บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พื้นที่ที่ศึกษา

พื้นที่วิจัยมี 15 แห่งครอบคลุมพื้นที่ซึ่งเป็นป่าดิบเขา ป่าสนและทุ่งหญ้าธรรมชาติและพื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องและใช้ทำไร่เลื่อนลอยดังรายละเอียดใน ตารางที่ 1 สำหรับพื้นที่ป่าดิบเขาที่ไม่เคยถูกรบกวน (พื้นที่ที่ 15) และทุ่งหญ้าธรรมชาติ (พื้นที่ที่ 14) อยู่บริเวณกิ่วแม่ปานในวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ เป็นพื้นที่ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ส่วนพื้นที่ที่เหลืออยู่ในเขตของบ้านขุนแม่วากจำนวน 7 แห่ง (พื้นที่ 1-7) และอยู่ในเขตของบ้านแม่มะลอ 6 แห่ง (พื้นที่ที่ 8-13) สำหรับพื้นที่ป่าในบ้านขุนแม่วากที่ใช้ศึกษาเป็นป่าดิบเขาที่มีอายุประมาณ 20 ปี และป่าสนที่มีอายุประมาณ 10-15 ปี ส่วนป่าที่อยู่ในเขตบ้านแม่มะลอเป็นป่าดิบเขาที่อายุไม่เกิน 10 ปี พื้นที่ที่ใช้ในการเกษตรที่อยู่ในหมู่บ้านทั้งสองแห่ง ซึ่งใช้ในการศึกษา ครอบคลุมพื้นที่ซึ่งมีการใช้ปลูกพืชแบบต่อเนื่องและพื้นที่ทำไร่เลื่อนลอยดังแสดงใน รูปที่ 1-8 และลักษณะในการใช้พื้นที่ในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างดังรายละเอียดใน ตารางที่ 2

วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินในระดับความลึก 0-5 เซนติเมตร แบบ composite 10 ตารางเมตร ในช่วงฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) และฤดูหนาว (มกราคม) ในแต่ละพื้นที่ใช้ composite sample จำนวน 4 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างดินในถังน้ำแข็งในช่วงที่ปฏิบัติงานในพื้นที่ หลังจากนั้นนำเข้าเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์ดัชนีทางชีวภาพของดินโดยเก็บรักษาได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

1 .การวิเคราะห์มวลชีวภาพจุลินทรีย์ดิน

ใช้วิธีการวิเคราะห์มวลชีวภาพจุลินทรีย์ดินที่เสนอโดย Horwath และ Paul (1994) ก่อนการวิเคราะห์มวลชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน แยกรากและชิ้นส่วนของพืชออกจากดิน หลังจากนั้นนำตัวอย่างดินมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2-4 มิลลิเมตร ใช้ตัวอย่างดินที่ร่อนแล้ว 20 กรัมบรรจุในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำตัวอย่างไปอบด้วย chloroform โดยใช้ vacuum desicator เพื่อฆ่าจุลินทรีย์ดินทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้น กำจัด chloroform ออกจากดินให้หมด เติมดินที่ไม่ได้อบด้วย chloroform ลงไปในตัวอย่างโดยใช้ดิน 0.2 กรัม incubate ดินไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทเป็นเวลา 10 วันในที่มืด เก็บ CO_2 ที่เกิดจากการสลายตัว

