ภาคผนวก ก

1. สมบัติบางประการของดิน

1.1 pH ดิน (เนาวรัตน์, 2527)

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

1.2 อินทรีย์วัตถุในดิน(organic matter) (Nelson และ Sommers, 1996)

สารเคมี

1. standard 1 N potassium dichromate
   ละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 49.04 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 L
2. 0.5 N Ferrous sulphate
   ละลาย $FeSO_4.7H_2O$ 140 g ในน้ำกลั่นประมาณ 800 ml แล้วเติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 40 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 L
3. o – phenanthroline ferrous complex
   ละลาย o – phenanthroline ferrous 0.74 g และ ferrous sulphate 0.35 g ในน้ำกลั่น 50 ml
4. H_2SO_4 98 %

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรง 0.5 ml จำนวน 0.5 g ใส่ Erlenmeyer flask 250 ml เติม $K_2Cr_2O_7$ 1 N. จำนวน 10 ml โดยใช้ volumetric pipette เขย่า flask เบาๆเพื่อให้น้ำยากับตัวอย่างดินผสมเข้ากัน ใส่ H_2SO_4 จำนวน 20 ml (รินกรดใส่ทีละน้อยเพื่อป้องกันการกระเด็นของอนุภาคดิน ควรเติมกรดในตู้ควัน) ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 ml หยด O-phenanthroline ferrous complex ประมาณ 5 - 6 หยด แล้วนำมาไตเตรททันทีกับ 0.5 N standard Ferrous sulfate จดปริมาตร Ferrous sulfate ที่ใช้ในแต่ละตัวอย่าง end point ของ suspension จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หาความเข้มข้นที่แท้จริงของ ferrous sulfate โดยการทำ blank คือการใช้ volumetric pipette 10 ml ดูด $K_2Cr_2O_7$ 1 N จำนวน 10 ml ใส่ Erlenmeyer flask 250 ml ใส่กรด H_2SO_4 จำนวน 20 ml ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 ml นำไปไตเตรทกับ ferrous sulfate โดยใช้ diphenylamine หรือ O-phenanthroline เป็น indicator เช่นเดียวกับตัวอย่าง จดปริมาตร ferrous sulfate ที่ใช้กับ blank end point ของ suspension จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้

V_1 = ปริมาตรของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้

N_2 = ความเข้มข้นของ Fe_2SO_4 ที่ใช้

V_2 = ปริมาตรของ Fe_2SO_4 ที่ใช้

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

M = ปริมาตร Fe_2SO_4 ที่ไตเตรทได้ (ml)

W = น้ำหนักดิน (g)

1.3 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ (available-P) (Houba *et* al, 1988b)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลาย Bray II

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

2. เตรียมสารละลาย Reagent A

ชั่ง Ammonium molybdate จำนวน 12.00 g เติมน้ำกลั่น 250 ml นำไปอุ่นจนกระทั่งละลาย จะได้สารละลาย (a) สำหรับสารละลาย (b) เตรียมได้จากการชั่ง antimony potassium tartrate ($KSbO.C_4H_4O_6$) จำนวน 0.2908 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml หลังจากนั้นผสมสารละลาย (a) และสารละลาย (b) เข้าด้วยกันใน volumetric flask ขนาด 2,000 ml เติม 5 N H_2SO_4 (เตรียมได้จาก conc.H_2SO_4 จำนวน 141 ml หรือ 98% H_2SO_4 จำนวน 136.24 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1,000 ml) จำนวน 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลและนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารละลาย Reagent B

ชั่ง Ascorbic acid จำนวน 1.056 g เติมสารละลาย Reagent A. จำนวน 200 ml ซึ่ง Reagent B. นี้จะมีอายุการใช้งานไม่เกิน 24 ชั่วโมง

4. เตรียมสารละลาย standard curve-P ที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 μg/ml

ใช้ volumetric pipette ดูดสารละลาย standard-P 100 μg/ml จำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติมสารละลาย Reagent B จำนวน 4 ml และเติมสารละลาย Bray II จำนวน 5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสง (% Transmittance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 nm บันทึกผล

วิธีการ

ชั่งดิน 2.5 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 ml ดูดสารละลาย Bray II เติมลงไปแล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วดูดมาจำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติมสารละลาย Reagent B. จำนวน 4 ml 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 standard curve-P (μg/ml)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 ml

