บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

1.1 เส้นใยปาล์ม กากตะกอนดีแคนเตอร์ และขี้เถ้าปาล์ม จากโรงงานน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จังหวัดสงขลา

1.2 น้ำกากส่า จากโรงงานนทีชัย จังหวัดสุราษฎร์ธานี

1.3 เมล็ดพันธุ์ผักบุ้งจีน พันธุ์ไพ่เงิน ตรางอบทอง จากบริษัท ที เอส เอ จำกัด กรุงเทพฯ

1.4 หัวพันธุ์ของต้นหอม จากตลาดสด เทศบาลนครหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.5 ดินสำหรับปลูกพืช ยี่ห้อ เกษตร จังหวัดสงขลา

2. จุลินทรีย์

2.1 หัวเชื้อกรมพัฒนาที่ดินหมายเลข 1 หรือ พด.1 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีดำ ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 8 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ อยู่ในสกุล *Bacillus* sp. แอคติโนมัยซิส 2 สายพันธุ์ อยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scopulariopsis* sp., *Helicomyces* sp., *Chaetomium* sp. และ *Trichoderma* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุเศษเหลือได้ดี (ข้อมูลจากกรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดสงขลา)

2.2 หัวเชื้อเอฟ-60 ของบริษัท ปุ๋ยไบโอนิค จำกัด กรุงเทพฯ หัวเชื้อนี้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีดำ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 ชนิด 10 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายเศษพืชซากสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว ตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ กำจัดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ ไม่เป็นอันตรายต่อพืช มนุษย์ และสัตว์

2.3 หัวเชื้ออีเอ็ม ของห้างหุ้นส่วนจำกัดหนองบัวอุบล จังหวัดอุบลราชธานีเป็นของเหลวสีน้ำตาล กลิ่นหอมอมเปรี้ยวอมหวาน ประกอบด้วยจุลินทรีย์ 5 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์เชื้อราที่มีเส้นใย จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก จุลินทรีย์ตรึงธาตุไนโตรเจน และจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์

2.4 เชื้อราผสมที่ประกอบด้วย *Rhizopus* sp. ST4 และ *Rhizopus* sp. ST29

2.5 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter capsulatus* SS3 ซึ่งสามารถผลิต ALA ในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (microaerobic-light) ได้สูง (ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต, 2545)

เก็บรักษาเชื้อโดยวิธี stab ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต (GM) ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลูตาเมต-มาเลต (GM medium) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) : ยีสต์สกัด 2, แอล- กลูตามเต 3.8, มาเลต 9, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 0.8, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, $CaCl_2.2H_2O$ 0.053, $MnSO_4.5H_2O$ 0.00012, nicotinic acid 1.0×10^{-3}, thiamine-HCl 1.0×10^{-3} และไบโอติน 1.0×10^{-5} ตามลำดับ ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็ง เติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (Lascelles *et al*., 1956)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย : มันฝรั่ง 20, น้ำตาลเด็กโทรส 20 และเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6 ± 2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ประกอบด้วย : ทริปโตน 5, ยีสต์สกัด 2.5, น้ำตาลเด็กโทรส 1 และเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P_2O_5) และโปตัสเซียม (K_2O) ตามวิธีการของ Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ ALA เช่น โซเดียมอะซิเตต อะซิทิลอะซิโตน และสารละลาย Ehrlich's reagent

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เช่น อะซิโตน โซเดียมซัลเฟต และแคลเซียมคาร์บอร์เนต

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการทำปุ๋ยหมัก

1.1 กระบะหมัก ขนาด 0.6x1.0x0.6 ลูกบาศก์เมตร (ภาพที่ 1)

1.2 เครื่องอัดเม็ดปุ๋ยหมัก ยี่ห้อ KMAC บริษัท เค. แมชชีน กรุงเทพฯ

1.3 พลั่วสำหรับการผสมวัสดุและกลับกองปุ๋ย

1.4 บัวรดน้ำและถังน้ำ

1.5 ปุ๋ยยูเรีย สูตร 46-0-0 ตราเรือใบไวกิ้ง บริษัท โรจน์พนกิจ กำจัด กรุงเทพฯ

1.6 ภาชนะสำหรับหาปริมาณความชื้น (moisture can)