ตารางที่ 1 ตำแหน่งของพื้นที่ซึ่งใช้ในการศึกษา

site no.	หมู่บ้าน	ประเภทของการใช้ประโยชน์ที่ดิน	Location	Altitude (m.)
1	KMW	ป่าดิบเขารุ่นที่สอง **(1-KSLMF)**	448E 596N	1,614
2	KMW	ป่าสนรุ่นที่สอง **(2-KSPF)**	451E 599N	1,560
3	KMW	พื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์ที่ดิน : แปลงกะหล่ำปลี **(3-KICC)**	457E 608N	1,500
4	KMW	พื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์ที่ดิน : แปลงสาลี่ **(4-KICPO)**	459E 621N	1,350
5	KMW	พื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์ที่ดิน : แปลงดอกไม้ **(5-KICFL)**	455E 621N	1,350
6	KMW	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้างเป็นเวลา 2-3 ปี : เผาพื้นที่ **(6-KFab)**	546E 626N	1,430
7	KMW	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้างเป็นเวลา 4 ปี **(7-KFa)**	459E 616N	1,400
8	MML	พื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์ที่ดิน : นาข้าว **(8-MICPR)**	415E 585N	1,045
9	MML	ป่าดิบเขารุ่นที่สอง **(9-MSLMF)**	417E 584N	1,110
10	MML	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง : ไม่มีการเผาพื้นที่ **(10-MFa)**	415E 586N	1,129
11	MML	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง : มีการเผาพื้นที่ **(11-MFab)**	415E 587N	1,120
12	MML	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง : Middle terrace **(12-MFaMid)**	416E 588N	1,080
13	MML	พื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์ที่ดิน:แปลงกะหล่ำปลี **(13-MIC)**	416E 588N	1,157
14	DINP	ทุ่งหญ้าที่ไม่ถูกรบกวน **(14-GL)**	451E 520N	2,280
15	DINP	ป่าดิบเขารุ่นแรก **(15-PLMF)**	451E 520N	2,200

KMW = หมู่บ้านขุนแม่วาก

MML = หมู่บ้านแม่มะลอ

DINP = บริเวณกิ่วแม่ปาน ในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

ตารางที่ 2 ชนิดของพืชที่ปลูกและการจัดการพื้นที่ในฤดูกาลต่าง ๆ ในพื้นที่ที่ใช้ประโยชน์ที่ดินทำการเกษตร

วันที่	พืชปลูกและการจัดการ	KMW					MML				
		Site					Site				
		3	4	5	6	7	8	10	11	12	13
4-6 สิงหาคม 2543	พืชที่ปลูก		P	PM	C		R				
	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง					√		√	√	√	
	เตรียมพื้นที่	√									
				F1							
19-21 มกราคม 2544	พืชที่ปลูก	C	P						CR		A
	พื้นที่หลังเก็บเกี่ยว แผ้วถางและเผาพื้นที่	√				√	√				
	พื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง							√		√	

* C = กะหล่ำปลี, P = สาลี่, F1 = ดอกไม้, PM = ฟักทองและข้าวโพด, R = นาข้าว, A = อะติโชก, CR = แครอท KMW=บ้านขุนแม่วาก MML=บ้านแม่มะลอ

(mineralization) ของอินทรีย์คาร์บอนในเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้ NaOH 2 M จำนวน 1 มิลลิลิตร หลังจากครบกำหนด ประเมิน microbial biomass N โดยสกัด inorganic N (NH_4^+-N และ NO_3^--N) ที่เกิดจาก กระบวนการ mineralization ของไนโตรเจนจากเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยการใช้ KCl 2 M เป็นน้ำยาสกัดและกลั่นหา inorganic N โดยการใช้ MgO และ Devarda alloy นอกจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินที่อบด้วย chloroform และยังใช้ดินที่ไม่อบด้วย chloroform ในการวิเคราะห์ควบคู่กันไปด้วยโดยใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนกันทุกประการ ประเมินปริมาณ microbial biomass C และ N จากสูตรต่อไปนี้

Biomass C = (Fc - UFc)/Kc

เมื่อ Fc = ปริมาณ CO_2 ที่เกิดจากตัวอย่างที่รมด้วย chloroform

UFc = ปริมาณ CO_2 ที่เกิดจากตัวอย่างที่ไม่รมด้วย chloroform

Kc = สัดส่วนของ biomass C ที่ย่อยสลายกลายเป็น CO_2

Biomass N = (Fn - UFn)/ Kn

เมื่อ Fn = ปริมาณของ NH_4^+-N ที่ได้จากตัวอย่างที่รมด้วย chloroform

Ufn = ปริมาณของ NH_4^+-N ที่เกิดในดินชุดควบคุมช่วงระยะเวลา 10 วัน

Kn = สัดส่วน biomass N ที่เกิดmineralize เป็น NH_4^+-N

ในการทดลองนี้ใช้ค่า Kc ของ Anderson และ Domsh (1978) อ้างโดย Horwath และ Paul (1994) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.41 และใช้ค่า Kn ของ Jenkinson (1988) อ้างโดย Horwath และ Paul (1994) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.54

2.การหาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

หาปริมาณจุลินทรีย์ดินพวก aerobe ที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วิธี most probable number และใช้อาหารเหลวที่มีกระดาษกรองเป็น C substrate (Pramer and Schmidt , 1967) อาหารเหลวดังกล่าวประกอบด้วย K_2HPO_4 1 g $NaNO_3$ 0.5 g $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g KCl 0.5 g และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.10 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตรปรับ pH เป็น 7.5 ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มล. ปริมาตร 9 มล. ที่มีกระดาษกรองที่ตัดเป็นขนาด 1 x 9 ซม. ใส่ไว้แล้ว จากนั้นนำ ขวดและหลอดทดลองที่เตรียมไว้แล้วอบฆ่าเชื้อด้วย autoclave ในการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในดินใช้ดินผสมน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วและเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำความเข้มข้นละ 4 ซ้ำบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน (Pramer และ Schmidt

, 1967) จากนั้นตรวจสอบผลโดยดูจากการเปลี่ยนสภาพของกระดาษกรอง ประเมินปริมาณจุลินทรีย์ดินจากจำหลอดอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพของกระดาษกรองโดยใช้ตาราง most probable number (Woomer, 1994)

3. การหาปริมาณไนโตรเจนที่เกิดจากกระบวนการ mineralization

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 4 มม. ภายใต้อุณภูมิห้อง (21-35 องศาเซลเซียส) โดยใส่ลงในถุงพลาสติกขนาด 7 x 12 ซม.และใช้ดิน 10 กรัมต่อถุงสำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมารไนโตรเจนและ 20 กรัมต่อถุงสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ปรับความชื้นให้อยู่ในระดับความชื้นสนามโดยใช้น้ำกลั่น ชั่งน้ำหนักถุงทุกๆ 1 สัปดาห์เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของดินในถุง หากน้ำหนักลดลงมากกว่า 5 % ต้องทำการเพิ่มความชื้นให้อยู่ในระดับเดิม (Hart *et al.*, 1994) การบ่มดินแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ ตรวจสอบ pH และวิเคราะห์ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนของดินในถุงทุก 1 เดือนเป็นเวลา 4 เดือน

เมื่อบ่มดินครบกำหนดวัด pH โดยใช้น้ำต่อดิน 1:1 (Thomas,1996) และใช้ pH meter สำหรับการวิเคราะห์อนินทรีย์ไนโตรเจนโดยใช้ KCl 2 M ปริมาณ 100 มล. ต่อดิน 10 กรัม และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายดินที่ได้ไปกลั่นหาปริมาณ NH_4-N และ NO_3-N (Mulvaney, 1996) โดยใช้สารละลายดิน 30 มล.สำหรับการกลั่นหา NH_4-N โดยใช้ MgO 0.2 กรัมและกลั่นหา NO_2-N+NO_3-N ต่อโดยการเติม Devada's alloy 0.2 g นอกจากนี้ยังหาปริมาณ NH_4-Nและ NO_3-N+NO_2-Nในดินก่อนการบ่มดินอีกด้วย เพื่อใช้หักออกจากปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ได้จากการบ่มแต่ละระยะเวลาเพื่อหาผลลัพธ์ของปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินทั้งหมดในการกลั่นแต่ละขั้นตอนใช้ H_3BO_3 2% ที่ผสม mixed indicator ซึ่งประกอบด้วย Bromcresolgreen+Methyl red (Bremner และ Mulvaney,1983) จำนวน 15 มล. รองรับสารละลายที่ออกมาจากเครื่องกลั่นและไตเตรตหาอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยการใช้สารละลายกรดมาตรฐาน H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.005 Nคำนวนหาอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{ppm N} = \frac{\left(H_2SO_4\right) \times (\text{ml} - \text{blank}) \times 14 \times 100 \times 10^6}{1000 \times V \times \text{น้ำหนักดิน}}$$

เมื่อ $\left(H_2SO_4\right)$ = ความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 ประมาณ 0.005 N

ml = ปริมาตรของกรด H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

blank = ปริมาตรกรด H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตกับ KCl ที่ใช้สกัดตัวอย่าง

V = ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง (30 มล.)

