

### ภาคผนวก ก

#### วิธีเตรียม Methylene blue indicator.(McClung and Linberg,1951)

เตรียม stock solution ดังต่อไปนี้

1. นำ NaOH 0.1 N จำนวน 6.0 มล. ใส่ volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
2. นำ 0.5 % ของสารละลาย methylene blue จำนวน 3.0 มล. ใส่ volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
3. นำ Glucose จำนวน 6.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. และเติม thymol ลงไปเล็กน้อย หลังจากนั้นนำ stock solution ทั้ง 3 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันในหลอดทดลองแล้วนำไปต้มจนกระทั่งสีน้ำเงินของสารละลายหายไปซึ่งต้องนำไปใช้ทันที

#### การวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน(เนาวรัตน์,2527)

สารเคมี

1. Standard 1 N potassium dichromate  
ละลาย  $K_2Cr_2O_7$  (reagent grade) ที่อบที่  $105^\circ C$  นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 49.04 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
2. 0.5 N Ferrous sulfate  
ละลาย  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (reagent grade) 140 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. แล้วเติมกรด  $H_2SO_4$  ที่เข้มข้นลงไป 40 มล. เพื่อป้องกันไม่ให้  $Fe^{+2}$  ถูก oxidized เป็น  $Fe^{+3}$  ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
3. Diphenylamine indicator  
ละลาย diphenylamine 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. และเติม  $H_2SO_4$  เข้มข้น 100 มล. อาจจะใช้ O-phenanthroline ferrous complex ละลาย O-phenanthroline 0.74 กรัม และ Ferrous sulfate 0.35 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล.
4. Phosphoric acid (85% U.S.P. grade)
5. Concentrated sulfate acid (96-98%) comerial grade

### วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรง 0.5 มม. จำนวน 0.5-1.0 กรัม ใส่ erlenmeyer flask 250 มล. ใส่  $K_2Cr_2O_7$  1 N จำนวน 10 มล. (โดยใช้ volumetric pipet) เขย่า flask เบาๆ เพื่อให้น้ำยากับตัวอย่างดินผสมเข้ากันดี ใส่  $H_2SO_4$  เข้มข้น (commercial grade) จำนวน 20 มล. (รินกรดใส่ทีละน้อยเพื่อป้องกันการกระเด็นของอนุภาคดิน และควรเติมกรดในตู้ดูดควัน) ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 มล. เติม phosphoric acid 10 มล. (เพื่อให้สังเกต end point ได้ชัดเจน) หยด diphenylamine ลงไปประมาณ 3 หยด แล้วนำมา titrate ทันทีกับ standard ferrous sulfate 0.5 N จดจำนวน ferrous sulfate ที่ใช้ในแต่ละตัวอย่าง end point ของ suspension จะเปลี่ยนจากน้ำเงินเป็นเขียว (ถ้าใช้ O-phenanthroline เป็น indicator, end point ของ suspension จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง)

2. หาคความเข้มข้นที่แท้จริงของ ferrous sulfate โดยการทำให้ Blank คือใช้ volumetric pipet 10 มล. ดูด  $K_2Cr_2O_7$  1 N จำนวน 10 มล. ใส่ erlenmeyer flask 250 มล. ใส่กรด  $H_2SO_4$  เข้มข้น 20 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 มล. เติม phosphoric acid 10 มล. นำไป titrate กับ ferrous sulfate โดยใช้ diphenylamine หรือ O-Phenanthroline เป็น indicator เช่นเดียวกับตัวอย่าง จดจำนวน ferrous sulfate ที่ใช้กับ blank แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ $N_1$	=	ความเข้มข้นของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้
$V_1$	=	ปริมาตรของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้
$N_2$	=	ความเข้มข้นของ $Fe_2SO_4$ ที่ใช้ titrate
$V_2$	=	ปริมาตรของ $Fe_2SO_4$ ที่ใช้ titrate

หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินดังสมการ

$$\text{อินทรีย์วัตถุ(\%)} = \frac{[10 - (A \times 0.5)] \times 0.672}{S}$$

เมื่อ A = ปริมาตรของ  $FeSO_4$  ที่ไตเตรตได้(มล.)

S = น้ำหนักของดินเท่ากับ 0.5 กรัม

## ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์สถิติของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำสกัดชีวภาพกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ

parameter	SOV	df	MS
pH	bioextracts(A)	5	45.528**
	storage time(B)	4	2.1079E-01
	A*B	20	8.7001E-02
	error	60	1.9869E-01
	total	89	
electrical conductivity	bioextracts(A)	5	3.2314E+04**
	storage time(B)	4	37.428**
	A*B	20	23.287**
	error	60	1.6897E-02
	total	89	
total-N	bioextracts(A)	5	51.119**
	storage time(B)	4	1.7385E-01
	A*B	20	1.1485E-01
	error	60	1.1002E-01
	total	89	
total-P	bioextracts(A)	5	410.91**
	storage time(B)	4	2.4004E-02
	A*B	20	4.4458E-02
	error	60	1.6366E-01
	total	89	
total-K	bioextracts(A)	5	1.708.5**
	storage time(B)	4	4.3138
	A*B	20	3.4287
	error	60	3.3927
	total	89	
total-Ca	bioextracts(A)	5	2.5833E+08
	storage time(B)	4	1.2709E+06
	A*B	20	1.4244E+06
	error	60	9.7894E+05
	total	89	

\*\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## ตารางภาคผนวกที่ 1(ต่อ)

parameter	SOV	df	MS
total-Mg	bioextracts(A)	5	1.1721E+07**
	storage time(B)	4	9622.8
	A*B	20	7109.6
	error	60	6473.7
	total	89	
total-Fe	bioextracts(A)	5	7.4391E+06**
	storage time(B)	4	2.7737E+04
	A*B	20	1.8793E+04
	error	60	1.3334E+04
	total	89	
total-Mn	bioextracts(A)	5	2.2144E+05**
	storage time(B)	4	7.4.93
	A*B	20	854.77
	error	60	724.36
	total	89	
total-Zn	bioextracts(A)	5	7.4212E+06**
	storage time(B)	4	1.0379E+05
	A*B	20	8.9999E+04
	error	60	6.3933E+04
	total	89	
total-Cu	bioextracts(A)	5	1.4164E+06**
	storage time(B)	4	1503.8
	A*B	20	1592.3
	error	60	1045.1
	total	89	

\*\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์สถิติของการบ่มดินด้วยน้ำสกัดชีวภาพเป็นระยะเวลา 1 เดือน

parameter	SOV	df	MS
pH	soil (A)	2	1.8097E-02**
	bioextracts (B)	6	5.7695E-02**
	A*B	12	9.3530E-02**
	error	42	8.9841E-04
	total	62	
Inorganic-N	soil (A)	2	6313.7**
	bioextracts (B)	6	67.407**
	A*B	12	29.116**
	error	42	8.9481
	total	62	
Ammonium-N	soil (A)	2	5526.0**
	bioextracts (B)	6	83.376**
	A*B	12	39.766**
	error	42	8.3943
	total	62	
Nitrate-N	soil (A)	2	26.725**
	bioextracts (B)	6	4.9779**
	A*B	12	10.460**
	error	42	9.3697E-01
	total	62	
Available-P	soil (A)	2	2019.35**
	bioextracts (B)	6	575.829**
	A*B	12	36.9042
	error	42	21.8284
	total	62	
Exchangeable-K	soil (A)	2	3451.8**
	bioextracts (B)	6	4933.1**
	A*B	12	273.34**
	error	42	41.278
	total	62	

\*\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* : แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 2(ต่อ)

parameter	SOV	df	MS
Microbial biomass-C	soil (A)	2	1.2833E+05**
	bioextracts (B)	6	3.9777E+04**
	A*B	12	2.9080E+04**
	error	42	3566.2
	total	62	
Microbial biomass-N	soil (A)	2	3284.5**
	bioextracts (B)	6	1017.9**
	A*B	12	744.23**
	error	42	91.265
	total	62	
cellulose decomposer	soil (A)	2	2.2777**
	bioextracts (B)	6	7.9525E-02
	A*B	12	1.3187E-01
	error	42	5.6563E-02
	total	62	

\*\* แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* แตกต่างกันอย่างสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์สถิติของการบ่มดินด้วยน้ำสกัดชีวภาพเป็นระยะเวลา 2 เดือน

parameter	SOV	df	MS
pH	soil (A)	2	1.9060**
	bioextracts (B)	6	1.8074E-02**
	A*B	12	9.2915E-03**
	error	42	1.3524E-03
	total	62	
Inorganic-N	soil (A)	2	6.78.60**
	bioextracts (B)	6	130.14**
	A*B	12	69.227*
	error	42	31.989
	total	62	
Ammonium-N	soil (A)	2	134.46**
	bioextracts (B)	6	45.628*
	A*B	12	39.122*
	error	42	18.690
	total	62	
Nitrate-N	soil (A)	2	425.67**
	bioextracts (B)	6	29.963
	A*B	12	26.152
	error	42	13.560
	total	62	
Available-P	soil (A)	2	330.16**
	bioextracts (B)	6	300.82**
	A*B	12	31.201**
	error	42	10.694
	total	62	
Exchangeable-K	soil (A)	2	5294.7**
	bioextracts (B)	6	6872.8**
	A*B	12	384.61**
	error	42	15.287
	total	62	

\*\* แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## ตารางภาคผนวกที่ 3(ต่อ)

parameter	SOV	df	MS
Microbial biomass-C	soil (A)	2	2790.1
	bioextracts (B)	6	1.3636E+04**
	A*B	12	9959.8**
	error	42	2993.3
	total	62	
Microbial biomass-N	soil (A)	2	71.423
	bioextracts (B)	6	348.98**
	A*B	12	254.91**
	error	42	76.605
	total	62	
cellulose decomposer	soil (A)	2	2.9446**
	bioextracts (B)	6	1.4245E-01
	A*B	12	1.6930E-01
	error	42	1.2131E-01
	total	62	

\*\* แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

\* แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ตารางภาคผนวกที่ 4 Most probable number of 2, 3, 4, 5 and 10-fold dilution series with four replicate units per dilution level.\*(Woomer,1994)

No. of positive results at dilution level	Population estimate (tabular MPN)				
	Ratio of the dilution series(A)				
1-2-3-4-5-6	2	3	4	5	10
1-0-0-0-0-0	0.2	0.5	0.8	1.1	2.5
1-1-0-0-0-0	0.5	1.1	1.7	2.2	5.1
2-0-0-0-0-0	0.5	1.2	1.8	2.5	5.9
2-1-0-0-0-0	0.9	1.9	2.9	3.9	9.2
3-0-0-0-0-0	1.0	2.0	3.3	4.5	11
3-1-0-0-0-0	1.3	2.9	4.6	6.4	15
3-2-0-0-0-0	1.7	3.9	6.2	8.7	21
4-0-0-0-0-0	1.4	3.3	5.5	8.0	23
4-1-0-0-0-0	1.9	4.5	7.7	11	36
4-1-1-0-0-0	2.4	5.7	10	15	54
4-2-0-0-0-0	2.4	6.0	11	16	61
4-2-1-0-0-0	3.0	7.5	14	22	93
4-3-0-0-0-0	3.0	8.0	15	24	112
4-3-1-0-0-0	3.8	10	20	33	159
4-3-2-0-0-0	4.5	13	25	44	213
4-4-0-0-0-0	3.9	11	23	40	230
4-4-1-0-0-0	4.7	14	31	57	359
4-4-1-1-0-0	5.5	17	40	75	544
4-4-2-0-0-0	5.7	18	43	81	614
4-4-2-1-0-0	6.6	23	55	107	926
4-4-3-0-0-0	6.9	24	60	121	1124
4-4-3-1-0-0	8.1	30	78	165	1593
4-4-3-2-0-0	9.5	38	102	218	2130
4-4-4-0-0-0	8.4	33	91	203	2305
4-4-4-1-0-0	10	43	125	287	3594
4-4-4-1-1-0	12	53	161	380	5469
4-4-4-2-0-0	12	56	172	409	6137
4-4-4-2-1-0	15	70	222	545	9262
4-4-4-3-0-0	14	75	243	611	11239

## ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

No. of positive results at dilution level	Population estimate (tabular MPN)				
	Ratio of the dilution series(A)				
1-2-3-4-5-6	2	3	4	5	10
4-4-4-3-1-0	17	94	319	830	
4-4-4-3-2-0	21	119	417	1113	21297
4-4-4-4-0-0	18	104	374	1035	230545
4-4-4-4-1-0	22	136	519	1465	359439
4-4-4-4-1-1	26	170	669	1992	546920
4-4-4-4-2-0	27	179	719	2109	613730
4-4-4-4-2-1	32	226	938	2813	1123930
4-4-4-4-3-0	33	244	972	3281	1592630
4-4-4-4-3-1	41	313	1272	4375	2129690
4-4-4-4-3-2	50	404	1686	5938	3594390
4-4-4-4-4-0	44	355	1496	5175	5469200
4-4-4-4-4-1	55	485	2072	7177	6137300
4-4-4-4-4-2	73	689	3872	10228	9262000
4-4-4-4-4-3	107	1069	3988	15263	11239300
Confidence factor**	2.00	2.40	2.67	2.88	3.80

\*This is the population density in the original test sample assumes 1-mL inoculation volume.

Table generated using MPNES softwar (Woomer *et al.*,1990)

\*\*The confidence factor is devided into and multiplied by the popuation estimate to establish the lower and upper confidence limits (P = 0.05), respectively. (Afer Cochran, 1950)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	มะลิวัลย์ แซ่ฮ้อย
วัน เดือน ปี เกิด	12 ตุลาคม พ.ศ. 2520
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาและมัธยมปลาย โรงเรียนบางกระพุ่มพิทยาคม จังหวัดพิษณุโลก ปีการศึกษา 2537  สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์ บัณฑิต สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541