บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษากระบวนการหมักและคุณสมบัติของปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชนสะลวง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ โดยได้มีการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการสำรวจและเก็บข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพในชุมชน ขั้นตอนที่สองเป็นการศึกษาคุณสมบัติน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรในชุมชนผลิตขึ้นใช้เอง และขั้นตอนที่สามทดลองพัฒนากระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพเพื่อให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำใช้ประโยชน์ต่อทางการเกษตรกรรมของชาวบ้านในชุมชนสะลวง

3.1 การสำรวจและเก็บข้อมูลในพื้นที่วิจัย

คณะผู้วิจัยได้ลงพื้นที่วิจัยเพื่อสำรวจและเก็บข้อมูลการหมักและการใช้ประโยชน์ปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพของชุมชน โดยได้มีการสัมภาษณ์แบบไม่เป็นทางการ แต่มีหัวข้อประเด็นที่ต้องการชัดเจน ซึ่งรูปแบบการสัมภาษณ์จะเป็นรูปแบบของการจัดเวทีชวนคุย แล้วโยงเข้าประเด็นที่ต้องการไม่เฉพาะเจาะจง หรือจำกัดคำตอบ เพื่อนำคำตอบที่ได้มาสรุป ประมวลผลเป็นข้อมูล ตลอดจนการสังเกตการปฏิบัติและแนวคิดที่ได้จากการพูดคุย

ได้มีการสำรวจและเก็บข้อมูลน้ำหมักชีวภาพในพื้นที่สะลวงตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน

3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักชีวภาพในชุมชน

นำน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรในชุมชนผลิตจากการสำรวจลงพื้นที่วิจัย มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ pH ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณธาตุอาหารหลักไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม

3.2.1 pH และ ค่าการนำไฟฟ้า

ใช้เครื่องวัด pH (pH meter) วัดค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพ และวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductivity-meter

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร

1) การวิเคราะห์หาไนโตรเจนในรูปทีเคเอ็นไนโตรเจน (TKN) ที่มีอยู่ในปุ๋ยอินทรีย์น้ำ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2543)

1.1) เครื่องมือและอุปกรณ์

- ขวดเจลดาลห์ (Kjeldahl flask)

- ชุดเครื่องมือสำหรับการย่อย
- ชุดเครื่องมือสำหรับการกลั่นแอมโมเนีย

1.2) สารเคมี

- สารละลายปรอทซัลเฟต
- สารละลายปรอทออกไซด์ 8 กรัมในกรดกำมะถัน 6 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- น้ำยาสำหรับการย่อยสลาย (Digestion Reagent) ละลายโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 134 กรัมในน้ำกลั่น 650 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และเติมสารละลายปรอทซัลเฟต 25 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกผลึก
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium Hydroxide-Sodium Thiosulfate Reagent) ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต ($NA_2S_2O_3.5H_2O$) 25 กรัมในน้ำและเจือจางเป็น 1 ลิตร
- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 5 กรัมในเอทธานอล (C_2H_5OH) 95% จำนวน 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นอีก 500 มิลลิลิตร

1.3) วิธีวิเคราะห์

- การเลือกขนาดตัวอย่าง โดยจะเลือกปริมาตรตัวอย่างที่จะใช้ตามตารางที่ 3.1 ขนาดของตัวอย่างจะต้องสอดคล้องกับปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี (สังเกตได้จากลักษณะของน้ำและแหล่งที่มาของน้ำตัวอย่าง) ถ้าใช้ขนาดตัวอย่างมากเกินไปเวลาในการย่อยนานหลายชั่วโมง เมื่อเลือกปริมาตรตัวอย่างได้แล้ว ตวงตัวอย่างใส่ในขวดเจลดาลห์ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมลูกแก้ว 3-4 เม็ด เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงภายในขวด

ตารางที่ 3.1 การเลือกขนาดตัวอย่าง

ปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ขนาดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

