

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

1. สาหร่ายไต้ไก่ (*Ulva* sp.) ที่เกยตื้นบริเวณชายฝั่งทะเลโรงโม่ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 18 มีนาคม พ.ศ. 2555 (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 สาหร่ายไต้ไก่ (*Ulva* sp.) บริเวณชายฝั่งทะเลโรงโม่ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

2. หัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 2 ผลิตภัณฑ์พัฒนาที่ดิน (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 หัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 2

340279

วัสดุและอุปกรณ์

1. ถังพลาสติก (Plastic Tank) ขนาด 90 ลิตร
2. ไม้พาย (Wood Paddle)
3. ขวดพลาสติก (Plastic Bottle)
4. กระบอกตวง (Cylinder)
5. กรวยกรอง (Funnel)
6. บีกเกอร์ (Beaker)
7. ปิเปตแบบปริมาตร (Volumetric Pipette)
8. ไมโครปิเปต (Micropipette)
9. ลูกยาง (Rubber Bulb)
10. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)
11. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
12. บิวเรตต์ (Burette)
13. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
14. ขวดแก้วสีชา (Amber Glass Bottles)
15. พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur Pipette)
16. ขวดบีบน้ำกลั่น (Dispensing Bottle)
17. โถดูดความชื้น (Desicator)
18. เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
19. ชุดเครื่องย่อย (Digestion Unit) ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น KB/KBL
20. ชุดเครื่องกลั่น (Distillation Unit) ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น VAPODEST 20S
21. หลอดเคลดาล์ (Kjeldahl Flask)
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1601
23. ตู้ดูดควัน (Laboratory Fume Hood Cupborad)
24. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ TRAN รุ่น Senz pH pro
25. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity Meter) ยี่ห้อ YSI รุ่น M0del 85
26. เครื่องวัดค่าความขุ่น (Turbidity Meter) ยี่ห้อ HACH รุ่น 2100N
27. กระจาดต้นไม้ขนาด 8 นิ้ว
28. ดินผสมสูตรสำเร็จ

29. เวอร์เนียพลาสติก ขี้อ SONIC
30. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (Sulphuric Acid: H_2SO_4)
2. กรดไนตริก (Nitric Acid: HNO_3)
3. กรดบอริก (Boric Acid: H_3BO_3)
4. แอมโมเนียมพาราโมลิบเดต (Ammonium Paramolybdate: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
5. แอนติโมนีโพแทสเซียมทาร์เทรตไตรไฮเดรต (Antimony Potassium Tartate Trihydrate: $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{Sb}_2\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
6. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
7. เมอร์คิวริกซัลเฟต (Mercuric Sulfate: HgSO_4)
8. ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver Nitrate: AgNO_3)
9. กรดออร์โธฟอสฟอริก (Orthophosphoric Acid: H_3PO_3)
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate: KH_2PO_4)
11. โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium Dichromate: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
12. โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium Thiosulfate: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
13. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol: $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
14. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulphate: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)
15. แมงกานีสซัลเฟต (Manganese Sulphate: MnSO_4)
16. เมทิลีนบลู (Methylene Blue: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}$)
17. เมทิลเรด (Methyl Red: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$)
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide: NaOH)
19. ซีลีเนียมรีเอเจนต์ (Selenium Reagent)
20. เมอเรกไซด์ (Murexide or Ammonium purpurate: $\text{NH}_4\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_5\text{O}_6$)
21. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride: NaCl)
22. กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (EDTA: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)
23. แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate: CaCO_3)
24. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl)
25. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide: NH_4OH)

3.1 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่

- 1) เก็บสาหร่ายไส้ไก่ ที่เก็บจากชายทะเลโรงโป๊ะ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี ใส่ถุงดำที่เตรียมไว้ แล้วนำมาล้างห้องปฏิบัติการ SD 103 อาคารสิรินธร มหาวิทยาลัยบูรพา
- 2) นำสาหร่ายไส้ไก่ที่เก็บมาได้ ล้างด้วยน้ำเปล่าเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและเกลือที่ไม่ต้องการออกจากตัวสาหร่าย แล้วนำสาหร่ายไปผึ่งให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำสาหร่ายไส้ไก่ส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชและส่วนที่เหลือนำไปทำน้ำหมักชีวภาพ

3.1.2 การทำน้ำหมักชีวภาพ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2549)

- 1) นำสาหร่ายไส้ไก่ที่เตรียมไว้ไปผสมกับกากน้ำตาล และน้ำใส่ลงในถังหมัก ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 สูตร ดังนี้
 สูตรที่ 1 อัตราส่วน สาหร่ายไส้ไก่ (กิโลกรัม): กากน้ำตาล (กิโลกรัม): น้ำ (ลิตร) เท่ากับ 1:1:10
 สูตรที่ 2 อัตราส่วน สาหร่ายไส้ไก่ (กิโลกรัม): กากน้ำตาล (กิโลกรัม): น้ำ (ลิตร) เท่ากับ 2:1:10
 สูตรที่ 3 อัตราส่วน สาหร่ายไส้ไก่ (กิโลกรัม): กากน้ำตาล (กิโลกรัม): น้ำ (ลิตร) เท่ากับ 3:1:10
 โดยทำสูตรละ 3 ถัง และเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด.2 เพื่อไปเร่งปฏิกิริยาในการหมักต้องค่อยๆทำการผสมเพื่อที่จะให้ส่วนผสมได้สัมผัสกันอย่างทั่วถึง
- 2) เมื่อผสมจนเข้ากันดีแล้ว ก็ปิดฝาถังให้เรียบร้อย แต่ไม่ควรปิดแน่นเกินไปเพราะอาจเกิดการระเบิดได้ นำถังหมักไปตั้งไว้ในที่ร่ม โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน
- 3) ในระหว่างทำการหมัก ต้องคนหรือกวนถังหมัก 1 – 2 ครั้งต่อวัน เพื่อระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ ทำให้ส่วนผสมเข้ากันได้ดี
- 4) เก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทุกวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 และ 84 ของระยะเวลาการหมัก ทำการกรองตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และเก็บใส่ขวดพลาสติกปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บรักษาตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป
- 5) ทำการหมักน้ำหมักชีวภาพจากกากน้ำตาลในอัตราส่วน กากน้ำตาล (กิโลกรัม): น้ำ (ลิตร) เท่ากับ 1:10 โดยวิธีการหมักดำเนินการเช่นเดียวกับการหมักน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายไส้ไก่ทุกประการ

3.1.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านกายภาพและทางเคมีของน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล

- ลักษณะสี วิเคราะห์โดย การสังเกตด้วยสายตา
- ลักษณะกลิ่น วิเคราะห์โดย การดมกลิ่น

- อุณหภูมิ วิเคราะห์โดย เทอร์โมมิเตอร์
- ค่าความเป็นกรดด่าง วิเคราะห์โดย เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)
- ค่าการนำไฟฟ้า วิเคราะห์โดย เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity meter)
- ค่าความขุ่น วิเคราะห์โดย เครื่องวัดค่าความขุ่น (Turbidimeter)

3.1.4 การวิเคราะห์ธาตุอาหารจากตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล

3.1.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีเคลดาล์ (Kjeldahl method) จากสาหร่ายไส้ไก่ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (มันส์ตันกุลเวศม์, 2538)

ขั้นตอนการย่อยสลาย

สาหร่ายไส้ไก่

- 1) ชั่งตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง
 - 2) เติมซีลีเนียมรีเอเจนต์มิกเซอร์ 1 กรัม
 - 3) เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
 - 4) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย ปรับอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 และ 300 องศาเซลเซียส ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใส
 - 5) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน
 - 6) ทำแบลนด์ (Blank) โดยใช้น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน
- น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล
- 1) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ หรือน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่างขนาด 300 มิลลิลิตร
 - 2) เติมซีลีเนียมรีเอเจนต์มิกเซอร์ 1 กรัม
 - 3) เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
 - 4) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย ปรับอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 380 องศาเซลเซียส ย่อยจนได้สารละลายใส
 - 5) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน
 - 6) ทำแบลนด์ (Blank) โดยใช้น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

ขั้นตอนการกลั่น

1) เปิดสารละลายตัวอย่างสาหร่ายใส่ไถ่หรือตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเคลดดาห์ล ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์เฟด (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดเคลดดาห์ลต่อเข้ากับเครื่องกลั่น

2) ใส่สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วหยดอินดิเคเตอร์ผสม (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด นำไปวางไว้ที่รองของเครื่องกลั่น ทำการกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการไตเตรท

1) นำสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.02 นอร์มอล (ภาคผนวก ข) จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง บันทึกปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่ใช้ ส่วนแบ่งที่ใช้ น้ำปราศจากไอออนและทำขั้นตอนทุกอย่าง (ทั้งการกลั่นและการไตเตรท) เหมือนทำตัวอย่าง

2) คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ภาคผนวก ก)

3.1.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน

ตัวอย่างสาหร่ายใส่ไถ่ โดยวิธีการเปรียบเทียบความเข้มของสี (Colorimetry method) (ดัดแปลงจากศรีสม สุวรรณวงศ์, 2547)

ขั้นตอนการสกัดสาหร่ายใส่ไถ่

- 1) ชั่งตัวอย่างสาหร่ายใส่ไถ่ 5 กรัม
- 2) สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
- 3) เติมกรดซัลโฟซาลิไซลิก ประมาณ 0.45 กรัม และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที
- 4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 15 นาที
- 5) นำสารละลายใส (supernatant) ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนจากสาหร่ายใส่ไถ่

- 1) เติมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการสกัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน
- 2) เติมสารละลายฟีนอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน

3) เติมโซเดียมไนโตรพลัสไซด์และสารละลายออกซิไดซ์ซึ่ง ปริมาตร 2.5 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

5) หาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

6) คำนวณหาปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ภาคผนวก ก)

การวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพสาหร่าย
ใส่ไข่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาลโดยวิธีไทเทรต (Titration method) (มันสิน ตันทุลเวศม์,
2538)

ขั้นตอนการกลั่น

1) เปิดเครื่องกลั่นและล้างเครื่องกลั่น 2 ครั้ง ด้วยน้ำปราศจากไอออน

2) ปล่อยให้ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเคลดคัลล์
ขนาด 300 มิลลิลิตร

3) เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20
มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในหลอดเคลดคัลล์ที่มีตัวอย่าง
น้ำหมักชีวภาพอยู่ แล้วนำเข้าเครื่องกลั่น

4) เติมกรดบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงในขวดรูป
ชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วหยดอินดิเคเตอร์ผสม 2-3 หยด นำไปวางไว้ที่รองของเครื่องกลั่น ทำ
การกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการไทเทรต

1) นำสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน
กรดซัลฟิวริก 0.02 นอร์มอล จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง บันทึกปริมาตร
กรดซัลฟิวริกที่ใช้

2) ทำแบลнк (Blank) โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

3) คำนวณหาปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน (ภาคผนวก ก)

3.1.4.3 การเตรียมตัวอย่างในรูปสารละลายเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส แมงกานีสและแคลเซียม จากตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547)

สาหร่ายไส้ไก่

1) ชั่งตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง
 2) ย่อยด้วยกรดผสมระหว่าง กรดไนตริก กับกรดซัลฟิวริก (อัตราส่วน 5 : 1)
 3) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย โดยย่อยที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส

4) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

5) ทำแบลнк (Blank) โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ หรือน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเกลดาค์ ขนาด 300 มิลลิลิตร

2) ย่อยด้วยกรดผสมระหว่าง กรดไนตริก กับกรดซัลฟิวริก (อัตราส่วน 5 : 1) ปริมาตร 32 มิลลิลิตร

3) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย โดยย่อยที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส

4) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

5) ทำแบลнк (Blank) โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

3.1.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส โดยวิธีกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid method) จากตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่หรือตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดผสม (กรดไนตริกและกรดซัลฟิวริก) จากข้อ 3.4.4.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2) เติมสารละลายผสม (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 30 นาที

3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

4) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (ภาคผนวก ก)

การทำแบลนด์ (Blank)

1) ใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส แต่ใช้น้ำปราศจากไอออนที่ได้จากการย่อยด้วยกรดผสมทั้งสองชนิดแทนตัวอย่างน้ำหมัก

2) นำสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมพาราโมลิบเดต (ภาคผนวก ข) 15 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแบลนด์ที่เตรียมไว้

3.1.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม โดยวิธี flame photometry จากตัวอย่างสาหร่ายไล้ไก่ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2551)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

สาหร่ายไล้ไก่

1) ชั่งตัวอย่างสาหร่ายไล้ไก่ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง
2) ย่อยด้วยกรดผสมระหว่าง กรดไนตริก กับกรดซัลฟิวริก
3) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย โดยย่อยที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส

4) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

5) ถ่ายสารละลายตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออนใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้เข้ากัน

6) ทำแบลนด์ (Blank) โดยใช้น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล้ไก่ หรือน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเคลดาร์ล ขนาด 300 มิลลิลิตร

2) ย่อยด้วยกรดผสมระหว่าง กรดไนตริก กับกรดซัลฟิวริกปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3) วางหลอดย่อยตัวอย่างลงในเครื่องย่อยสลาย โดยย่อยที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายใส

4) วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

5) ถ่ายสารละลายตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออน ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้เข้ากัน

6) ทำแบลнк (Blank) โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน ด้วยวิธีการเดียวกัน

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างสำหรับใส่ไอ้ไก่หรือน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากขั้นตอนการย่อยสลายด้วยกรดผสม จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมอยู่ในช่วง 0 ถึง 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลาย Suppressor (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้เข้ากัน

3) นำมาวัดค่าการเปล่งแสงด้วยเครื่องอะตอมมิกแอ็บซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ (AAS) ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ถ้าค่าที่อ่านได้จากตัวอย่างมีค่าเกินค่ามาตรฐาน ต้องเจือจางตัวอย่างใหม่เป็นอัตราส่วน 1:20 หรือมากกว่านั้น ตามความเหมาะสม

4) คำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (ภาคผนวก ก)

3.1.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม โดยวิธี EDTA จากตัวอย่างสำหรับใส่ไอ้ไก่น้ำหมักชีวภาพสำหรับใส่ไอ้ไก่และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (มันลิน ดัชนีอุตสาหกรรม, 2538)

1) ตวงสารละลายตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยกรดผสมสองชนิดคือ กรดไนตริกและกรดซัลฟิวริก จากข้อ 3.4.4.3 ที่คาดว่าจะมีแคลเซียมอยู่ในช่วง 5-10 มิลลิกรัมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดพีเอช ถ้าต่ำกว่า 12 ให้เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปอีกจนได้พีเอชดังกล่าว

3) เติมเมอร์แคปโตอินดิเคเตอร์ประมาณ 0.2 กรัม (หรือ 1-2 หยด) (ภาคผนวก ข) สารละลายตัวอย่างจะเป็นสีชมพู

4) ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ 0.01 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) อย่างรวดเร็วซึ่งสีชมพูค่อยๆ เข้มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งแสดงว่าใกล้ถึงจุดยุติจึงค่อยเติมทีละหยดจนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงิน

5) คำนวณหาปริมาณแคลเซียม (ภาคผนวก ก)

3.1.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณแมงกานีส โดยวิธีการเปรียบเทียบความเข้มของสี (Colorimetry method) จากตัวอย่างสาหร่ายไลก์ น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไลก์และน้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล (ศรีสม สุวรรณวงศ์, 2547)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแมงกานีส

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างสาหร่ายไลก์หรือตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดผสม (กรดไนตริกและกรดซัลฟิวริก) จากข้อ 3.4.4.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

2) เติมน้ำประปาจากไอออนให้ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3) เติมน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4) เติมน้ำแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่ทำให้แห้งในโถดูดความชื้น) 0.25 กรัม เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง

5) อุ่นสารละลายในขวดปรับปริมาตรในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

6) ทำให้เย็นโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านขวดปรับปริมาตร

7) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 25 มิลลิลิตร

8) วัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

9) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณแมงกานีส (ภาคผนวก ก)

3.1.4.8 การวิเคราะห์ดินค่าความเป็นกรดด่างและค่าการนำไฟฟ้าของดิน (พัชรี ชีวจินดาขจร, 2552)

1) ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

2) เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที

3) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อนุภาคดินตกตะกอน จากนั้นรินสารละลายส่วนใสใส่ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร

4) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรดด่างและค่าการนำไฟฟ้า

3.2 ขั้นตอนการปลูกพริก (ธำรงค์ เครือชุมพล, 2552)

เลือกเมล็ดพันธุ์ที่ต้องการปลูก นำเมล็ดพันธุ์ไปแช่น้ำอุ่นทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นใช้ผ้าหุ้มเมล็ดและเก็บไว้ในที่ร่มและชื้น จนกระทั่งเริ่มมีรากสีขาวงอกออกมาเพียงเล็กน้อย จึงนำไปเพาะในกระบะที่เตรียมไว้ เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 15 วัน ควรถอนต้นกล้าที่ไม่สมบูรณ์ทิ้ง ดูแลต้นกล้าโดยการให้น้ำในช่วงแรกของการเพาะกล้าควรให้วันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น เมื่อต้นกล้าเริ่มเจริญแล้วอาจจะรดน้ำเพียงวันละครั้ง จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุประมาณ 30 วันหรือมีใบจริง 3-4 ใบ ก็สามารถย้ายปลูกลงกระถาง ซึ่งก่อนย้ายต้นกล้าไปปลูกประมาณ 2-3 วันควรรดให้น้ำแก่ต้นกล้าและก่อนย้ายต้นกล้าประมาณ 1 ชั่วโมงควรรดน้ำต้นกล้าให้ชุ่มเพื่อให้ดินร่วนซุยเพื่อให้ง่ายต่อการถอนและต้นกล้าไม่ช้ำมาก

จัดเตรียมกระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว และเตรียมดินสำหรับปลูก โดยแบ่งดินเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเป็นดินที่ซื้อมาปกติ อีกส่วนนำดินไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ซึ่งดินใส่กระถางที่เตรียมไว้ กระถางละ 1 กิโลกรัม ทำดินในกระถางให้เป็นหลุมลึกประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำต้นกล้าพริกย้ายไปปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ การย้ายควรให้มีดินติดรากไปด้วยมากที่สุดและต้องทำด้วยความระมัดระวัง และต้นกล้าที่ถอนย้ายแล้วต้องรีบนำไปปลูกให้เร็วที่สุด ทำโดยวางต้นกล้าลงกลางหลุมแล้วใช้ดินที่ปากหลุมกลบ โคนต้น ควรกลบดินให้แน่นและระวังอย่าให้รากลอยเพราะจะทำให้พริกโคนล้มได้ง่าย หลังจากปลูกพริกเสร็จต้องรีบรดน้ำทันทีเพื่อให้ดินจับรากของต้นกล้า และดูแลรักษาต้นพริกโดยให้น้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น ครั้งละ 200 มิลลิลิตร กำจัดวัชพืช โดยใช้มือถอน

3.3 ขั้นตอนการทดสอบน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล์ไก่อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพริก (ดัดแปลงจากอรธรรณา ศิวังแพง และคณะ, 2553, อรุณทัย สิริธรรมเจริญ, 2548)

คัดเลือกน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล์ไก่อจากสูตร 3:1:10 ที่มีอายุการหมัก 35 วัน มาใช้ในการทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD)

3.3.1 วิเคราะห์ผลของน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไล์ไก่อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพริกขี้หนู พริกกระเหรียงและพริกขี้ฟ้า

ปัจจัยหลัก (A) คือ พริก 3 สายพันธุ์ ได้แก่

- 1) พริกขี้หนูพันธุ์จินดา

2) พริกกะเหรี่ยงพันธุ์เวียงพิงค์

3) พริกชี้ฟ้าพันธุ์พิจิตร

ปัจจัยรอง (B) คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ดังนี้

1) ตัวควบคุม (Control) น้ำเปล่า

2) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 25,000 พีพีเอ็ม

3) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 50,000 พีพีเอ็ม

4) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 100,000 พีพีเอ็ม

ปลูกพริกชนิดละ 20 กระถาง ทุกกระถางใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15:15:15 กระถางละ 5 กรัม

ให้น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อต้น แต่ละหน่วยการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ซ้ำ โดยการฉีดพ่นให้โดนใบทั่วทั้งทรงพุ่มและส่วนที่เหนือแปลงในกระถางบริเวณโคนต้น ทุก 5 วัน เป็นเวลา 45 วัน และทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นพริก ดังนี้

- ความสูงของต้น (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่อยู่เหนือวัสดุปลูกในกระถางจนถึงปลายยอด

- ความกว้างของทรงพุ่ม (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่ม

- วัดขนาดของลำต้น (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่อยู่เหนือวัสดุปลูก 5 เซนติเมตร

ทำเครื่องหมายไว้ และวัดในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง

- ความยาวและความกว้างของใบ (เซนติเมตร) โดยเลือกใบจากต้นพริกที่อายุ 15 วัน หลังย้ายปลูก ที่มีขนาดเท่ากัน 3 ใบ และใช้เชือกที่มีสีแตกต่างกันผูกก้านใบไว้

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยการทดลอง ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistics Package for the Social Sciences (SPSS)

3.3.2 ผลของน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพริกซูปเปอร์ สอที่ปลูกในดินปกติและดินที่นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ปัจจัยหลัก (A) คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ดังนี้

1) ตัวควบคุม (Control) น้ำเปล่า

2) น้ำหมักชีวภาพกากน้ำตาล

3) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 25,000 พีพีเอ็ม

4) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 50,000 พีพีเอ็ม

5) น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ความเข้มข้น 100,000 พีพีเอ็ม

ปัจจัยรอง (B) คือ การใส่ปุ๋ยเคมีและไม่ใส่ปุ๋ยเคมี

1) ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 กระถางละ 5 กรัม

2) ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี

ปลูกพริกขี้หนูพริกทั้งหมด 30 กระถาง โดยแบ่งเป็นใส่ปุ๋ยเคมีและไม่ใส่ปุ๋ยเคมีอย่างละ 15 กระถาง ให้น้ำหมักชีวภาพสาหร่ายไส้ไก่ ปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่อต้น แต่หน่วยการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำโดยการฉีดพ่นให้โดนใบทั่วทั้งทรงพุ่มและส่วนที่เลื้อยเถลงในกระถางบริเวณโคนต้น ทุก 5 วัน เป็นเวลา 60 วันและทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นพริกทุก 5 วัน หลังย้ายปลูกลงในกระถาง ดังนี้

- ความสูงของต้น (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่อยู่เหนือวัสดุปลูกในกระถางจนถึงปลายยอด

- ความกว้างของทรงพุ่ม (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่ม

- วัดขนาดของลำต้น (เซนติเมตร) โดยวัดจากส่วนที่อยู่เหนือวัสดุปลูก 5 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายไว้ และวัดในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง

- ความยาวและความกว้างของใบ (เซนติเมตร) โดยเลือกใบจากต้นพริกที่อายุ 15 วัน หลังย้ายปลูก ที่มีขนาดเท่ากัน 3 ใบ และใช้เชือกที่มีสีแตกต่างกันผูกก้านใบไว้

- จำนวนดอก (ดอก) โดยเลือกดอกที่ระยะบานเท่า ๆ กัน และใช้เชือกที่มีสีต่าง ๆ ผูกไว้

- น้ำหนักของผลพริกที่ออกในแต่ละต้น (กรัม) โดยเลือกเก็บผลเมื่อพริกเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง หรือเมื่อต้นพริกอายุประมาณ 90 วันหลังย้ายปลูก

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยการทดลอง ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistics Package for the Social Sciences (SPSS)