บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองในศูนย์วิจัยระบบทรัพยากรเกษตร (Center for Agricultural System Research) โรงเรือนทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แปลงทดลองใน ต. หนองล่อง อ. เวียงหนองล่อง จ. ลำพูน และห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน สาขาวิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 – เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

3.2 การคัดกรองวิธีการสกัดกรดฮิวมิคจากลีโอนาร์ไดท์

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิธีการสกัดกรดฮิวมิคในครั้งนี้ ได้แก่ ลีโอนาร์ไดท์จากเหมืองถ่านหิน 3 แหล่ง คือ แหล่งเชียงม่วน แม่เมาะแหล่งที่ 1 และแม่เมาะแหล่ง 2 ดินจากกลุ่มชุดดินที่ 21 ชุดดินสรรพยา (Sapphaya series: Sa) ในพื้นที่บ้านต้นผึ้ง ม. 8 ต.หนองล่อง อ.เวียงหนองล่อง จ.ลำพูน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2555a) และปุ๋ยหมักของ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการผึ่งตัวอย่างทั้งหมดให้แห้งในที่ร่มและนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh (250 ไมโครเมตร) วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทำการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์กรดฮิวมิคจากตัวอย่างทั้งหมด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ตำรับละ 6 ซ้ำ วิธีวิเคราะห์กรดฮิวมิคได้คัดเลือกวิธีการจากผลงานวิจัยการสกัดกรดฮิวมิคที่ได้ผลดีมากที่สุด 5 ผลงานดังนี้

วิธีที่ 1 สกัดตัวอย่าง 5 กรัม โดยใช้ 0.1 M NaOH 50 ml ใส่ในหลอด polyethylene centrifuge แล้วทำการเขย่า 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองแยกเอาตะกอนทิ้งไป เก็บสารละลายที่กรองได้มาปรับ pH ให้เป็น 1 ด้วย 6 M HCl ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้กรดฮิวมิคตกตะกอน นำมาแยกตะกอนโดยการ centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที กรดฮิวมิคจะแยกออกจากกรดฟุลวิคอย่างชัดเจนโดยที่ส่วนที่เป็นสารละลายใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) เป็นกรดฟุลวิคและส่วนที่เป็นตะกอนเป็นกรด ฮิวมิค นำตะกอนกรดฮิวมิคที่ได้มาอบที่ 55-60 ^{o}C จนกว่าจะแห้งสนิท (Ahmed *et al.*, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 2 สกัดตัวอย่าง 1 กรัม โดยใช้ 0.25 M KOH ต่อสารละลาย 20 ml ใส่ในหลอด polyethylene centrifuge ขนาด 50 ml แล้วทำการเขย่า 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที กรองแยกเอาตะกอนทิ้งไป เก็บสารละลายที่กรองได้มาปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วย HCl เข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อให้กรดฮิวมิคตกตะกอน นำมาแยกตะกอนโดยการ centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีอีกครั้ง นำตะกอนกรดฮิวมิคที่ได้มาอบที่ 55-60 ^{o}C จนกว่าจะแห้งสนิท (Garcia *et al*.,1996)

วิธีที่ 3 สกัดตัวอย่าง 2 กรัม โดยใช้ 0.5 M NaOH 40 ml ใส่ใน Erlenmeyer flask นำมาแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C ประมาณ1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างละลาย กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายแยกออกเก็บไว้จากส่วนที่ละลาย นำส่วนที่ไม่ละลายเติม 0.5 M NaOH อีกครั้ง ทำเช่นเดิม แล้วนำส่วนที่ละลายเพิ่มมาเทใส่รวมกัน จากนั้นนำส่วนที่ละลายได้ทั้งหมด มาเติมกรด HCl เข้มข้น 10 ml กรดฮิวมิคจะตกตะกอน กรองเอาตะกอนกรดฮิวมิคที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 65-70 ^{o}C ประมาณ 20 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator (พวงผกา, 2541)

วิธีที่ 4 สกัดตัวอย่าง 1 กรัม โดยใช้สารละลายผสม 0.5 M NaOH ต่อ 0.15 M $Na_4P_2O_7$ 25 ml ทำการเขย่า 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที กรองแยกเอาตะกอนทิ้งไป เก็บสารละลายที่กรองได้มาปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วย 0.1 M HCl ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้กรดฮิวมิคตกตะกอน ทำการแยกตะกอนโดยการ centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีอีกครั้ง นำตะกอนกรดฮิวมิคที่ได้มาอบที่ 55-60 ^{o}C จนกว่าจะแห้งสนิทดัดแปลงจาก (Deborah and Burba, 1999)

วิธีที่ 5 สกัดตัวอย่าง 5 กรัม โดยใช้ 0.1 M $Na_4P_2O_7$ 50 ml คน 1 นาที ปรับ pH ให้เป็น 13 ด้วย NaOH (20% w/v) แล้วทำการเขย่า 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที กรองแยกเอาตะกอนทิ้งไป เก็บสารละลายที่กรองได้มาปรับ pH ให้เป็น 1 ด้วย HCl (10% w/v) ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้กรดฮิวมิคตกตะกอน ทำการแยกตะกอนโดยการ centrifuge ที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนกรดฮิวมิคที่ได้มาอบที่ 60 ^{o}C จนกว่าจะแห้งสนิท (Arunya *et al*., 2009)

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดกรดฮิวมิคจากลีโอนาร์ไดท์

วิธีการสกัดกรดฮิวมิคที่นำมาศึกษานี้ เป็นวิธีที่ 4 ที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2 ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด คือการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 M ต่อสารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.15 M (0.5 M NaOH /0.15 M $Na_4P_2O_7$) อัตราส่วนของสารสกัด 25 ml ต่อตัวอย่าง 1 g (Deborah and Burba, 1999) ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาในการสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยวางแผนการทดลองแบบ (3x5) Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยให้มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยแรกเป็นแหล่งของ ลีโอนาร์ไดท์จากเหมืองถ่านหิน 3 แหล่ง คือ แหล่งเชียงม่วน แม่เมาะแหล่งที่ 1 และแม่เมาะแหล่งที่ 2 ตามลำดับ ปัจจัยที่สองคือ ระยะเวลาในการสกัด 5 ระยะเวลา คือ 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ รวมเป็น 15 ตำรับโดยวิเคราะห์ตำรับละ 3 ซ้ำ

3.4 การปรับปรุงคุณภาพปุ๋ยหมักโดยการใช้ลีโอนาร์ไดท์

ทดสอบการเพิ่มคุณภาพปุ๋ยหมักโดยการผสมลีโอนาร์ไดท์จากเหมืองถ่านหิน 3 แหล่งคือ แหล่งเชียงม่วน แม่เมาะแหล่งที่ 1 และแม่เมาะแหล่งที่ 2 ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ (3x4) Factorial in Completely Randomized Design (CRD) มี 2 ปัจจัย โดยให้แหล่งของลีโอนาร์ไดท์เป็นปัจจัยหลัก และปัจจัยรองคือ อัตราของลีโอนาร์ไดท์ที่ใช้ผสมในปุ๋ยหมักมี 4 อัตรา คือ 0,10, 25 และ 40% โดยน้ำหนัก รวมเป็น 9 ตำรับ โดยให้มีตำรับละ 3 ซ้ำ การผสมปุ๋ยหมักและลีโอนาร์ไดท์ได้ปรับให้มีความชื้นที่ 60% ของความจุความชื้นสูงสุด (Maximun Water Holding Capacity) ของแต่ละส่วนผสม ทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดฮิวมิคและธาตุอาหารของปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์ของแต่ละตำรับการทดลองก่อนการหมักและหลังการหมัก 60 วัน โดยในระหว่างการทดลองได้ปรับความชื้นให้คงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของปุ๋ยหมัก ปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์และลีโอนาร์ไดท์ โดยรายละเอียดดังแสดงใน ภาคผนวก

3.5 การทดสอบผลของปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์ต่อการเจริญเติบโตของคะน้า

คัดเลือกปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์ จากผลการทดลองในข้อ 3.4 ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดฮิวมิคสูงที่สุดและใช้อัตราส่วนของลีโอนาร์ไดท์ที่ใช้ในการผสมที่น้อยที่สุด ในขณะที่มีระดับ pH ของปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์ที่ไม่ต่ำเกินไป นำไปใช้ทดสอบกับพืช วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อค (Randomized Complete Block Design (RCBD)) ตำรับละ 5 ซ้ำ โดยทำการเตรียมวัสดุเพาะกล้าต้นคะน้าและหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของอรวรรณ (2554) ซึ่งวัสดุเพาะกล้าและเชื้อจุลินทรีย์ได้เลือกจากสูตรและไอโซเลท (isolate) ที่ให้ค่าการเจริญเติบโตของต้นกล้าคะน้าฮ่องกงโดยเฉลี่ยแล้วสูงที่สุด มาใช้ในระยะการเพาะต้นกล้าคะน้าฮ่องกง โดยทำการเพาะเมล็ดคะน้าในวัสดุเพาะที่ได้ปลูกเชื้อ (inoculate) จุลินทรีย์ลงในถาดเพาะเมล็ด รดน้ำทุกเช้าเย็น เมื่อต้นกล้าคะน้าอายุได้ 18-21 วัน จึงทำการย้ายปลูกลงในดิน 2 ชนิด ซึ่งบรรจุในกระถาง บรรจุดิน 15 กิโลกรัม ให้มีต้นกล้ากระถางละ 1 ต้น วางกระถางไว้กลางแจ้งเพื่อให้ได้รับแสงแดดเต็มที่ ตลอดการทดลองทำการกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีกลร่วมกับการใช้ยาฆ่าแมลงพาราไธออน (Parathion) ปลูกต่อไปจนครบอายุเก็บเกี่ยว 45 วัน ทำการปลูกช่วงเดือน กุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ. 2555 โดยมีตำรับการทดลองดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตำรับที่ 1 เพาะเมล็ดในดินปลูกไม่มีการใส่ปุ๋ย (ตำรับควบคุม-Control ในดินที่ใช้ปลูก)

ตำรับที่ 2 ไม่มีการใส่ปุ๋ย (ตำรับควบคุม-Control ในวัสดุเพาะ)

ตำรับที่ 3 ใส่เฉพาะปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ คือ ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 (46-0-0) หลังจากย้ายปลูก 7-10 วัน ในอัตรา 120 กรัม/ตร.ม. ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 หลังจากย้ายปลูก 14-20 วัน โดยใส่ปุ๋ย 46-0-0 ผสมกับปุ๋ย 15-15-15 ในอัตรา 1:2 ใส่ในอัตรา 120 กรัม/ ตร.ม. (บทความเกษตร, 2555)

ตำรับที่ 4 ใส่ปุ๋ยหมักอย่างเดียวในอัตรา 5 ตัน/ไร่

ตำรับที่ 5 ใส่ลีโอนาร์ไดท์แม่เมาะแหล่งที่ 2 อย่างเดียวในอัตรา 5 ตัน/ไร่

ตำรับที่ 6 ใส่ปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์แม่เมาะแหล่งที่ 2 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 5 ตัน/ไร่

ตำรับที่ 7 ใส่ลีโอนาร์ไดท์ แม่เมาะแหล่งที่ 2 ปรับปรุงคุณภาพในอัตรา 5 ตัน/ไร่

ตำรับที่ 8 ใส่ปุ๋ยหมักผสมลีโอนาร์ไดท์แม่เมาะแหล่งที่ 2 10 เปอร์เซ็นต์ ปรับปรุงคุณภาพในอัตรา 5 ตัน/ไร่

*หมายเหตุ ตำรับที่ 2-8 เป็นต้นกล้าคะน้าที่เพาะในวัสดุเพาะกล้า

3.6 การเก็บข้อมูล

1) การเก็บข้อมูลด้านสมบัติของดิน

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ มี 2 กลุ่มชุดดิน คือ กลุ่มชุดดินที่ 4 ชุดดินราชบุรี (Ratdhaburi series: Rb) ในพื้นที่บ้านต้นผึ้ง ม. 2 ต.หนองล่อง อ.เวียงหนองล่อง จ.ลำพูน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2555a) และกลุ่มชุดดินที่ 22 ชุดดินสันทราย (San Sai series: Sai) ในพื้นที่สถานีวิจัยฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2555b) โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในการถางก่อนปลูกพืช ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี โดยผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งในที่ร่ม หลังจากนั้นนำไปบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 mesh (250 ไมโครเมตร) วิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของดินได้แก่ ปฏิกิริยาดิน (pH) ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (electrical conductivity) ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (total N) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) โพแทสเซียมที่สกัดได้ (extractable K) เปอร์เซ็นต์กรดฮิวมิคในดิน (% HA) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic for Window Version 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การเก็บข้อมูลพืช

ทำการเก็บผลผลิตคะน้าในกระถางทดลองเมื่ออายุครบ 45 วัน วัดความสูงต้นจากโคนต้นถึงยอดอ่อน วัดความยาวรากจากโคนต้นถึงปลายราก ชั่งน้ำหนักต้นสดและน้ำหนักต้นแห้ง ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของพืช ภายหลังจากบันทึกข้อมูลความสูงของต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ในทุกการทดลองแล้ว โดยสมบัติที่ทำการวิเคราะห์ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด (%Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (%Total P) โพแทสเซียมทั้งหมด (%Total K) แคลเซียมทั้งหมด (%Total Ca) และแมกนีเซียมทั้งหมด (%Total Mg) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม Statistic for Window Version 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved