บทที่ 3

วิธีการทดลอง

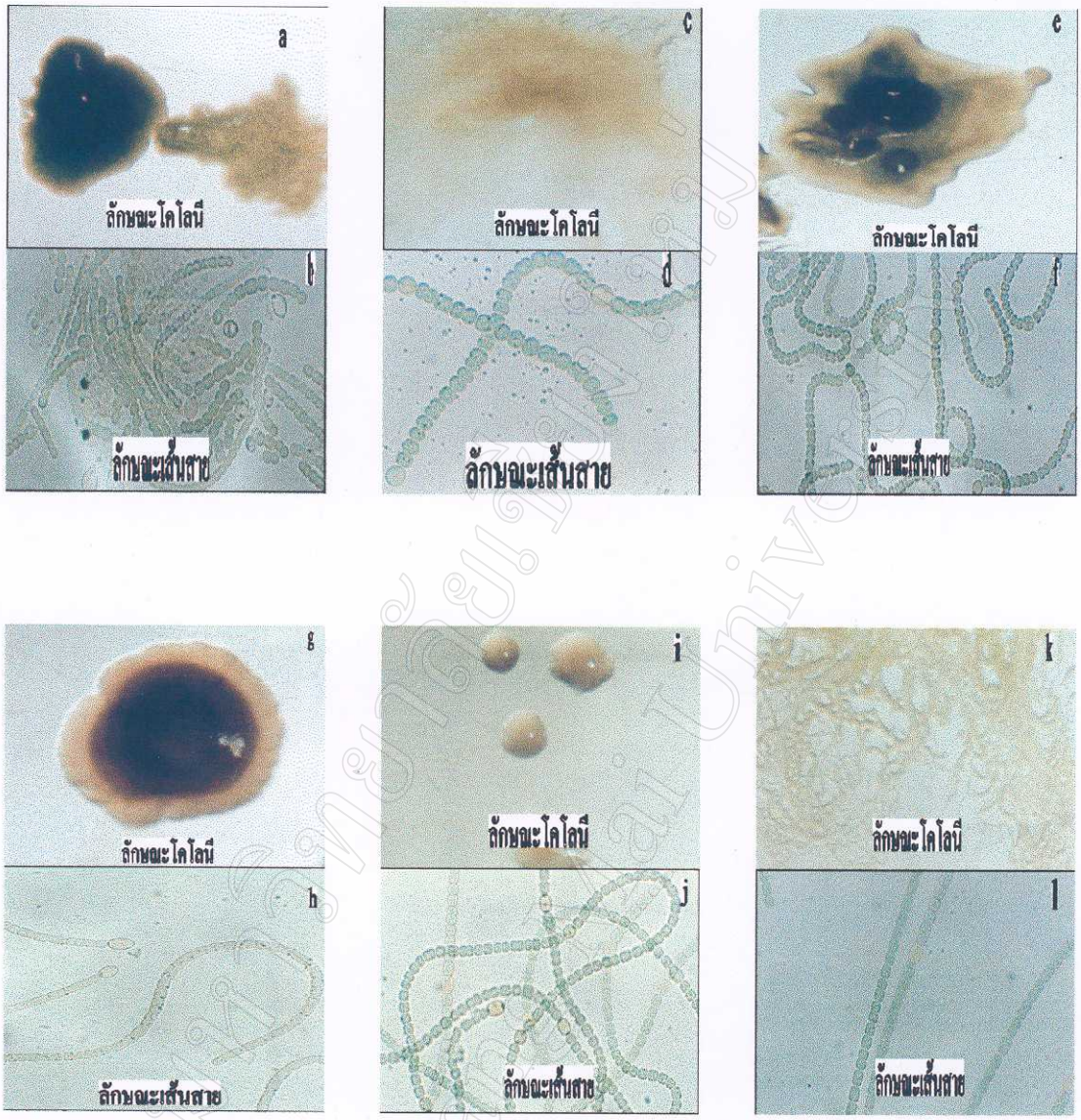
1. วิธีการทดลอง

1.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เก็บรวบรวมไว้ในหลอดเก็บเชื้อ ของหมวดวิชาจุลินทรีย์ทางดิน ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 728 ตัวอย่าง (อภิชาติ, 2544) จากตัวอย่างดังกล่าว สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง และเจริญเติบโตเร็ว ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ 6CCR1-1, 6CCR2-6, 6NR3-6, 6NECR4-1, 6NECR4-5 และ 6NR4-8 (รูปที่ 3) ซึ่งได้นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} (Rippka, 1988) 20 มิลลิลิตร โดยเริ่มต้นให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร นำไปเขย่าภายใต้แสง 4000 lux อุณหภูมิ 25 ^{0}C เก็บข้อมูลเมื่อครบ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และ 3 , 6 ,12 , 18, และ 21 วัน แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ โดยหาองค์ประกอบต่าง ๆ ต่อไปนี้เพื่อคัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความเหมาะสมมากที่สุด คือ

1.1.1 การวัดมวลชีวภาพ ทำการประเมินจากน้ำหนักแห้ง โดยนำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษกรองใส่ในโถดูดความชื้นรอจนกระดาษกรองเย็น นำมาชั่งหาน้ำหนักกระดาษก่อนกรองสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่กรองสาหร่ายแล้วไปอบให้แห้งอีกครั้ง ที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 48 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (ประกิต, 2536)

1.1.2 จำนวนเซลล์ ทำการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยทำให้เซลล์ที่เป็นเส้นสาย อยู่ในสภาพการกระจายแบบสุ่ม (random distribution) ด้วยการนำเข้าเครื่องปั่นให้เซลล์แยกจากกัน การนับจำนวนเซลล์ใช้ Petroff-hausser counting chamber โดยการหยดตัวอย่างบนสไลด์ปิดกระจก (cover glass) รอให้เซลล์ตกตะกอนประมาณ 4-5 นาที แล้วนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า(ยุวดี,2538)



รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน6 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และองค์ประกอบต่างๆ

a, b) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง 6CCR1-1 (*Nostoc* sp.)