V_e : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดินเท่ากับ 25 ml

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 25 ml

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 2.5 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 ปริมาณโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ (exchangeable-K) (Helkme และ Sparke, 1996)

สารเคมี

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

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

2. เตรียม standard curve ให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมเป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 μg/ml

ใช้ volumetric pipette ดูด standard-K 5 μg/ml มาจำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม 1 N NH_4Oac pH 7 จำนวน 20 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง flame photometer

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างดิน 4 กรัม ใส่ในหลอดเขย่าดิน เติมสารละลาย 1 N NH_4Oac pH 7 จำนวน 40 ml เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 หลังจากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml 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 standard curve-K(μg/ml)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 25 ml

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเท่ากับ 40 ml

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ เท่ากับ 5 ml

W : น้ำหนักดินแห้งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดินชื้น 4 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์หาสมบัติบางประการของพืช

2.1 คุณภาพความหวาน

คั้นน้ำสตรอเบอรี่จากผลแล้วหาความหวานด้วย Hand refract meter หน่วยวัดที่ได้เป็นองศาบริกซ์ (^{o}Brix)

2.2 การย่อยตัวอย่างพืช (สุพัตรา, 2545)

นำตัวอย่างพืชทั้งต้นหรือใบอบที่อุณหภูมิ 68 ^{0}C จนแห้งแล้วนำไปบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 0.5000 g ใส่ในหลอดย่อยขนาดความจุ 112 ml เติมกรดย่อย 7 ml (กรดย่อยเตรียมจากการละลาย Na_2SO_4 100 g กับผง selenium 1 g ในกรดซัลฟิวลิก (H_2SO_4) ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกให้ครบ 1 L) แล้วทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำไปย่อยด้วย digestion block ให้ความร้อนแก่ตัวอย่างพืชจนถึงที่อุณหภูมิประมาณ 400 ^{0}C เมื่อเปลี่ยนเป็นสารละลายใสจึงปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ขนาด 100 ml จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารต่อไป

2.3 การหาไนโตรเจนทั้งหมด (total-N) (Bremner,1996)

สารเคมี

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

ชั่ง H_3BO_3 จำนวน 20 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml เติมน้ำกลั่นจำนวน 200 ml นำไปอุ่นเพื่อให้ H_3BO_3 ละลายจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 600 ml ปล่อยไว้ให้เย็น เติม mixed indicator (metylred 0.0660 g และ bromcresol green 0.0990 g ละลายใน ethanol จำนวน 100 ml) จำนวน 20 ml ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 โดยใช้ 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N HCL จะได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงแดง ทดสอบว่าสีของสารละลายใช้ได้หรือไม่ โดยการนำสารละลาย boric acid-indicator มาจำนวน 10 ml ใส่ในกระบอกตวงแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจำนวน 10 ml สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียวทันที แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml (เนาวรัตน์,2527)

2. การเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 40 %

ละลาย NaOH 400 g ในน้ำกลั่น 1 L (ทำในตู้ดูดควัน)

3. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น (H_2SO_4 conc.) 0.05 N

ละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 20 ml ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 L หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยมีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1) ชั่ง Na_2CO_3 0.0500 g (ชั่งอบ 105 ^{0}C 2 ชั่วโมง)
2) ใส่น้ำกลั่น 20 ml เขย่าให้ละลาย
3) เติม mixed indicator (0.1% metylred และ 0.15% bromcresol green อัตราส่วน 1 : 1 2 – 3 หยด
4) ไตเตรทกับ H_2SO_4 ที่เตรียมจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู
5) ต้มบน hot plate ประมาณ 2 นาที จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเดิม (สีเขียว)
6) ไตเตรทต่อจนเปลี่ยนเป็นสีชมพู
7) คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน

$$H_2SO_4 = \frac{\text{น้ำหนักของ } Na_2CO_3 \text{ x } 1000 \text{ x } 2}{105.99 \text{ x ปริมาตรของ } H_2SO_4}$$

$$= \frac{18.8697 \text{ x น้ำหนักของ } Na_2CO_3}{\text{ปริมาตรของ } H_2SO_4}$$

วิธีการ

การกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Beremner,1996) ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 ml ดูดสารละลายที่ย่อยได้นำมาใส่ในหลอดกลั่นของเครื่องกลั่นไนโตรเจน เติม 40% NaOH 20 ml รองรับของเหลวที่ได้รับจากการกลั่น ประมาณ 75 ml นำ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml ที่มี boric acid-indicator บรรจุอยู่เป็นจำนวน 15 ml มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ Erlenmeyer flask ที่บรรจุสารละลายที่ได้ซึ่งมีสีเขียวใสมาไตเตรทกับ standard 0.05 N H_2SO_4 จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรทและนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสมการ

$$\text{Total-N(\%)} = \frac{(V_s - V_b) \text{ x } N \text{ x } 14 \text{ x } V_d \text{ x } 100}{1000 \text{ x } V_a \text{ x } W}$$