น้ำหนักดิน = น้ำหนักดินที่สกัด (10 กรัม)

สำหรับปริมาณของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เกิดจากกระบวนการ mineralization คำนวณได้ดังนี้

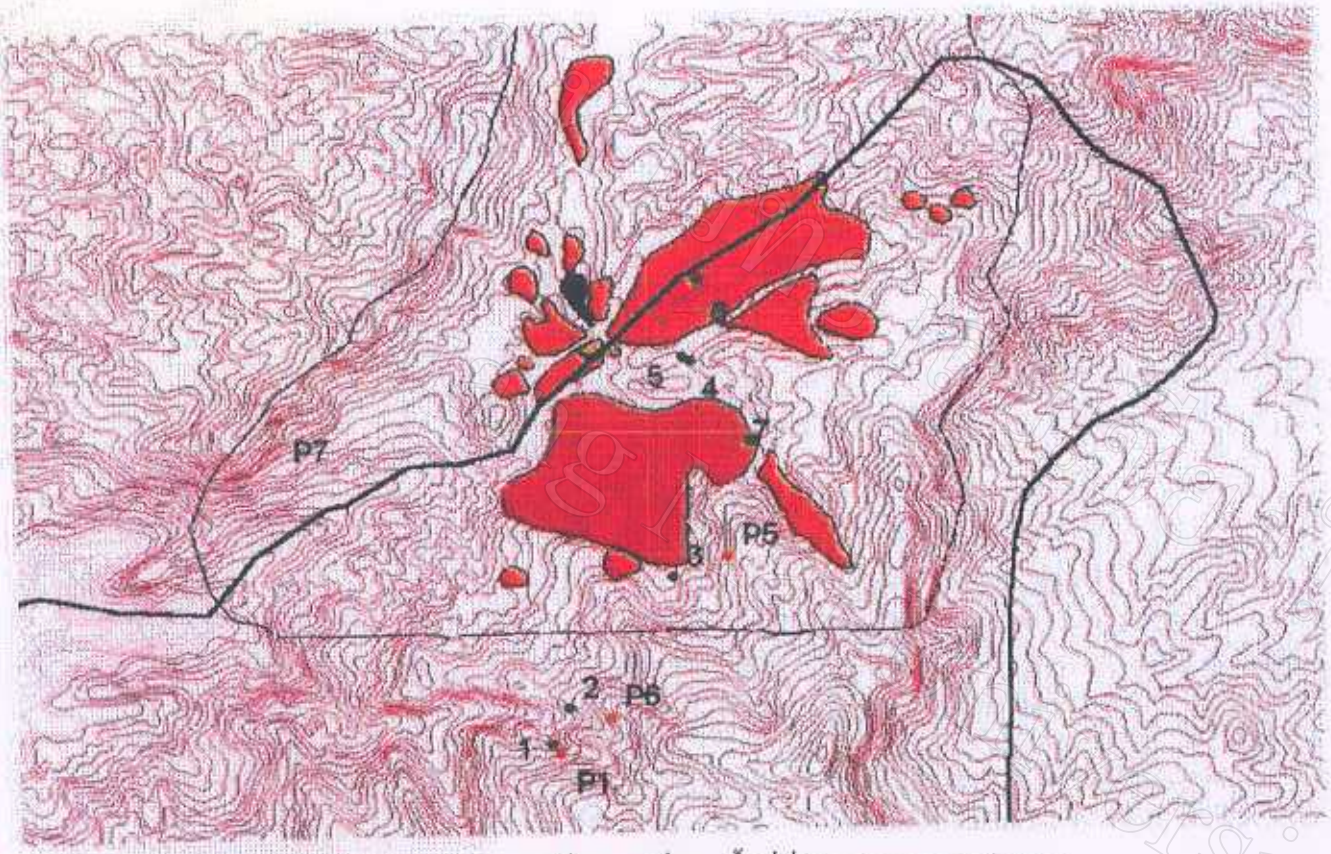
Total mineralized nitrogen = $(NH^+_4\text{-}N + NO^-_3\text{-}N + NO_2\text{-}N)_{t+1} - (NH^+_4\text{-}N + NO^-_3\text{-}N + NO_2\text{-}N)_{t0}$

$(NH^+_4\text{-}N + NO^-_3\text{-}N + NO_2\text{-}N)_{t+1}$ = ปริมาณอนินทรีย์ ไนโตรเจนที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาใดๆ หลังการบ่มดิน

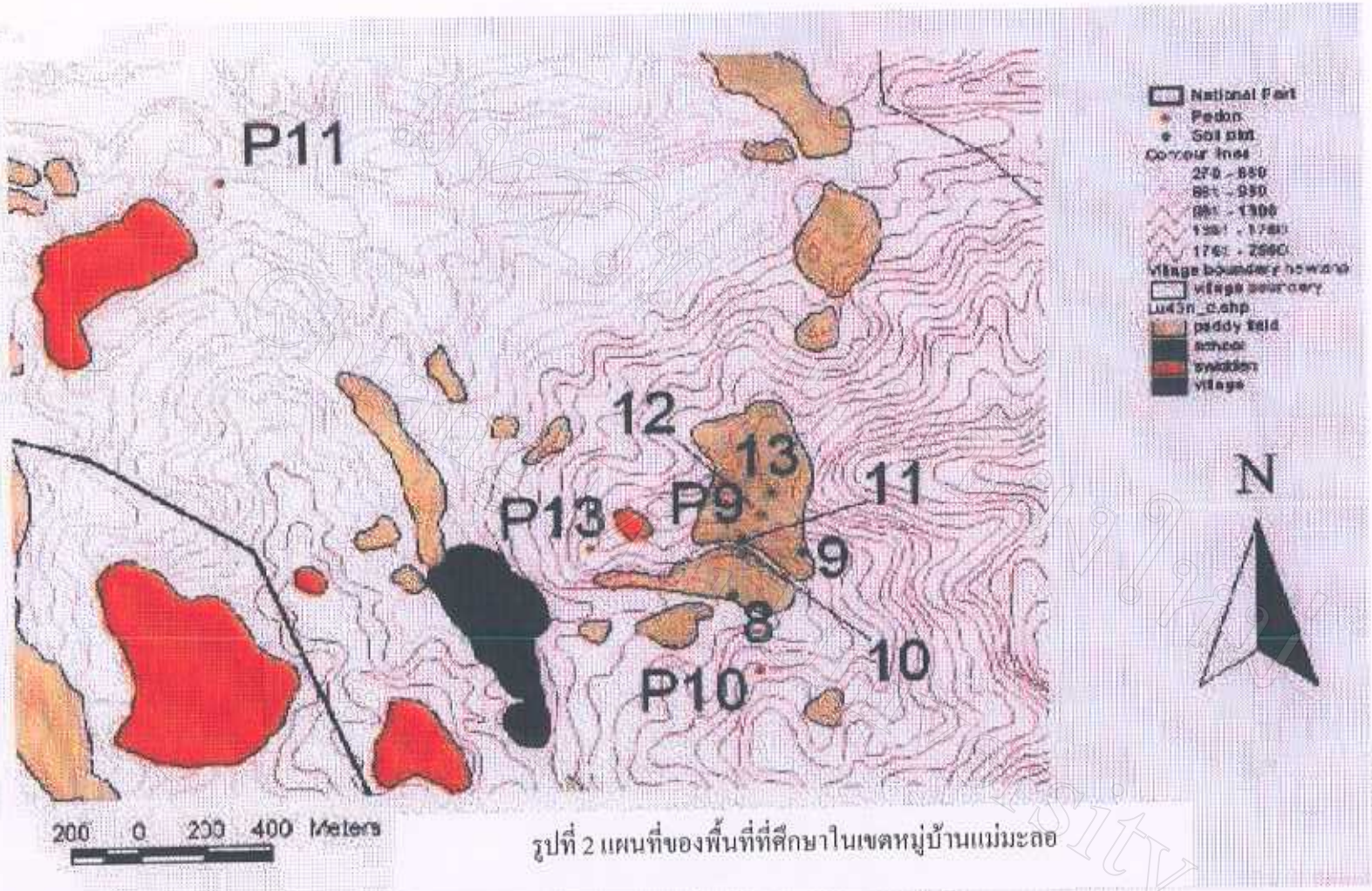
$(NH^+_4\text{-}N + NO^-_3\text{-}N + NO_2\text{-}N)_{t0}$ = ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินก่อนนำไปบ่ม

4. การหาปริมาณแบคทีเรีย เชื้อราและ แอคติโนมัยซีทในดินโดยวิธี plate count (อำพรรณ,2541)

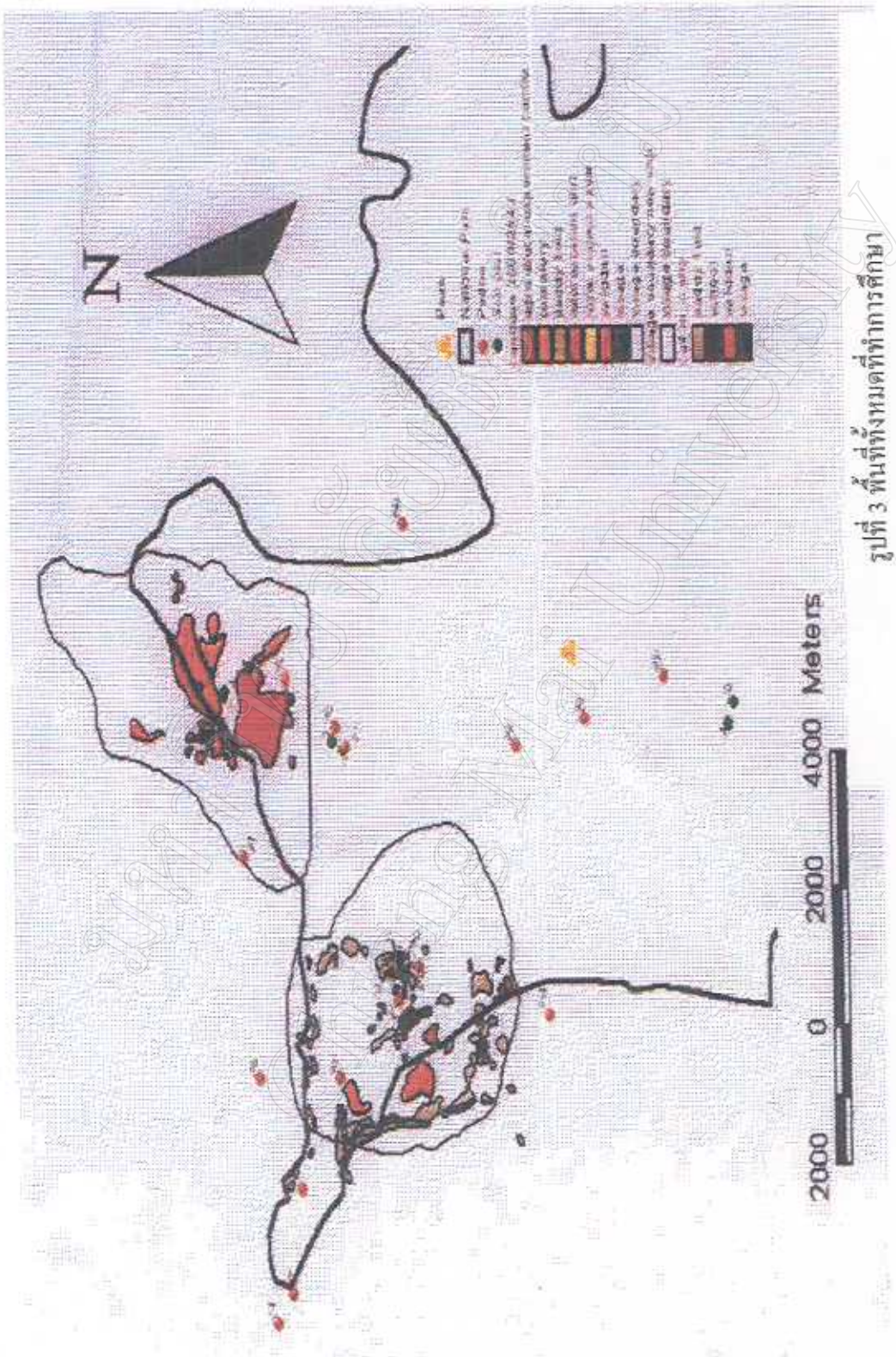
ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดปากกว้าง ซึ่งมีน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วอยู่ 95 มล. แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 15 นาที เพื่อให้ดินอยู่ในสภาพ suspension อย่างสมบูรณ์จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} ไปเจือจางลงเท่ากับ 10^{-2} ถึง 10^{-6} โดยต้องระวังการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ขณะทำการเจือจางจากนั้นใช้ไปเปท 1 มล. ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายดินจากความเข้มข้นที่ 10^{-3} ถึง 10^{-6} ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อใบละ 1 มล. โดยการหาปริมาณแบคทีเรียและแอคติโนมัยซิทจะเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10^{-4} ขึ้นไปความเข้มข้นละ 3 จาน ใช้อาหาร egg alblumin agar ส่วนเชื้อราจะเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10^{-3} ขึ้นไปและใช้ rose bengal - streptomycin agar เป็นอาหาร จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน แล้วทำการนับโคโลนีของแบคทีเรียและเชื้อราเมื่อครบ 7 วัน สำหรับแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทต้องทำการนับอีกครั้งหนึ่งเมื่อครบ 14 วัน สำหรับรายละเอียดการทำอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงไว้ในภาคผนวก ก