- การย่อยสลาย(Digestion) เติมน้ำสำหรับย่อยสลาย 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อยสลาย ต้มจนกระทั่งเกิดควันสีขาวของ SO_3 ให้ต้มไปเรื่อยๆจนได้สารละลายใส จากนั้นย่อยสลายต่อไปอีก 20-30 นาที (ถ้ายังไม่ได้สารละลายใสให้เติมน้ำยาย่อยสลายอีก 50 มิลลิลิตร แล้วย่อยต่อไปจนได้สารละลายใส) ปิดไฟและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร และ ฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและทำให้เป็นด่างโดยค่อยๆ เติมน้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ไธโอซัลเฟต 50 มิลลิลิตร(ใช้น้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ไธโอซัลเฟต 50 มิลลิลิตร ต่อน้ำยาย่อยสลาย 50 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน ถ้าได้สีชมพูของฟีนอล์ฟทาลีนยังไม่เกิด ให้เติมน้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์ไธโอซัลเฟตลงไปอีก จากนั้นนำไปกลั่น

- การกลั่นต่อขวดเจลดาลห์เข้ากับเครื่องกลั่น ทำการกลั่นโดยให้ความร้อนที่พอเหมาะ เก็บส่วนที่กลั่นได้ออกมา 200 มิลลิลิตร ผ่านหลอดแก้วที่จุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร ถ้าจะหาแอมโมเนียมไนโตรเจนโดยวิธี Nesslerization ให้กรดบอริคธรรมดาแต่ถ้าจะหาโดยวิธีไตรเตรตให้ใช้กรดบอริคที่เติมอินดิเคเอตร์ เมื่อกลั่นครบ 200 มิลลิลิตร เลื่อนขวดเก็บสารละลายที่ได้จากการกลั่น (Distillate) ออกและนำไปหาแอมโมเนียต่อไป ให้ทำแบลงค์ด้วยโดยใช้น้ำกลั่นแล้วทำตามขั้นตอนเหมือนของน้ำตัวอย่าง

- การคำนวณ ปริมาณแอมโมเนียที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำที่ผ่านการย่อยและการกลั่นมาแล้วจะเป็นค่า TKN ถ้าต้องการหาความเข้มข้นของสารละลายอินทรีย์ไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว จะต้องวิเคราะห์หาค่าแอมโมเนียของตัวอย่างน้ำก่อน จากนั้นจึงคำนวณหาค่าสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดังนี้

สารอินทรีย์ไนโตรเจน = TKN - แอมโมเนียไนโตรเจน

2) การวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia nitrogen) ด้วยวิธีเนสเลอไรเซชัน (อรทัย ชวาลภาฤทธิ์, 2545)

2.1) เครื่องมือและอุปกรณ์

- สเปกโทรโฟโตมิเตอร์
- เครื่องวัดพีเอช
- หลอดเนสเลอร์ขนาด 100 และ 50 มิลลิลิตร

2.2) สารเคมี

- สารละลายซิงค์ซัลเฟต (Zinc Sulfate Solution)
- ละลายซิงค์ซัลเฟต ($ZnSo_4$,$7H_2O$) 100 กรัม ในน้ำกลั่นเจือจางให้เป็น 1 ลิตร
- สารละลายอีดีทีเอ (EDTA reagent) ละลายไดโซเดียมเอทธิลีนไดอะมีน เตตระอะเซเตตไดไฮเดรต (Disodium Ethylenediamine Tetraacetate Dihydrate) 50

กรัม ในน้ำ 60 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายอยู่ ถ้าจำเป็นให้อุ่นเพื่อให้ละลายอย่างสมบูรณ์ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- น้ำยาเนสเลอร์ (Nessler Reagent) ละลาย Hg_2 100 กรัม และ KI 70 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และเติมของผสมนี้ช้าๆพร้อมคนลงในสารละลายที่เย็นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 160 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่ทำด้วยแก้วบอโรซิลิเคต ปิดด้วยจุกยางอย่าให้ถูกแสงเพื่อรักษาสภาพน้ำยาให้คงสภาพอยู่เป็นปี ตรวจสอบน้ำยาเพื่อให้แน่ใจว่าจะให้สีกับแอมโมเนียไนโตรเจน 0.1 มิลลิกรัม ภายในเวลา 10 นาที หลังจากเติมน้ำยาและไม่เกิดตะกอนกับแอมโมเนียจำนวนเล็กน้อยใน 2 ชั่วโมง (ระวัง: มีพิษอย่าให้เข้าปาก)

- สารละลายสต็กแอมโมเนีย (Stock Ammonia Solution) ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ปราศจากน้ำ (NH_4Cl) ที่อบแห้ง ณ อุณหภูมิ 100 องศาเซียเซียส แล้ว 3.819 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

สารละลายนี้ 1.00 มล. = 1.00ไมโครกรัม N = 1.22ไมโครกรัม NH_3

- สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย ตวงสต๊อกแอมโมเนียม 10.00 มิลลิลิตร ลงในขวดตวงและทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

สารละลายนี้ 1.00 มล. = 10.00 ไมโครกรัม N = 1.22 ไมโครกรัม NH_3

2.3) วิธีการวิเคราะห์

- เตรียมตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกลั่น ถ้าตัวอย่างน้ำมีคลอรีนต้องกำจัดออกก่อนตามหัวข้อ ค. ข้อ 2 ตวงตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่หลอดเนสเลอร์ เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มัล 0.5 มิลลิลิตรเพื่อปรับให้ได้พีเอช 10.5 คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาทีเพื่อให้ตะกอนตกลงมาจะได้น้ำใสและไม่มีสีอยู่ข้างบน แยกน้ำใสออกมาโดยใช้เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge)

- ตัวอย่างที่ผ่านการกรอง ปรับพีเอชของกรดบอริคที่ใช้เป็นสารละลายจับแอมโมเนียให้เป็นกลางก่อนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มัล

- การทำให้เกิดสี ตวงตัวอย่างน้ำที่ผ่านการเตรียมแล้ว 50.0 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าแล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 50.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดเนสเลอร์ ถ้าส่วนที่ไม่กลั่นมีแคดเมียม แมกนีเซียมหรืออิออนตัวอื่นที่ทำให้เกิดความขุ่นกับน้ำยาเนสเลอร์ในปริมาณมากให้เติมน้ำยาอีดีทีเอ 1-2 หยด เติมน้ำยาเนสเลอร์ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้หลอดยาปิดหลอดเนสเลอร์ เขย่าหลอดกลับไปกลับมา 5-6 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 15 นาที แบลงค์

ใช้น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแล้วทำเช่นเดียวกับตัวอย่างในขั้นทำให้เกิดสีเลย เมื่อครบเวลานำไปวัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร อ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน

- การเตรียมกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายแอมโมเนียไนโตรเจนให้มีความเข้มข้น 20 , 40 , 60, 80 , 100 และ 120 ไมโครกรัม โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย (ในหัวข้อ ข. ข้อ 5) มา 2 , 4 ,6 , 8 , 10 และ 12 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเนสเลอร์ เติมน้ำให้ครบ 50.0 มิลลิลิตร แล้วทำให้เกิดสีเช่นเดียวกับตัวอย่าง พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมกับ Absorbance โดยใช้กราฟธรรมดา และคำนวณตามสูตร

$$\text{แอมโนเมีย (มก./ล. ในรูป N)} = \frac{\text{ไมโครกรัมแอมโมเนียที่อ่านจากกราฟ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$$

3) การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสในรูปออโธฟอสเฟต ด้วยวิธีกรดแอสคอร์บิค(มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์,2543)

3.1) เครื่องมือและอุปกรณ์

- สเปกโตรโฟเตมิเตอร์ ซึ่งมีอินฟาเรดโฟโตทิวบ์ใช้กับความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร
- เครื่องแก้วที่ล้างด้วยกรดและน้ำกลั่นจนสะอาด

