

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง



ก. การดำเนินการในแปลงทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1 - สารเคมี ใช้คือลครินซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Dieldrex[®]

ชนิด 18 % อีซี ได้รับจากบริษัทเชลล์แห่งประเทศไทยจำกัด

2 - น้ำกลั่น

3 - ข้าวพันธุ์ กข.7

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1 - เครื่องพ่นยาฝอย HI SPRAYER ขนาดบรรจุ 1.5 ลิตร

ของบริษัท Green Plant

2 - ไปเปต (pipettes) ขนาด 5 มิลลิลิตร

3 - กระบอกลูกดิน (soil auger) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง
ประมาณ 10 ซม. ยาวประมาณ 20 ซม. และคานคอรูปตัว T ยาวประมาณ
2 เมตร

4 - เทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิดิน

5 - เครื่องมือสำหรับวัดความเป็นกรด - ด่างของดิน (pH meter)

6 - ถังพลาสติกสำหรับใส่ดินตัวอย่าง และยางสติกสำหรับรัดปาก

ถุงและปากกาสำหรับเขียนเบอร์ตัวอย่าง

7 - ถาดพลาสติกขนาด 30×40 (ซ.ม.)² สำหรับการคลุก
ตัวอย่างดินก่อนเลือกมาใส่ถุง

8 - เครื่องวัดระดับความชื้นของอากาศ

2. สถานที่ทำการทดลอง ทำการทดลองที่สถานีทดลองข้าววังสิต อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

3. การวางแผนทดลอง วางแผนแปลงทดลองแบบ Completely Randomized Block (CRB)^{1/} (เจริญ จันทลักขณา 2519) ประกอบด้วยแปลงเปรียบเทียบ (control) ซึ่งไม่ใช้คีตครินและแปลงที่ใช้คีตคริน 1 พันกิโลกรัมความเข้มข้น 0.04% อัตรา 50 ลิตร/ไร่ (สำเนียง เปรมสัย 2513) และแปลงที่ใช้คีตคริน 2 พันกิโลกรัมความเข้มข้น 0.08% อัตรา 50 ลิตร/ไร่ แต่ละแปลงมี 3 ซ้ำ และทุกแปลงปลูกข้าวพันธุ์ กข.7 ลักษณะแปลงทดลองเป็นดังนี้

แปลงที่

I

1	2	3
---	---	---

II

3	1	2
---	---	---

III

2	3	1
---	---	---

1=เปรียบเทียบ

2=คีตคริน 0.04%

3=คีตคริน 0.08%

^{1/} CRB เป็นวิธีการวางแผนทดลองทางสถิติแบบหนึ่ง ใช้ในกรณีที่สามารถแบ่งแยกกลุ่มสิ่งทดลองออกเป็นประเภทได้โดยมีเหตุผล จุดประสงค์ก็เพื่อให้หน่วยทดลองในแปลงเดียวกันมีความสม่ำเสมอมากที่สุดก่อนการทดลอง

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 วิธีการพ่นยาในแปลงทดลอง ใช้เครื่องพ่นยาชื่อ HI SPRAYER ขนาดบรรจุ 1.5 ลิตร ของบริษัท Green Plant

การเตรียมคิลกรีนความเข้มข้น 0.04% อัตรา 50 ลิตร/ไร่ สำหรับเนื้อที่แปลงทดลอง 25 ตารางเมตร ใช้คิลเกรกซ์ 18% อีซี (Dieldrex[®] 18% EC)² จำนวน 0.3125 กรัมสารออกฤทธิ์หรือเท่ากับคิลเกรกซ์ 18% อีซี 1.74 มิลลิลิตร นำมาเติมน้ำสะอาดจนได้ปริมาตรประมาณ 1 ลิตรในเครื่องพ่นยา เขย่าจนเข้ากันดีแล้วนำไปพ่นบนต้นข้าวซึ่งปักดำมาก่อนแล้วประมาณ 2 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 3 ของเดือนมกราคม 2520) จนทั่วแปลงที่ใช้คิลกรีน 1 และให้เหยื่อยาอยู่ประมาณ 1/3 ของเครื่องพ่นแล้วเติมน้ำลงไปอีกจนได้ปริมาตรเท่าเดิม เขย่าให้เข้ากันแล้วพ่นจนทั่วแปลงทำเช่นเดียวกันนี้อีก 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายจึงพ่นจนหมด การทำเช่นนี้ทำให้เกิดความสม่ำเสมอมากที่สุด

สำหรับคิลกรีนความเข้มข้น 0.08% อัตรา 50 ลิตร/ไร่ ใช้คิลเกรกซ์ 18% อีซี เพิ่มขึ้นอีก 1 เท่า คือ 3.48 มิลลิลิตร แล้วดำเนินการพ่นแบบเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วทุกประการในแปลงที่ไซยา 2

4.2 วิธีการเก็บข้อมูลและตัวอย่าง ทำการเก็บข้อมูลและตัวอย่างกินทุกวันเสาร์แรกของเดือน นับตั้งแต่เดือนมกราคม 2520 จนกระทั่งถึงเดือนสิงหาคม 2520 กินแต่ละตัวอย่างสุ่มเก็บจาก 5 จุดของทุกแปลงย่อย ที่ความลึกไม่เกิน 20 ซม. นำมาคลุกให้เข้ากันในภาควัสดุแล้วเลือกตัวแทนใส่ถุงพลาสติกถุงละประมาณ 5 กิโลกรัม สำหรับข้อมูลที่ทำกรวัดในแปลงทดลองได้แก่ วัชพืชมิน,

² Diieldrex เป็นชื่อทางการค้าชื่อหนึ่งของคิลกรีนซึ่งผลิตโดยบริษัท เซลล์ และอีซี ย่อมาจากคำว่า Emulsifiable concentration หมายถึงยาฆ่าแมลงชนิดผสมน้ำ

ระดับความเป็นกรด - ค่างของดิน, ความชื้นของอากาศ และสิ่งที่ควรสังเกตอื่น ๆ เช่นการเจริญเติบโตของข้าว, ระดับน้ำในแปลง, วัชพืชเป็นต้น ตัวอย่างดินนำไปสกัดหาปริมาณและชนิดของไส้เดือนฝอยและสัตว์ในดินอื่น ๆ และส่วนหนึ่งแบ่งไปสกัดหาปริมาณของกิลกรินในห้องทดลอง ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

ข. การดำเนินการในห้องทดลอง

1. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสัตว์ในดิน

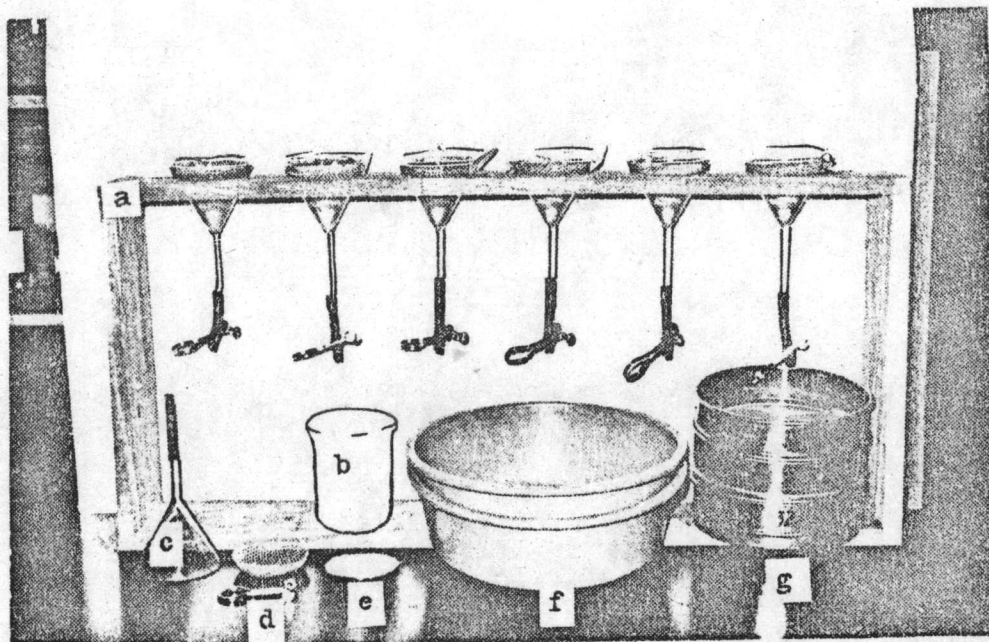
1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- 1 - แอลกอฮอล์ 75% หรือฟอร์มาลิน 4%
- 2 - น้ำสะอาด
- 3 - ตัวอย่างดิน

1.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

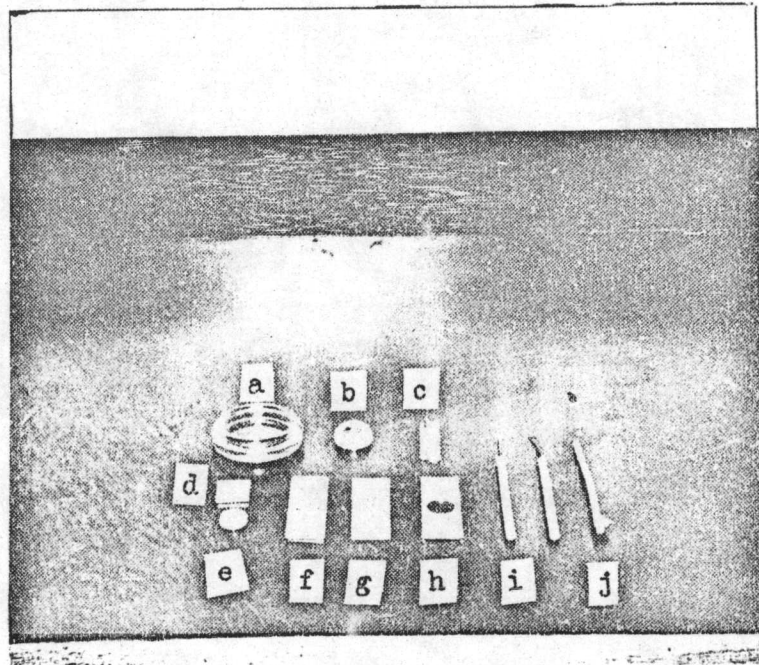
- 1 - กรวย (Baerman funnels) ซึ่งประกอบด้วยกรวยแก้วต่อควยสายยาง และตรงเกือบปลายสุดของสายยางมีที่สำหรับหนีบควบคุมการปิด - เปิดสายยาง (รูปที่ 2c)
- 2 - กรวยของทุงเกรน (Tungren funnels) (รูปที่ 5)
- 3 - ตะแกรง (Test sieve) ขนาด 325 เมช (325 ช่อง/นิ้ว) หรือมีความกว้างของช่องประมาณ 45 ไมครอน (รูปที่ 2g)
- 4 - กระจกเยื่อชนิดเนื้อเหนียวพิเศษ (รูปที่ 2e)
- 5 - Erlenmeyer flasks ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 6 - กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) (รูปที่ 4a)



รูปที่ 2

เครื่องมือที่ใช้แยกไส้เดือนฝอยออกจากดิน

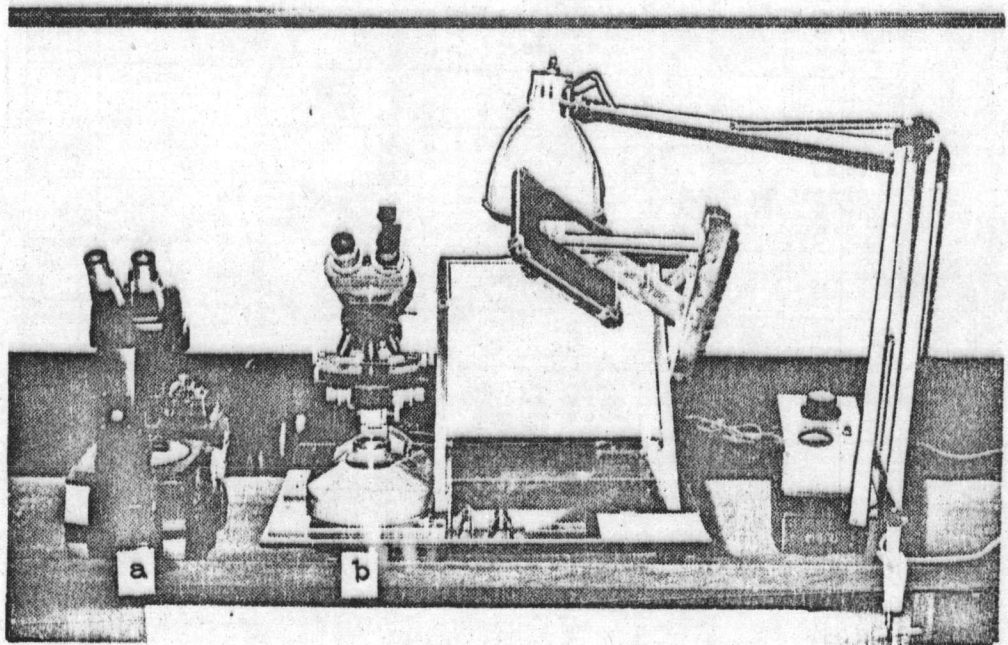
- a. ที่วางกรวย
- b. บีกเกอร์พลาสติกขนาด 600 ซ.ม.³
- c. กรวยแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกรวยกว้าง 4 นิ้ว พร้อมท่อยางที่ปลายก้นกรวย
- d. ตะแกรงลวดและที่หนีบ
- e. กระดาษกรองไส้เดือนฝอย
- f. อ่างพลาสติก
- g. ตะแกรงทองแดงขนาด 30, 140 และ 325 เมช



