บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการดำเนินการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี
   - 1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
   - 1.2 เตาเผา (Muffle furnace)
   - 1.3 เตาความร้อน (Hot plate)
   - 1.4 ตู้ดูดควัน (Hood)
   - 1.5 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)
   - 1.6 เครื่องชั่งละเอียด (Electrical balance)
   - 1.7 ชุดวิเคราะห์ไนโตรเจน (Nitrogen equipment)
   - 1.8 Spectrophotometer
   - 1.9 Atomic Absorption Spectrophotometer
   - 1.10 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
   - 1.11 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
2. เครื่องแก้ว
   - 2.1 Kjaldahl flask
   - 2.2 Buret
   - 2.3 Volumetric flask
   - 2.4 Erlenmeyer flask
   - 2.5 Beaker
   - 2.6 Reagent bottle
   - 2.7 จานเพาะเชื้อ
   - 2.8 Test tube

3. สารเคมี

3.1 Potassium Sulfate (K_2SO_4)

3.2 Copper sulfate ($CuSO_4 . 5H_2O$)

3.3 Sodium Hydroxide (NaOH)

3.4 Sodium Thiosulfate ($Na_2S_2O_3$)

3.5 Boric acid

3.6 Methyl red

3.7 Methylene blue

3.8 Antimony Potassiumtratate (K (SbO) $C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$)

3.9 Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)

3.10 Ammonium Persulfate

3.11 Ascorbic acid

3.12 Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Cellulose azure media

4.2 CMC (Carboxymethyl cellulose)

4.3 NA (Nutrient agar)

4.4 PDA (Potato Dextrose Agar)

5. ชุดการทดลอง

5.1 ชุดอุปกรณ์เก็บผักตบชวาระบบไซ่พาลำเลียง ออกแบบโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

5.2 ถังหมักทรงกระบอกปริมาตร 160 ลิตร

5.2 ชุดอุปกรณ์เติมอากาศ PUMA รุ่น PP-2

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างผักตบชวา

เก็บตัวอย่างผักตบชวาจากจุดสกัดในแม่น้ำนครชัยศรี บริเวณวัดสัมปทวน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม โดยเครื่องเก็บผักตบชวาระบบไซ่พาลำเลียงแบบติดตั้งริมน้ำ พร้อมสับย่อย ดังแสดงในภาพที่ 8

ภาพที่ 8 เครื่องเก็บผักตบชวาระบบโซ่พาลำเลียงแบบติดตั้งริมน้ำ

2. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

2.1 การเก็บตัวอย่างกิ่งไม้หรือเศษไม้ผุและตัวอย่างดิน

2.1.1 เก็บตัวอย่างกิ่งไม้หรือเศษไม้ผุพังใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด

2.1.2 เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณโคนต้นไม้โดยขุดลึกลงไปจากผิวหน้าประมาณ 3-5 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด

2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์

2.2.1 นำตัวอย่างที่เก็บมาในข้อ 2.1.1 มาตัดเป็นชิ้นขนาด 1-2 เซนติเมตร แล้วนำมาวางบนจานอาหาร CMC (Carboxy methylcellulose)

2.2.2 นำตัวอย่างที่เก็บมาในข้อ 2.1.2 มาทำการเจือจางใน CMC broth ตามลำดับสิบเท่า (ten-fold serial dilution) ก่อน จากนั้นจึงนำตัวอย่างจากแต่ละค่าการเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนจานอาหาร CMC แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

2.2.3 เลือกจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร CMC ซึ่งมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

2.3 การทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อที่คัดแยกได้ (วิสาข์ ลีปัญญา, 2545)

2.3.1 นำจุลินทรีย์บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ในข้อ 2.2 มาเพาะเลี้ยงโดยวิธี point inoculation ลงบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็งที่มี cellulose azure เป็นแหล่งของ cellulose

2.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 อาทิตย์ สังเกตการแพร่ของสีน้ำเงินในหลอดอาหาร

2.3.3 คัดเลือกไอโซเลทที่การแพร่ของสีน้ำเงินในหลอดอาหาร cellulose azure ที่ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการเร่งอัตราการย่อยสลายผักตบชวา

3.1 เพาะเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ ในอาหาร CMC บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วเติมสารละลาย 1% Tween 80 ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีสปอร์ราเจริญอยู่ เขย่าเบาๆ แล้วดูดสปอร์แขวนลอย ใส่หลอดปราศจากเชื้อ

3.2 นับจำนวนสปอร์ด้วย haematocytometer และปรับจำนวนให้เป็น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเติมลงในถังหมัก

4. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการย่อยสลายตามธรรมชาติของผักตบชวา