3.2) สารเคมี

- กรดวัลฟิวริค 5 นอร์มัล เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 70 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร
- สารละลายแอนติดมนิลโปแตสเซียมตาเตรต (Potassium Antimonyl Tartrate Solution) ละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$ 1.3715 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เก็บในขวดแก้ว
- สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium Molybdate Solution) ละลาย $(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic Acid) ละลายกรดแอสคอร์บิค 1.76 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะคงตัวประมาณ 1 สัปดาห์ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องสาเซลเซียส
- น้ำยารวม(Combined reagen) ผสมน้ำยาเคมีที่กล่าวข้างต้นในสัดส่วนสำหรับ 100 มิลลิลิตร ดังนี้

กรดซัลฟูริค 5 นอร์มัล	50 มิลลิลิตร
สารละลายแอนติโมนิลโปแตสเซียมตาเตรต	5 มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต	15 มิลลิลิตร

สารละลายกรดแอสคอร์บิค 30 มิลลิลิตร

ก่อนผสมต้องปล่อยให้สารละลายแต่ละชนิดอยู่ที่อุณหภูมิห้องก่อน นำมาผสมโดยผสมให้เข้ากันทุกครั้งเมื่อเติมส่วนผสมแต่ละชนิด (ให้เติมเรียงลำดับไป) ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นในน้ำยารวมหลังจากเติมสารละลายแอนติโมนิลโปแตสเซียมตาเตรต หรือแอมโมเนียมโมลิบเดตให้เขย่าน้ำยาเคมีรวมนี้แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จนกระทั่งความขุ่นหายไป จึงเติมน้ำยาตัวอื่นต่อไป น้ำยารวมนี้อยู่ตัวได้นาน 4 ชั่วโมง

- สารละลายสต๊อกฟอสเฟต ละลาย Anhydrous KH_2PO_4 219.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นและเจือจางให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต นำสารละลายสต๊อกฟอสเฟตมา 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 มิลลิลิตร

3.3) วิธีการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสในรูปออโธฟอสเฟต

- การเตรียมตัวอย่าง ปิเปตตัวอย่างน้ำ 50.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 1 หยด ถ้าเป็นสีแดงให้หยด กรดซัลฟุริค 5 นอร์มัล ลงไปทีละหยดจนกระทั่งสีแดงหายไป เติมน้ำยารวม 8.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสง(absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 880 นาโนเมตรโดยใช้ reagent blank เทียบ A= 0

- การทำ correction สำหรับตัวอย่างน้ำที่มีสีหรือความขุ่น โดยทั่วไปสีของน้ำธรรมชาติจะไม่ขัดขวางการหาที่ความยาวคลื่นสูง ๆซึ่งใช้อยู่ แต่ในกรณีที่น้ำขุ่นหรือมีสีมากให้ใช้น้ำตัวอย่างแบลงค์ โดยเติมน้ำยาทุกอย่างยกเว้นสารละลายกรดแอสคอร์บิคและสารละลายแอนติโมนิลโปแตสเซียมตาเตรต ลงในตัวอย่าง นำไป set A=0 แล้ววัดabsorbance ของตัวอย่างน้ำที่เติมน้ำยาครบทุกชนิด

- การเตรียมกราฟมาตรฐาน เตรียมอนุกรมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอตเฟต ดังนี้ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัม โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอตเฟต (1 มิลลิลิตร = 2.5 µg) มา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.0 มิลลิลิตร แต่ละขวดแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ขวดรูปกรวย ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยารวม 8.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร โดยใช้ขวดที่มีความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมเป็นแบลงค์พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละความเข้มข้น และคำนวณตามสมการข้างล่าง

ฟอสเฟต (มิลลิกรัมP/ล.) = ไมโครกรัมฟอสเฟตที่อ่านได้จากกราฟ / ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

4) การวิเคราะห์โพแทสเซียม (จำเป็น อ่อนทอง, 2547)

4.1) วัสดุและอุปกรณ์

- เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.0001 กรัม
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เตาให้ความร้อน (Hot plate)
- กระดาษกรองวัตแมน (Whatman filter paper)
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- เครื่องเฟลมโฟโตมิเตอร์ (Flame photometer)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- หลอดย่อยตัวอย่าง (Digestion tube) ขนาด 20 มิลลิลิตร

4.2) สารเคมี

- สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัม ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride:KCl) ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง โดยใช้ 1.9067 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรในขวดวัดปริมาตร
- กรดผสมไนทริก-เพอร์คลอริก (HNO_3-$HClO_4$) : ผสมในกรดไนทริก (Nitric acid 65 % w/w HNO_3) กับกรดเพอร์คลอริก (Perchloric acid : 70 % w/w $HClO_4$) ในสัดส่วน 3: 1 โดยปริมาตร
- กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (Sulphuric acid : 98 % w/w H_2SO_4)
- ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide: H_2O_2)30 %w/w

4.3) วิธีวิเคราะห์

- การย่อยตัวอย่างด้วยกรดผสมไนทริก-เพอร์คลอริก นำตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร เติมกรดไนทริกเพอร์คลอริกลงไป 7 มิลลิลิตร ทำแบลงค์โดยนำกรดไปย่อยเช่นเดียวกับตัวอย่าง นำไปย่อยบนเตาให้ความร้อนโดยเริ่มที่อุณหภูมิประมาณ 80-100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งควันสีน้ำตาลหมดไป เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ย่อยต่อจนปรากฏควันสีขาวประมาณ 30 นาที วางให้เย็นและถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรและปรับเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นกรองผ่านกระดากรองวัตแมนเบอร์ 1 เก็บสารละลายไว้วิเคราะห์
- การย่อยด้วยวิธีกรดซัลฟิวริก-ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ นำตัวอย่างมาประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยขนาด 20 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 1 มิลลิลิตร ย่อยบนเตาย่อยตัวอย่างอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที ยกออกจากเตาและวางไว้ประมาณ 1 นาที แล้วเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงไป 0.5 มิลลิลิตร นำไปย่อยต่อประมาณ 20 นาทีแล้วยกออกวางไว้ประมาณ 1 นาที เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร และย่อยต่อไป โดยทำซ้ำ 3-4 ครั้ง จนได้สารละลายไม่มีสี แล้วย่อยครั้งสุดท้าย

ติดต่อกันอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นและกรองผ่านกระดาษกรองวัตแมนเบอร์ 1 เก็บสารละลายไว้วิเคราะห์ธาตุต่างๆ

- การวัดโพแทสเซียม เตรียมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 0, 10, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0, 1, 2, 4 และ 6 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร เติมกรดเพอร์คลอริกลงไป 0.7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดไนทริก-เพอร์คลอริก เตรียมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมความเข้มข้นที่ระดับ 0, 10, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0, 1, 2, 4 และ 6 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร เติมกรดซัลฟิวริกลงไป 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก-เพอร์คลอริก เจือจางตัวอย่าง 5 เท่า โดยปิเปตมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไป 4 มิลลิลิตร ใช้สารละลายมาตรฐานที่ไม่มีโพแทสเซียมปรับให้เครื่องอ่านค่าเป็นศูนย์ และใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 60 มิลลิกรัมต่อลิตรปรับเครื่องอ่านค่าได้ประมาณ 100 และทำซ้ำจนเครื่องอ่านค่าสารละลายมาตรฐานที่ไม่มีโพแทสเซียมเป็นศูนย์ และสารละลายมาตรฐานสูงสุดเป็น 100 วัดสารละลายมาตรฐานตามลำดับความเข้มข้น แล้วจึงวัดแบลงค์และตัวอย่าง

3.3 ศึกษากระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ

3.3.1 วัสดุอุปกรณ์

1) เศษวัสดุทางการเกษตรในชุมชน

วัสดุทางการเกษตรในชุมชน ได้แก่ ผักกาด ผักบุ้ง กล้วย มะละกอ เศษขยะอินทรีย์ ได้แก่ เศษปลา หอย ที่ได้จากชุมชนตำบลสะลวงและพื้นที่บริการขององค์การบริหารส่วนตำบลสะลวง ซึ่งจะเป็นวัตถุดิบหลักในการใช้ทำปุ๋ยน้ำชีวภาพ

2) กากน้ำตาล

กากน้ำตาลเป็นของเหลวที่ได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล มีองค์ประกอบทางเคมี คือ น้ำ ซูโครส รีดิวซิงชูการ์ ใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานหลักของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักปุ๋ย (พงษ์ พฤกษา, 2547)

3) หัวเชื้อ

หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักเชื้อทางการค้า

4) น้ำ

น้ำใช้เป็นตัวที่คอยให้ความชื้นและควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินไปในการหมัก และเป็นตัวทำละลายธาตุอาหารที่ได้จากการหมัก

5) ถังหมัก

ถังน้ำพลาสติกที่มีฝาปิด มีความหนาพอสมควร มีความจุหรือปริมาตรที่สามารถรองรับขยะที่เป็นวัสดุหลักได้อย่างพอดี มีฝาปิดมิดชิด ภาชนะควรเป็นพลาสติกจะ

ดีกว่าโลหะเพราะโลหะอาจจะทำปฏิกิริยากับกรดที่เกิดขึ้นจากการหมักหรือทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจนเกิดสนิม

6) ตาชั่ง/เครื่องชั่ง

เครื่องชั่งจะใช้ในการชั่งปริมาณของวัตถุดิบที่จะนำมาทำน้ำหมักชีวภาพเพื่อความแน่นอนของสัดส่วนที่แม่นยำ

7) ปั๊มให้อากาศ

เป็นเครื่องมือที่ช่วยเติมอากาศลงน้ำหมักขณะทำการหมัก

3.3.2 การทดลองหมัก

ในการทดลองพัฒนากระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพได้มีการทดลองเปรียบเทียบการหมัก 2 แบบ คือ แบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ เพื่อศึกษาผลของการให้อากาศต่อคุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพ ในการทดลองแต่ละชุดจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยสูตรน้ำหมักชีวภาพที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นสูตรที่ประยุกต์มาจากวัสดุต่างๆที่มีอยู่ในท้องถิ่น ดังนี้

เศษพืชผักผลไม้	3	กิโลกรัม
เศษปลาและหอย	3	กิโลกรัม
กากน้ำตาล	1	กิโลกรัม
น้ำสะอาด	1-10	ลิตร
หัวเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น	1	ลิตร

โดยสับผักผลไม้เป็นชิ้นเล็ก นำไปคลุกเคล้ารวมกับเศษอาหารในถังหมัก ผสมน้ำกับน้ำตาลให้เข้ากัน เป็นเนื้อเดียวกัน เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้นในน้ำและน้ำตาลแล้วเททับลงในถังที่ใส่เศษอาหารให้ทั่วๆ ปิดฝาถังหมัก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำหมักทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 16 สัปดาห์

3.4 การตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 นำตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพมาเจือจางแบบ 10-fold dilution ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นดูดสารละลายที่มีความเจือจาง ตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรด้วยปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (egg albumin agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อรา (Rose Bengal-streptomycin agar) ดังภาคผนวก 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobe) ให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงใน anaerobic jar เป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกผลเชื้อจุลินทรีย์ โดยนับเฉพาะจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี และเชื้อราจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีเชื้ออยู่ระหว่าง 10-100 โคโลนี

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Egg albumin agar) มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

Egg albumin	0.25	กรัม
0.1 N NaOH	10	มิลลิลิตร
Glucose	1	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3.9H_2O$	0.01	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ในอาหารให้ได้ 7.0 ด้วย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา (Rose Bengal-streptomycin agar) มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.0350	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมไปต้มให้ละลายแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารละลาย streptomycin ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองแบคทีเรีย ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ streptomycin เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร