

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การพัฒนาปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ดในการกำจัดพาราควอตตกค้างในพื้นที่การเกษตรกรรมเป็น การศึกษาโดยใช้แบบแผนการทดลอง (Experimental Design) ทำการศึกษาความเหมาะสมของ อัตราส่วนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในการกำจัดพาราควอตตกค้างในดินต่ออัตราส่วนปุ๋ยชีวภาพ อัดเม็ดที่เป็นประโยชน์ต่อการเติบโตของมันสำปะหลังและศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ของ การกำจัดพาราควอตต่อการเติบโตของมันสำปะหลังในแปลงทดลองตลอดจนประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ย ของพืช ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้

ประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาครั้งนี้คือ ดินมันสำปะหลังที่ปลูกในแปลงทดลอง โดยการออกแบบ การทดลองแปลงปลูกมันสำปะหลังแบบ Split Plots Design ที่ประกอบไปด้วยแปลงใหญ่ (Main plots) 4 ดำรับ แต่ละดำรับในแปลงใหญ่ประกอบด้วย 4 แปลงย่อย (sub-plots) รวมทั้งสิ้น 16 ดำรับการทดลองและมีการสุ่มกลุ่มตัวอย่างแบบจับฉลากในแต่ละดำรับ

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลต่างๆ ที่เก็บรวบรวม มีดังต่อไปนี้

1. สมบัติของดินในแปลงทดลอง
2. ความเข้มข้นสารพาราควอตในดินแปลงทดลอง
3. ปัจจัยทางด้านกายภาพที่มีผลต่อการกำจัดสารพาราควอตตกค้างในดินและการ เติบโตของมันสำปะหลัง ได้แก่ ปริมาณน้ำฝนอุณหภูมิของอากาศ และความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ
4. การเติบโตของมันสำปะหลัง ได้แก่ ความสูงของลำต้นมันสำปะหลัง น้ำหนักของ ลำต้นสด น้ำหนักหัวมันสำปะหลังสด ดัชนีเก็บเกี่ยว จำนวนหัวสดเฉลี่ยต่อต้น และปริมาณแป้งใน หัวมันสำปะหลัง
5. ประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยของพืช ได้แก่ อัตราการดูดใช้ธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) ของมันสำปะหลัง

เครื่องมือในการวิจัย

อุปกรณ์

1. หลอดเก็บตัวอย่างดิน (soil tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 8เซนติเมตร
2. ถุงปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุตัวอย่างดิน (sterile bag)

3. หลอดฝาเกลียว (screw cap test tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ (conical flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
6. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 25, 100 และ 500 มิลลิลิตร
7. แท่งแก้วคน (stirring rod)
8. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
9. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
10. ปิเปตต์ทิป (pipette tip)
11. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
12. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
13. ปากคีบ (forcep)
14. ไม้เมตร (Metre Rule)

เครื่องมือ

1. เครื่องวัดปริมาณน้ำฝน (Rain Gauge)
2. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
3. เครื่องวัดความชื้นในอากาศ (Hygrometer)
4. เครื่องชั่ง Reimann scale (Reimann Scale Balance)
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrometer)
6. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography, GC)
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)
8. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
9. เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
10. เครื่องเขย่า (Shaker)
11. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
12. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)
13. เครื่องอัดเม็ดปุ๋ย (Fertilizer Compress Machine)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA, Difco, USA)
2. Nutrient Broth (NB, Difco, USA)
3. Paraquat (Sigma, Aldrich, Germany)
4. Phosphphate Buffer Saline (Sigma Aldrich, USA)
5. รำละเอียด (นราพิมล, ประเทศไทย)
6. กากน้ำตาล (มิตรผล, ประเทศไทย)
7. ปุ๋ยคอก

8. แกลบดิบ

9. แกลบเผา

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรีย

ในศึกษาครั้งนี้จะใช้แบคทีเรีย *A. veronii* strain NK 67 (JN880412) ที่มีความสามารถในการย่อยพาราควอตซึ่งแยกได้ในประเทศไทยจากการศึกษาของณัฐบดีและคณะในปี พ.ศ. 2554 นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ทำการเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงโดยใช้หลอดหยดเชื้อแต่ละ stock เชื้อมาเล็กน้อยแล้ว streak ลงบนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 1-2 วัน โคโลนีของเชื้อบนอาหาร NA แสดงในภาพที่ 3.1 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีเชื้อเจริญนี้ มาเติมอาหารเหลว NB ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อเล็กน้อยใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดเซลล์จากผิวหน้าอาหาร แล้วใช้ micropipette ดูดเชื้อในจานมาใส่ในอาหารเหลว NB นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจนมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้มาผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพภาพที่ 3.2 แสดงการเตรียมตัวอย่างแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที



ภาพที่ 3.1 โคโลนีของ *A. veronii* strain NK 67 (JN880412) ที่มีความสามารถในการย่อยพาราควอต ซึ่งนำมาผลิตปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ด



ภาพที่ 3.2 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

2.การผลิตปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ด

ขั้นตอนการผลิตปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ด เริ่มจากการนำเกลบดิบ เกลบเผา ปุ๋ยคอกและรำละเอียด อย่างละ 1 กิโลกรัม มาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ราดด้วยกากน้ำตาล 1 กิโลกรัมผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1: 1 จากนั้นฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพ 1 ลิตรให้ทั่วกองปุ๋ย นำมาคลุกเคล้ากับแบคทีเรีย *A. veronii* strain NK 67 (JN880412) ในอัตราส่วนระหว่างเนื้อปุ๋ยต่ออัตราส่วนของแบคทีเรียเท่ากับ 100: 0.5 100:1 100:1.5 ตามลำดับ โดยใส่แบคทีเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1เปอร์เซ็นต์และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับจากนั้นจึงนำมาบดให้ละเอียด ใช้น้ำเป็นส่วนผสมกับเนื้อปุ๋ยในอัตราส่วนต่างๆ โดยมวลของปุ๋ยต่อน้ำ 4 อัตราส่วน คือ 1:0.3 1:0.4 1:0.5 และ 1:0.6 ตามลำดับ เทใส่เครื่องอัดเม็ดปุ๋ย (ภาพที่ 3.3) โดยอัดที่แรงกด 18 นิวตันนำเม็ดปุ๋ยที่ได้ร่อนในตะแกรกร่อนเพื่อให้ได้เม็ดปุ๋ยที่มีขนาดเดียวกันโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2.0 เซนติเมตรนำไปตากในที่ร่มจนแห้ง แล้วจึงบรรจุภาชนะเก็บที่อุณหภูมิห้องวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร N P และ K ในปุ๋ยเม็ด โดยวิเคราะห์ธาตุ N ด้วยเครื่อง Scrubber unit and Digestionและเครื่อง Distillation วิธี Kjeldahl method และวิเคราะห์ธาตุ P ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ส่วนธาตุ K วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และเครื่อง Atomic absorption



ภาพที่ 3.3 เครื่องอัดเม็ดปุ๋ยชีวภาพ

3. การวิจัยในพื้นที่แปลงทดลอง

เก็บตัวอย่างดินแบบตัวอย่างดินรวม (composite sampling) ก่อนเริ่มปรับพื้นที่ และปลูกมันสำปะหลัง ต้นฤดูฝนปี 2555 จากแปลงทดลองในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในเขตอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเทคนิคการเก็บจะทำการสุ่มพื้นที่ออกเป็น 15 จุดย่อยและเก็บตัวอย่างดินโดยนำดินทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากันและทำการ quartering ดินออกเป็น 4 ส่วนนำมา 1 ส่วนเพื่อทำการทดลอง มีน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม แล้วแบ่งดินออกเป็น 2 ส่วน ดินส่วนที่ 1 นำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดินส่วนที่ 2 นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นพาราควอต ส่วนการวิจัยในพื้นที่แปลงทดลอง เริ่มดำเนินการในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2555 ซึ่งเป็นช่วงการปลูกมันสำปะหลัง โดยการศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ดในการกำจัดพาราควอตในพื้นที่แปลงทดลอง และผลต่อการเติบโตของมันสำปะหลัง ตลอดฤดูปลูก จะใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่หลังปลูก 45 วัน ครั้งที่สองใส่หลังปลูก 90 วัน ซึ่งการวิจัยประกอบด้วยแผนการทดลองทางสถิติแบบ split plot design 3 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำประกอบด้วยตำรับการทดลอง (treatment) อัตราส่วนระหว่างเนื้อปุ๋ยกับอัตราส่วนของแบคทีเรียในแปลงใหญ่ (main plot) 4 ตำรับการทดลอง ซึ่งได้แก่

ตำรับการทดลองที่ 1 แปลงที่ปลูกพืช โดยไม่มีการใส่ปุ๋ย (F_0)

ตำรับการทดลองที่ 2 แปลงที่ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรที่มีอัตราส่วนระหว่างเนื้อปุ๋ยกับอัตราส่วนของแบคทีเรียเท่ากับ 100 : 0.5 ($F_{0.5}$)

ตำรับการทดลองที่ 3 แปลงที่ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรที่มีอัตราส่วนระหว่างเนื้อปุ๋ยกับอัตราส่วนของแบคทีเรียเท่ากับ 100 : 1.0 ($F_{1.0}$)

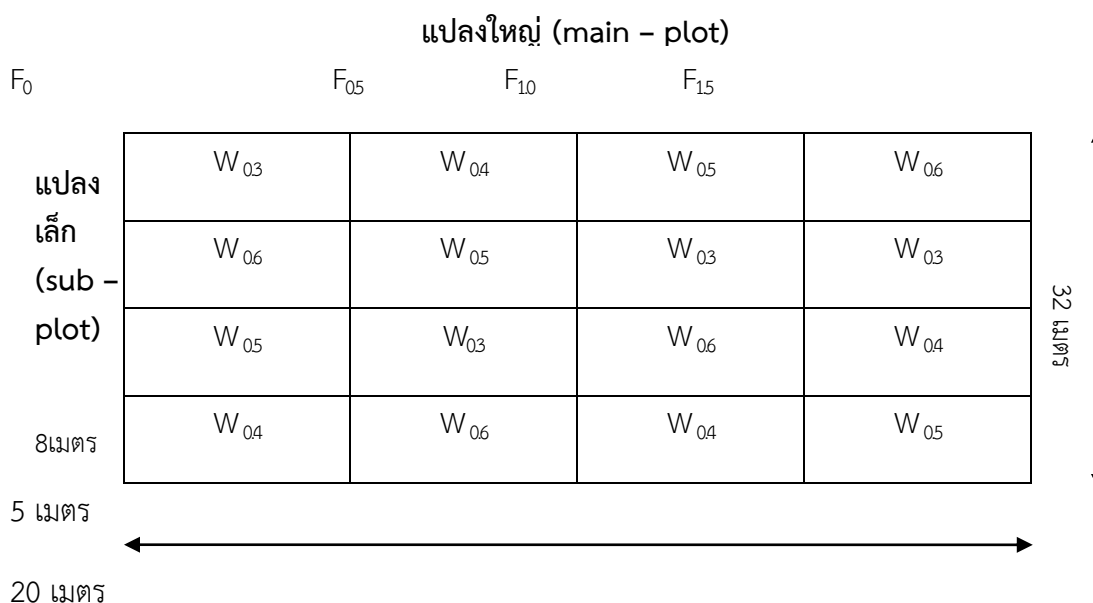
ตำรับการทดลองที่ 4 แปลงที่ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรที่มีอัตราส่วนระหว่างเนื้อปุ๋ยกับอัตราส่วนของแบคทีเรียเท่ากับ 100 : 1.5 ($F_{1.5}$)

ส่วนการทดลองในแปลงเล็ก (sub plot) ของแต่ละแปลงใหญ่ (main plot) เป็นการทดลองส่วนผสมระหว่างเนื้อปุ๋ยโดยมวลกับน้ำในการอัดเป็นปุ๋ยเม็ด ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตำรับทดลองอัตราผสมของเนื้อปุ๋ย (โดยมวล) กับน้ำในแปลงเล็ก (sub plot) ของการทดลองในปี 2555/56

ตำรับการทดลอง	รายละเอียด	ระยะเวลาใส่ (แบ่งใส่ 2 ครั้ง)	วิธีการใส่ปุ๋ย
$W_{0.3}$	อัตราเนื้อปุ๋ย 1 ต่อน้ำ 0.3	ครั้งแรกใส่หลังปลูก 45 วัน ครั้งที่สองใส่หลังปลูก 90 วัน	ข้างต้นแล้ว กลบ
$W_{0.4}$	อัตราเนื้อปุ๋ย 1 ต่อน้ำ 0.4	ครั้งแรกใส่หลังปลูก 45 วัน ครั้งที่สองใส่หลังปลูก 90 วัน	ข้างต้นแล้ว กลบ
$W_{0.5}$	อัตราเนื้อปุ๋ย 1 ต่อน้ำ 0.5	ครั้งแรกใส่หลังปลูก 45 วัน ครั้งที่สองใส่หลังปลูก 90 วัน	ข้างต้นแล้ว กลบ
4. $W_{0.6}$	อัตราเนื้อปุ๋ย 1 ต่อน้ำ 0.6	ครั้งแรกใส่หลังปลูก 45 วัน ครั้งที่สองใส่หลังปลูก 90 วัน	ข้างต้นแล้ว กลบ

ดังนั้นแต่ละซ้ำ (replication) จึงมีจำนวนแปลงเล็ก (sub - plot) ขนาด 3 x 3 เมตร เท่ากับ 4 แปลงใหญ่ (main plot) x 4 แปลงเล็ก (sub plot) รวม 16 แปลงดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แผนผังการทดลองทั้งแปลงใหญ่ (main plot) และแปลงเล็ก (sub-plot) แต่ละซ้ำ

4. การศึกษาความเข้มข้นพาราควอทในดิน

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงทดลองไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นพาราควอท โดยมีช่วงเวลาการเก็บดังนี้ 1) เก็บก่อนปลูกพืช 1 สัปดาห์ 2) เก็บระหว่างปลูกไปแล้ว 3 6 และ 9 เดือน และ (ฤดูแล้ง) และ 3) เก็บหลังเก็บเกี่ยวไปแล้ว 1 สัปดาห์ เพื่อดูความเข้มข้นสารพาราควอทตกค้าง โดยใช้เทคนิค GC ตามวิธีวิเคราะห์ TNO, 1993 Standard Operation Procedure, Zeist. Netherlands

5. การศึกษาปัจจัยทางด้านกายภาพที่มีผลต่อคุณสมบัติของปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ด

ตรวจวัดปัจจัยทางด้านกายภาพที่มีผลต่อคุณสมบัติของปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ดในการกำจัดสารพาราควอทตกค้างในดินและการเติบโตของมันสำปะหลังดังนี้

5.1 เก็บข้อมูลปริมาณน้ำฝน โดย Rain Gauge

5.2 วัดอุณหภูมิอากาศ โดย Hygrothermometer

5.3 วัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ โดย Hygrothermometer

6. การศึกษาการเติบโตของมันสำปะหลัง

ศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ดต่อการเติบโตของมันสำปะหลังโดยตรวจวัดปัจจัยต่างๆ ดังนี้

6.1 วัดความสูงของลำต้น ในช่วง 2, 4, 6, 8 และ 10 เดือนหลังปลูกโดยไม่เมตรวัดระยะ

6.2 ชั่งน้ำหนักของลำต้นสด โดยเครื่องชั่งน้ำหนัก

6.3 ผลผลิตรูปน้ำหนักสดของหัวมันสำปะหลังที่ระยะ 11 เดือนหลังปลูก

6.4 องค์ประกอบของผลผลิต

1) ดัชนีเก็บเกี่ยว

2) จำนวนหัวสดเฉลี่ยต่อต้น โดยการนับจำนวนหัวต่อต้นมันสำปะหลัง

3) ปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลัง โดยการวัดร้อยละของแป้งในหัวมัน

สำปะหลังด้วยเครื่องชั่ง Reimann scale

7. การวัดประสิทธิภาพการใส่ปุ๋ยของพืช โดยเปรียบเทียบอัตราการดูดใช้ธาตุ N P และ K ของมันสำปะหลังในแปลงที่ใส่ปุ๋ยเม็ดต่ออัตราการดูดใช้ธาตุ N P และ K ของมันสำปะหลังในแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ยเม็ด

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

8.1 เปรียบเทียบความแปรปรวน (Analysis of Variance) ของประสิทธิภาพการกำจัดพาราควอทตกค้างในดินและประสิทธิภาพการเติบโตของมันสำปะหลังในแต่ละตำรับการทดลอง

8.2 หาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างปัจจัยทางด้านกายภาพต่อปริมาณการจัดสรรพาราควอทตกค้างและการเติบโตของพืชเพาะปลูกในแต่ละตำรับการทดลอง โดยวิธีการทางสถิติเพื่อนำมาหาความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญ

9. สรุปผลการศึกษาในภาคสนามเพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์และปรับปรุงต่อไป