1.7 เตาเผาความร้อนสูง

ภาพที่ 1 กระบะที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยหมัก

Fig.1 Wire mesh reactor for compost production

2. อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

2.1 ถังหมักขนาด 5 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ EYELA รุ่น MDL-300 Marubishi Trading Co., Ltd

2.2 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000

2.3 เครื่องวัดพีเอช รุ่น Model 420 A บริษัท Orion

2.4 เครื่องวัดแสง (Lux meter) Model LX-50 บริษัท Digicon จำกัด

2.5 หลอดไฟฟ้าทังสเตน ขนาด 60 และ 100 วัตต์

2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal บริษัท K.S.C. Becthai จำกัด

2.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงยี่ห้อ Jouan รุ่น A14

2.8 ตู้อบสำหรับหาน้ำหนักแห้ง บริษัท Memmert

2.9 อ่างแก้วขนาด 33 x 48 x 15 เซนติเมตร พร้อมอุปกรณ์วัดความเข้มแสง

2.10 โถแก้วไร้อากาศสำหรับบ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

3. อุปกรณ์สำหรับการปลูกผัก และการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์

3.1 โรงเรือนสำหรับปลูกพืช

3.2 กระถางพลาสติกและที่รองกระถางขนาด 8 นิ้ว

3.3 ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ตราปุ๋ยแห่งชาติ บริษัท ปุ๋ยแห่งชาติ จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ

3.4 บัวรดน้ำ

3.5 โกร่งบด

3.6 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000

3.7 ตู้อบสำหรับหาน้ำหนักแห้ง บริษัท Memmert

3.8 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S บริษัท Sartorius

3.9 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S บริษัท Sartorius

วิธีการวิเคราะห์

1. ปริมาณไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P_2O_5) และโปตัสเซียม (K_2O)

ปริมาณไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P_2O_5) และโปตัสเซียม (K_2O) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990)

2. การวัดพีเอช (pH)

เก็บตัวอย่าง 5 จุด คือ บริเวณมุมของกระบะหมักทั้งสี่ด้าน และบริเวณแกนกลางของกองปุ๋ยหมัก เก็บตัวอย่างที่ระดับความลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร จุดละ 50 กรัม จากนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่างปุ๋ยหมัก 10 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้ววางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 5 นาที วัดค่าพีเอชของสารละลายด้วย pH meter

3. การวัดอุณหภูมิ

วัดอุณหภูมิ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์เสียบบริเวณแกนกลางของกองปุ๋ยหมักจากนั้นรอให้ค่าอุณหภูมิคงที่ประมาณ 2-3 นาที อ่านค่าอุณหภูมิและบันทึกผล

4. การวัดปริมาณความชื้น

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักที่ทำการสุ่มตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ถาดอะลูมิเนียมหรือภาชนะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จนน้ำหนักคงที่ใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น ชั่งน้ำหนักหลังการอบและบันทึกผล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของความชื้น

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (total organic carbon, TOC)

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักที่อบแห้ง (จากการวัดปริมาณความชื้น) บดให้ละเอียดประมาณ 3-5 กรัม ใส่ใน Porcelain crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาใน Muffle furnace ที่อุณหภูมิ 550-

580 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล คำนวณหาปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ (total volatile solid, TVS) (AOAC, 1990) แล้วนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) คำนวณตาม สมการของ Mustin (1987 อ้างโดย Hoyos *et al*., 2002) ดังนี้

$$TOC = (\%organic\ matter/1.8) = (\%TVS/1.8)$$

6. น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจนเซลล์เจริญสูงสุด เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วทำการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank นำเซลล์ที่ระดับความขุ่นต่างๆปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละความขุ่นทำ 3 ซ้ำ เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก จะได้กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งเพื่อใช้คำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Noparatnaraporn *et al*., 1986)

7. การวิเคราะห์ปริมาณ ALA โดยวิธี colorimetric

วิเคราะห์หาปริมาณ ALA ภายนอกเซลล์ หลังจากนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 x g นาน 5 นาที นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ ALA 1 มิลลิลิตร อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 2 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิทิลอะซิโตน 0.05 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายเข้ากันทันที ต้มในน้ำเดือด 15 นาที และทำให้เย็นในทันที เติมสารละลาย Ehrlich's reagent 3.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้เกิดสีม่วงแดง นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้แล้ว (Lin *et al*., 1989)

8. การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์

นำผักบุ้งและต้นหอมหั่นให้ละเอียด สุ่มตัวอย่างประมาณ 1-5 กรัม ใส่ในโกร่งบด เติมแคลเซียมคาร์บอร์เนต 1 กรัม เติมทรายละเอียดที่สะอาด (purified acid sand ขนาด 40-60) เพื่อช่วยในการสกัดคลอโรฟิลล์ เติมอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อยและบดตัวอย่างให้ละเอียด หลังจากนั้นเติมอะซิโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พร้อมกับคนผสมให้เข้ากันประมาณ 3-2 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยระบบสุญญากาศ นำสารละลายส่วนใสที่ได้มากำจัดโมเลกุลของน้ำด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตที่มีสูตรโมเลกุลไร้น้ำปริมาณ 3-5 กรัม กรองเอาโซเดียมซัลเฟต ออกแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตนเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 649 และ 665นาโนเมตร (AOAC, 1990)

ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $17.72\ A_{649} + 6.45\ A_{665}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ(มิลลิกรัมต่อลิตร) = $11.63\ A_{665} - 2.39\ A_{649}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี(มิลลิกรัมต่อลิตร) = $20.11\ A_{649} - 5.18\ A_{665}$

วิธีการทดลอง

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตปุ๋ยหมัก

1.1 ผลของวัสดุหมัก

1.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของวัสดุหมัก

นำวัสดุหมัก ได้แก่ เส้นใยปาล์ม กากตะกอนดีแคนเตอร์ และขี้เถ้าปาล์ม วิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปตัสเซียม และนำน้ำกากส่ามาวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน

1.1.2 การหมัก

นำเส้นใยปาล์มผสมกับกากตะกอนดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 5:1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใส่ลงในกระบะอลูมิเนียมที่บุด้วยลวดตาข่าย 50 กิโลกรัม ภายใต้โรงเรือนที่มุงหลังคา วัดความชื้นเริ่มต้นและปรับความชื้นให้มีค่าประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ โดยเส้นใยปาล์มที่ผสมกับกากตะกอนดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 1:1 และ 5:1 ปรับความชื้นโดยใช้น้ำ ส่วนเส้นใยปาล์มที่ผสมกับกากตะกอนดีแคนเตอร์ในอัตราส่วน 3:1 การปรับความชื้นแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ใช้น้ำ และแบบที่ 2 ใช้น้ำกากส่าปรับความชื้น วัดค่าพีเอชเริ่มต้นและปรับพีเอชให้เท่ากับ 7-8 โดยใช้ขี้เถ้าปาล์ม (pH ประมาณ 9.0) และเติมยูเรียให้มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 30-40:1จากนั้นเติมหัวเชื้อปุ๋ยหมัก พด. 1 (150 กรัม/น้ำ 20 ลิตร/วัสดุหมัก 1 ตัน) ทำการหมักเป็นเวลา 4-12 สัปดาห์ (Hoyos *et al.*, 2002) โดยมีการวัดค่าพีเอช และอุณหภูมิทุกวัน วัดความชื้น ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ทุกๆ 5 วัน (Mustin, 1987 อ้างโดย Hoyos *et al.*, 2002) เมื่อสิ้นสุดการหมักวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปตัสเซียม กลับกองปุ๋ยหมักและปรับความชื้นให้มีค่าประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 10 วัน วิธีการตรวจสอบปริมาณความชื้นอย่างง่ายๆ คือ การสอดมือเข้าไปในกองปุ๋ยหมักให้ลึกและหยิบวัสดุหมักภายในกองปุ๋ยหมักมาบีบดู ถ้ามีน้ำติดฝ่ามือหรือมีน้ำไหลออกมาตามนิ้วมือ แสดงว่าไม่ต้องปรับความชื้นอีก แต่ถ้าไม่มีน้ำติดฝ่ามือ และวัสดุหมักแยกออกจากกันได้ง่ายแสดงว่าน้ำน้อยเกินไป (Zadrazil and Brunnert, 1981 อ้างโดย ธาตรี ลีธีระประเสริฐ, 2532)

1.2 ผลของหัวเชื้อชนิดต่างๆ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยเลือกใช้วัสดุหมักที่ประกอบด้วยเส้นใยปาล์มผสมกับกากตะกอนดีแคนเตอร์อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด (อัตราส่วน1:1) เติมหัวเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ หัวเชื้อพด.1 หัวเชื้อเอฟ-60 หัวเชื้ออีเอ็ม และเชื้อราผสมที่ประกอบด้วย *Rhizopus* sp. ST4 และ *Rhizopus* sp. ST 29 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ จากนั้นนำปุ๋ยหมักที่ผลิตได้ไปอัดเม็ดโดยผ่านเครื่องอัดเม็ดปุ๋ยหมัก ที่ อบต. ท่าข้าม จังหวัดสงขลา ปุ๋ยหมักที่อัดเม็ดแล้วทำให้แห้งโดยการผึ่งแดดนาน 1-2 วัน เพื่อให้มีความชื้นเหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาปุ๋ยหมักอัดเม็ดในภาชนะแห้งที่ปิดสนิท เช่น กระสอบหรือถุงพลาสติก (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2545)

2. ศึกษาผลความเข้มข้นของกรดลีวูลินิกที่เติมต่อการเจริญและการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก จาก *Rhodobacter capsulatus* SS3

2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter capsulatus* SS3 จากหลอดอาหารวุ้นเอียงลงสู่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารสูตร GM 150 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเชื้อด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร GM เพื่อให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (สุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต, 2544)

2.2 การผลิต ALA

เติมเชื้อเริ่มต้น 450 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (สุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต, 2544) ประกอบด้วยอาหารเหลวสูตรGM (4.05 ลิตร) ที่มีการเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ ซัคซินิค 40 มิลลิโมลาร์ โพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์ ไพริดอกซัลฟอสเฟต 10 ไมโครโมลาร์ และเติมกรดลีวูลินิกครั้งละ 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3 ครั้ง ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่เวลาเริ่มต้น และทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าพีเอช การเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง (Noparatnarapon *et al.*,1986) และปริมาณ ALA ภายนอกเซลล์ด้วยวิธี colorimetric (Lin *et al*., 1989)

3. การทำปุ๋ยอัดเม็ดให้มีสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต้องการ

นำปุ๋ยหมัก (จากข้อ 1) มาผสมกับน้ำหมักที่มี ALA (จากข้อ 2) ในอัตราส่วน 1:0, 1:0.06, 1:0.6, 1:6, 1:60 และ1:600 กิโลกรัมต่อไมโครโมล (Hotta *et al*, 1997) โดยฉีดพ่นน้ำหมักที่มี ALA ลงบนปุ๋ยหมักอัดเม็ดที่เตรียมไว้จนทั่ว นำไปผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นเก็บรักษาปุ๋ยหมักอัดเม็ด

ที่มีคุณสมบัติเป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืชผักในถุงดำปิดสนิท ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (วาริช หมัดหมาน, 2545)

4. การทดสอบคุณภาพของปุ๋ยหมัก

นำปุ๋ยหมักที่ผสมและไม่ผสมน้ำหมักจากการผลิต ALA มาทดสอบคุณสมบัติเป็นสารส่งเสริมการเจริญของผักบุ้งและต้นหอมดังนี้

