุ๋ยน้ำหมักที่ทำจากปลาฉีดพ่นให้แก่ต้นผักทุกๆ 3 วัน โดยใช้ปุ๋ยน้ำหมักจากปลา 10 มล. เจือจางด้วยน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นน้ำหมักที่เจือจางแล้วในอัตรา 1 ลิตรต่อพื้นที่ 6 ตร.ม. (266.7 ลิตร/ไร่) บันทึกข้อมูลด้านน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของส่วนเหนือดินของผักคะน้าตลอดจน

ที่ระยะเก็บเกี่ยวโดยใช้พื้นที่เก็บเกี่ยว 2 ต.ร.ม. การสะสม N ในส่วนเหนือดินใช้วิธีวิเคราะห์ N ในตัวอย่างพืชดังที่ระบุไว้ในขั้นตอนที่ 1 แสดงไว้ในตาราง 3 และรายละเอียดในภาคผนวก ก

นอกจากนี้ยังศึกษาการปลดปล่อย N ที่เป็นประโยชน์ได้ของดินที่มีการไถกลบถั่วพุ่ม โดยใช้วิธีการบ่มดินที่เก็บจากแปลงทดลองทั้งที่มีการไถกลบถั่วพุ่ม และไม่ใช้ถั่วพุ่มในการปรับปรุงดิน ใช้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะบ่มดิน ปิดปากถุง และนำถุงพลาสติกไปไว้ในแปลงทดลองตลอดช่วงที่มีการปลูกผัก เก็บตัวอย่างดินในถุงมาวิเคราะห์หาปริมาณ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ และ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ และ pH ทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้ KCl 1 M เป็นน้ำยาสกัดดิน วิเคราะห์หา $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ด้วยวิธีการพัฒนาสีด้วย indophenol blue (Houba และคณะ, 1988) ส่วน $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ใช้วิธีการพัฒนาสีด้วยปฏิกิริยา nitration ของกรด salicylic (Diatloff and Rengel, 2001) และหาความเข้มข้นของ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ และ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ในสารละลายด้วยวิธี spectrophotometry ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

การคำนวณด้านการสะสมธาตุ N ในต้นถั่ว

คำนวณปริมาณการสะสม N ในผลผลิตใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{การสะสม N ในพืช (กก./ไร่)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของธาตุอาหาร(\%)} \times \text{น้ำหนักแห้งของผลผลิต (กก./ไร่)}}{100}$$

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ F-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยวิธี Least Significant Difference ที่ $P < 0.05$