รูปที่ 3

เครื่องมือที่ใช้ในการทำสไลด์

- a. syracuse watch-glass ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม.
- b. syracuse watch-glass ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.
- c. มีดโกน
- d. cover glass ชนิดสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 24 x 24 มม.
- e. cover glass ชนิดกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 มม.
- f. สไลด์แบบ aluminium double cover slid
- g. สไลด์กระຈก
- h. สไลด์กลม
- i. เข็มเขี่ย
- j. ไม้เฝ้ายลายแหลม

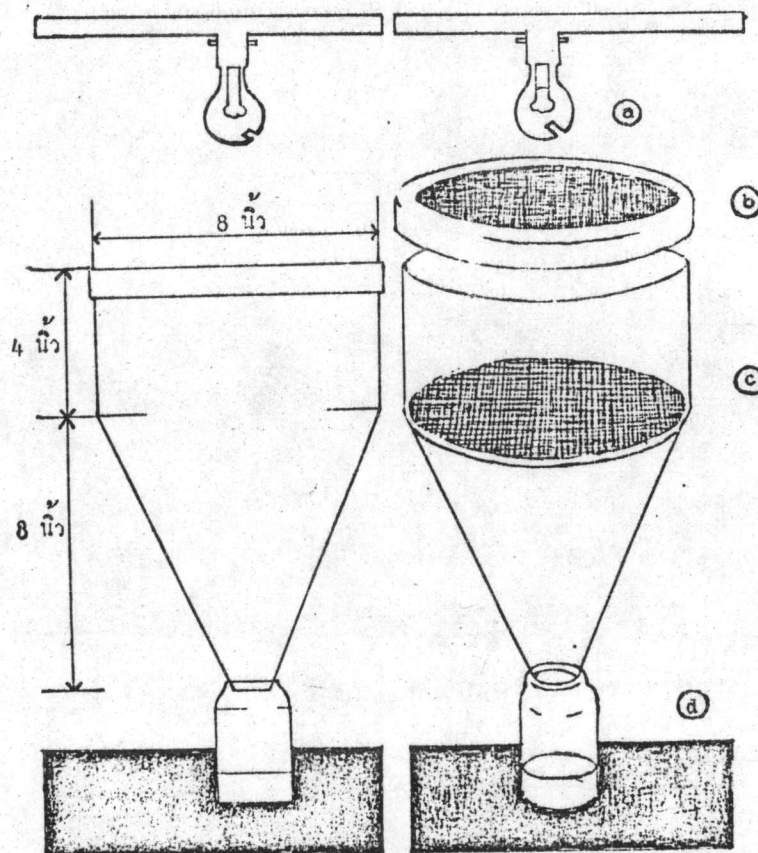


รูปที่ 4

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจและศึกษาอนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอย
และสัตว์ในกินอื่น ๆ

a. stereoscopic microscope

b. compound microscope ที่ติดตั้งด้วย camera-lucida



รูปที่ 5

เครื่องสกัดสัตว์ในดินขนาดเล็ก แบบ Tungren funnel

- a. หลอดไฟขนาด 60 วัตต์
- b. ฝาครอบกรวย ป้องกันแมลงตกลงไปในกรวย
- c. กรวยซึ่งมีตะแกรงลวดขนาดช่องกว้าง 2 มม.
- d. ขวดแก้วบรรจุแอลกอฮอล์ 75% 1/3 ของขวด

- 7 - กุ๊องจุดที่ศันกำลังขยายสูง (รูปที่ 4 b)
- 8 - จานใสสำหรับนับจำนวน
- 9 - เข็มเย็บทำจากแขนงไม้ไผ่เหลาปลายให้แหลมบาง
- 10 - ถังพลาสติกสำหรับล้างดินขนาดต่าง ๆ
- 11 - อุปกรณ์และวัสดุสำหรับทำสไลด์โดยวิธีรวดเร็ว

(rapid method) (Southey 1970) (รูปที่ 3)

- 12 - กลองเก็บตัวอย่าง สไลด์
- 13 - ภูกัน เบอร์ 2
- 14 - เครื่องชั่งแบบละเอียด ปานกลาง
- 15 - หลอดไฟฟ้าขนาด 60 วัตต์
- 16 - ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 10 มิลลิลิตร
- 17 - ขวดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 นิ้ว

สูง 3.5 นิ้ว

- 18 - เทอร์โมมิเตอร์
- 19 - ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร
- 20 - บีกเกอร์พลาสติก ขนาด 600 มิลลิลิตร
- 21 - Hot plate

1.2 วิธีดำเนินการทดลอง

1.2.1 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของไส้เดือนฝอยในดิน
การสกัดไส้เดือนฝอยใช้วิธีการของเปียร์แมน (Southey 1970) ขั้นตอนมีดังนี้

- 1 - นำตัวอย่างดินที่คลุกเข้ากันดีแล้วมา 500 กรัม ละลายน้ำปริมาณพอสมควร (ประมาณ 3 ลิตร) ในถังพลาสติกจนหมด แล้วนำไปรินผ่านตะแกรงขนาด 325 เมช นำสิ่งที่กรองได้ในตะแกรงไปล้างด้วยน้ำที่ไหล

จากกอกอย่างช้า ๆ จนน้ำที่ไหลผ่านตะแกรงใสแล้วจึงถ่ายสิ่งที่กรองได้ในตะแกรงใสปิกเกอร์เก็บไว้

2 - ใช้กระดาษเยื่อหนาสองชั้นตัดเป็นรูปวงกลมขนาดพอดีกับตะแกรงที่จะนำไปวางบนปากกรวย (รูป 2 a) วางกระดาษเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วให้สนิทกับตะแกรงแล้วนำสิ่งที่กรองได้ในปิกเกอร์มารินให้ผ่านกระดาษเยื่อบนตะแกรงอย่างช้า ๆ จนหมดเอาน้ำใส่ลงในปิกเกอร์อีกเล็กน้อย เขย่าแล้วรินทำนองเดียวกัน ทำเช่นนี้สองครั้งเพื่อความแน่ใจว่าจะไม่มีไส้เดือนฝอยเหลืออยู่อีกในปิกเกอร์

3 - นำตะแกรงที่รินน้ำเสร็จแล้วนำไปวางบนกรวยแก้วซึ่งเติมน้ำสะอาดจนเกือบเต็ม หลังจากนั้นจึงเติมน้ำจันทุมกระดาษเยื่อบนตะแกรงใช้ผ้าของเพทรี คิช ครอบเอาไว้ป้องกันไม่ให้มีไรทะเลยถึงเอาไว้ 48 ชั่วโมง แล้วจึงไขเอาน้ำส่วนล่างของกรวยซึ่งจะมีไส้เดือนฝอยที่ตกลงมาตามแรงดึงดูดของโลกไปตรวจสอบหาชนิดและนับจำนวน สำหรับตัวอย่างที่ยังไม่ทำการตรวจสอบทันทีนำไปเก็บเอาไว้ในตู้เย็นที่ระดับอุณหภูมิประมาณ 7 °C.

4 - การนับจำนวนต้องปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรเสียก่อน แล้วจึงไขไปเปตคูกขึ้นมาครั้งละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในจานใสสำหรับนับจำนวนแต่ละตัวอย่างทำการนับ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยและแต่ละครั้งก่อนคุดตัวอย่างจะต้องเขย่าขวดให้ไส้เดือนฝอยกระจายทั่วเสียก่อน ค่าเฉลี่ยที่นับได้นำไปเปรียบเทียบกับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ก็จะได้ปริมาณไส้เดือนฝอยต่อหน้าหนักดิน 50 กรัม (ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 18 ตารางเซนติเมตร) หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นจำนวน/พื้นที่ 1 ตารางเมตร การนับจำนวนต้องนับภายใต้กล้องสเตรียอไมคอนกำลังขยายระหว่าง 7 - 30 เท่า

1.2.2 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสัตว์ในดินอื่น ๆ

1 - นำตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงทดลองใหม่ ๆ จำนวน

1 กิโลกรัม ใส่ลงในกรวยของฟุนเกอร์น ซึ่งมีตะแกรงลวดขนาดของกว้าง 2 มิลลิเมตร รองอยู่ข้างล่างแผ่นดินในกระจายทั่วกรวยอย่างสม่ำเสมอ แล้วปิดฝาให้มิดชิด

2 - ไซซอกแควบรจุแอลกอฮอล์ 75% หรือฟอร์มาลิน 4% อยู่ประมาณ 1/3 ของขวด รองไว้ที่ปลายล่างของกรวย หลังจากนั้นเปิดไฟทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำตัวอย่างสัตว์ที่สกัดได้ไปตรวจสอบชนิดและนับจำนวนภายใต้กล้องสเตรียโอ

3 - ตัวอย่างสัตว์ที่สกัดได้ที่จะใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เก็บคองไว้ในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น

4 - สำหรับสัตว์ในดินที่มีขนาดใหญ่โตกว่าของตะแกรง ทำการตรวจสอบโดยไข่มือและมองควยตาเปล่า

2. การวิเคราะห์หาปริมาณของคีลครินในดินตัวอย่าง

ขั้นตอนของการวิเคราะห์หาปริมาณของคีลครินในดินส่วนใหญ่ทำตามวิธีการใน Chemistry Laboratory Manual หน้า 56 - 75 ของ Environmental Protection Agency (Anonymous 1969)

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1 - อีเทอร์ (diethyl ether, anhydrous).

สำหรับการวิเคราะห์หัตถุมีพิษของบริษัท Baker, สหรัฐอเมริกา

2 - เฮกเซน (n-hexane) สำหรับการวิเคราะห์หัตถุมีพิษของบริษัท Baker, สหรัฐอเมริกา

3 - เฮกเซน (ยูวี) (n-hexane UV) ผ่านการกลั่นจากอุปกรณ์ที่ทำจากแก้ววน ใช้สำหรับฉีดเข้าเครื่อง GLC ในตอนปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่างครั้งสุดท้าย

4 - อะซีโตน (acetone) สำหรับการวิเคราะห์หัตถุ
มีพิษของบริษัท Baker, สหรัฐอเมริกา

5 - โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4 , anhydrous) แบบ
ผงละเอียด มีความบริสุทธิ์สูงพิเศษ ของบริษัท Merck, เยอรมันนี้ ผ่าน
การอบที่อุณหภูมิ 130°C . ตลอดคืน

6 - ฟลอรินซิล (florisil) ขนาด 60/100 เมช
อบที่อุณหภูมิ 130°C . ตลอดคืน

7 - สารละลายมาตรฐานผสม (mixed standard
solution) ของคัลคริน, ดีดีอี (DDE), ทีดีอี (TDE), พารา พารา
ดีดีที (pp'- DDT), และลินเดน (lindane) ความเข้มข้น 0.1 ng/ μl

2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1 - Soxhlet heating mantles ขนาด
250 วัตต์/หน่วย, 115 โวลต์ ของบริษัท Glas-Col Apparatus Co.,
สหรัฐอเมริกา

2 - เครื่องสำหรับระเหยแบบ flash evaporator

3 - ขวดก้นกลม (round bottom flasks) ขนาด
500 มิลลิลิตร ของบริษัท Kontes, สหรัฐอเมริกา

4 - คอลัมน์แก้วสำหรับการสกัด (extraction
columns) ของบริษัท Kontes, สหรัฐอเมริกา

5 - หม้อแปลงไฟฟ้า (variable transformers)
ยี่ห้อ Voltac แบบ BS-10 2KVA, ญี่ปุ่น

6 - เครื่องแกสลิควิด โครมาโตกราฟ (Gas Liquid
Chromatograph, GLC) ยี่ห้อ Tracor แบบ MT-220, สหรัฐอเมริกา
ซึ่งมีอุปกรณ์และสภาพของเครื่องดังนี้

- เครื่องตรวจวัด (detector) ใช้เครื่องตรวจวัดแบบจับอิเล็กตรอน (electron capture detector)

- อุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด: 275 °ซ.

- คอลัมน์ (Chromatographic column)

บรรจุควาย 1.5% SP 2250/1.95% SP 2401

- อุณหภูมิของคอลัมน์: 200 °ซ.

- แก๊สตัวพา (carrier gass): แก๊สไนโตรเจน

7 - เข็มสำหรับใช้ฉีดสารละลายสกัดเข้าเครื่อง GLC (microliter syringe) ของบริษัท Hamilton, สวิสเซอร์แลนด์

8 - กระดาษบันทึกการอ่านของเครื่อง GLC (record chart) ของบริษัท Tracor Westronics, สหรัฐอเมริกา

9 - เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ของบริษัท Beckman แบบ Zeromatic SS-3

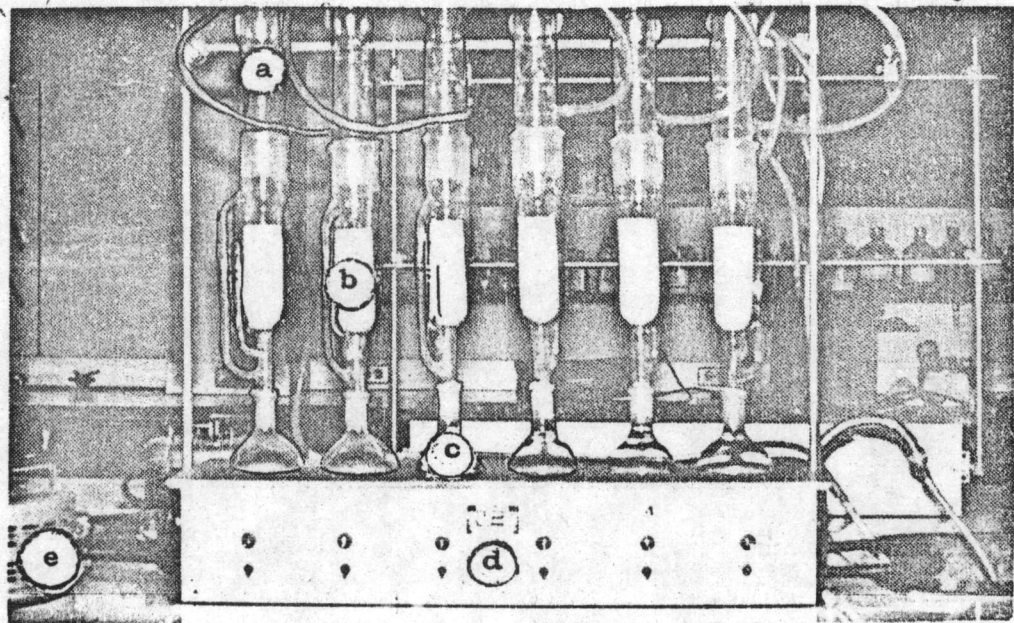
10 - ไปเปต (pipettes) ขนาดต่าง ๆ ของบริษัท Kontes, สหรัฐอเมริกา

11 - Volumetric flasks ขนาด 5, 25, 50, 100 มิลลิลิตร ของบริษัท Kontes, สหรัฐอเมริกา

12 - Erlenmeyer flasks ขนาด 50, 250, 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Kontes, สหรัฐอเมริกา

13 - กระบอกตวง (cylinders) ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร

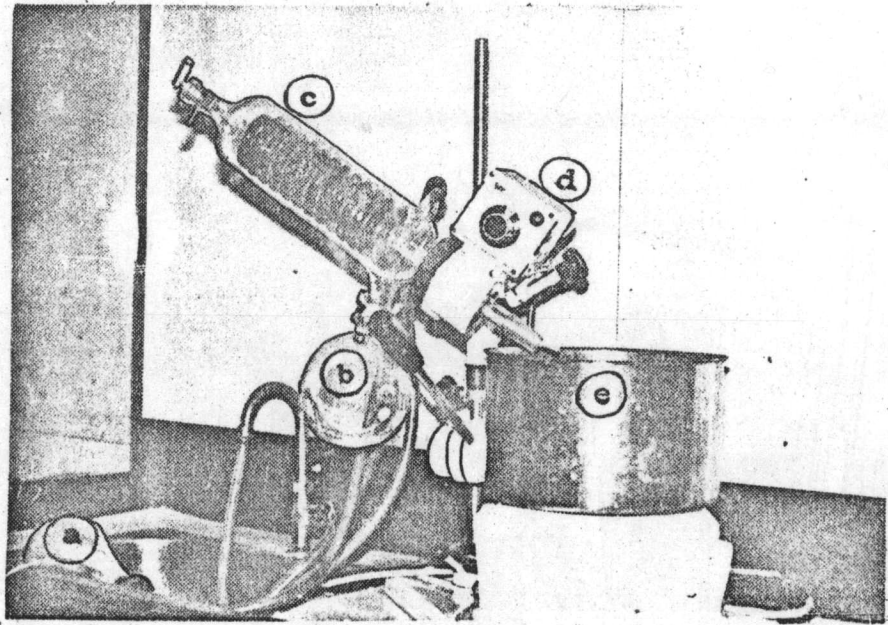
14 - ขวดใส่ตัวอย่างสารละลายสกัด ขนาด 5, 10, 15, 20 มิลลิลิตร



รูปที่ 6

เครื่อง Soxhlet apparatus

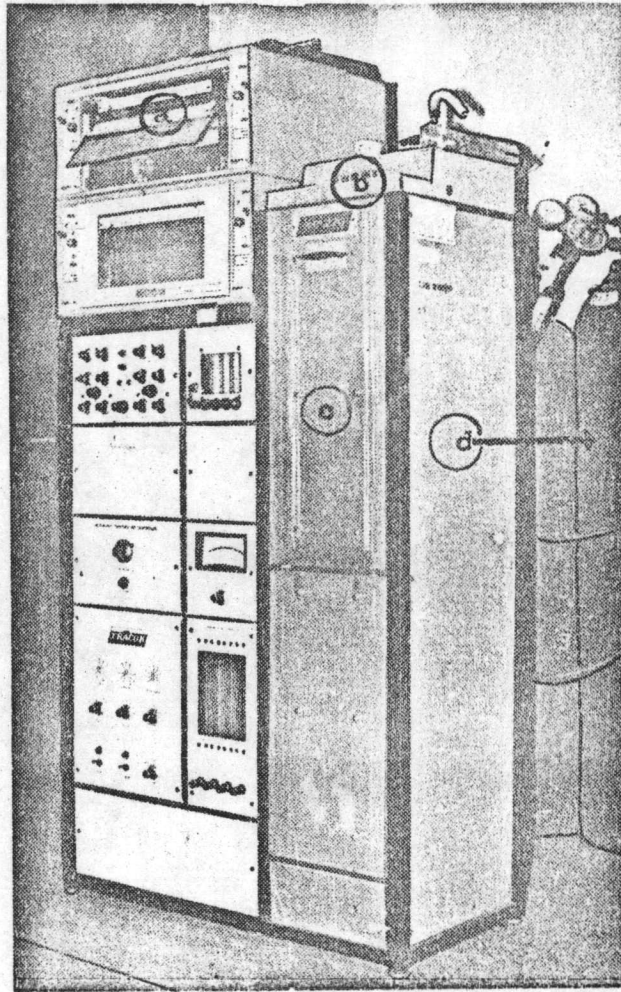
- a. เครื่องควบแน่น (condenser)
- b. คอลัมน์สกัด (extraction column) ซึ่งภายในมีกรวยกระดาษที่บรรจุตัวอย่างดิน
- c. ขวดกักเก็บของเหลวที่ละลายสกัด
- d. Soxhlet heating mantles
- e. หม้อแปลงไฟฟ้า



รูปที่ 7

เครื่องระเหยแบบ Flash evaporator

- a. เครื่องดูดอากาศ
- b. ขวดกักเก็บสำหรับรองรับสารละลายที่กลั่นจาก condenser
- c. condenser
- d. เครื่องควบคุมความเร็วการหมุนของขวดแก้วกักเก็บที่ใส่ตัวอย่างสำหรับระเหย
- e. ถังค้ำน้ำซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้



รูปที่ 8

เครื่อง GLC

- a. กระดาษม้วนสำหรับบันทึกการอ่านของเครื่องออกมาเป็นโครมาโตแกรม (รูปที่ 9)
- b. ที่สำหรับฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง
- c. ห้องซึ่งมีโครมาโตกราฟฟิก คอลัมน์อยู่ภายใน
- d. ถังบรรจุแก๊ส ไนโตรเจน

- 15 - ขวดใส่ตัวอย่างคินแห้งที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 เมช
แล้ว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.5 เซนติเมตร สูงประมาณ 8.5 เซนติเมตร
- 16 - ลูกยางสำหรับใช้ดูดสารละลายของบริษัท Pumpett,
สวีเดน
- 17 - ทุยีนแบบป้องกันการระเบิดได้ ของบริษัท Lab-
Line, สหรัฐอเมริกา
- 18 - ถาดสแตนเลสขนาด 10 x 50 x 70 (ซ.ม.)³

2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง. คินตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลง
ทดลองนำมาผึ่งให้แห้งในถาดสแตนเลสภายในที่ร่มประมาณ 2 สัปดาห์ ใช้คินเปียก
ประมาณ 500 - 1000 กรัม/ตัวอย่าง หลังจากที่ได้คินแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด
แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 เมช นำตัวอย่างคินที่ร่อนผ่านตะแกรงใส่ขวด
ฉีกฝาให้แน่นเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อคอยสกัดในขั้นต่อไป

2.2.2 การสกัดตัวอย่างโดยใช้ Soxhlet apparatus.
นำตัวอย่างคินที่เตรียมไว้ตั้งกลแล้ว ใส่ลงไปในกระบอกกระดาษ (extrac-
tion thimbles หรือ Whatman thimbles) ตัวอย่างละ 50 กรัม
แล้วปิดข้างบนด้วยใยแก้วเพื่อป้องกันการกระเด็นของเม็คคินจากกระบอกกระดาษ

เติมสารละลายสกัด (extraction solvent) (hexane/acetone
อัตราส่วน 1:1) ลงในขวดกนกกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณ 250 มิลลิลิตร
แล้วใส่เม็คแก้วลงไปจำนวน 3 - 4 เม็ค ป้องกันการเดือดที่รุนแรงเกินไป

นำกระบอกกระดาษที่มีตัวอย่างคินตั้งกลบรรจุลงในคอลัมน์แก้วสำหรับ
การสกัด (extraction column) แล้วนำคอลัมน์ต่อกับท่อแก้วสำหรับกลั่น
(condenser) และคานาลงต่อกับขวดกนกกลม ปรับรอยต่อให้เรียบร้อยจนแน่ใจ

ว่าไม่มีการรั่วของสารละลายจากไซซ์ฝั่งกรีส (grease) เชื่อมรอยต่อเมื่อจำเป็น และระมัดระวังการรั่วของน้ำระหว่างคอนเดนเซอร์และท่ออย่างขณะเปิดน้ำให้ไหล

เมื่อจัด Soxhlet apparatus เรียบร้อยแล้ว เปิดน้ำให้ไหลผ่าน คอนเดนเซอร์ ในอัตราที่สม่ำเสมอและทำการสกัดที่อุณหภูมิประมาณ $50^{\circ} - 60^{\circ}$ ซ. เป็นเวลา 8 ชั่วโมงติดต่อกัน

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบ Flash evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 60° ซ. ให้ปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมบาง (aluminium foil) รัศยงให้แน่น เก็บไว้ใน ตู้เย็นที่ป้องกันการระเบิดได้ เพื่อนำไปทำให้สะอาดขึ้น (cleaned-up) ใน ชั้นต่อไป

2.2.3 การทำให้สะอาดขึ้น (cleaned-up). ไซซ์คอด้มัน์ แกวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว ยาวประมาณ 24 นิ้ว บรรจุด้วยสาร ฟลอริสซิลที่ผ่านการอบแล้ว (activated florasil) ประมาณ 40 กรัม และตอนบนของฟลอริสซิล เคมีโซเคียม ซัลเฟตที่ผ่านการอบแล้วเช่นกันประมาณ 20 กรัม ซึ่งหลังจากการบรรจุคอด้มัน์แล้วต้องรีบไซซ์ทันที มิฉะนั้นแล้วฟลอริสซิลจะ เสียคุณสมบัติในการดูดซับสารไป

เติมเฮกเซนลงไปทันทีประมาณ 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการล้างครั้งแรก พอร์คับผิวบนของเฮกเซนใกล้จะถึงผิวของโซเคียม ซัลเฟต รีบเติมตัวอย่างที่ทำให้ชุ่มชื้นดังกล่าวแล้วลงไปทันที แล้วปรับกอกให้สารละลายไหลผ่านคอด้มัน์ลงไป ในอัตราประมาณ 60 - 100 หยด/นาที ใช้ Erlenmeyer flasks รองรับ สารละลายที่ผ่านคอด้มัน์เอาไว้ จนกระทั่งระดับของสารละลายเกือบจะถึงผิวบนของ โซเคียม ซัลเฟต ให้รีบเติมสารละลายชะ 1 (eluting solvent 1) (6% diethyl ether ในเฮกเซน) ลงไป 100 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารละลาย

ชะผ่านคอลัมน์ลงไปจนระดับของสารละลายชะในคอลัมน์เกือบถึงผิวของโซเดียมซัลเฟตอีกครั้ง ให้รีบเติมสารละลายชะ 2 (eluting solvent 2) (15% diethyl ether ในเฮกเซน) ลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ชะผ่านคอลัมน์จนหมด เสร็จแล้วใช้แผ่นอะลูมิเนียมบางปิดฝาขวดที่เก็บสารละลายเอาไว้ รักษายางให้แน่นเพื่อนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบ Flash evaporator อีกครั้งจนแห้ง หากยังไม่ระเหยในทันทีก็นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่ป้องกันการระเบิดได้ เพื่อเก็บไว้ระเหยต่อไป

ตัวอย่างที่ผ่านการระเหยจนแห้งแล้ว นำมาทำการปรับปริมาตรโดยใช้เฮกเซน (ยูวี) หรือเฮกเซนที่ผ่านการกลั่นด้วยอุปกรณ์แก้ววนไม่ต่ำกว่า 2 ครั้ง ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงเพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาชนิดและปริมาณของคีลดรินต่อไป

2.2.4 การหาปริมาณคีลดรินโดยเครื่อง GLC (หลักการของเครื่องคุณภาพคนวาก ก.)

2.2.4.1 เทคนิคการใช้เข็มสำหรับฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง GLC (hypodermic หรือ microliter syringe). ก่อนใช้เข็มฉีดควรละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างทุกครั้งจะต้องล้างเข็มฉีดในเฮกเซนตามลำดับ ดังนี้

- เฮกเซนขวดที่ 1 5 ครั้ง
- เฮกเซนขวดที่ 2 5 ครั้ง
- เฮกเซนขวดที่ 3 5 ครั้ง

ทั้งนี้เพื่อป้องกันความสกปรกที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจาก GLC เป็นเครื่องที่มีความไวสูงมาก สามารถตรวจสอบได้ละเอียดถึง 1 - 5 ppb. (พิลลิคัน พยอสมแยม 2519)

ในกรณีที่เข็มฉีดยามีความผิด ทำให้การฉีดและการวิเคราะห์ละลายทำได้ลำบาก ให้นำคานเหล็กของเข็มฉีดยากับปลายจุกที่สะอาด ช่วยทำให้เข็มดีขึ้น (ชลธีรัตน์ พยอมแย้ม 2519)

อุปกรณ์ทุกชิ้นที่ใช้กับ GLC ต้องมีความสะอาดสูง ผ่านการล้างด้วย ผงซักฟอกในน้ำสะอาด, น้ำกลั่น, อะซิโตน, และเฮกเซน ตามลำดับ

2.2.4.2 การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง. ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ จำนวน $2 \mu\text{l}$ แล้ววัดค่าช่วงเวลาการเกิดยอดกราฟ (peak) ของคีลคริน (duration time) เอาไว้ เพื่อนำไปใช้เป็น ตัวเปรียบเทียบกับยอดกราฟที่เกิดจากการฉีดสารละลายตัวอย่าง ต่อจากนั้นทำการ ฉีดสารละลายตัวอย่างโดยฉีดครั้งละ $5 \mu\text{l}$ ทำสองซ้ำเพื่อความแน่นอนแล้วหาค่าเฉลี่ย และเมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างครบ 5 ครั้ง ควรฉีดสารละลายมาตรฐาน ผสมสลับไปทุกครั้ง เพื่อว่าค่าที่ได้จะไม่ผิดพลาด

2.2.4.3 การคำนวณผลจากโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ GLC อ่านได้ เมื่อได้โครมาโตแกรมของตัวอย่างแล้ว (รูปที่ 9) นำไปเปรียบเทียบกับค่าช่วงเวลาการเกิดยอดกราฟ (duration time) ของสารละลายมาตรฐานคีลครินในโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม เพื่อหาขนาดของคีลครินในโครมาโตแกรมของตัวอย่าง หลังจาก ที่พบยอดกราฟของคีลครินแล้ว ทำการคำนวณพื้นที่ของสามเหลี่ยมภายใต้ยอดกราฟ นั้น เพื่อหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้ยอดกราฟของสารละลายมาตรฐาน คีลคริน วิธีการคร่าว ๆ คือ

1 - หาพื้นที่ใต้ยอดกราฟ โดยการลากเส้น ฐานเฉลี่ย (approximate baseline) โดยพยายามลากให้เป็นเส้นฐานที่เป็นค่าเฉลี่ยของยอดกราฟที่ต้องการหาค่าพื้นที่

2 - ลากเส้นสัมผัสกับคานทั้งสองของสามเหลี่ยม
 ยอดกราฟมาตัดกับเส้นฐาน

3 - หาความสูงของสามเหลี่ยม โดยลากเส้น
 จากยอดกราฟของสามเหลี่ยมลงมาตั้งฉากกับเส้นฐาน

4 - หาพื้นที่โดยยอดกราฟจากสามเหลี่ยมที่สร้าง
 ได้โดยใช้สูตร: พื้นที่โดยยอดกราฟ = $1/2 \times$ ฐานของสามเหลี่ยม \times ความสูง

การคำนวณค่า ppm. ของคีลครินในตัวอย่าง คำนวณโดยการเปรียบเทียบพื้นที่โดยยอดกราฟกับสารคีลครินมาตรฐาน เนื่องจากเรทราบปริมาณสารของสารคีลครินมาตรฐานเป็นจำนวนแน่นอน และสามารถคำนวณหาพื้นที่โดยยอดกราฟได้ตามวิธีดังกล่าวแล้ว จึงสามารถใช้เป็นตัวเปรียบเทียบคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่างได้ ปริมาณสารในตัวอย่างที่คำนวณออกมาเป็น ppm. สรุปออกมาเป็นสูตรในการคำนวณได้ดังนี้ (วิธีการคำนวณดูภาคผนวก ก.)

$$\text{ppm. คีลครินในตัวอย่าง} = \frac{\begin{array}{l} \text{ng ของคีลคริน} \\ \text{มาตรฐาน} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{พื้นที่โดยยอดกราฟ} \\ \text{ของตัวอย่าง} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{มิลลิลิตร} \\ \text{ของตัวอย่าง} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{พื้นที่โดยยอดกราฟของ} \\ \text{สารคีลครินมาตรฐาน} \end{array} \times \begin{array}{l} \mu\text{l ของ} \\ \text{ตัวอย่างที่ฉีด} \end{array} \times 50}$$

2.2.5 การหาปริมาณคืนกลับ (recovery) นำตัวอย่างดินแห้งที่บดและร่อนผ่านตะแกรงมาแล้ว 4 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเอาไปวิเคราะห์หาปริมาณของคีลครินตามวิธีการดังกล่าวมาแล้ว และอีกส่วนหนึ่งนำมาเติมสารละลายมาตรฐานของคีลครินที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของคีลครินตามวิธีการเดียวกัน เพื่อตรวจสอบว่าได้ปริมาณของคีลครินคืนกลับเท่าไร โดยคิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)

3. การหาปริมาณของอินทรีย์วัตถุในดิน (Walkley and Black 1934)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- 1 - กรดฟอสฟอริก 85% (H_3PO_4)
- 2 - โซเดียม ฟลูออไรด์ ชนิดของแข็ง (solid NaF)
- 3 - กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ที่มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 96%
- 4 - โปตัสเซียม ไดโครเมต มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 N (49.04 กรัม $K_2Cr_2O_7$ ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรพอดี)
- 5 - คัชสีทดสอบปฏิกิริยา (indicator) ใช้เฟอร์รัส ซัลเฟต (anhydrous ferrous sulphate, $FeSO_4$) 0.5 กรัม และโอ-ฟีแนนโธรลีน (o-phenanthroline) 1.0 กรัม รวมกับน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร
- 6 - สารละลายเฟอร์รัส (ferrous solution, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 0.5 N^{3/}

^{3/} สำหรับสารละลายเฟอร์รัสภาชนะที่บรรจุจะต้องสามารถป้องกันการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ ทำได้โดยการบรรจุไฮโดรเจน หรือคาร์บอนไดออกไซด์เอาไว้เหนือสารละลายและก่อนใช้ควรนำไปทำปฏิกิริยา (titrate) กับโปตัสเซียมไดโครเมตมาตรฐานเสียก่อน เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสที่แท้จริง หรืออาจเตรียมโดยการละลาย ferrous ammonium sulphate จำนวน 196.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ซึ่งมีกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตรก็ได้ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรพอดี ก็จะได้สารละลายเฟอร์รัสที่มีความเข้มข้น 0.5 N

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1 - conical flasks ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2 - ไปเปต (pipettes) ขนาด 10 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิลิตร
- 3 - บิวเรต (Buret) สำหรับใส่สารละลายของเพอร์รัสแอมโมเนียม ซัลเฟต $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$
- 4 - เครื่องชั่งแบบละเอียดสูง (analytical balance)

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง (Walkley and Black 1934)

1 - เติมกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ลงไป 2 มิลลิลิตร น้ำ 5 มิลลิลิตร และคั่นที่ทดสอบปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ลงไปในคิน 0.5 กรัม แล้วเติมเพอร์รัส ซัลเฟต ให้มากเกินไปซึ่งสังเกตได้จากสีของคั่นที่ทดสอบปฏิกิริยา (ประมาณ 5 มิลลิลิตร) ปล่อยให้ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วทำปฏิกิริยากลับ (back titrate) กับส่วนเกินของฟอร์รัส ซัลเฟตโดยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต ปริมาณของเพอร์รัส ซัลเฟตที่หายไป (ส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับโปตัสเซียมไดโครเมต) คือส่วนที่ไปทำปฏิกิริยากับแมงกานีสไดออกไซด์ในคิน ซึ่งเป็นตัวเค็มออกซิเจนที่สำคัญในคิน (oxidizing agent) และทำปฏิกิริยากับเพอร์รัสไดออกไซด์ ซึ่งอาจทำให้ได้อินทรีย์วัตถุที่คำนวณได้มากกว่าปกติที่เป็นจริง ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์หาอินทรีย์วัตถุในคินจะต้องหาปริมาณของเพอร์รัส ซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยากับแมงกานีส ไดออกไซด์ก่อน แล้วเอาไปเติมในคินตัวอย่างที่จะหาปริมาณอินทรีย์วัตถุจริง ๆ ร่วมกับกรดฟอสฟอริก 2 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ผสมกันทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ซึ่งส่วนใหญ่ของแมงกานีส ไดออกไซด์จะถูกทำปฏิกิริยาจนหมดแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาอินทรีย์วัตถุต่อไป

2 - สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุ ใช้ดินตัวอย่างที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 8 เมช ปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงใน conical flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเฟอร์รัส ซัลเฟต และกรกพอสฟอริกตามปริมาณที่คำนวณได้จากการทดลองครั้งก่อนแล้ว หลังจากนั้นจึงคุกสารละลายมาตรฐานไปตัส เข็มไฮโครเมท เข็มชั้น 1N เติมลงไปเบา ๆ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ หมุน conical flask ให้ส่วนผสมทำปฏิกิริยากันอย่างทั่วถึง เติมกรกซัลฟูริกลงไป 20 มิลลิลิตร แล้วหมุน flask แบบเดียวกันให้สารละลายผสมกันนานประมาณ 1 นาที ให้แน่ใจว่าสารเคมีสัมผัสกับอนุภาคดินอย่างสมบูรณ์โดยระมัดระวังอย่างให้อนุภาคดินกระเด็นมาติดข้าง flask แล้วปล่อยให้ทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 30 นาที ทำการทดสอบวิธีการโดยการทำแบบเดียวกันนี้แต่ไม่ใส่ตัวอย่างดิน (ทำ blank) หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 100 มิลลิลิตร ปล่อยให้ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมดัชนีทดสอบปฏิกิริยา ลงไปประมาณ 5 หยด นำมาทำปฏิกิริยากลับ (back titration) กับสารละลายเฟอร์รัส แอมโมเนียม ซัลเฟต ที่หยกจากบูเรต ซึ่งจะให้จุดสมมูลโดยเปลี่ยนสีดัชนีปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลแดง

3 - การคำนวณหาเปอร์ เซนต์อินทรีย์คาร์บอนและ เปอร์ เซนต์อินทรีย์วัตถุ สรุปเป็นสูตรไค้ดังนี้ (วิธีการคำนวณดูภาคผนวก ก.)

$$\text{เปอร์ เซนต์อินทรีย์คาร์บอน} = 0.3896 \times (B-S)$$

(% organic carbon)

โดยที่

B	=	มิลลิลิตรของสารละลายเฟอร์รัสที่ใช้กับ Blank
S	=	มิลลิลิตรของสารละลายเฟอร์รัสที่ใช้กับดินตัวอย่าง 0.5 กรัม

และถ้าต้องการเปลี่ยนไปเป็นเปอร์ เซนต์อินทรีย์วัตถุ ใช้ค่าคงที่ 1.724 แทนค่าในสูตร (Walkley 1947) ก็จะได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ} &= 0.3896 \times 1.724 \times (B-S) \\ &= 0.6717 \times (B-S) \end{aligned}$$

4. การทดลองหาค่า Lethal Concentration₅₀ (LC₅₀) ของ กิลกรินทอไลต์เคื้อนผอยบางชนิดในดิน

4.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1 - สำหรับไส้เคื้อนผอยศัตรูพืชเลือกเอา Tylencho-
rhynchus spp. และสำหรับไส้เคื้อนผอยที่ไม่เป็นศัตรูพืชเลือกเอา Eudo-
rylaimus spp. เป็นตัวแทนในการทดลองหาค่า LC₅₀ เนื่องจากประชากร
ของไส้เคื้อนผอยทั้งสองสกุลนี้มีลักษณะค่อนข้างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากพอที่จะนำ
มาทดลองได้ โดยสกัดจากดินที่เก็บมาจากแปลงที่ไม่เคยพ่นยาฆ่าแมลงใด ๆ มาก่อน

2 - Dieldrex[®] ชนิด 18% อีซี

3 - น้ำกลั่น

4.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1 - Petri dishes

2 - Volumetric flasks ขนาดต่าง ๆ

3 - Pipettes

4 - กล้องจุลทรรศน์

4.1.3 วิธีดำเนินการทดลอง

ส่วนหนึ่งของไส้เคื้อนผอยที่สกัดได้นำไปทดสอบหาช่วงของ
ความเข้มข้นของกิลกรินที่มีผลต่อการตายของไส้เคื้อนผอยเสียก่อน โดยนำไป
ทดสอบกับกิลกรินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงกว้าง เพื่อหาช่วงของความ

เข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อครีนิที่จะนำมากำหนดจุดของความเข้มข้น (dilution series) 5 ระดับ ความเข้มข้นในการทดลองหาค่า LC_{50} เมื่อเตรียมเชื้อครีนิที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่เหมาะสมได้แล้วรินใส่เพตริ คิซ หลังจากนั้นจึงเขี่ยใส่ก้อนผอยที่สกัดมาได้ใหม่ ๆ ใส่ลงไปโนเพตริ คิซ ๆ ละ 100 ตัว แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจเปอร์เซ็นต์ตาย (% mortality) ของใส่ก้อนผอยทุกระดับความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำทุกระดับความเข้มข้น (รายละเอียดและวิธีการคำนวณดูภาคผนวก ก.)