c, d) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง6CCR2-6 (*Anabaena* sp.)

e, f) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง6NR3-6 (*Anabaena* sp.)

g, h) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง 6NECR4-1(*Anabaena* sp.)

i, j) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง6NECR4-5 (*Anabaena* sp.)

k, l) ลักษณะโคโลนีและเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอย่าง6NR4-8 (*Anabaena* sp.)

1.1.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทำการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Wintermans and Demots (1965) ดังนี้คือ ดูดอาหาร BG_{11} ที่เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบ/15 นาที นำตะกอนที่ได้เติมด้วย ethanol 95% ปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นบดละเอียดโดยเครื่อง Homogenizer เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายส่วนใสที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ ethanol 95% เป็น Blank (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

1.1.4 ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) หลังจากการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 N NaOH 0.1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เมื่อต้มเดือดแล้วปรับปริมาตรส่วนผสมให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่สารละลาย C (สารละลาย Na หรือ K Tartrate 2% 1 มิลลิลิตร ผสมกับ $CuSO_4$ 1% 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันแล้วเอาส่วนผสมนี้ 1มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $NaCO_3$ 2% ใน 0.1 $\bar{N}$ NaOH 50 มิลลิลิตร) ลงในหลอดตัวอย่าง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้น ใส่สารละลาย Phenol 1 $\bar{N}$ ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมกันให้ทั่วทันที ทิ้งไว้ 30 นาที จึงวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ความยาวคลื่นที่ 660 นาโนเมตร โดยใช้ NaOH 0.1 $\bar{N}$ เป็น Blank และเปรียบเทียบกับ Standard Curve ของปริมาณโปรตีน BSA (Bovine Serum Albumin) ละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่ทราบค่า (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

