

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยเรื่อง การส่งเสริมการดูดใช้ธาตุโพแทสเซียมจากดินดาน โดย Potassium solubilizing bacteria เพื่อเพิ่มผลผลิตมันสำปะหลัง ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย มีการดำเนินการวิจัยตามลำดับหัวเรื่องดังนี้

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เก็บดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังบริเวณพื้นที่แปลงมันสำปะหลังที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีประวัติการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม เพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรีย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ในเขตพื้นที่อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา

2. แยกแบคทีเรีย KSB ด้วยวิธี serial dilution plate method โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ modified aleksandrov medium ที่มี insoluble mica powder เป็นแหล่ง potassium source บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 3 วัน

เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

3. คัดเลือกแบคทีเรีย KSB ที่มีศักยภาพในการละลายโพแทสเซียมออกจากแร่ธรรมชาติ เพื่อให้โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยนำแบคทีเรีย KSB ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified aleksandrov medium plate ที่มี soluble form ของโพแทสเซียม (K_2HPO_4) ด้วยวิธี spot test method บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการสร้าง potassium solubilization zone

4. ตรวจสอบวัดปริมาณการปลดปล่อยโพแทสเซียมของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรีย KSB ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified aleksandrov medium broth ที่มี insoluble mica powder บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำ suspension ของเชื้อมา centrifuge ที่ 7000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วน supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณการปลดปล่อยโพแทสเซียม ด้วย atomic absorption spectrometer เทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามวิธีของ Manib, Zahra, Abdel-Al, & Heggo (1986)

6. คัดเลือกแบคทีเรีย KSB ที่มีศักยภาพสูงสุดในการละลายโพแทสเซียม ในระดับห้องปฏิบัติการ มาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะเซลล์และคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ และทำการทดสอบลักษณะที่ใช้แยกกลุ่มแบคทีเรีย โดยอาศัยข้อมูล Classification ตามหลักอนุกรมวิธานวิทยาของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Hensel, 1994) และจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา โดยสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะ ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เครื่อง Thermo Cycler แล้วนำผลการ amplify ส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียมาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sequencing นำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) นำลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการละลายโพแทสเซียมที่แยกได้ ไปรายงาน (submission) ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อเผยแพร่ในระดับนานาชาติ

7. นำแบคทีเรีย KSB ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายโพแทสเซียม ไปทดสอบการย่อยดินดานในกระถางโรงเรือน เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยโพแทสเซียม วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในดินก่อนนำมาใช้ในการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CBD ประกอบไปด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ดินใส่ไมกา 6 กรัม/กระถาง ไมใส่เชื้อ KSB กรรมวิธีที่ 2 ดินใส่เชื้อ KSB 25 มิลลิลิตร ร่วมกับแร่ไมกา 6 กรัม/กระถาง กรรมวิธีที่ 3 ดินใส่เชื้อ KSB 50 มิลลิลิตร ร่วมกับแร่ไมกา 6 กรัม/กระถาง และกรรมวิธีที่ 4 ดินใส่เชื้อ KSB 75 มิลลิลิตร ร่วมกับแร่ไมกา 6 กรัม/กระถาง เก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ทุก 2 วัน ในช่วง 6 วันแรก ผสมน้ำลงในกระถางทดลองแต่ละกรรมวิธี คลุกเคล้าให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างดินทุกวัน ในช่วง 7 วันแรก แล้วนำดินมาวิเคราะห์ ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable K) โดยสกัดด้วยน้ำยา 1 N ammonium acetate และวัดปริมาณโพแทสเซียมโดย Atomic Absorption Spectrophotometer

8. เปรียบเทียบวิธีการต่อเวลาในการย่อยที่ต่างกัน และเปรียบเทียบแต่ละกรรมวิธีต่อช่วงเวลาการย่อยเดียวกัน ประเมินความเป็นไปได้ของโครงการวิจัยและสรุปผลการศึกษาในภาคสนามเพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์และปรับปรุงต่อไป

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

1. ร้อยละ (%)
2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน S.D
3. ค่าเฉลี่ย (\bar{X})
4. ค่าความแปรปรวน (ANOVA)