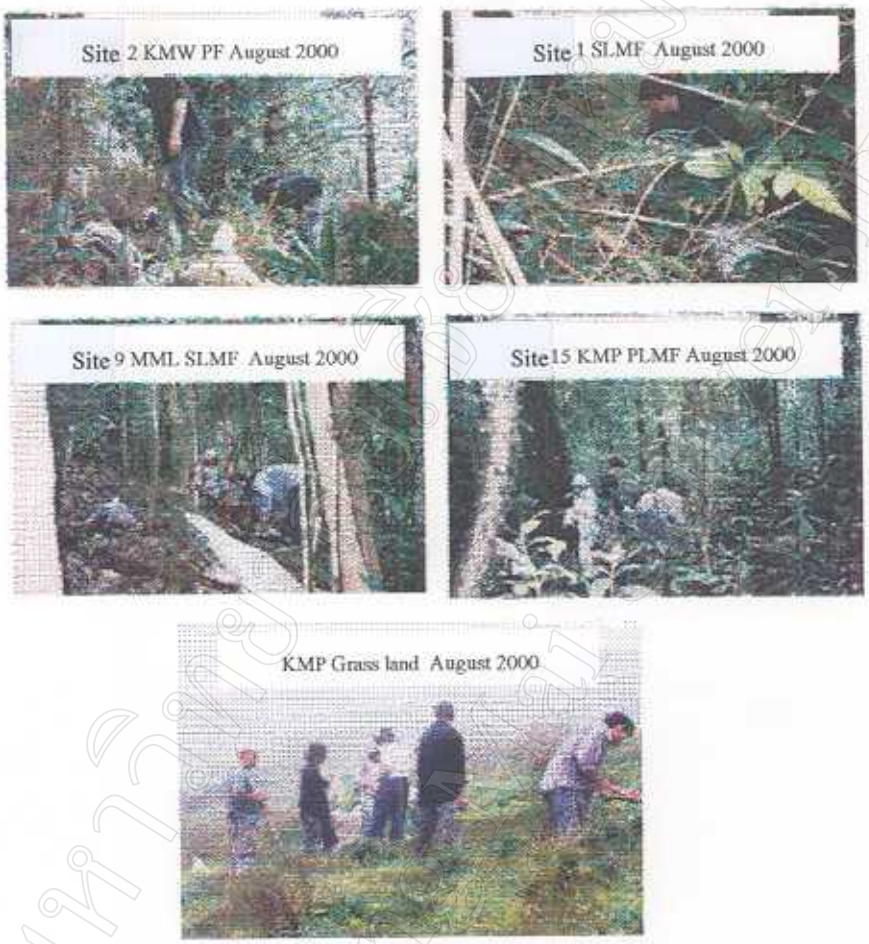
รูปที่ 1 แผนที่ของพื้นที่ที่ศึกษาในเขตหมู่บ้านขุนแม่วาก



รูปที่ 2 แผนที่ของพื้นที่ที่ศึกษาในเขตหมู่บ้านแม่มะลอ



รูปที่ 3 พื้นที่ทั้งหมดที่ทำการศึกษา

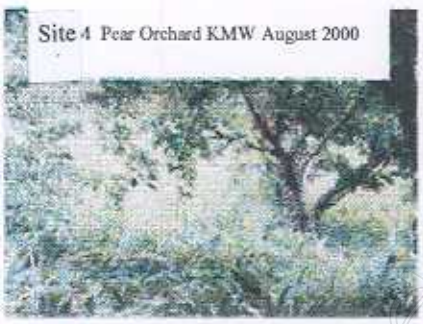


รูปที่ 4 พื้นที่ป่าและทุ่งหญ้าในฤดูฝน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 5 พื้นที่ที่ทิ้งรกร้างในฤดูฝน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

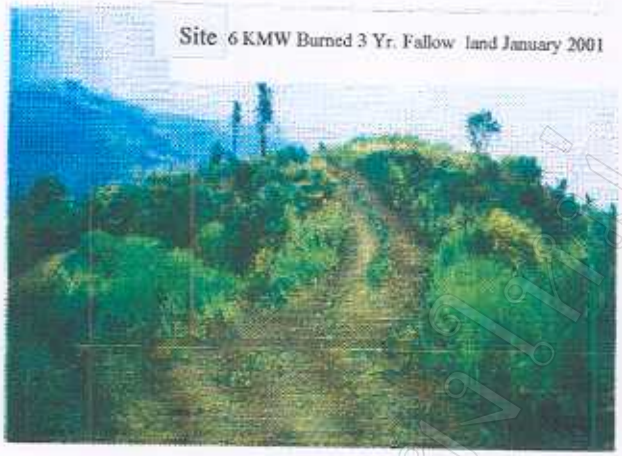


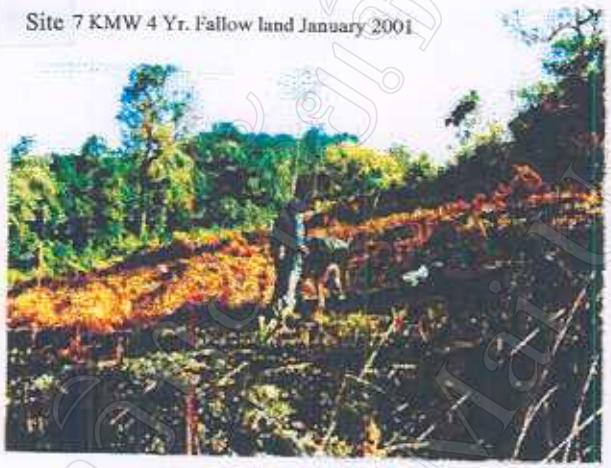
รูปที่ 6 พื้นที่ที่ใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องที่หมู่บ้านขุนแม่วากในฤดูฝน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ 7 พื้นที่ที่ใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องที่หมู่บ้านแมะลอในฤดูฝน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University





รูปที่ 8 พื้นที่ที่ทิ้งรกร้างที่หมู่บ้านขุนแม่วากในฤดูหนาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University