1.1.5 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ทำการตรวจวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Grant *et al.* (1985) นำ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG_{11} ดูดเอาก๊าซภายในขวดที่ใช้ออก 10% ของปริมาตรอากาศทั้งหมดในขวด และใส่ acetylene ที่บริสุทธิ์เข้าไปแทนที่ โดยใช้ acetylene เข้าไปแทนที่ให้เท่ากับที่ดูดออก นำไปบ่มในบริเวณที่มีแสงสว่าง 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างก๊าซภายในขวด 10 มิลลิลิตร ไว้ใน vacutainer เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ ethylene โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography

1.2 การเพาะเลี้ยง, ขยาย และการติดฉลากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วย ^{15}N

โดยนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่ได้จากการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 4000 lux อุณหภูมิ 25-30 ^0C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งวิธีการติดฉลากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วย ^{15}N ทำโดยเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในอาหาร BG_{11} ที่เติม $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (10% atom ^{15}N) 10 มิลลิลิตร/ลิตร(เตรียมจากการชั่ง $(^{15}NH_4)_2SO_4$ 1.1616 กรัม/ลิตร ; ดัดแปลงจาก Rippka, 1988) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สำหรับวิธีการเก็บสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เมื่อครบ 4 สัปดาห์ โดยวิธีการกรอง ซึ่งจะใช้ถุงกรองแพลงตอนขนาด 10 ไมครอน กรองสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จึงนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 40 ^0C จนน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่เปลี่ยนแปลง นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้น (dessicator) (Tirol *et al.*, 1982) จนกว่าจะนำไปใช้ศึกษาต่อไป

1.3 การศึกษาการสะสมไนโตรเจนในต้นข้าว

ปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 โดยใช้กล้าข้าว ที่มีอายุ 25 วัน กระถางละ 3 ต้น ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่บรรจุดินที่นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120 ^0C นาน 3 ชั่วโมง กระถางละ 10 กิโลกรัม ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้คือ มีลักษณะเป็นดินเหนียว มี pH 6.1 อินทรีย์วัตถุในดิน 1.07 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน 10 ppm โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดิน 42 ppm แคลเซียมที่เป็นประโยชน์ในดิน 634 ppm แมกนีเซียมที่เป็นประโยชน์ในดิน 78 ppm และไนโตรเจนทั้งหมดในดิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังปักดำรักษาระดับน้ำให้ลึก 5 เซนติเมตร จากผิวดิน วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design แบ่งการทดลองเป็น 4 ตำรับการทดลอง ทำ 4 ซ้ำ มีตำรับการทดลองดังนี้ คือ

1.3.1 ปลูกข้าวอย่างเดียวไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน , ไม่ใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (control)

1.3.2 ใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 4 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกระถาง (BGA)

1.3.3 ใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ติดฉลากด้วย ^{15}N จำนวน 4 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกระถาง (^{15}N BGA)

1.3.4 ใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (10% atom ^{15}N) ให้มีไนโตรเจนเท่ากับ 0.20 กรัมต่อกระถาง ($(^{15}NH_4)_2SO_4$

ทุกตำรับการทดลองใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูป triple super phosphate ในอัตรา 0.20 g P_2O_5 /กระถาง และปุ๋ยโพแทสเซียมในรูป potassium chloride ในอัตรา 0.15 g K_2O /กระถาง (สมพร และคณะ, 2538)

ตำรับที่ใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแห้งที่อบให้แห้งแล้ว การใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (10% atom ^{15}N) ใส่ในดินบริเวณปักดำต้นข้าว ปิดกระถางด้วยแผ่นพลาสติก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากภายนอก รักษาระดับน้ำในกระถางให้เท่าระดับเดิมอยู่ตลอดเวลา โดยใช้น้ำกรอง

1.4 การเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลตามระยะการเจริญเติบโตของข้าว คือ ระยะแตกกอสูงสุด, ระยะออกดอก และระยะเก็บเกี่ยว

1.4.1 ตัวอย่างพืช

ข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิต

1. วัดความสูงของต้นข้าว โดยวัดจากผิวดินจนถึงปลายใบ หรือปลายรวงที่ยืดให้ตรงเป็นเซนติเมตร

2. จำนวนต้นหรือรวงต่อกระถาง ทำการนับจำนวนต้นหรือรวงต่อกอของแต่ละกระถาง

3. จำนวนเมล็ด และจำนวนเมล็ดดีต่อรวง โดยเมื่อนับจำนวนเมล็ดทั้งหมดแล้ว นำมาแยกเมล็ดดี และลีบออกจากกัน และนับจำนวนเมล็ดดีทั้งหมด จากนั้นมาคำนวณเป็นจำนวนเมล็ดทั้งหมด และจำนวนเมล็ดดีต่อรวง

4. น้ำหนักแห้งของต้น รวง และเมล็ดของแต่ละกระถาง หลังจากเก็บตัวอย่างและนำไปล้างน้ำกลั่นให้สะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 ^0C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (นพรัตน์ และวิทยา, 2534) นำตัวอย่างมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

ปริมาณธาตุอาหารในพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อการวิเคราะห์ นำตัวอย่างพืชที่อบให้แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ร่อนตัวอย่างที่บดด้วยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร การวิเคราะห์ตัวอย่างชั่งตัวอย่างที่อบแห้งและเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (dessicator) ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดย่อย เติมกรดผสมที่มีส่วนประกอบดังนี้ คือ กรดกำมะถัน AR. Grade เข้มข้น 98% 1,000 มิลลิลิตร, Na_2SO_4 100 กรัม และ Se 1 กรัม โดยอุ่นของผสมบน hot plate จนกระทั่งสารละลายใส และมีสีเหลืองจาง (Bergersen *et al.*, 1988) ลงไป 7 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำไปย่อยด้วย digestion block จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ volumetric flask แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์หาธาตุอาหารในพืชต่อไป

ปริมาณ ฟอสฟอรัส

ใช้ volumetric pipet ดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายตัวอย่างพืชจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร เติม mixed reagent 5 มิลลิลิตร (mixed reagent เตรียมจาก A : ละลาย ammonium vanadate 1.25 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่น 200 มิลลิลิตร เติม HNO_3 sp. 1.42 ลงไป 158.42 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ,B: ละลาย ammonium molybdate tetrahydrate 25 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่น 300 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลาย A และ B ทั้งสองเข้าด้วยกันปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask) ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าอีกครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ทำการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร (ศรีสม, 2544)

ปริมาณโพแทสเซียม

ใช้ volumetric pipet ดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายตัวอย่างพืชจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดด้วยเครื่อง Flame photometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร (Helmke, 1996)

1.4.2 สมบัติของดิน

การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อการวิเคราะห์หาสมบัติดินและปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ทั้งก่อนปลูกและหลังการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้ง โดยนำตัวอย่างดินไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วนำมาบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร โดยทำการเก็บข้อมูล ดังนี้

pH ดิน

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จำนวน 20 กรัม ใส่ใน beaker 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของดิน: น้ำ = 1:1) คนให้น้ำกับดินเข้ากัน โดยคนประมาณ 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดด้วยเครื่อง pH meter (Thomas, 1996)

ความชื้นดิน

วิธี Gravimetric method โดยนำตัวอย่างดินใส่ใน plate เปล่าที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว บันทึกน้ำหนักดินชื้นรวม plate นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 110 ^{0}C เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำมาชั่งหาน้ำหนักดินแห้งรวม plate แล้วนำข้อมูลไปคำนวณหาความชื้นของตัวอย่างดิน (เกษมศรี,2541) ดังนี้ คือ

$$\text{ความชื้นดิน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักของดินหลังอบแห้ง}}{\text{น้ำหนักของดินหลังอบแห้ง}} \times 100$$

ปริมาณฟอสฟอรัส

ชั่วตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จำนวน 2.5 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด Bray II 25 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 จะได้สารละลายใส ดูดสารละลายใสที่ได้ 5 มิลลิลิตร (แล้วแต่ตัวอย่าง) ใส่ volumetric flask 25 มิลลิลิตร เติมสาร Reagent B 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ประมาณ 10-30 นาที นำไปอ่านด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

สำหรับน้ำยาสกัด Bray II เตรียมได้จาก ละลาย Ammonium fluomide (NH_4F) 1.11 กรัม ใน 0.1 $\bar{N}$ HCl 1 ลิตร ส่วน Reagent A เตรียมได้จากละลาย Ammonium molybdate 12 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร และละลาย Antimony potassium tartrate ($Ksbo.C_4H_4O_6$) 0.2908 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เทสารทั้งสองลงไปใน 1 ลิตร ของ 5 $\bar{N}$ H_2SO_4 Reagent B เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยละลาย Ascobic acid 1.056 กรัม ใน 200 มิลลิลิตรของ Reagent A (นิวัตน์, 2545)

ปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จำนวน 4 กรัม เติมน้ำยาสกัด Ammonium acetate 1 $\bar{N}$ 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดิน : น้ำ = 1:10) เขย่านาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม (เนาวรัตน์, 2527)

การหาปริมาณโพแทสเซียม ใช้วิธี Flame photometer โดยดูดสารละลายใสจำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดด้วยเครื่อง Flame photometer

ส่วนการหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม ใช้สารละลายใสจำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย Lanthanum chloride 0.2% เขย่าแล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption spectrophotometer

ปริมาณอินทรีย์วัตถุ

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Erlenmeyer flask 250 มิลลิลิตร ใส่ potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$ 1 $\bar{N}$) จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่า flask เบาๆ เพื่อให้น้ำยากับตัวอย่างเข้ากันดี ใส่ H_2SO_4 conc. (commercial grade) 20 มิลลิลิตร โดยรินใส่ทีละน้อย เพื่อป้องกัน

การกระเด็นของอนุภาคดิน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ใส่ O-phenanthroline เป็น indicator (ประมาณ 6 หยด) นำไปไตเตรต โดยใช้ $FeSO_4$ 0.5 N ที่จุด end point ของ suspension จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง (เนาวรัตน์, 2527)

1.4.3 การวิเคราะห์ ^{15}N ในตัวอย่างพืชและตัวอย่างดิน

ในการวิเคราะห์หา ^{15}N ในตัวอย่างพืชและตัวอย่างดิน ใช้ตัวอย่างพืชที่อบให้แห้งในตู้อบ และตัวอย่างดินที่ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ซึ่งบดละเอียดมีขนาดน้อยกว่า 500 มิลลิเมตร จำนวน 10-15 มิลลิกรัม ใส่ใน tin capsule และใส่ตัวอย่างดังกล่าวในเครื่อง Elermental Analyser (NC2500) เพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดโดยตรง ซึ่งเครื่องมือชนิดนี้จะเชื่อมต่อกับเครื่อง Stable Isotope Ratio Analysis (SIRA) Mass Spectrometer (Iso Prime) เพื่อวิเคราะห์หาค่า $^{14}N/^{15}N$ ratio ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ (จริยา, 2545)

1.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์สถิติ โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistix version 4.0

2. สถานที่ทำการทดลอง

2.1 การทดลองดำเนินการ ณ ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และกลุ่มงานวิจัยนิวเคลียร์เทคนิคเพื่อการเกษตร กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร

2.2 ระยะเวลาการทดลอง ระยะเวลาในการดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่เดือนกันยายน 2544 ถึงเดือนสิงหาคม 2545