เมื่อ V_s : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V_b : ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

N : ความเข้มข้นของ standard H_2SO_4 (0.05 N)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (ml)

V_d : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย (ml)

W : น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์ (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด(total-P) (ศรีสม,2544)

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Mixed reagent

ละลาย ammonium vanadate 1.25 g ในน้ำกลั่นอุ่นจำนวน 200 ml เติม HNO_3 (s.p.= 1.42) ปริมาตร 158.42 ml เขย่าให้เข้ากันจะได้เป็นสารละลาย ก. สำหรับสารละลาย ข. ได้จากการละลาย ammonium molybdate tetra hydrate จำนวน 25.00 g ในน้ำกลั่นอุ่น 300 ml หลังจากนั้นผสมสารละลาย ก และสารละลาย ข เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml โดยใช้ volumetric flask

2. การเตรียม standard-P 100 μg/ml

ชั่ง potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.4390 g ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม standard curve ให้มีความเข้มข้นของ P เป็น 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 μg/ml

ใช้ volumetric pipette ดูด standard-P 100 μg/ml มาจำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ตามลำดับใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม mixed reagent ลงไปปริมาตร 5 ml หลังจากนั้นเติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1.88 M จำนวน 2 ml ปรับปริมาตรเป็น 25 ml โดยน้ำกลั่น เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นค่าการส่องผ่านของแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 470 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าที่อ่านได้โดยใช้กราฟ

วิธีการ

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย จำนวน 5 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม mixed reagent จำนวน 5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเหมือนกับ standard curve ในข้อ 3 เทียบค่าความเข้มข้นของตัวอย่างกับ standard curve แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างจากสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{Total-P (\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{10^6 \times V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve-P(μg/ml)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์ (ml)

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย (ml)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (ml)

W : น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์ (g)

2.5 การหาปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด (total-K) (Helkme และ Sparke,1996)

สารเคมี

1. การเตรียม standard-K 1,000 μg/ml

ละลาย KCl บริสุทธิ์ (อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) จำนวน 0.9533 g ใน volumetric flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียม standar-K 100 μg/ml

ดูด standard-K 1,000 μg/ml จำนวน 10 ml โดยใช้ vilumetric pipette ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม standard curve ให้มีความเข้มข้นของ K เป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 μg/ml

ใช้ volumetric pipette ดูด standar-K 100 μg/ml มาจำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ใส่ใน volumetric ขนาด 100 ml เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1.88 M จำนวน 2 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 nm ที่ slit width เท่ากับ 0.7 และที่ energy อยู่ในช่วง 66-70

วิธีการ

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย จำนวน 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปอ่านด้วยเครื่อง Flame photometer เหมือนกับ standard curve แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ K ดังสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{Total-K (\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{V_a \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve-K(μg/ml)

V_f : ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์ (ml)

V_d : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย (ml)

V_a : ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (ml)

W : น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์ (g)

3. การหาปริมาณและกิจกรรมของเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ silicate bacteria (Hebei Academy of Science, 1996)

สูตรอาหาร

1) yeast extract 0.5 g
2) $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g
3) sucrose 5 กรัม, $CaCO_3$ 0.1 g
4) Na_2HPO_4 2 g
5) $FeCl_3.6H_2O$ 0.005 g
6) KH_2PO_4 2 g หรือ feldspar 3 g

   (ในการทดลองจะชั่ง feldspar 0.045 g ใส่ flask ขนาด 50 ml แยกไว้จะไม่ผสมกับอาหาร)
7) ปรับ pH เป็น 7.0$\pm$0.2
8) agar 15 g
9) ผสมสี Bromthymol blue 5 ml

   (ใช้ Bromthymol blue 0.5 g ละลายใน ethanol 50 ml)

