บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ดำเนินการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ PGPR ที่ได้มีการศึกษารวบรวมไว้

3.1.1 PGPR, Bacillus และ Streptomuces จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

3.1.2 PGPR ที่ตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอร์โมนพืชได้จากกลุ่มวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

3.1.3 PGPR และเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสฟอรัส และโปแตสเซียมจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 ทำการคัดเลือก PGPR จากที่รวบรวมไว้ตามคุณสมบัติ

3.2.1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ทำการทดสอบทั้งในสภาพมีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน โดยใช้เทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) ตรวจสอบด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยใช้ Capillary Column

3.2.2 ความสามารถในการสร้าง Indole Acetic Acid (IAA) โดยการเกิดสี เมื่อใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้น

3.2.3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคกลุ่ม Phytopthora, Fusarium และ Collectotricham โดยดูจากลักษณะ clear zone ที่เกิดจากการยับยั้ง

3.2.4 ทำการคัดเลือก PGPR เพิ่มเติมโดยใช้ลักษณะจากข้อ 3.2.1 -3.2.3 แต่ทดสอบในสภาวะกดดัน ได้แก่ อุณหภูมิสูง (40, 45, 50 และ 60°ซ), ความเป็นกรด (pH 3.5, 4, 4.5, 5 และ 5.5) และความเป็นด่าง (pH 8, 8.5 และ 9)

3.2.5 นำ PGPR ที่คัดเลือกได้ ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น 3 ประการ มาทดสอบกับพืชในระดับกระถางสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ กลุ่มผัก และข้าวโพด โดยคุณสมบัติในส่วนที่เป็นปุ๋ยชีวภาพ จะทำการทดสอบกับพืชที่ปลูกด้วยอาหารสังเคราะห์ในระบบปลอดเชื้อ จากนั้นปลูกเชื้อ PGPR ลงไป โดยมีตำรับ ดังนี้ อาหารสังเคราะห์ที่ขาดธาตุอาหาร N (ในกรณี N_2-fixer) และ อาหารที่มี P และ K ต่ำ (ในกรณี phosphate และ potassium solubilizer) สำหรับคุณสมบัติที่มีการสร้าง phytohormone จะทำการทดสอบกับพืชในระบบปลอดเชื้อ โดยทำการปลูกเชื้อร่วมกับพืช จากนั้นทำการตรวจสอบความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และมวลของราก ส่วนกรณีต้านทานโรคจะทำในทำนองเดียวกัน แต่จะกระตุ้นให้พืชเกิดสภาพอ่อนแอ และไม่เป็นโรค จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกไว้ในผัก จะทำการบันทึกผลทุก

7 วัน เป็นเวลา 35-40 วัน ส่วนข้าวโพด จะบันทึกผลทุก 14 วัน เป็นเวลา 45-60 วัน โดยแต่ละลักษณะบทบาทของ PGPR ของพืชแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 10 ซ้ำในเรือนเพาะ

3.2.6 ทำการคัดเลือกกลุ่ม PGPR ที่มีศักยภาพสูงที่ได้จาก ข้อ 3.2.5 มาทำการจำแนกชนิดโดยใช้การอ่านลำดับเบสบน DNA จากกลุ่มยีน ribosomal DNA

ทั้งนี้ วิธีการศึกษาวิจัย และการวิเคราะห์ผลโดยละเอียดได้แสดงไว้ในผลงานวิจัย (รายเอียดแนบในภาคผนวก) ดังนี้

1. พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ Bacillus subtilis เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.
2. Piromyou, P *et. al.,* 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand. Eu. J. of Soil. Biol. 47:44-54.