4.1 นำตัวอย่างผักตบชวาน้ำหนักประมาณ 30 กิโลกรัมใส่ลงในถังพลาสติกทรงกระบอกขนาดความจุ 110 ลิตร นำไปวางในที่โล่ง มีอากาศถ่ายเทสะดวก

4.2 เก็บตัวอย่างจากถังหมักดังกล่าว ทุกๆ อาทิตย์ โดยเก็บถังละ 3 ซ้ำ หลังจากพลิกผสมตัวอย่างแล้ว เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ ทางเคมี ได้แก่ ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พร้อมทั้งวัดค่าความชื้น อุณหภูมิ และบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักตบชวา

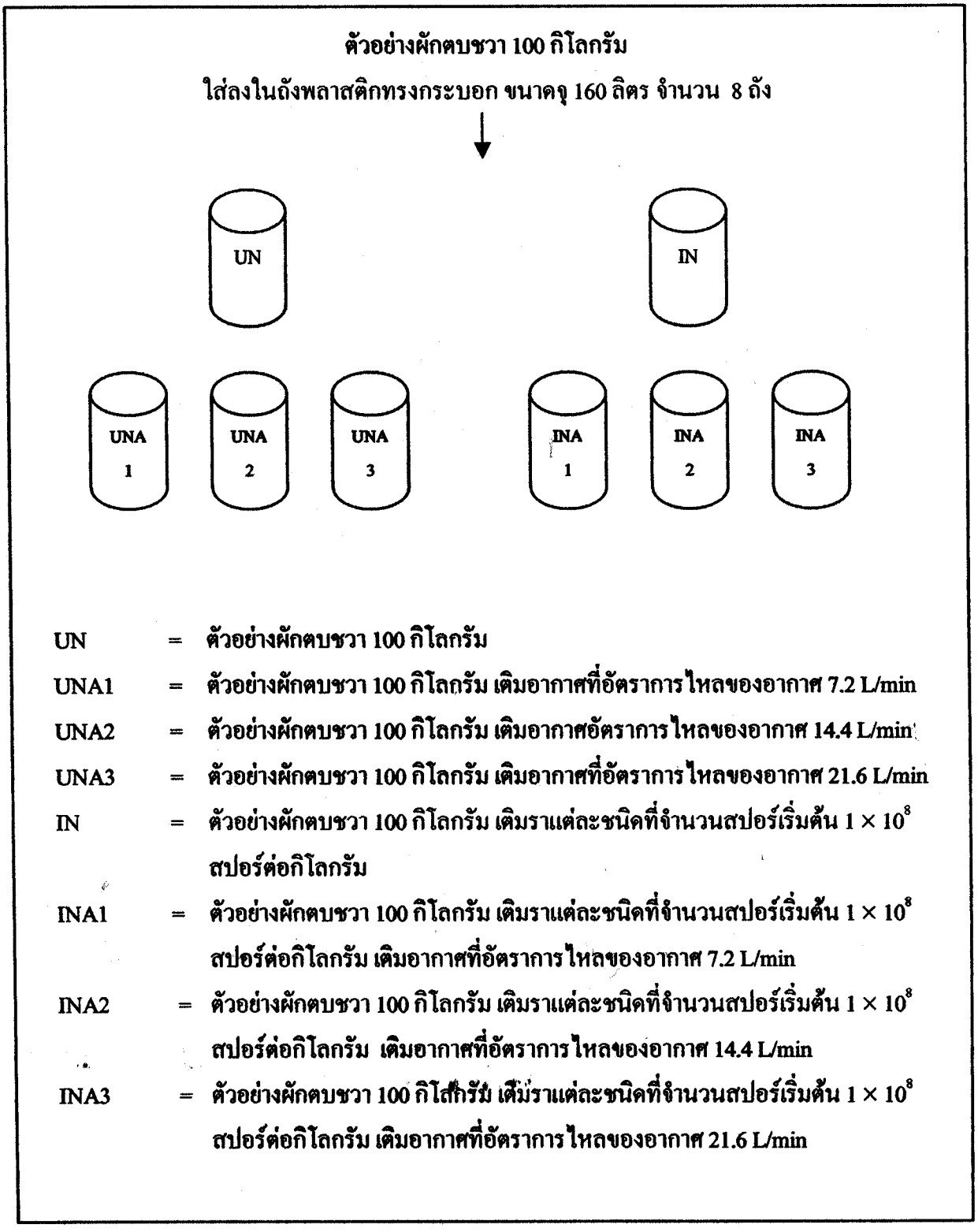
4.3 ยุติการหมักเมื่อพบว่า C/N ratio ลดลงเหลือน้อยกว่า 20 (วรรณลดา สุนันทพงศ์ศักดิ์ และณวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์, 2540)

5. การศึกษาผลการใช้จุลินทรีย์ และ/หรือ การเติมอากาศต่อการย่อยสลายผักตบชวาเพื่อผลิตปุ๋ยหมัก (ดังแสดงในรูปที่ 9)

5.1 นำตัวอย่างผักตบชวาที่ผึ่งไว้ 1 วันใส่ในถังพลาสติกทรงกระบอกขนาดความจุ 160 ลิตร จำนวน 8 ถัง ๆ ละ 100 กิโลกรัม

5.2 สำหรับชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อนั้น จะนำไปเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 3 ลงในแต่ละถัง โดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นแต่ละไอโซเลทประมาณ 1×10^8 สปอร์ต่อผักตบชวา 1 กิโลกรัม ส่วนชุดควบคุมไม่มีการเติมหัวเชื้อ

5.3 จดบันทึกลักษณะทางกายภาพของผักตบชวา อุณหภูมิและความชื้น พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างจากถังหมัก ถังละ 3 ซ้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม



ภาพที่ 9 แบบแผนการศึกษาผลการใช้จุลินทรีย์ และการเติมอากาศต่อการย่อยสลายผักตบชวาเพื่อผลิตปุ๋ยหมัก

5.4 สำหรับชุดการทดลองที่ต้องให้อากาศจะมีการต่อท่อให้อากาศเข้าไปในถังหมัก โดยใช้อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน คือ 7.2, 14.4 และ 21.6 ลิตรต่อนาที (L/min) ส่วนชุดควบคุมไม่มีการเติมอากาศเพิ่มเติม

5.5 นำไปตั้งไว้ในที่โล่งมีหลังคาและมีอากาศถ่ายเทสะดวก เก็บตัวอย่างจากถังหมักดังกล่าว ทุกๆ อาทิตย์ โดยเก็บถังละ 3 ซ้ำ (ช่วงบน กลางและด้านล่างของถัง) หลังจากผลิกผสมตัวอย่างแล้ว เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ สำหรับอุณหภูมิจะทำการตรวจวัดเป็นประจำทุกวันด้วยการเจาะที่ช่วงกลางของถังหมักทางด้านข้างเพื่อเสียบเทอร์โมมิเตอร์

5.6 ยุติการหมักเมื่อพบว่า C/N ratio ลดลงเหลือน้อยกว่า 20

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา

6.1 ปริมาณคาร์บอน (ประโสด ธรรมเขต, 2540) คือ คาร์บอนในรูปที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง หาได้โดยการคำนวณจากค่าของแข็งที่ระเหยได้ทั้งหมด (Volatile Solid) ทำได้โดย

1) นำตัวอย่างที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3-6 กรัมโดยบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ด้วย ใส่ในถ้วยทนความร้อน (porcelain crucible) ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3) นำไปเผาที่อุณหภูมิ 850 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักสารที่คงเหลือ แล้วจดบันทึกไว้

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ volatile solid} = \left[\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไป} \times 100 \right] / \text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}$$

$$\% C = \left[\% \text{ volatile solid} \right] / 1.8$$

6.2 ปริมาณไนโตรเจน (ประโสด ธรรมเขต, 2540) คือส่วนประกอบที่เป็นไนโตรเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยอยู่ในรูปของ organic-nitrogen หรือ ammonia-nitrogen ด้วย Kjeldahl method ทำได้โดย

1) นำตัวอย่างอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2) สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 0.5 - 1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask

3) เติม copper sulfate ($CuSO_4 . 5H_2O$) 0.5 กรัม potassium sulfate (K_2SO_4) 10 กรัม และ sulfuric acid เข้มข้นปริมาณ 25 มิลลิลิตร

3) ย่อยด้วยความร้อนจนสารละลายที่ได้มีลักษณะใสจึงหยุดซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

4) เติมน้ำกลั่นประมาณ 250 มิลลิลิตร และ NaOH (40 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 75 มิลลิลิตร นำมากลั่นโดยใช้ boric acid solution (4 เปอร์เซ็นต์) 50 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับสารละลายที่กลั่นได้ (distillate) จนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จึงยุติการกลั่น

5) นำมาไตเตรตด้วย H_2SO_4 0.05 N โดยใช้ methyl purple solution เป็น indicator ยุติเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Nitrogen (N)} = [(A-B) \times (N) \times 14 \times 100] / C$$

ให้ A = ปริมาตรของ sulfuric acid standard solution ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ sulfuric acid standard solution ที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

N = normality of sulfuric acid standard solution (N)

วิธีเตรียมสารเคมี

boric acid solution (4%) ละลาย boric acid 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

methyl purple solution ละลาย methyl red 0.3125 กรัม และ methylene blue 0.2062 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

6.3 ปริมาณฟอสฟอรัส (ประโสด ธรรมเขต, 2540) คือ ส่วนประกอบที่เป็นฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอยู่ในรูป สารประกอบฟอสฟอรัส (phosphate) วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสด้วย ascorbic acid method ทำได้ดังนี้

1) นำตัวอย่างมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นใน ตู้ดูดความชื้น

2) ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 1-2 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3) เติม H_2SO_4 เข้มข้นปริมาณ 25 มิลลิลิตร

4) เติม ammonium persulfate ประมาณ 0.4 กรัม เพื่อเป็น catalyst

5) ย่อยด้วยความร้อนจนได้สารละลายใส จึงนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนปรับ pH ด้วย 6N NaOH โดยใช้ phenophthalene เป็น indicator

6) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Combined reagent ลงไป 8 มิลลิลิตร

7) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 880 nm ภายใน 10-30 วินาที

8) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

6.4 ปริมาณโพแตสเซียม (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542) คือ ส่วนประกอบที่เป็นโพแตสเซียมที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอยู่ในรูปสารประกอบโพแตสเซียม วิเคราะห์หาปริมาณโพแตสเซียมด้วย Tri Acid Mixture ทำได้ดังนี้

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่อบแห้งมาประมาณ 0.4 กรัมใส่ลงหลอดทดลองขนาด 75 มิลลิลิตร

2) เติม Tri acid mixture (ประกอบด้วย HNO_3 เข้มข้น 5 ส่วน, H_2SO_4 เข้มข้น 1 ส่วน และ $HClO_4$เข้มข้น 2 ส่วน) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

3) นำไปย่อยด้วยความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส จนได้ตัวอย่างที่ใสจึงยกลงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4) กรองตัวอย่างแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

5) นำไปวัดปริมาณโพแตสเซียมโดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer

7. การวิเคราะห์ค่าความชื้น (ประโสด ธรรมเขต, 2540) คือ ปริมาณน้ำที่มีอยู่ มีหน่วยเป็นร้อยละของตัวอย่างทั้งหมด ทำได้โดย

1) ชั่งน้ำหนักถาดเปล่าและจดบันทึกน้ำหนักที่อ่านได้

2) สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-5 กรัมใส่ลงในถาดที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3) ชั่งน้ำหนักถาดรวมทั้งตัวอย่างและจดบันทึกน้ำหนักที่อ่านได้

4) นำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน จนกระทั่งตัวอย่างแห้งสนิท

5) ชั่งน้ำหนักถาดรวมทั้งตัวอย่างหลังจากอบแห้งและจดบันทึกน้ำหนักที่อ่านได้

วิธีการคำนวณ

ค่าความชื้น = [น้ำหนักตัวอย่างที่หายไป × 100] / น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบแห้ง

8. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

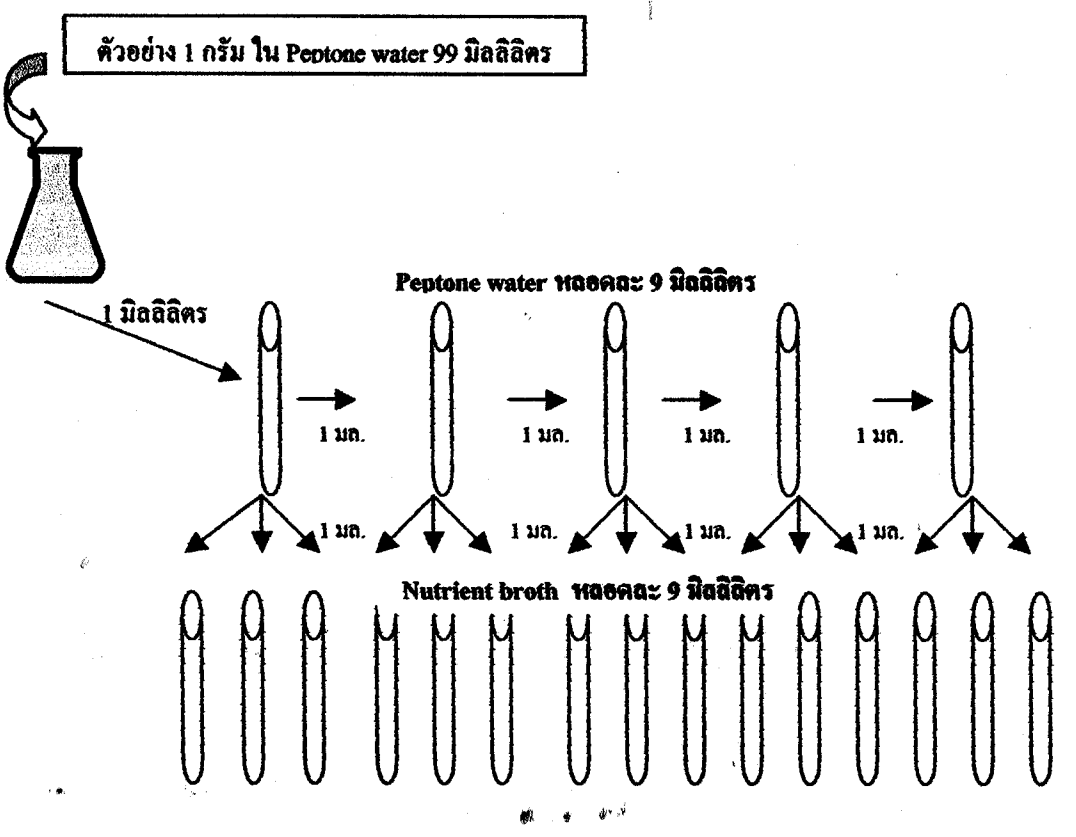
8.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) ตามวิธีของ University of Melbourne, 1995 ทำได้ดังนี้

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1.0 กรัมใส่ลงใน Peptone water 99 มิลลิลิตร เจือจางตามลำดับสิบเท่า (ten-fold serial dilution) โดยใช้ Peptone water เป็นสารละลายเจือจาง (diluent) แล้วเขย่าประมาณ 1 นาที

2) ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดที่มี Nutrient broth 9 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด ดังแสดงในภาพ

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อย่างละ 1 ชุด เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จึงตรวจดูการเจริญของเชื้อ โดยบันทึกผลที่เป็นบวกหรือหลอดที่มีความขุ่น

4) คำนวณหาดรรชนี MPN โดยนำตัวเลขผลบวกที่เกิดขึ้นของช่วงความเข้มข้น 3 ค่าความเข้มข้นมาเปิดตารางหาค่าดรรชนี MPN แล้วคูณด้วยค่า dilution factor ค่ากลาง



ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ MPN

8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อราด้วยวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี Elson-Morgan (Johnson, 1971) มีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างผักตบชวาที่ทำให้แห้งมาบดให้ละเอียด

2) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ที่มีสารละลาย 2% NaOH ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3) นำมาย่อยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4) นำสารละลายเส้นใยที่ย่อยแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

5) นำมาตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ผ่านการกรอง (Whatman No.2) มีค่า pH 7 (วัดค่า pH ด้วย pH meter)

6) นำตะกอนมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

7) นำมาบดให้ละเอียดอีกครั้งเพื่อนำไปวิเคราะห์กลูโคซามีน

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

1) ชั่งตัวอย่างที่เตรียมแล้ว 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร

2) ละลายด้วย 4 M HCl 3 มิลลิลิตร แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง โดยการต้มผ่านน้ำ

3) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4

4) ดูดส่วนใสมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

5) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลางด้วย 30% NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

7) กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4

8) นำส่วนใสที่ผ่านการกรอง 1 มิลลิลิตร มาเติม 4% Acetylacetone reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9) นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยการต้มผ่านน้ำ เป็นเวลา 30 นาที

10) ตั้งทิ้งให้เย็นในน้ำที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที

11) ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 ชั่วโมง

12) เติม Absolute Ethanol 5 มิลลิลิตร ในทุกๆ หลอดแล้วเขย่าให้ผสมกัน (โดยเตรียมน้ำกลั่นเป็น Blank ด้วย)

13) เติม Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ในทุกๆ หลอดแล้วเขย่าให้ผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5-25 นาที

14) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

15) คำนวณกลูโคซามีนของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกลูโคซามีน (ภาคผนวก ง)

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS/PC for Window 95 version 10 โดยการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในผักตบชวา ได้แก่ คาร์บอน(Carbon, C) ไนโตรเจน (Nitrogen, N) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ฟอสฟอรัส (Phosphorus, P) โพแตสเซียม (Potassium, K) รวมทั้งปริมาณความชื้นที่มีในตัวอย่างผักตบชวาตลอดระยะเวลาการหมักซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจากถังหมักทุกๆ สัปดาห์ และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน ทางเดียว (one-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแปรปรวนหลายทาง (Multiway ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการทดลองในสภาพธรรมชาติซึ่งไม่สามารถควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ได้ทั้งหมด