# บทที่ 3

# วิธีการวิจัย

## 3.1 วัสดุและสารเคมี

**3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด** สารเคมีที่ใช้ เกรด Analytical Reagent

| | |
|---|---|
| Potassium sulfate | (Merck, Germany) |
| Boric indicator Bromocresol green | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Copper sulfate pentahydrate, Methyl red | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Hydrochloric acid, Selenium | (Lab-scan, Ireland) |
| Sodium hydroxide, Sulfuric acid | (Lab-scan, Ireland) |

**3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด** สารเคมีที่ใช้ เกรด Analytical Reagent

| | |
|---|---|
| Ammonium metavanadate | (Lab-scan, Ireland) |
| Ammonium molybdate | (Riedel-de Haen, Germany) |
| Nitric acid, Perchloric acid, Potassium hydrogen phosphate | (Lab-scan, Ireland) |

**3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในรูป $K_2O$** สารเคมีที่ใช้ เกรด Analytical Reagent

| | |
|---|---|
| Nitric acid, Perchloric acid | (Lab-scan, Ireland) |
| Potassium Chloride | (BDH, England) |

**3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณแมกนีเซียม และสังกะสี** สารเคมีที่ใช้ เกรด Analytical Reagent

| | |
|---|---|
| Nitric acid, Perchloric acid | (Lab-scan, Ireland) |

**3.1.5 การนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยวิธีการ pour plate**

| | |
|---|---|
| Nutrient agar (NA), Potato dextrose agar (PDA) | (Difco, USA) |
| Peptone | (Difco, USA) |

**3.1.6 การย้อมสีแบคทีเรียแบบแกรม (Grams' staining)**

| | |
|---|---|
| Crystal violet, Gram's iodine solution | (Difco, USA) |
| Lactophenol, Safranin | (Difco, USA) |

**3.1.7 การแจงเนื้อดิน** สารเคมีที่ใช้ เกรด Analytical Reagent

| | |
|---|---|
| Hydrogen peroxide | (Lab-scan, Ireland) |
| Sodium hexametaphosphate, Sodium carbonate | (Merck, Germany) |

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.2 อุปกรณ์**

**3.2.1 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)** Model 600 ผลิตโดย Memmert

**3.2.2 เตาเผา** Model 6000 ผลิตโดย Thermolyne

**3.2.3 ตู้ดูดความชื้น** Model In 601 ผลิตโดย K Lab Incubator

**3.2.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)** Model MP 220 ผลิตโดย Mettler Toledo

**3.2.5 เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity meter)** Model Cond 315I ผลิตโดย Wissenchaftish-Tech

**3.2.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง** Model TR-254 ผลิตโดย Denver Instrument

**3.2.7 เตาให้ความร้อน (Hot plate)** Model ARE ผลิตโดย VELP Scientifica

**3.2.8 เครื่องเซ็นตริฟิวจ์** Model 1000 Series ผลิตโดย LABQUIP

**3.2.9 เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (DI)** Model 185 ผลิตโดย Milli-Q- plus

**3.2.10 เครื่อง Spectrophotometer** Model Libra s11 ผลิตโดย Biochrom

**3.2.11 เครื่อง Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS)** Model Analyst 100 ผลิตโดย Perkin Elmer แสดงดังรูปที่ 3.1

**รูปที่ 3.1** เครื่อง Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS)

**3.2.12 เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน** Model Vapodest 12 ผลิตโดย Gerhardt

**3.2.13 ตู้อบพืช** ผลิตโดย Shel Lab

**3.2.14 เครื่องบดตัวอย่างพืช** ผลิตโดย RETSCH

**3.2.15 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)** ผลิตโดย Biomac Group

**3.2.16 ตู้อบเครื่องแก้ว** ผลิตโดย Binder

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.3 วิธีการทดลอง**

ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และปริมาณธาตุอาหารในตัวอย่างกากขี้แป้งจากโรงงาน และตัวอย่างกากอินทรีย์ ได้แก่ มูลไก่ ขี้เลื่อยและรำข้าว ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแปรสภาพกากขี้แป้งร่วมกับกากอินทรีย์ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (EM) ในระหว่างการแปรสภาพ วิเคราะห์ค่าพีเอช การนำไฟฟ้า อุณหภูมิ และจำนวนจุลินทรีย์ หลังจากสิ้นสุดการหมัก วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณธาตุอาหารก่อนทำการหมัก ทดสอบประสิทธิภาพของสารปรับปรุงดินที่เตรียมได้ โดยการปลูกทานตะวัน *Helianthus annuus* เป็นเวลา 60 วัน วัดการเจริญเติบโต ปริมาณธาตุอาหารก่อนและหลังการปลูก โดยทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ ดังนี้

**3.3.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างกากขี้แป้งประมาณ 10 กิโลกรัม จากจุดเกิดกากขี้แป้ง คือ ถังปั่นน้ำยาง รูปที่ 3.2 ประมาณ 10 กิโลกรัม จากตัวแทนโรงงานน้ำยางข้น 3 แห่ง คือ

- บริษัทถาวรอุตสาหกรรม จำกัด อ. สะเดา จ. สงขลา
- บริษัทจะนะอุตสาหกรรมน้ำยางข้น จำกัด อ. จะนะ จ. สงขลา
- บริษัทปัตตานีอุตสาหกรรม จำกัด อ. เมือง จ. ปัตตานี

เก็บตัวอย่างกากอินทรีย์ โดยตัวอย่างมูลไก่ได้จากโรงเลี้ยงไก่ อำเภอ ปะนาเระ จังหวัดปัตตานี ขี้เลื่อยได้จากโรงเลื่อยไม้ยางพารา จังหวัดสงขลา และรำข้าวได้จากจังหวัดพัทลุง

(a) (b)

รูปที่ 3.2 บริเวณที่เก็บกากขี้แป้ง (a) ถังปั่นน้ำยาง และ (b) กากขี้แป้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างกากขี้แป้ง มูลไก่ ขี้เลื่อยและรำข้าว ก่อนทำการแปรสภาพตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (2000) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่ทำการวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** พารามิเตอร์ต่างๆ และวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

| พารามิเตอร์ | วิธีการวิเคราะห์ |
|---|---|
| 1. Total Solids Content | Gravimetric method |
| 2. Moisture Content | Gravimetric method |
| 3. Volatile Solids and Fix Solid Content | Gravimetric method |
| 4. pH | pH meter |
| 5. Electrical conductivity | Conductometer |
| 6. Density | Weight/Volume |
| 7. Total Nitrogen | Kjeldahl method |
| 8. Total Phosphorus | Spectrophotometer (molybdovanadophosphate method) |
| 9. Potassium | Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) |
| 10. Magnesium | Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) |
| 11. Zinc | Flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) |

ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.3.2 การเตรียมจุลินทรีย์ (EM) ขยายส่วน**

เตรียม EM ขยายส่วนโดยใช้หัวเชื้อ EM (บริษัทอีเอ็ม คิวเซ) ผสมกับกากน้ำตาลและน้ำในอัตราส่วน 1:1:20 โดยปริมาตร (Khaliq *et al.*, 2006) ในภาชนะปิดสนิท เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและการเจริญของ EM ขยายส่วนดังต่อไปนี้

1. วัดค่าพีเอช การนำไฟฟ้า และ อุณหภูมิ ทุกวันตลอดการทดลอง

2. ศึกษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ EM โดยตรวจนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Viable plate count) โดยวิธีเขย่าจานอาหาร (Pour plate) ใช้อาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และ PDA สำหรับยีสต์และรา ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ

3. แยกเชื้อจุลินทรีย์ให้เป็นเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ (Pure culture) โดยวิธีการขีดบนจานอาหาร (Streak plate) และ ศึกษารูปร่างจุลินทรีย์ที่ได้จาก Pure culture ด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณ EM ในระหว่างการหมัก โดยตรวจนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Pour plate

ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค

**3.3.3 การปรับกลิ่นของตัวอย่างกากขี้แป้งโดยใช้ EM ขยายส่วน**

1. ปรับค่าพีเอชของตัวอย่างกากขี้แป้งด้วย 5% กรดอะซิติก ให้มีพีเอชประมาณ 5-6 (กนัฐยา และอุบล, 2549)

2. หมักกากขี้แป้งที่ปรับพีเอชแล้ว กับ EM ขยายส่วนในภาชนะปิด โดยใช้อัตราส่วนระหว่างกากขี้แป้ง : EM ดังนี้ คือ 3:1, 2:1, 1:1, 1:1.5, 1:2 ทำการทดลองอัตราส่วนละ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. วัดค่า พีเอช ค่าการนำไฟฟ้าของกากขี้แป้งหมัก ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

4. เก็บตัวอย่างกากขี้แป้งที่หมักด้วย EM ขยายส่วน เพื่อทดสอบกลิ่นด้วยวิธีการดมกลิ่น โดยใช้ผู้ทดสอบ 40 คนทำแบบสอบถาม (ภาคผนวก ง) เพื่อทำการให้คะแนนในการดมกลิ่น โดยผู้ทดสอบแต่ละคนจะได้รับตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 mL ซึ่งบรรจุในขวดที่ปิดสนิท ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เมื่อผู้ทดสอบดมกลิ่นจากตัวอย่าง ผู้ทดสอบจะให้คะแนนในแบบสอบถามโดยมีระดับคะแนน ดังนี้ คือ ระดับคะแนน 1 มีกลิ่นน้อยมาก ระดับคะแนน 2 มีกลิ่นน้อย ระดับคะแนน 3 มีกลิ่นปานกลาง ระดับคะแนน 4 มีกลิ่นแรง ระดับคะแนน 5 มีกลิ่นแรงมาก

**3.3.4 การแปรสภาพกากขี้แป้งโดยการหมักด้วย EM ขยายส่วนและกากอินทรีย์ผสม**

1. ปรับค่าพีเอชของตัวอย่างกากขี้แป้งด้วย 5% กรดอะซิติก ให้มีพีเอชประมาณ 5-6 (กนัฐยา และอุบล, 2549)

2. หมักกากขี้แป้งที่ปรับพีเอชแล้ว กับ EM ขยายส่วนและกากอินทรีย์ทางการเกษตร 3 ชนิดรวมกัน คือ มูลไก่แห้งป่นละเอียด ขี้เลื่อยและรำข้าวละเอียด (อัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร) คลุกให้เข้ากัน โดยใช้กากขี้แป้ง (S): กากอินทรีย์ (O): EM ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันดังนี้คือ 3:1:1, 3:2:1, 4:1:1, 4:2:1, 4:3:1 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีความชื้นเหมาะสม (ภาคผนวก จ) โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีค่าประมาณร้อยละ 50-60 (Gajalakshmi and Abbasi, 2008)

3. ทำการหมักตัวอย่างอัตราส่วนต่างๆ ในข้อที่ 2 โดยหมักแบบมีอากาศและไม่มีอากาศตัวอย่างละ 2 ซ้ำ การหมักแบบมีอากาศบรรจุในกระสอบวางบนพื้นไม้ คลุกเคล้าโดยการกวนให้เข้ากันทุกวัน และแบบไร้อากาศโดยบรรจุในถุงพลาสติก คลุกเคล้าโดยการเขย่าถุงให้เข้ากันทุกวัน

4. ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้อัตราส่วนเดียวกัน และสภาวะ

Prince of Songkla University Pattani Campus

เหมือนกันกับการทดลองในชุดการทดลองของกลุ่มตัวอย่าง แต่เปลี่ยนจากการใช้จุลินทรีย์ EM เป็นการใช้น้ำกลั่นแทน

5. วัดค่าพีเอช การนำไฟฟ้า และอุณหภูมิของตัวอย่างหมัก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

6. วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและปริมาณธาตุอาหารของตัวอย่างหลังการแปรสภาพตามวิธีการของ AOAC (2000) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่วิเคราะห์ ได้แก่

- Total Solids Content, Volatile Solids Content
- Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)
- Total Phosphorus
- Potassium
- Magnesium และ Zinc

7. นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก ด้วยวิธี Viable plate count โดยตรวจนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Pour plate นับจำนวนจุลินทรีย์ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.3.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดิน**

วิเคราะห์ ค่าพีเอช ลักษณะเนื้อดิน (รายละเอียดในภาคผนวก ฉ) สมบัติทางกายภาพ และปริมาณธาตุอาหารตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (2000) โดยชุดดินที่ใช้ในการทดลอง คือ ชุดดินรูสะมิแล อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี (สถานีพัฒนาที่ดิน, 2547) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่วิเคราะห์ ได้แก่

- Total Solids Content, Volatile Solids Content
- Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)
- Total Phosphorus
- Potassium
- Magnesium และ Zinc

**3.3.6 การศึกษาอัตราส่วนของสารปรับปรุงดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกพืช**

นำสารปรับปรุงดินที่เตรียมได้จากการใช้อัตราส่วนของกากขี้แป้ง: กากอินทรีย์ผสม : EM 5 ชุดการทดลอง คือ 3:1:1, 3:2:1, 4:1:1, 4:2:1 และ 4:3:1 โดยปริมาตร ในระบบเปิด มาผสมกับดิน

โดยใช้อัตราส่วนของ สารปรับปรุงดิน : ดิน คือ 1:2, 1:3 และ 1:4 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ทำให้ต้นทานตะวันมีการรอดชีวิต ร้อยละ 95-100 (ภาคผนวก ช) โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 2 ลิตร จากนั้นปลูกต้นทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) พันธุ์ Sun-smile โดยใช้ต้นทานตะวันชุดการทดลองละ 10 ต้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มควบคุมที่มีการเติมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่โดยใส่รองพื้นก่อนปลูกและปุ๋ยยูเรีย 25 กิโลกรัมต่อไร่เมื่อทานตะวันอายุได้ 30 วัน เรียกว่า positive control กลุ่มควบคุมที่ใช้ดินทราย เรียกว่า negative control และกลุ่มควบคุมที่มีการใช้ดินปกติ ติดตามการเจริญเติบโตทุกๆ 10 วันเป็นระยะเวลา 60 วัน

- ศึกษาอัตราการเจริญ โดยวัดความสูงของต้น ซึ่งเริ่มวัดห่างจากดิน 1 เซนติเมตร วัดขนาดของลำต้นโดยแสดงเป็นเส้นรอบวง ซึ่งทำการวัดเหนือข้อแรก ของแต่ละต้น และวัดจำนวนใบ
- ตรวจสอบน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทานตะวันหลังจากเก็บเกี่ยว
- วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดินและก่อนและหลังการทดลองและในทานตะวันหลังจากเก็บเกี่ยวที่ 60 วัน โดยวิเคราะห์ธาตุอาหารตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) ดังนี้
    - Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)
    - Total Phosphorus
    - Potassium
    - Magnesium และ Zinc

Prince of Songkla University Pattani Campus

### 3.3.7 การประเมินต้นทุนการผลิต

ประเมินต้นทุนการผลิตสารปรับปรุงดินที่ได้จากการผสมกากขี้แป้งและกากอินทรีย์ชนิดต่างๆ แล้วหมักด้วยจุลินทรีย์ EM ขยายส่วน โดยคำนวณจากราคาต้นทุนของกากอินทรีย์ (บาทต่อกิโลกรัม) จากนั้นคิดราคาต้นทุนของสารปรับปรุงดินเป็นราคาต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง (บาทต่อกิโลกรัมโดยน้ำหนักแห้ง)

### 3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test