4.1 ผลของการใช้ปุ๋ยหมักผสม ALA เป็นสารเร่งการเจริญของผักบุ้ง

ทำการทดลองปลูกผักบุ้งด้วยดินผสม (1.5 กิโลกรัมต่อกระถาง) ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร รดน้ำวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) ก่อนทำการปลูกนำเมล็ดผักบุ้งจีนไปแช่น้ำนาน 12-24 ชั่วโมง แล้วนำเฉพาะเมล็ดที่จมน้ำมาปลูก ทำการปลูกในกระถางๆละ 20 เมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุได้ 10 วัน แยกถอนเหลือกระถางละ 10 ต้น และวัดความสูงเริ่มต้นของต้นกล้า ให้ปุ๋ยในอัตรา 7 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ (0.309 กรัมไนโตรเจนต่อกระถาง) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งละ 0.154 กรัมไนโตรเจนต่อกระถาง ครั้งแรกเมื่อต้นกล้าอายุ 10 วัน และครั้งที่ 2 เมื่อต้นกล้าอายุ 20 วัน โดยใส่ปุ๋ยลงไปที่โคนต้น (ดัดแปลงจากวิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล, 2544) วัดความสูงของลำต้นทุกๆ 5 วัน โดยใช้สายวัดทำการวัดความสูงตั้งแต่ยอดจนถึงโคนต้น (Hotta *et al*., 1997) สุ่มเก็บตัวอย่างผักบุ้งกระถางละ 1-2 ต้น เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมในผักบุ้งทุกๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน (A.O.A.C., 1990)

การให้ปุ๋ยแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

แบบที่ 1 ไม่ให้ปุ๋ย

แบบที่ 2 ให้ปุ๋ยเคมี

แบบที่ 3 ให้ปุ๋ยหมักผสม ALA ในอัตราส่วนดังนี้ 1:0, 1:0.06, 1:0.6, 1:6, 1:60 และ 1:600 กิโลกรัมต่อไมโครโมล (Hotta *et al*, 1997)

4.2 ผลของการใช้ปุ๋ยหมักผสม ALA เป็นสารเร่งการเจริญของต้นหอม

ทำการทดลองปลูกหัวหอมด้วยดินผสม (1.5 กิโลกรัมต่อกระถาง) ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร รดน้ำวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) ก่อนทำการปลูกควรคัดเลือกและเตรียมหัวพันธุ์ โดยเลือกหัวที่แก่จัด แห้งสนิท และไม่ฝ่อ นำมาตัดแต่งทำความสะอาด ตัดส่วนรากเก่าและยอดแห้งออก รดน้ำให้ชุ่ม ทำการปลูกในกระถางกระถางละ 10 หัว โดยปลูกลึกลงไปในดินประมาณครึ่งหัว หลังจากปลูกประมาณ 15 วัน ต้นหอมจะแทงยอดออกมา แยกถอนเหลือกระถางละ 5 ต้น ให้ปุ๋ยในอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ (2.107 กรัมต่อกระถาง) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งละ 1.553 กรัมต่อกระถาง ครั้งแรกใส่เป็นปุ๋ยรองพื้นตอนปลูก ครั้งที่ 2 เมื่อต้นหอมอายุ 30 วัน โดยใส่ปุ๋ยห่างจากโคนต้นเล็กน้อย (อุดม โกสัยสุข, 2537) วัดความสูงของลำต้นทุกๆ 5 วัน โดยใช้สายวัด

ทำการวัดความสูงตั้งแต่ยอดจนถึงโคนต้น (Hotta *et al*., 1997) สุ่มเก็บตัวอย่างต้นหอมกระถางละ 1-2 ต้น เพื่อวิเคราะห์หาวิเคราะห์น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมในต้นหอมทุกๆ 5 วันเป็นระยะเวลา 40 วัน (A.O.A.C., 1990) การให้ปุ๋ยแบ่งเป็น 3 แบบเช่นเดียวกับข้อ 4.1