บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการสำรวจและรวบรวมน้ำสกัดชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรและที่มีวางจำหน่ายในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ขั้นตอนที่สองเป็นการศึกษาคุณสมบัติของน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการสำรวจ ขั้นตอนที่สามเป็นการทดลองศึกษาผลกระทบของอายุการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำสกัดชีวภาพ และ ขั้นตอนที่สี่เป็นการทดลองศึกษาผลกระทบของน้ำสกัดชีวภาพต่อสมบัติของดิน ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การสำรวจและรวบรวมน้ำสกัดชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรและที่มีวางจำหน่ายในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมน้ำสกัดชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรและที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดของจังหวัดเชียงใหม่ สำหรับน้ำสกัดชีวภาพของเกษตรกรได้จากกลุ่มเกษตรกรที่ผลิตผักอินทรีย์ใน อำเภอแม่แตง บ้านป่าน็อต กิ่งอำเภอแม่ออน และอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการสำรวจและที่ผลิตขึ้นตามคำแนะนำ

นำน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากข้อที่ 3.1 มาวิเคราะห์หาสมบัติทางเคมี ซึ่งได้แก่ pH ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณ NH_4-N organic labile N เช่น amino sugar-N NH_4-N NO_3-N ไนโตรเจนทั้งหมด (total-N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (total-P) โปแตสเซียมทั้งหมด (total-K) แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส สังกะสี เหล็ก และ ทองแดง ในการผลิตน้ำสกัดชีวภาพจากผัก เปลือกสับปะรดและเศษปลาที่ผลิตตามคำแนะนำ ใช้อัตราส่วนของวัสดุจากพืชต่อน้ำตาลทราย 3 ต่อ 1 ส่วนเศษปลาใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 หมักเป็นเวลา 14 วัน ยกเว้นน้ำสกัดชีวภาพจากเศษปลาซึ่งใช้เวลาหมักเป็นเวลา 1 เดือน และนำน้ำสกัดชีวภาพที่ผลิตขึ้นตามคำแนะนำและสูตรการค้ามาหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส ปริมาณแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน และ เชื้อรา ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.2.1 pH และ ค่าการนำไฟฟ้า

วัด pH ของน้ำสกัดชีวภาพด้วย pH-meter และวัดค่าการนำไฟฟ้าโดย conductivity-meter

3.2.2 ปริมาณ NH_4-N + amino sugar-N NH_4-N และ ปริมาณ NO_3-N

1. การเตรียม MgO

ชั่ง MgO (heavy powder) เผาไล่ CO_2 โดยใช้เตาเผาที่อุณหภูมิ 600-700° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บไว้ในโถแก้วที่บรรจุ KOH เพื่อกันการดูด CO_2 จากอากาศ

2. การเตรียมสารละลาย 2% Boric acid-indicator (2% H_3BO_3)

ชั่ง H_3BO_3 จำนวน 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่นจำนวน 200 มล. นำไปอุ่นเพื่อให้ H_3BO_3 ละลายจนหมดจากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 600 มล. ปล่อยไว้ให้เย็น เติม mixed indicator (Methylred 0.0660 g. และ bromcresol green 0.0990 g. ละลายใน ethanol จำนวน 100 ml.) จำนวน 20 มล. วัด pH ของสารละลายและปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 โดยใช้ NaOH 0.1 N หรือ HCl 0.1 N จะได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงแดง ทดสอบว่าสีของสารละลายใช้ได้หรือไม่โดยการนำสารละลาย Boric acid-indicator มาจำนวน 10 มล. ใส่ในกระบอกตวงแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจำนวน 10 มล. สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียวทันทีแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. (เนาวรัตน์, 2527)

3. กลั่นหาปริมาณ NH_4-N + amino sugar-N

ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มล. ดูดน้ำสกัดชีวภาพใส่ในหลอดกลั่นของเครื่องกลั่นโตรเจนเติม 40% NaOH ประมาณ 20 มล. และใช้ระยะเวลาการกลั่น 5-7 นาที (เก็บตัวอย่างหลังการกลั่นเป็นจำนวน 100 มล.) นำ erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ที่มี boric acid-indicator บรรจุอยู่เป็นจำนวน 15 มล.มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ erlenmeyer flask จุ่มลงใน boric acid-indicator ทำการกลั่น เมื่อกระบวนการกลั่นสิ้นสุดลง นำ erlenmeyer flask ที่บรรจุสารละลายที่ได้ซึ่งมีสีเขียวใสมาไตเตรตกับ standard H_2SO_4 0.005 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรตและนำมาคำนวณหาปริมาณ NH_4-N + amino sugar-N

4. ปริมาณ NH_4-N ปริมาณ NO_3-Nโดยวิธี Magnesium oxide-Devada alloy method

ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มล. ดูดน้ำสกัดชีวภาพใส่ในหลอดกลั่นของเครื่องกลั่นโตรเจน แล้วเติม MgO จำนวน 0.2 กรัม จากนั้นนำหลอดกลั่นไปใส่ในเครื่องกลั่นไนโตรเจน นำ erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ที่มี boric acid-indicator บรรจุอยู่เป็นจำนวน 15 มล.มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ erlenmeyer flask จุ่มลงใน boric acid-indicator ทำการกลั่น โดยใช้เวลาการกลั่นไม่เกิน 7 นาที ซึ่งจะได้ปริมาณของเหลวที่ได้จากการกลั่นประมาณ 50 มล. เมื่อสิ้นสุดกระบวนการกลั่น นำ erlenmeyer flask ที่บรรจุสารละลายที่ได้ซึ่งมีสีเขียวใสมาไตเตรตกับ standard H_2SO_4 0.005 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรตและนำมาคำนวณหาปริมาณ NH_4-N หลังจากกลั่นหา

NH_4-N เสร็จแล้วปล่อยหลอดกลั่นไนโตรเจนให้เย็นแล้วเติม devada alloy จำนวน 0.2 กรัมลงไป และทำการกลั่นซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ระยะเวลาในไม่เกิน 7 นาที เมื่อสิ้นสุดกระบวนการกลั่น นำ erlenmeyer flask ที่บรรจุสารละลายที่ได้ซึ่งมีสีเขียวใสมาไตเตรตกับ standard H_2SO_4 0.005 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต และนำมาคำนวณหาปริมาณ NO_3-N ทั้งหมดจากสมการ

$$NH_4\text{-N} + \text{amino sugar-N} / NH_4\text{-N} / NO_3\text{-N}\ (\%) = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times 100}{1{,}000 \times W}$$

เมื่อ V_s : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มล.)

V_b : ปริมาตร standard H_2SO_4 ทีใช้ไตเตรต blank (มล.)

N : ความเข้มข้นของ standard H_2SO_4 เท่ากับ 0.05 N.

W : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 25 มล.

3.2.3 การย่อยตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ (ดัดแปลงจาก ศรีสม,2544 และ Walinga *et al*,1989)

ใช้ตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพจำนวน 2 มล. ใส่ในหลอดย่อย เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น จำนวน 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เติม 50%ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จำนวน 3 มล. โดยแบ่งใส่ครั้งละ 1 มล. รอให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ก่อนจึงเติมเป็นครั้งที่สองและครั้งที่สามตามลำดับ ต่อจากนั้นย่อยตัวอย่างโดยใช้ N digestion block โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นประมาณ 100 องศาเซลเซียล และค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทีละน้อยจนถึงอุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียล ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มล. โดยใช้ volumetric flask นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.5 ซึ่งสารละลายที่ย่อยได้นี้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส สังกะสี เหล็ก และ ทองแดง ต่อไป ในการย่อยตัวอย่างแต่ละครั้งจะย่อย blank โดยใช้เฉพาะสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างและใช้วิธีการย่อยตลอดจนวิธีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเหมือนกับที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างควบคู่กันทุกครั้ง

3.2.4 ไนโตรเจนทั้งหมด (Total-N) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสารละลาย 2% Boric acid-indicator (2% H_3BO_3) เหมือนข้อ 2 ในหัวข้อ 3.2.2

2. การกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Bremner,1996)

ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มล. ดูดสารละลายที่ย่อยได้ในข้อที่ 3.2.3 นำมาใส่ในหลอดกลั่นของเครื่องกลั่นโตรเจนเติม 40% NaOH 5-7 มล. รองรับของเหลวที่ได้รับจากการกลั่น

ประมาณ 75 มล. นำ erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ที่มี boric acid-indicator บรรจุอยู่เป็นจำนวน 15 มล.มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ erlenmeyer flask จุ่มลงใน boric acid-indicator ทำการกลั่น เมื่อกระบวนการกลั่นสิ้นสุดลง นำ erlenmeyer flask ที่บรรจุสารละลายที่ได้ซึ่งมีสีเขียวใสมาไตเตรตกับ standard H_2SO_4 0.005 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรตและนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสมการ

$$\text{Total-N}(\%) = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times V_d \times 100}{1{,}000 \times V_a \times W}$$

เมื่อ V_s : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มล.)

V_b : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรต blank (มล.)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 50 มล.

N : ความเข้มข้นของ standard H_2SO_4 เท่ากับ 0.05 N.

W : ปริมาตรตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

3.2.5 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total-P) (ดัดแปลงจาก Walinga *et al.*,1989)

1. การเตรียมสารละลาย Mixed reagent

ละลาย ammonium vanadate 1.25 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่นจำนวน 200 มล. เติม HNO_3 (s.p.= 1.42) ปริมาตร 158.42 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้เป็นสารละลายที่ (1) สำหรับสารละลายที่ (2) ได้จากการละลาย ammonium molybdate tetrahydrate จำนวน 25.00 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่น 300 มล. หลังจากนั้นผสมสารละลายที่ (1) และสารละลายที่(2) เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. โดยใช้ volumetric flask.

2. การเตรียม Standard-P 100 ppm.

ชั่ง potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ซึ่งอบที่ 105 °C เป็นเวลา 2 ชม. จำนวน 0.4390 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม Standard Curve ให้มีความเข้มข้นของ P เป็น 0 4 8 12 16 และ 20 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูด Standard-P 100 ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล. ตามลำดับใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติม mixed reagent ลงไปปริมาตร 5 มล. หลังจากนั้นเติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1.88 M. จำนวน 2 มล. ปรับปริมาตรเป็น 25 มล.โดยน้ำกลั่น เขย่าแล้วตั้ง

ทิ้งได้เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การส่องผ่านของแสง (% transmittance) ที่ความยาวคลื่น 470 *n*m. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าที่อ่านได้โดยใช้กราฟsemi-log

4. การหาปริมาณ P ในตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ

ดูดสารละลายตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการย่อยในหัวข้อ 3.2.3 จำนวน 2 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติม mixed reagent จำนวน 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเหมือนกับ Standard Curve ในข้อที่(3) เทียบค่าความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพกับ Standard Curve แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างจากสมการ

$$\text{Total-P(\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{10^6 \times V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std.curve-P(ppm.)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 50 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

W : ปริมาตรตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

3.2.6 ปริมาณโพแตสเซียมทั้งหมด (Total-K) (ดัดแปลงจาก Walinga *et al.*,1989)

1. การเตรียม Standard-K 1,000 ppm.

ละลาย KCl บริสุทธิ์ (อบให้แห้งที่ 105 °C เป็นเวลา 2 ชม.) จำนวน 0.9533 กรัม ใน volumetric flask ปริมาตร 500 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียม Standard-K 100 ppm.

ดูด Standard-K 1,000 ppm. จำนวน 10 มล. โดยใช้ volumetric pipette ใส่ใน volumetric flask ปริมาตร 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม Standard Curve ให้มีความเข้มข้นของ K เป็น 0 2 4 6 8 และ 10 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูด Standard-K 100 ppm. มาจำนวน 0 2 4 6 8 และ 10 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1.88 M. จำนวน 12 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 *n*m ที่ slit width เท่ากับ 0.7 *n*m และที่ energy อยู่ในช่วง 66-70.

4. การหาปริมาณ K ในตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ

ดูดสารละลายตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการย่อยในหัวข้อ 3.2.3 จำนวน 3 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนำไปอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer เหมือนกับ standard curve ในข้อที่(3) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ K ดังสมการ

$$\text{Total- K (\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{10^6 \times V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std.curve- K (ppm.)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 50 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 3 มล.

W : ปริมาตรตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

3.2.7 การหาปริมาณ Ca และ Mg (ดัดแปลงจาก Walinga *et al*,1989)

1. การเตรียมสารละลาย 5% Lanthanum chloride.

ชั่ง Lanthanum oxide จำนวน 58.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มล. เติม 37% HCl ลงไป ปริมาตร 250 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารละลาย 0.2% Lanthanum chloride.

ดูดสารละลาย 5% Lanthanum chloride จำนวน 40 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลาย Standard-Ca ที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm. และสารละลาย Standard-Ca ที่มีความเข้มข้น 100 ppm.

ชั่ง $CaCO_3$ จำนวน 2.5250 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. เติม conc.HCl จำนวน 5 มล. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask จะได้ Standard-Ca 1,000 ppm. สำหรับ Standard-Ca ที่มีความเข้มข้น 100 ppm. เตรียมได้จากการดูดสารละลาย Standard-Ca 1,000 ppm. จำนวน 10 มล. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4. การเตรียมสารละลาย Standard-Mg ที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm. และสารละลาย Standard-Mgที่มีความเข้มข้น 100 ppm.

ชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ จำนวน 1.0271 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น สำหรับ Standard-Mg. ที่มีความเข้มข้น 100 ppm. เตรียมได้จากการดูดสารละลาย Standard-Ca 1,000 ppm. จำนวน 10 มล. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม Standard Curve ของ Ca และ Mg ที่มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.

เตรียม Standard Curve ของ Ca ที่มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.จากการดูดสารละลาย Standard-Ca 100 ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล.ตามลำดับ ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม H_2SO_4 1.88 M. ปริมาตร 5 มล. ปรับปริมาตรด้วย 0.2% Lanthanum chloride และสำหรับ Standard Curve ของ Mg ที่มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.จากการดูดสารละลาย Standard-Mg 100 ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล.ตามลำดับ ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม H_2SO_4 1.88 M. ปริมาตร 5 มล. ปรับปริมาตรด้วย 0.2% Lanthanum chloride เช่นเดียวกัน เขย่าแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ซึ่งตั้ง Lamp ที่ 30 โดย Ca จะอ่านที่ความยาวคลื่น 422.7 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.7 *n*m. และที่ energy เท่ากับ 73 ส่วน Mg จะอ่านที่ความยาวคลื่น 285.2 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.7 *n*m. และที่ energy อยู่ในช่วง 69-74.

6. การหาปริมาณ Ca และ Mg ในตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ

ดูดสารละลายตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการย่อยในหัวข้อ 3.2.3 มาจำนวน 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วย 0.2 % lanthanum chloride เขย่าแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer เช่นเดียวกับ standard curve ในข้อที่(5) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ Ca และ Mg ดังสมการ

$$\text{Ca หรือ Mg (ppm)} = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น Ca หรือ Mgในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Standard curve

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 50 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 5 มล.

W : ปริมาตรตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

3.2.8 การปริมาณ Mn Zn Fe และ Cu (ดัดแปลงจาก Walinga *et al.*,1989)

1. การเตรียมสารละลาย Standard-Mn Zn Cu และ Fe ความเข้มข้น 100 ppm.

ชั่ง $MnSO_4.H_2O$ จำนวน 0.0308 กรัม ชั่ง Zn $SO_4.7H_2O$ จำนวน 0.0440 กรัม และ ชั่ง Cu $SO_4.5H_2O$ 0.0387 กรัม ที่เก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น แยกใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล.แต่ละอัน เติมน้ำกลั่น 20 มล. เขย่าให้ละลายหลังจากนั้นเติม conc.HNO_3 จำนวน 1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลาย Standard-Mn Zn และ Cu ที่มีความเข้มข้น 100 ppm. สำหรับสารละลาย Standard-Fe ความเข้มข้น 100 ppm. เตรียมได้จากการชั่ง $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ ที่เก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น จำนวน 0.0702 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่น 20 มล. เข่าให้ละลาย เติม conc.H_2SO_4 ปริมาตร 0.25 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียม Standard curve ของ Mn Zn Cu และ Fe ที่มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.

ดูดสารละลาย Standard-Mn Zn และ Fe ที่มีความเข้มข้น 100 ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล.ตามลำดับ ลำดับ ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มล. โดยแยกเป็นแต่ละธาตุ เติม H_2SO_4 1.88 M. ปริมาตร 12 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer โดย Mn จะอ่านที่ความยาวคลื่น 279.8 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.2 *n*m. และที่ energy อยู่ในช่วง 61-74 สำหรับ Cu จะอ่านที่ความยาวคลื่น 324.8 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.7 *n*m. และที่ energy อยู่ในช่วง 64-74 และ Fe จะอ่านที่ความยาวคลื่น 248.3 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.2 *n*m. และที่ energy อยู่ในช่วง 45-50 ตามลำดับ

3. การเตรียม Standard curve ของ Zn ที่มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ppm.

เตรียมสารละลาย standard-Zn ที่มีความเข้มข้น 10 ppm. จากการดูด standard-Zn 100 ppm. มาจำนวน 10 มล. โดยใช้ volumetric pipette ใส่ใน vojumetric flask ขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหลังจากนั้นดูดสารละลาย standard-Zn 10 ppm. มาจำนวน 0 2 4 6 8 และ 10 ppm. ตามลำดับ ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม H_2SO_4 1.88 M. ปริมาตร 12 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่องAtomic Absorption Spectrophotometer โดยอ่านที่ความยาวคลื่น 213.9 *n*m. ที่ slit width เท่ากับ 0.7 *n*m.และที่ energyอยู่ในช่วง 58-64

4. การหาปริมาณ Mn Zn Fe และ Cu ในน้ำสกัดชีวภาพ

ดูดสารละลายตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ได้จากการย่อยในหัวข้อ 3.2.3 จำนวน 3 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophoto meter เหมือนกับ standard curve ในข้อที่(2) และ(3) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ Mn Zn Fe และ Cu ดังสมการ

$$\text{Mn /Zn /Fe /Cu (ppm)} = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น Mn/Zn /Fe /Cu ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std.curve

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 50 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 3 มล.

W : ปริมาตรตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 2 มล.

3.2.9 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส (อำพรรณ, 2541)

1. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส

ใส่น้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จำนวน 900 มล. เติม $NaNO_3$ จำนวน 0.5 กรัม K_2HPO_4 1.0 กรัม MgSO4.7 H_2O จำนวน 0.5 กรัม KCl จำนวน 0.5 กรัม และ $Fe_2(SO_4)_3.9H_2O$ ปริมาณเล็กน้อย แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl 0.1 N หรือ NaOH 0.1 N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นตัดกระดาษกรอง Whatman No1. ให้มีขนาดกว้าง 1.0 ซม. ยาว 10 ซม. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16 ซม. หลอดละ 1 อันแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ลงไปหลอดละ 9 มล. ปิดฝาแล้วปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ(Sterilize) ด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางเมตร เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมทำ Dilution

นำน้ำกลั่นปริมาตร 9 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 16 ซม. ปิดฝาแล้วปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ นำ tip ของ autopipette ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเช่นกัน และนำ pipette ปากกว้างขนาด 1 มล.ใส่สำลีที่ปลายด้านบนแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. การทำ Dilution

นำ pipette ปากกว้างที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพใส่หลอดทดลองที่ 1 ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Mixer จะได้สารละลายที่มีความเจือจางเป็น 10^{-1} ดูดสารละลายจากหลอด 10^{-1} ปริมาตร 1 มล. โดยใช้ tip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ในหลอดทดลองที่ 2 ปริมาตร 1 มล. ดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มล.ใส่ในหลอดที่ 3 ดูดสารละลายจากหลอดที่ 3 ปริมาตร 1 มล.ใส่ในหลอดที่ 4 ดูดสารละลายจากหลอดที่ 4 ปริมาตร 1 มล.ใส่ในหลอดที่ 5 ดูดสารละลายจากหลอดที่ 5 ปริมาตร 1 มล.ใส่ในหลอดที่ 6 จะได้สารละลายที่มีความเจือจางเป็น 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ

4. การหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในสภาพไม่มีออกซิเจนโดยวิธี Most Propulation Number (MPN) แล้วปิดทับด้วยพาราฟินเหลว

นำสารละลายดินที่มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} มาอย่างละ 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสและปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ความเจือจางละ 4 ซ้ำ หลังจากนั้นนำมาบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลแล้วนำมาแปลงเป็นค่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสโดยนำมาเปรียบเทียบกับตาราง MPN ที่ค่าความเจือจางของสารละลายดินเป็น 10 เท่า ซึ่งมี 4 ซ้ำต่อสารละลายดิน(ดูในภาคผนวก)

3.2.10 การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา(อำพรรณ,2541)

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคที่เรีย (Egg Albumin Agar) นำน้ำกลั่นใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จำนวน 900 มล. เติม egg alumin จำนวน 0.25 กรัมที่ละลายใน NaOH 0.1 N จำนวน 10 มล. เติม glucose จำนวน 1 กรัม K_2HPO_4 จำนวน 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ จำนวน 0.2 กรัม $Fe_2(SO_4)_3.9H2O$ จำนวน 0.01 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย HCl 0.1 N หรือ NaOH 0.1 N แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ใส่ผงวุ้นจำนวน 15 กรัมแล้วนำไปต้มจนเดือดหลังจากนั้นเทใส่ขวดแบนขนาด 250 มล. ประมาณ 200 มล.ปิดจุกสำลีปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Rose Bengal-Streptomycin Agar) นำน้ำกลั่นใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จำนวน 900 มล. เติม glucose จำนวน 10 กรัม peptone จำนวน 5 กรัม KH_2PO_4 จำนวน 1.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ จำนวน 0.5 กรัม rose bengal จำนวน 0.0350 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่นและเติมผงวุ้น 15 กรัม นำไปต้มจนเดือด หลังจากนั้นเทใส่ขวดแบนขนาด 250 มล. จำนวน 200 มล.ปิดจุกสำลีปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน สำหรับสารละลาย strep tomycin เตรียมได้จากการชั่ง streptomycin จำนวน 0.3000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. แล้วนำไปผ่านเครื่องกรองแบคทีเรียที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจะได้สารละลาย streptomycin ที่มีความเข้มข้นเป็น 6,000 μg /ml. ใส่สารละลาย streptomycin ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนการ pour plate โดยใส่ในอัตราที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของ streptomycin 30 μg /ml.

2. เตรียมทำ Dilution : เหมือนข้อ(2) ในหัวข้อ 3.2.9

3. ทำ Dilution : เหมือนข้อ(3) ในหัวข้อ 3.2.9

4. หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิด Aerobe และ Anaerobe และ เชื้อราโดยวิธี Pour Plate

นำสารละลายตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} มาอย่างละ 1 มล.โดยใช้ tip ของ autopipette ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงใน plate ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่ 180 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่งโมง โดยใช้ dilution ละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราลงไปปริมาตร 15 มล./plate นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สำหรับแบคทีเรียชนิด Anaerobe จะเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่มี O_2 โดยนำ plate ที่ใช้หาปริมาณเชื้อไปใส่ในโถดูดความชื้นที่มี anaerocule A และ methylene blue indicator (วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวก) บรรจุอยู่เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยเชื้อแบคทีเรียจะนับเฉพาะ plate ที่มีจำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 30-300 colony. และเชื้อราจะนับเฉพาะ plate ที่มีจำนวนเชื้อราอยู่ระหว่าง 10-100 colony. เท่านั้น

3.2.11 ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Indole Acetic Acid (IAA) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เตรียมแผ่น Silica gel สำหรับทำ Thin layer chromatography.

ล้างแผ่นกระจกขนาด 20 X 20 ซม. ผึ่งให้แห้ง เช็ดด้วย acetone ปล่อยให้แห้ง นำผง Silica gel สำหรับ TLC จำนวน 30 กรัม ละลายน้ำกลั่น 60 มล. แล้วคนให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งไม่มีฟองอากาศ(slurry) นำไปเคลือบกระจกให้หนา 0.5 มม. โดยใช้ชุดเคลือบ TLC-Plate วางกระจกที่เคลือบแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปอบที่ 110 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากคณาจารย์สาขาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี, 2544)

2. เตรียมต้นกล้าถั่วเขียว

นำเมล็ดถั่วเขียวแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเพาะลงในกระบะทรายนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้ได้ coleoptile ยาวประมาณ 10 ซม. หลังจากนั้นนำไปไว้ในที่ที่มีแสงเป็นเวลา 10 วัน(Weerasooriya *et al*, 2001)

3. คัดแยก IAA จากน้ำสกัดชีวภาพโดยวิธี Thin layer chromatography.

ดูดตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพปริมาตร 100 μl. ด้วย automicropipette หยดเป็นแถบลงบนแผ่น silica gel โดยมีระยะห่างกัน 2 ซม. แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าผม นำไปวางใน chamber ที่มีตัวทำละลาย(solvent) ซึ่งประกอบด้วย chloroform : methanol :28% ammonia solution เป็น 5:4 :1 โดยปริมาตร กำหนดให้มีระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเป็น15 ซม.(ประมาณ 1.45 ชั่วโมง) แล้วนำออกมาผึ่งให้แห้ง ขูดช่วงที่มีค่า R_f เป็น 0.43-0.45(Norcini and Heuser,1988) ละลายใน NaOH 1 N จำนวน 1 มล. (http://www.phytotechlab.com/webdocs/msdsSheets.pdf) แล้วนำมาทำการทดสอบต่อไป

4. เตรียม standard IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-5} และ 10^{-7} M

ชั่ง IAA จำนวน 0.0018 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. ละลายด้วย NaOH 1 N จำนวน 1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้ standard IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M หลังจากนั้นเตรียม standard IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-5} Mโดยการดูด standard IAA 10^{-3} M มา จำนวน 1 มล. ด้วย volumetric pipette ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วเติม NaOH 1 N จำนวน 1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้ standard IAA ที่มีความเข้มข้น10^{-5} M สำหรับ standard IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-7} M นั้นได้จากการดูด standard IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-5} M จำนวน 1 มล. ด้วย volumetric pipette ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วเติม NaOH 1N จำนวน 1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น(ดัดแปลงจาก **http://www.koning.ecsu.ctstateu.edu/Plants_Human/vegproplab.html** และ http://www.aggie-horticulture.tamu.edu/syllabi/202h/auxin.html)

5. หาปริมาณ IAA ในตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ

นำสารละลายที่ได้จากข้อที่ (3) และสารละลาย standard IAA ในข้อที่ (4) ปริมาตร 10 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ตัดต้นถั่วเขียวที่เตรียมในข้อที่ (2) ให้ห่างจากพื้นดิน 1 นิ้ว นำไปแช่ในสารละลายทันทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายใส่ขวดที่มีน้ำกลั่น 140 มล.ที่หุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยโดยปากขวดจะเจาะรูไว้สำหรับใส่ต้นถั่ว นำต้นถั่วไปไว้ในห้องทดลองที่สามารถควบคุมแสงและอุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนรากและบันทึกผลการทดลองแล้วนำไปเปรียบเทียบกับ Standard Curve ของ IAA.

3.3 การศึกษาผลกระทบของอายุการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำสกัดชีวภาพ

ใช้การทดลองในห้องปฏิบัติการโดยจัดตำรับการทดลองแบบ 6 X 5 factorial แบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มีปัจจัยที่ทดลอง 2 ปัจจัย คือ ชนิดของน้ำสกัดชีวภาพ ซึ่งมี 6 ชนิด ได้แก่ น้ำสกัดชีวภาพจากผัก เปลือกสับปะรด และเศษปลาซึ่งผลิตขึ้นเองตามคำแนะนำ และน้ำสกัดชีวภาพสูตรการค้าที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด 3 สูตร คือ ปุ๋ยปลาฟิชชี่ Bio-King สูตรเตรียมต้นเพื่อการออกดอกและปุ๋ยน้ำชีวภาพโพธิ์กรุณา และ ปัจจัยที่สอง คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำสกัดชีวภาพที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีระยะเวลาการเก็บรักษา 5 ระยะคือ ที่ 0 1 2 3 และ 4 เดือน แล้วตรวจสอบสมบัติของน้ำสกัดชีวภาพเมื่อครบกำหนดโดยตรวจสอบ ค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณ N P K Ca Mg Mn Zn Fe และ Cu โดยมีวิธีการวิเคราะห์เหมือนกับหัวข้อ 3.2

3.4 การศึกษาผลกระทบของน้ำสกัดชีวภาพบางสูตรต่อสมบัติของดิน

ศึกษาผลกระทบของน้ำสกัดชีวภาพต่อสมบัติของดินด้วยวิธีการบ่มดิน (soil incubation) ที่อุณหภูมิห้อง โดยวางแผนการทดลองเป็น 7 X 3 factorial แบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ มีปัจจัยที่ทดลอง

2 ปัจจัย ปัจจัยแรก คือ ชนิดของน้ำสกัดชีวภาพ 6 สูตร ได้แก่ น้ำสกัดชีวภาพจากผัก เปลือกสับปะรด และเศษปลาซึ่งผลิตขึ้นเองตามคำแนะนำ และน้ำสกัดชีวภาพที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด 3 สูตร คือ ปุ๋ยปลาฟิชชี่ Bio-King สูตรเตรียมต้นเพื่อการออกดอก และปุ๋ยน้ำชีวภาพโพธิ์กรุณา ปัจจัยที่สอง คือชนิดของดินซึ่งมี 3 ชนิด ได้แก่ ดินชุดสันทราย (เก็บจาก MCC) ดินชุดหางดง (เก็บจาก อ.แม่แตง) และ ดิน Alluvial poory drained (เก็บจาก อ.สันกำแพง) ในการบ่มดินใช้น้ำสกัดชีวภาพมา เจือจางกับน้ำตามอัตราแนะนำคือ 1 ต่อ 500 และใส่น้ำสกัดชีวภาพที่เจือจางแล้วลงในดินแต่ละชนิดในปริมาณที่ทำให้ดินมีความชื้นที่ระดับ 60% ของความจุความชื้นสนาม (field capacity) ใช้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะบรรจุในการบ่มดินโดยแยกการทดลองออกเป็น 2 ผลการทดลองย่อย คือ การทดลองแรกทำการบ่มดินกับน้ำสกัดชีวภาพเป็นเวลา 1 เดือน และการทดลองที่สองพ่มดินกับน้ำสกัดชีวภาพเป็นเวลา 2 เดือน แล้วตรวจสอบสมบัติทางเคมีและชีวภาพ ซึ่งสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่ pH ความสามารถในการปลดปล่อยอนินทรีย์ N (mineralizable-N) ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถเป็นประโยชน์ได้(available-P) ปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ (exchangeable-K) และสมบัติทางชีวภาพของดิน ซึ่งได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose decomposer) และชีวมวลของจุลินทรีย์(microbial biomass) ดังรายละเอียดของการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.1 pH ดิน มีวิธีการดังต่อไปนี้(เนาวรัตน์,2527)

ชั่งดินจำนวน 20 g. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml. เติมน้ำกลั่น 40 มล.(อัตราส่วนของดินต่อน้ำเป็น 1: 2 ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้อัตราส่วนของดินต่อน้ำเป็น 1:1 แต่ในการทดลองนี้อัตราส่วนของดินต่อน้ำเป็น 1 ต่อ 1 ไม่สามารถวัดค่า pH ได้) คนให้เข้ากันโดยคน 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 5 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีจึงนำไปวัด pH โดยใช้ pH-meter

3.4.2 ความสามารถในการปลดปล่อยอนินทรีย์ N(Mineralizable-N) (Mulvaney,1996)

อนินทรีย์-N จะมีอยู่ในดินด้วยกัน 2 รูป คือ NH_4-N และ NO_2+ NO_3-N ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์หาดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย KCl 2 N.

ชั่ง KCl จำนวน 149.12 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ ขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่น 300 มล.ละลาย KCl ให้หมดถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียมสารละลาย 2% Boric acid indicator : เหมือนกับข้อ(2) ในหัวข้อ 3.2.2 ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว
3. การเตรียม MgO เหมือนกับข้อ(1) ในหัวข้อ 3.2.2 ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว
4. หาปริมาณ Mineralizable-N ในรูปของ NH_4-N และ NO_2+ NO_3-N ในตัวอย่างดิน

ชั่งดินจำนวน 10 กรัม ใส่ใน erlenmayer flask ขนาด 250 มล. เติม KCl 2 N. จำนวน 100 มล. ปิดจุกเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นหาอนินทรีย์-N โดยวิธี Magnesium oxide-Devada alloy method เหมือนข้อ (4) ในหัวข้อ 3.2.2 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ mineralizable-N ดังสมการ

$$NH_4\text{-}N / NO_2 + NO_3\text{-}N \text{ (ppm)} = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times V_d \times 10^6}{1{,}000 \times V_a \times W}$$

เมื่อ V_s : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มล.)

V_b : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรต blank (มล.)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเท่ากับ 100 มล.

N : ความเข้มข้นของ standard H_2SO_4 เท่ากับ 0.05 N.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 10 กรัม

3.4.3 ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถเป็นประโยชน์ได้ (Available-P) (Soil and plant analysis council, 1999)

1. เตรียมสารละลาย Bray II

ชั่ง NH_4F จำนวน 1.11 กรัม ปรับปริมาตรด้วย HCl 0.1 N (เตรียมได้จาก conc.HCl 8.28 มล. นำมาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.) จนได้ปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วย volumetric flask ขนาด 1,000 มล.

2. เตรียมสารละลาย Reagent A

ชั่ง ammonium molybdate จำนวน 12.00 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มล. นำไปอุ่นจนกระทั่งละลาย จะได้สารละลาย (a) สำหรับสารละลาย (b) เตรียมได้จากการชั่ง antimony potassium tartrate($KSbO.C_4H_4O_6$) จำนวน 0.2908 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. หลังจากนั้นผสมสารละลาย (a) และ สารละลาย(b) เข้าด้วยกันใน volumetric flask ขนาด 2,000 มล. เติม H_2SO_4 5 N (เตรียมได้จาก conc. H_2SO_4 จำนวน 141 มล. หรือ 98% H_2SO_4 จำนวน 136.24 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.) จำนวน 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลและนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารละลาย Reagent B

ชั่ง Ascorbic acid จำนวน 1.056 กรัม เติมสารละลาย Reagent A. จำนวน 200 มล. ซึ่ง Reagent B. นี้จะมีอายุการใช้งานไม่เกิน 24 ชั่วโมง

4. เตรียมสารละลาย Standard-P 100 ppm. : เหมือนในข้อ (2) ในหัวข้อ 3.2.5

5. เตรียมสารละลาย Standard curve-P ที่มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ1.0 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูดสารละลาย Standard-P 100 ppm.จำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล. ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล.เติมสารละลาย Reagent B. จำนวน 4 มล. และเติม สารละลาย Bray II จำนวน 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาทีนำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสง (%Transmittance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 *n*m. บันทึกผล

6. หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ในดิน

ชั่งดิน 2.5 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มล. ดูด สารละลาย Bray II เติมลงไปแล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman N0.5 ดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล.เติมสารละลาย Reagent B. จำนวน 4 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาทีนำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสงเช่นเดียวกับ Standard curve-P ในข้อที่(6) นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสจากสมการ

$$P(\%) = \frac{C \times V_f \times V_e \times 100}{10^6 \times V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std.curve-P(ppm.)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_e : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดินเท่ากับ 25 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 5 มล.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 2.5 กรัม

3.4.4 ปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable-K) (Soil and Plant Analysis Council, 1999)

1. เตรียมสารละลาย Ammonium acetate (NH_4oAc) 1 N pH 7

ชั่ง NH_4oAc จำนวน 77.08 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่น 800 มล. แล้วนำไปวัด pH และปรับ pH ให้เป็น 7 โดยใช้ NH_3-solution หรือ acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียมสารละลาย Standard-K 1,000 ppm. และ สารละลาย Standard-K 100 ppm. เหมือนในข้อ (1) และ (2) ในหัวข้อ 3.2.6

3. เตรียม Standard Curve ให้มีความเข้มข้นของ K เป็น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูด Standard-K 100 ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม NH_4oAc 1 N pH 7 จำนวน 20 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง flame photometer เช่นเดียวกับข้อ(3) ในหัวข้อ 3.2.4

4. หาปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยน (exchangeable-K)ได้ในดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 4 กรัม ใส่ในหลอดเขย่าดิน เติมสารละลาย NH_4oAc 1 N pH 7 จำนวน 40 มล. เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman N0.5 หลังจากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer เช่นเดียวกับข้อ(3) ในหัวข้อ 3.2.6 บันทึกผลแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ดังสมการ

$$K(ppm) = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std.curve- K (ppm.)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 40 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 5 มล.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 4 กรัม

3.4.5 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulose Decomposer) (Pramer and Schmid,1964)

1. เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส : เหมือนข้อ(1) ในหัวข้อ 3.2.9
2. เตรียมอุปกรณ์ทำ Soil dilution

นำน้ำกลั่นปริมาตร 9 มล.ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 ซม. ปิดฝาปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดกระดาษขนาดกว้าง 8 ซม. ยาว 10 ซม. ห่อด้วยกระดาษแล้วใส่ถุงพลาสติกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ นำน้ำใส่ขวดแก้วขนาด 250 มล. จำนวน 95 มล. ปิดฝาปิดทับด้วยกระดาษรัดด้วยยางนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ นำ tip ของ autopipette ขนาด 1 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน นอกจากนี้นำ pipette ปากกว้างขนาด 1 มล. ใส่สำลีที่ปลายด้านบนแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. การเตรียม Soil dilution

ชั่งดิน 10 กรัม (ใส่ในขวดที่มีน้ำอยู่ 95 มล. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) โดยใช้กระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและใช้ที่ตักสารซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มโดยจุ่ม alcohol และนำไปเผาไฟ หลังจากนั้นนำสารละลายดินไปเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-6} โดยใช้ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow cabinet) โดยใช้ pipette ปากกว้างที่ฆ่าเชื้อแล้วในการดูดสารละลายดินในขวดซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} กับที่เจือจางมากกว่า 10^{-1} ใช้ autopipette และ tip ขนาด 1 มล.ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเขย่าของผสมเป็นเวลา 15 นาที

4. หาปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี Most Propulation Number(MPN)

นำสารละลายดินที่มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} มาอย่างละ 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ความเจือจางละ 4 ซ้ำ แล้วนำมาบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลแล้วนำมาแปลงเป็นค่าปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสโดยนำมาเปรียบเทียบกับตาราง MPN ที่ค่าความเจือจางของสารละลายดินเป็น 10 เท่า ซึ่งมี 4 ซ้ำต่อสารละลายดิน

3.4.6 ชีวมวลของจุลินทรีย์ (Nunan *et al.*,1998)

1. เตรียมสารละลาย K_2SO_4 0.5 N

ชั่ง K_2SO_4 87.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล.

2. หาชีวมวลของจุลินทรีย์โดยวิธี Chloroform Fumigation และ UV-absorption ที่ 280 *n*m.

ชั่งตัวอย่างดิน 20 กรัม ด้วยช้อนตักสารที่ผ่านการจุ่ม alcohol แล้วเผาไฟ และใช้กระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในขวดแก้วขนาด 50 มล. โดยแยกดินออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 3 ตัวอย่าง โดยชุดที่ 1 สำหรับรม Chloroform และชุดที่ 2.ไม่รม Chloroform นำตัวอย่างดินชุดที่ 1 ใส่ลงในโถดูดความชื้นที่มีกระดาษทิชชูชื้นวางอยู่ด้านล่าง ใส่ Chloroform ปริมาตร 40 มล.ในบีกเกอร์แล้วนำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น ปิดฝาโถดูดความชื้นใช้เครื่องดูดอากาศดูดอากาศในโถดูดความชื้นออกจนกระทั่งไอ Chloroform มาเกาะตามผนังของโถดูดความชื้น รม Chloroform ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืดสำหรับดินชุดที่ 2 นำไปบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน เมื่อครบ 24 ชั่ว

โมงนำ Chloroform และกระดาษทิชชูออก ดูด Chloroform ที่เหลือในตัวอย่างดินออกโดยใช้เครื่องดูดอากาศดูดอากาศออก 8 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที นำดินถ่ายใส่ขวดพลาสติกที่มีฝาปิด เติม K_2SO_4 0.5 M. จำนวน 100 มล. เขย่าเป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 นำสารละลายที่กรองได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงของ UV. ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 *n*m. ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการกรอง นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหาปริมาณชีวมวลคาร์บอนและชีวมวลไนโตรเจนดังสมการ

$$\text{Biomass C} = 21{,}747\ (E_{280})$$

$$\text{Biomass N} = 3{,}479\ (E_{280}) + 40$$

เมื่อ E_{280} : ค่าการดูดกลืนแสงต่อกรัมของดิน

Biomass C มีหน่วยเป็น $\mu gC.\ g^{-1}soil$

Biomass N มีหน่วยเป็น $\mu gN.\ g^{-1}soil$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University