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นควรปรับ pH และปรับปริมาตรเป็น 1 L ให้เรียบร้อยก่อนที่จะใส่วุ้นแล้วจึงนำไปต้มให้วุ้นละลาย เทอาหารใส่ flask ขนาด 50 ml จำนวน 15 ml ที่มีแร่ feldspar ใส่เตรียมไว้ ปิดจุกให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ภายใต้ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปเทใส่จานเพาะเชื้อ ที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 180 ^{0}C นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 1 flask ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ

2.3 การวิเคราะห์ซิลิกอนในอาหารเหลว

การหาซิลิกอนโดยวิธี yellow silicomolybdic acid (Govett, 1961 อ้างโดย Jones และคณะ. 1996) โดยใช้ Light absorption spectrometry ใช้กับสารละลายที่มี Si 2 – 8 μg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี

1. 0.3 M Ammonium molybdate tetrahydrate [$(NH_4)_6MO_7O_{27}.4H_2O$]

ชั่ง ammonium molybdate tetrahydrate 54 g ละลายในน้ำกลั่น 750 ml ปรับ pH ≤ 7 ด้วย 5 M NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L แล้วเก็บในขวดพลาสติก

2. Tartaric acid ($C_4H_6O_6$) 20 %

ชั่ง tartaric acid 100 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 ml แล้วเก็บในขวดพลาสติก

3. Reducing agent

ชั่ง sodium bisulfate ($NaHSO_3$) 25 g ละลายในน้ำ 200 ml และชั่ง 4-sulfonic acid [$NH_2C_{10}H_5(OH)SO_3H$] 0.4 g ละลายในน้ำ 25 ml แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 250 ml และเก็บใส่ขวดพลาสติกไว้ในตู้เย็น

5. 0.5 M H_2SO_4 500 ml

4. Standard silicon 50 μg/ml 100 ml

ใช้ stock standard Si 1000 μg/ml ดูดสารละลายมา 5 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ volumetric flask

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ silicate bacteria ที่ใส่แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าลงไปแทน KH_2PO_4ใส่ falsk ขนาด 50 ml ปริมาณ 25 ml นำ stock เชื้อที่เลี้ยงไว้ ดูดใส่ 1 ml แล้วเลี้ยงไว้ประมาณ 9 วัน เมื่อครบ 9 วัน นำมา drop plate แล้ว centrifuge โดยใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หา Si ต่อไป

2. ดูดสารละลายใสจากตัวอย่างมา 1 ml ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml

2.1 เติม 0.5 M H_2SO_4 2 ml

2.2 เติม 0.3 M ammonium molybdate tetrahydrate 2 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2 นาที

2.3 เติม tartaric acid 2 ml เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 10 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยต้องทำการวัดระหว่าง 2 ถึง 10 นาที หลังจากใส่ ammonium molybdate tetrahydrate

3. เตรียม standard Si ให้มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 μg/ml โดยดูดจาก standard Si 50 μg/ml จำนวน 0, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 ml ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ silicate bacteria ที่ไม่ใส่แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าลงไป 1 ml แล้วดำเนินการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1 – 2.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เข้าสมการ Linear regression จะได้ปริมาณ Si ในหน่วย μg/ml ให้คำนวณดังนี้

$$\text{Si ในตัวอย่าง } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Si จากกราฟ } (\mu\text{g/ml})}{\text{ปริมาตรสารละลายที่ดูด (ml)}} \times 10 \text{ (ml)}$$

2.4 การวิเคราะห์ Indole-3-acetic acid (IAA) (Gordon และคณะ, 1951)

สารเคมี

1. salkovskii reagent (ใช้สำหรับพัฒนาสี)
   0.5 M $FeCl_3$ 1 ml
   35% $HClO_4$ 50 ml
2. standard Indole – 3 – acetic acid (IAA)

เตรียม standard IAA (MW = 175.19) 10 mM เตรียมโดยละลาย IAA ใน 50 % methanol ทำให้เจือจางเป็น 1 mM ด้วย 50 % methanol เตรียม standard ความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 μM โดยใช้ IAA 1 mM ที่เตรียมไว้ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ tryptophan เพื่อปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นของ standard ให้เป็น 1 ml

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ silicate bacteria ที่ใส่แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าลงไปแทน KH_2PO_4 โดยต้องใส่ tryptophan 0.102 g/L แล้วดูดมาใส่ falsk ขนาด 50 ml ปริมาณ 25 ml ต่อจากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธ์ที่คัดเลือกไว้มา 1 loop ใส่ลงไป แล้วเลี้ยงไว้ประมาณ 2 วัน เมื่อครบ 2 วัน นำมา drop plate แล้ว centrifuge โดยใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หา IAA
2. ดูดสารละลายใสจากตัวอย่างมา 1 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent 2 ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที 30 ^{0}C จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm
3. เตรียม standard IAA

No.	1 mM IAA (μL)	medium (μL)	ความเข้มข้น (μM/L)
1	0	1000	0
2	10	990	10
3	20	980	20
4	50	950	50
5	100	900	100
6	150	850	150

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้ standard แต่ละความเข้มข้น 1 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent 2 ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที 30 ^{0}C จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm

การคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เข้าสมการ Linear regression จะได้ปริมาณ IAA ในหน่วย μmol/L

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อจำนวนใบและขนาดของทรงพุ่มของสตรอเบอรี่ที่ระยะ 54 วัน หลังการย้ายปลูก

SOV	df	MS	
		จำนวนใบ (จำนวน ใบ/ต้น)	ขนาดทรงพุ่ม (cm)
Treatment	2	148.44	50.520
Replication	24	118.01	29.736
Error	48	59.384	14.659
Total	74		

ตารางผนวกที่ 2 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อจำนวนดอกของ สตรอเบอรี่ ในระยะ 47 และ 76 วัน หลังการย้ายปลูก (จำนวนดอก/ต้น)

SOV	df	MS	
		ระยะ 47 วัน	ระยะ 76 วัน
Treatment	2	13.453	256.49
Replication	24	4.1389	40.114
Error	48	2.5922	22.646
Total	74		

ตารางผนวกที่ 3 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อจำนวนผลของ สตรอเบอรี่ ในระยะ 47 และ 76 วัน หลังการย้ายปลูก (จำนวนผล/ต้น)

SOV	df	MS	
		ระยะ 47 วัน	ระยะ 76 วัน
Treatment	2	9.6756	329.08
Replication	24	8.4933	19.924
Error	48	18.049	21.024
Total	74		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางผนวกที่ 4 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อน้ำหนักผลสด (g) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total water soluble solid, TSS) ในผล (^{0}Brix) และน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน (g) ที่ระยะ 76 วัน หลังการย้ายปลูก

SOV	df	MS		
		น้ำหนักผลสด (g)	ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (^{0}Brix)	น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน (g)
Treatment	2	8532.6	2.4304	32.088
Replication	10	2616.6	6.2046	13.281
Error	20	808.23	2.1450	13.302
Total	32			

ตารางผนวกที่ 5 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อความเข้มข้นของ N, P และ K ในใบอ่อนที่คลี่เต็มที่ (young fully expended leaves, YFL) ที่ระยะ 76 วันหลังการย้ายปลูก

SOV	df	MS		
		% N	% P	% K
Treatment	2	0.11115	0.0018136	0.021123
Replication	10	0.053596	0.0041576	0.0096939
Error	20	0.04717	0.0013266	0.017363
Total	32			

ตารางผนวกที่ 6 Analysis of variance การใส่หัวเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อ N, P และ K ที่สะสมในส่วนเหนือดินที่ระยะ 76 วันหลังการย้ายปลูก

SOV	df	MS		
		N uptake (g/plant)	P uptake (g/plant)	K uptake (g/plant)
Treatment	2	0.06785	0.00009494	0.015876
Replication	10	0.006253	0.00009416	0.0040606
Error	20	0.01149	0.00010064	0.0040324
Total	32			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางผนวกที่ 7 Analysis of variance การใส่เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียลงในอาหารเหลวที่ใช้ แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าต่อปริมาณเซลล์ของซิลิเกตแบคทีเรียในอาหารเหลวหลังการใส่เชื้อลงในอาหารเหลวครบ 3, 6 และ 9 วัน (log cfu/ml)

SOV	df	MS			
		เฟลด์สปาร์เชอร์มาท	เฟลด์สปาร์ลำปาง	ไมก้า 1	ไมก้า 2
ระยะ 3 วัน					
Treatment	6	1.3361	0.86043	2.2185	1.4344
Replication	2	2.3054	0.47067	0.14091	0.17896
Error	12	0.15161	0.41978	0.38081	0.47981
Total	20				
ระยะ 6 วัน					
Treatment	6	1.4107	0.51208	1.7312	0.65150
Replication	2	1.2873	0.26389	0.081672	0.52337
Error	12	0.15961	0.59477	0.32459	0.24421
Total	20				
ระยะ 9 วัน					
Treatment	6	0.78104	0.72603	2.3856	1.1103
Replication	2	0.15136	0.47801	0.30149	1.2155
Error	12	0.13005	0.16542	0.080662	0.45209
Total	20				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางผนวกที่ 8 Analysis of variance การใส่เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียลงในอาหารเหลวที่ใช้ แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าต่อ pH ของอาหารเหลวหลังการใส่เชื้อลงในอาหารเหลวครบ 3, 6 และ 9 วัน

SOV	df	MS			
		เฟลด์สปาร์เซอร์มาท	เฟลด์สปาร์ลำปาง	ไมก้า 1	ไมก้า 2
ระยะ 3 วัน					
Treatment	6	3.4768	3.9476	3.5437	3.5310
Replication	2	0.0025583	0.010644	0.016748	0.0011893
Error	12	0.0025889	0.0099968	0.0061171	0.0077115
Total	20				
ระยะ 6 วัน					
Treatment	6	3.7086	3.5416	3.6321	3.6721
Replication	2	0.016129	0.022171	0.046671	0.0025762
Error	12	0.0087563	0.030210	0.017616	0.0030206
Total	20				
ระยะ 9 วัน					
Treatment	6	3.3619	3.2204	3.5492	3.5967
Replication	2	0.032919	0.0076762	0.012282	0.046071
Error	12	0.015158	0.011751	0.016624	0.013894
Total	20				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางผนวกที่ 9 Analysis of variance การใส่เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียลงในอาหารเหลวที่ใช้ แร่เฟลด์สปาร์และไมก้าต่อปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดที่ละลายได้ในอาหารเหลวหลังการใส่เชื้อลงในอาหารเหลวครบ 3, 6 และ 9 วัน (mgK/100 ml)

SOV	df	MS			
		เฟลด์สปาร์เชอร์มาท	เฟลด์สปาร์ลำปาง	ไมก้า 1	ไมก้า 2
ระยะ 3 วัน					
Treatment	6	1764300	2551800	2746300	1234500
Replication	2	1732700	1466800	358960	2028400
Error	12	531370	649380	1872900	224970
Total	20				
ระยะ 6 วัน					
Treatment	6	60724000	5934400	8285700	7254700
Replication	2	3874300	591250	737110	10075000
Error	12	2071300	2178400	1693000	1563000
Total	20				
ระยะ 9 วัน					
Treatment	6	10652000	10329000	12386000	16425000
Replication	2	3800700	1055300	546250	7287600
Error	12	1927600	2245600	2855900	2081600
Total	20				

ตารางผนวกที่ 10 Analysis of variance การใส่เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อปริมาณซิลิกอนที่ละลายได้ในอาหารเหลวที่ใส่แร่เฟลด์สปาร์ของบริษัทเชอร์มาทหลังการใส่เชื้อ 9 วัน

SOV	df	MS			
		เฟลด์สปาร์เชอร์มาท	เฟลด์สปาร์ลำปาง	ไมก้า 1	ไมก้า 2
Treatment	6	219.66	760.67	109.73	149.71
Replication	2	2.7186	22.233	0.13088	23.735
Error	12	3.6311	22.225	1.0692	15.470
Total	20				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางผนวกที่ 11 Analysis of variance การใส่เชื้อซิลิเกตแบคทีเรียต่อปริมาณ IAA ในอาหารเหลวที่ใส่แร่เฟลด์สปาร์ของบริษัทเชอร์มาทหลังการใส่เชื้อ 2 วัน

SOV	df	MS			
		เฟลด์สปาร์ เชอร์มาท	เฟลด์สปาร์ ลำปาง	ไมก้า 1	ไมก้า 2
Treatment	6	8651.3	4788.3	5044.7	2478.6
Replication	2	395.53	1455.6	405.31	269.16
Error	12	1118.7	484.20	264.88	366.30
Total	20				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศิณีนาถ กานตารัมภ์
วัน เดือน ปี เกิด	3 ธันวาคม 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายโรงเรียนสุโขทัยวิทยาคม ปีการศึกษา 2540
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved