ภาคผนวก ก

1. **ค่าการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity)** (Miller, 1959)

สารเคมี

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 mg/ml

ชั่งกลูโคสจำนวน 0.1 g ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ครบ 100 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

2. เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent

ชั่ง 3, 5-Dinitrosalicylic acid จำนวน 10.00 g เติมน้ำกลั่นประมาณ 250 ml คนให้ละลายจากนั้นเติม NaOH จำนวน 10.00 g คนให้ละลายแล้วเติม Na_2SO_4 จำนวน 0.50 g คนให้ละลาย จากนั้นเติม phenol จำนวน 2.00 g (ทำในตู้ดูดควัน) ผสมให้ละลายเข้าด้วยกันใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาและนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารละลาย Potassium Sodium tartrate ความเข้มข้น 40 %

ชั่ง Potassium Sodium tartrate (K-Na tartrate) (Rochelle salt) ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) จำนวน 40.00 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใน volumetric flask เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

4. เตรียมสารละลาย Carboxymethyl cellulose solution (CMC solution)

ชั่ง Carboxymethyl cellulose (CMC) จำนวน 1.00 g ละลายในสารละลาย Phosphate buffer (PB) ความเข้มข้น 0.05 M pH 7 ประมาณ 50 ml นำไปอุ่นจนกระทั่งละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วย PB ให้เป็น 100 ml เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

5. เตรียมสารละลาย Phosphate buffer (PB) ความเข้มข้น 0.05 M pH 7

(Somasegaran and Hoben, 1985)

5.1 เตรียม Stock solution

- A1 Solution 0.2 M ของสารละลาย Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)

ละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ จำนวน 31.43 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml

- B1 Solution 0.2 M ของสารละลาย Dibasic sodium phosphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ จำนวน 52.65 g หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ จำนวน 71.70 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml

5.2 เตรียม Working solution

x ml ของ (A) solution + y ml ของ (B) solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 200 ml

ตาราง การเตรียม working solution ของสารละลาย Phosphate buffer (PB)

A (ml)	B (ml)	pH	A (ml)	B (ml)	pH
42.50	7.50	6.1	16.50	33.50	7.1
40.75	9.25	6.2	14.00	36.00	7.2
38.75	11.25	6.3	11.50	38.50	7.3
36.75	13.25	6.4	9.50	40.50	7.4
34.25	15.75	6.5	8.00	42.00	7.5
31.25	18.75	6.6	6.50	43.50	7.6
28.25	21.75	6.7	5.25	44.75	7.7
25.50	24.50	6.8	4.25	45.75	7.8
22.50	27.50	6.9	3.50	46.50	7.9
19.50	30.50	7.0	2.65	47.35	8.0

วิธีการ

ดูดสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ปริมาตร 0.50 ml ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 1% CMC ใน 0.05 M Phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 0.5 ml เขย่าให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNS reagent ปริมาตร 1.0 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที เติม 40% K-Na tartrate ปริมาตร 1.00 ml และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจะอ่านได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หลังจากลบค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ของหลอดเปรียบเทียบที่ทำการทดลองเหมือนหลอดทดลองตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดเปรียบเทียบ

หลอดที่ 1 : Substrate control (SC) ประกอบด้วย 0.5 ml CMC solution และ 0.5 ml Phosphate buffer

หลอดที่ 2 : Enzyme control (EC) ประกอบด้วย 0.5 ml crude enzyme และ 0.5 ml Phosphate buffer

การทำกราฟมาตรฐานกลูโคสสำหรับหาค่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity)

ปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 0.05 - 1.00 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.05 M Phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 0.05 - 1.00 ml เติม DNS reagent ปริมาตร 1.0 ml เขย่าให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที เติม 40% K-Na tartrate ปริมาตร 1.00 ml และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ดังตาราง 1.2 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ซึ่งจะได้กราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง (รูปที่...) และนำไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ตาราง การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

สารที่ใช้ (ml)	หลอดที่								
	Blank	1	2	3	4	5	6	...	20
สารละลายกลูโคส 1 mg/ml	-	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	...	1.0
Phosphate buffer 0.05 M	1.00	0.95	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	...	-
DNS reagent	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	...	1.0
เขย่าให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C 5 นาที									
40% K-Na tartrate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	...	1.0
ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น ↓ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm									

การคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสตามหลักของ The International Union of Biochemistry

1 Enzyme Unit = 1 μmole ของ substrate ที่ถูกย่อยสลายใน 1 นาที

= 1 μmole ของ glucose ที่ถูกปล่อยใน 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

= 0.180 mg ของ glucose ที่ถูกปล่อยใน 1 นาที

จากปฏิกิริยาระหว่าง crude enzyme จากเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 0.5 ml กับ substrate 1% CMC เป็นเวลา 30 นาที ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ทำปฏิกิริยากับ DNS reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 nm แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (รูปที่...) จะทราบค่าปริมาณน้ำตาลเท่ากับ χ μg/ml

จากการใช้เวลา 30 นาที ทำปฏิกิริยา enzyme ให้น้ำตาลรีดิวซ์ $\chi\mu$g หรือ χ/180 μmole

แสดงว่าการใช้เวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยา enzyme ให้น้ำตาลรีดิวซ์ χ/180/30 μmoleจากการใช้ crude enzyme ปริมาณ 0.5 ml ให้ปริมาณน้ำตาล χ/180/30 μmoleแสดงว่าการใช้ crude enzyme ปริมาณ 1 ml ให้ปริมาณน้ำตาล χ/180/30/0.5 μmole

Cellulase activity เท่ากับ χ/180/30/0.5 Unit/ml

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลาย BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 500 μg/ml

ชั่ง BSA จำนวน 5 mg ละลายในสารละลาย 0.85 % NaCl แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ด้วย 0.85 % NaCl ให้ครบ 10 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

2. เตรียมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 %

ชั่ง NaCl จำนวน 8.50 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 20 นาที และปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ใน volumetric flask เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N

ชั่ง NaOH จำนวน 40.00 g คนให้ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

4. เตรียมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N

ผสมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ml ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

5. เตรียมสารละลาย Phenol reagent (Folin Ciocalteau) ความเข้มข้น 1 N ผสมสารละลาย Folin Ciocalteau และน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในอัตรา1:1 (ผสมแล้วใช้ทันทีในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง)

6. เตรียมสารละลาย C Solution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1 เตรียม Stock solution

- A1 Solution : เตรียมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 % ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N โดยละลาย Na_2CO_3 จำนวน 10.00 g ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N และปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น
- B1 Solution : เตรียมสารละลาย Potassium Sodium tartrate ความเข้มข้น 2% โดยชั่ง Potassium Sodium tartrate (K-Na tartrate) (Rochelle salt) ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) จำนวน 10.00 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น
- B2 Solution : เตรียมสารละลาย $Cu_4SO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 2% โดยชั่ง $Cu_4SO_4.5H_2O$ จำนวน 5.00 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

6.2 เตรียม C Solution (Working solution)

49.00 ml A solution + 0.50 ml B1 solution + 0.50 ml B2 solution

(ผสมแล้วใช้ทันทีในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง)

วิธีการ

ดูดสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ปริมาตร 0.10 ml ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย C Solution ปริมาตร 5.00 ml ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Phenol reagent ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm

ปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจะอ่านได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย Bovine serum albumin (BSA)

การทำกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA (bovine serum albumin)

ปิเปตสารละลาย BSA ความเข้มข้น 500 μg/ml ปริมาตร 0.01 - 1.00 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 0.01 - 1.00 ml เติมสารละลาย C Solution ปริมาตร 5.00 ml ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Phenol reagent ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ดังตาราง 2.1 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ซึ่งจะได้กราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง (รูปที่---) และนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นเพื่อหาค่าการทำงานเฉพาะของเอนไซม์ (specific activity)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

สารที่ใช้ (ml)	หลอดที่							
	Blank	1	2	3	4	5	...	10
สารละลาย BSA 500 µg/ml	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	...	1.0
น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	...	-
C Solution	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	...	5.0
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที								
สารละลาย D	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	...	0.5
เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ↓ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm								

การวิเคราะห์สมบัติของดิน

pH ดิน (เนาวรัตน์, 2527)

ชั่งดินจำนวน 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่น 20 มล. ใช้อัตราส่วนของดินต่อน้ำเป็น 1:1 คนให้เข้ากันโดยคน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัด pH โดยใช้ pH-meter

อนินทรีย์ไนโตรเจน (Mulvaney, 1996)

อนินทรีย์-N จะมีอยู่ในดินด้วยกัน 2 รูป คือ NH_4-N และ NO_2+ NO_3-N ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์หาดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย KCl 2 N.

ชั่ง KCl จำนวน 149.2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่น 300 มล. ละลาย KCl ให้หมดใส่ volumetric flask ขนาด 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียม MgO

ชั่ง MgO(heavy powder)เผาไล่ CO_2 โดยใช้เตาเผาที่อุณหภูมิ 600-700°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บไว้ในโถแก้วที่บรรจุ KOH เพื่อกันการดูด CO_2 จากอากาศ

3. การเตรียมสารละลาย 2% boric acid-indicator(2% H_3BO_3)

ชั่ง H_3BO_3 จำนวน 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่นจำนวน 200 มล. นำไปอุ่นเพื่อให้ H_3BO_3 ละลายจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 600 มล. ปล่อยไว้ให้เย็น เติม mixed

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

indicator (metylred 0.0660 g. และ bromcresol green 0.0990 g. ละลายใน ethanol จำนวน 100 ml.) จำนวน 20 มล. ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 โดยใช้ NaOH 0.1 N หรือ HCL 0.1 N จะได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงแดง ทดสอบว่าสีของสารละลายใช้ได้หรือไม่ โดยการนำสารละลาย boric acid-indicator มาจำนวน 10 มล. ใส่ในกระบอกตวงแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจำนวน 10 มล. สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียวทันที แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.(เนาวรัตน์,2527)

4. หาปริมาณ Mineralizable-N ในรูปของ NH_4-N และ NO_2+ NO_3-N ในตัวอย่างดิน

ชั่งดินจำนวน 10 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. เติม KCl 2 N. จำนวน 100 มล. ปิดจุกเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นหาอนินทรีย์-N โดยวิธี Magesium oxide-Devada alloy method แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ Inorganic-N ดังสมการ

$$NH_4\text{-}N\ /NO_2^{+}\ NO_3\text{-}N\ (ppm) = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times V_d \times 10^6}{1{,}000 \times V_a \times W}$$

เมื่อ V_s : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มล.)

V_b : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรท blank (มล.)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มล.)

V_d : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการสกัด (มล.)

N : ความเข้มข้นของ standard H_2SO_4 เท่ากับ 0.05 N.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 10 กรัม

ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถเป็นประโยชน์ได้ (available-P) (Houba *et al.*, 1988b)

1. เตรียมสารละลาย Bray II

ชั่ง NH_4F จำนวน 1.11 กรัม ปรับปริมาตรด้วย HCl 0.1 N (เตรียมได้จาก conc.HCl 8.28 มล. นำมาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.) จนได้ปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วย volumetric flask ขนาด 1,000 มล.

2. เตรียมสารละลาย Reagent A

ชั่ง Ammonium molybdate จำนวน 12.00 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มล. นำไปอุ่นจนกระทั่งละลาย จะได้สารละลาย (a) สำหรับสารละลาย (b) เตรียมได้จากการชั่ง antimony potassium tartrate ($KSbO.C_4H_4O_6$) จำนวน 0.2908 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. หลังจากนั้นผสมสารละลาย (a) และสารละลาย (b) เข้าด้วยกันใน volumetric flask ขนาด 2,000 มล. เติม H_2SO_4 5 N (เตรียมได้จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

conc.H_2SO_4 จำนวน 141 มล. หรือ 98% H_2SO_4 จำนวน 136.24 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.) จำนวน 1,000 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลและนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารละลาย Reagent B

ชั่ง Ascorbic acid จำนวน 1.056 กรัม เติมสารละลาย Reagent A. จำนวน 200 มล. ซึ่ง Reagent B. นี้จะมีอายุการใช้งานไม่เกิน 24 ชั่วโมง

4. เตรียมสารละลาย standard curve-P ที่มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูดสารละลาย standard-P 100 ppm. จำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล. ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติมสารละลาย Reagent B จำนวน 4 มล. และเติมสารละลาย Bray II จำนวน 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสง (% Tranmittance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 *nm* บันทึกผล

5. หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ในดิน

ชั่งดิน 2.5 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มล. ดูดสารละลาย Bray II เติมลงไปแล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 1 มล. (ตามความเข้มข้นตัวอย่าง แต่เมื่อปรับปริมาณแล้วต้องมีความเข้มข้นไม่เกินความเข้มข้นของ standrad) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มล.ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วดูดมาจำนวน 1 มล.ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติมสารละลาย Reagent B. จำนวน 4 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสงเช่นเดียวกับ standard curve-P ในข้อที่ 4 นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสจากสมการ

$$P(\%) = \frac{C \times V_f \times V_e \times 100}{10^6 \times V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ Std. Curve-P (ppm)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_e : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดินเท่ากับ 25 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 25 มล.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 2.5 กรัม

ปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ (exchangeable-K) (Helkme และ Sparke, 1996)

1. เตรียมสารละลาย Ammonium acetate (NH_4OAc) 1 N pH 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่ง NH_4Oac จำนวน 77.08 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำกลั่น 800 มล. แล้วนำไปวัด pH และปรับ pH ให้เป็น 7 โดยใช้ NH_3-solution หรือ acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียม standard curve ให้มีความเข้มข้นของ K เป็น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm.

ใช้ volumetric pipette ดูด standard-K 5ppm. มาจำนวน 0 1 2 3 4 และ 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล. เติม NH_4Oac 1 N pH 7 จำนวน 20 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง flame photometer

3. หาปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยน (exchangeable-K) ได้ในดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 4 กรัม ใส่ในหลอดเขย่าดิน เติมสารละลาย NH_4Oac 1 N pH 7 จำนวน 40 มล. เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 หลังจากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 5 มล. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer เช่นเดียวกับข้อ 2 บันทึกผลแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ดังสมการ

$$K(ppm) = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ std.curve-K(ppm.)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 มล.

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 40 มล.

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 5 มล.

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 4 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ANOVA ของปริมาณ inorganic N ในดินสันทรายที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ และใส่ตะกอนบ่อบำบัด และขี้เลื่อยที่เหลือใช้จากการเพาะเห็ด เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	1,906.07 **	2,931.45 **
ของเหลือใช้ (W)	2	5,432.32 **	32,315.83 **
MxW	4	603.80 **	462.57 *
Error	18	28.68	77.40

ตารางภาคผนวกที่ 2 ANOVA ของปริมาณ inorganic N ในดินสันทรายที่ฆ่าเชื้อ และใส่ตะกอนบ่อบำบัดและขี้เลื่อยที่เหลือใช้จากการเพาะเห็ด เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	21,782.33 **	8,798.34 **
ของเหลือใช้ (W)	2	670.83 **	8,861.72 **
MxW	4	61.86	552.24
Error	18	66.39	1,042.70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 3 ANOVA ของปริมาณ inorganic N ในดินแม่เหียะที่ฆ่าเชื้อ และใส่ตะกอนบ่อบำบัดและขี้เลื่อยที่เหลือใช้จากการเพาะเห็ด เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	24,646.60 **	16,720.67 **
ของเหลือใช้ (W)	2	1,721.28 **	1,104.26 **
MxW	4	2,309.58 **	196.87
Error	18	165.31	126.22

ตารางภาคผนวกที่ 4 ANOVA ของปริมาณ inorganic N ในดินแม่เหียะที่ไม่ฆ่าเชื้อ และใส่ตะกอนบ่อบำบัดและขี้เลื่อยที่เหลือใช้จากการเพาะเห็ด เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	5,062.67 **	5,951.44 **
ของเหลือใช้ (W)	2	7,188.26 **	11,513.30 **
MxW	4	808.48	382.68
Error	18	76.16	738.64

ตารางภาคผนวกที่ 5 ANOVA ของปริมาณ available P ในดินสันทรายที่ไม่ฆ่าเชื้อ และใส่ filter cake เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	30,953.17 **	2,576.89 *
ของเหลือใช้ (W)	1	10,3816.06 **	40,422.72 **
MxW	2	1,020.39 **	368.22
Error	12	50.61	566.06

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 6 ANOVA ของปริมาณ available P ในดินสันทรายที่ฆ่าเชื้อ และใส่ filter cake เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	76.06	36,100.67 **
ของเหลือใช้ (W)	1	118,909.39 **	120,050.00 **
MxW	2	1.39	578.67
Error	12	153.22	342.44

ตารางภาคผนวกที่ 7 ANOVA ของปริมาณ available P ในดินแม่เหียะที่ไม่ฆ่าเชื้อ และใส่ filter cake เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	23,776.60 **	17,640.72 **
ของเหลือใช้ (W)	1	3,200.00 **	1,549.39 **
MxW	2	927.17 **	317.72 *
Error	12	26.89	42.72

ตารางภาคผนวกที่ 8 ANOVA ของปริมาณ available P ในดินแม่เหียะที่ฆ่าเชื้อ และใส่ filter cake เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	37,029.50 **	22,157.17 **
ของเหลือใช้ (W)	1	1,922.00 **	982.72 **
MxW	2	141.50	73.39
Error	12	123.50	47.89

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 9 ANOVA ของปริมาณ exchangeable K ในดินสันทรายที่ไม่ฆ่าเชื้อ และใส่ใบยาสูบ เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	9,603.17 **	11,323.56 **
ของเหลือใช้ (W)	1	244,067.56 **	165,888.00 **
MxW	2	1,604.06 *	422.00
Error	12	389.83	296.67

ตารางภาคผนวกที่ 10 ANOVA ของปริมาณ exchangeable K ในดินสันทรายที่ฆ่าเชื้อ และใส่ใบยาสูบ เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	13,956.72	28,985.06
ของเหลือใช้ (W)	1	183,214.22	201,824.22
MxW	2	9,977.72	1,248.72
Error	12	4,174.78	221.39

ตารางภาคผนวกที่ 11 ANOVA ของปริมาณ exchangeable K ในดินแม่เหียะที่ไม่ฆ่าเชื้อ และใส่ใบยาสูบ เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	41,878.50 **	49,669.44 **
ของเหลือใช้ (W)	1	119,560.50 **	218,240.22 **
MxW	2	747.67	360.11
Error	12	1,806.72	8,464.67

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 12 ANOVA ของปริมาณ exchangeable K ในดินแม่เหียะที่ฆ่าเชื้อ และใส่ใบยาสูบ เมื่อบ่มดินครบ 1 และ 2 เดือน

SOV	Df	MS	
		1 เดือน	2 เดือน
จุลินทรีย์ (M)	2	37,117.17	19,116.67
ของเหลือใช้ (W)	1	214,076.06	168,974.22
MxW	2	3675.39	505.56
Error	12	1,054.28	878.94

ตารางภาคผนวกที่ 13 ANOVA ของ cellulose activity ของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส

SOV	Df	MS
Isolate	4	0.013 **
Error	160	0.001

ตารางภาคผนวกที่ 14 ANOVA ของ cellulose activity ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ย่อยสลายเซลลูโลส

SOV	Df	MS
Isolate	6	0.003 **
Error	161	0.001

ตารางที่ภาคผนวกที่ 15 ANOVA ของ CZ ต่อ CL ของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส

SOV	Df	MS
Isolate	4	224.99 **
Error	10	0.80

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 16 ANOVA ของ CZ ต่อ CL ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ย่อยสลายเซลลูโลส

SOV	Df	MS
Isolate	6	54.86 **
Error	14	1.00

ตารางภาคผนวกที่17 ANOVA ของ inhibiting zone ของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช

SOV	df	MS		
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
		เชื้อ Fusarium		
Isolate	6	28.44 **	38.63 **	
Error	14	0.14	0.17	
		เชื้อ Collectotrichum		
Isolate	6	12.409 **	19.440 **	20.885 **
Error	14	0.036	0.476	0.357
		เชื้อ Sclerotium		
Isolate	6	0.663 **	0.90 **	1.08 **
Error	14	0.024	0.02	0.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 18 ANOVA ของ inhibiting zone ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช

SOV	df	MS		
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
		เชื้อ Fusarium		
Isolate	4	13.375 **	29.725	25.183 **
Error	10	0.033	0.183	0.100
		เชื้อ Collectotrichum		
Isolate	4	6.600 **	22.140 **	25.520 **
Error	10	0.133	0.160	0.120
		เชื้อ Rhizoctonia		
Isolate	4	12.317 **	16.6 **	16.43 **
Error	10	0.133	0.16	0.12
		เชื้อ Sclerotium		
Isolate	4	0.663 **	0.90 **	1.08 **
Error	10	0.024	0.02	0.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวนันพนา จันทร์แก้ว

วัน เดือน ปี เกิด 30 ธันวาคม 2522

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย
โรงเรียนดาราวิทยาลัย จ.เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)
สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved