บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

ต้นส้มเขียวหวาน พันธุ์สายน้ำผึ้ง อายุ 1-2 ปี จำนวน 10 ต้น และอายุ 4-5 ปี จำนวน 10 ต้น ที่สวนส้ม อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์พืชและดิน

1. atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท Perkin Elmer รุ่น 3100
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท Hitachi รุ่น U-2001
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. ตู้อบ
6. เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท Techne รุ่น DB-4
7. เครื่อง conductivity meter ของบริษัท Hanna รุ่น HI 8819 N
8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ของบริษัท Hirayama Hiclave รุ่น HV-85
9. ตะแกรงร่อนดิน ขนาด 20 เมช
10. เครื่องวัดสี รุ่น CR-300 ยี่ห้อ Minolta

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น โดยแต่ละกรรมวิธีมีลักษณะของต้นส้ม ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ต้นส้มที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 1-2 ปี (small declined tree ; SD) (ภาพที่ 1)

กรรมวิธีที่ 2 ต้นส้มที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 4-5 ปี (large declined tree ; LD) (ภาพที่ 2)

กรรมวิธีที่ 3 ต้นส้มปกติ อายุ 1-2 ปี (small normal tree ; SN) (ภาพที่ 3)

กรรมวิธีที่ 4 ต้นส้มปกติ อายุ 4-5 ปี (small normal tree ; LN) (ภาพที่ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 ต้นส้มที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 1-2 ปี ; SD

ภาพที่ 2 ต้นส้มที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 4-5 ปี ; LD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 ต้นส้มปกติ อายุ 1-2 ปี ; SN

ภาพที่ 4 ต้นส้มปกติ อายุ 4-5 ปี ; LN

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บตัวอย่างยอดและใบ

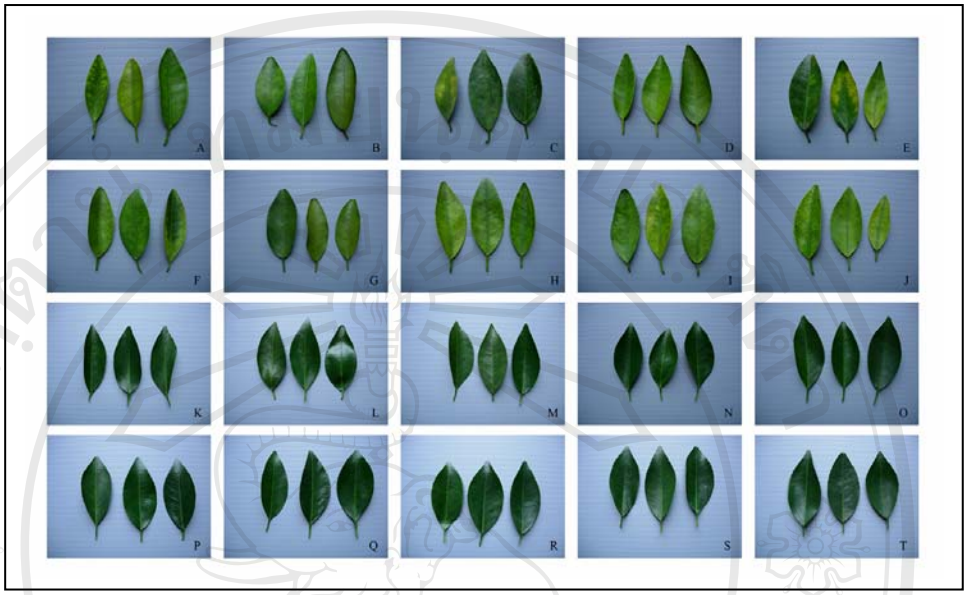
เก็บตัวอย่างใบของส้ม โดยทำการคัดเลือกยอดส้ม ที่ปราศจากการเข้าทำลายของแมลง (ภาพที่ 5) จากนั้นทำการตัดยอดส้มยาว 10 เซนติเมตร แล้วทำการเก็บใบทั้งหมดในส่วนยอดมาทำการศึกษา ส่วนการเก็บตัวอย่างใบแก่ ทำโดยการคัดเลือกใบที่แก่เต็มที่แล้ว ในตำแหน่งใบที่ 4, 5 หรือ 6 แต่พันระยะ 10 เซนติเมตร วัดจากยอดลงมา โดยเก็บตัวอย่าง กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ในแต่ละซ้ำจะเก็บ 4 จุด คือ ทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก

ส่วนการเก็บตัวอย่างที่ทำการตรวจหาเชื้อ citrus tristeza *closterovirus* และ *Candidatus* Liberobacter asiaticum ทำโดยคัดเลือกใบที่แก่เต็มที่แล้ว จากตัวอย่างต้นส้ม (ภาพที่ 6) มาทำการตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ หนัก 0.05 กรัม มาคั้นเอาน้ำคั้นเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 5 ลักษณะใบยอดของส้มที่แสดงอาการต้นโทรม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งที่นำมาตรวจหาเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticum และเชื้อ citrus tristeza *closterovirus*

แถวที่ 1 A-E ตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งสภาพต้นที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 1-2 ปี
แถวที่ 2 F-J ตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งสภาพต้นที่แสดงอาการต้นโทรม อายุ 4-5 ปี
แถวที่ 3 K-O ตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งสภาพต้นปกติ อายุ 1-2 ปี
แถวที่ 4 P-T ตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้งสภาพต้นปกติ อายุ 4-5 ปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Total Non-structural Carbohydrate ; TNC)

วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่อยู่ในรูปโครงสร้าง (TNC)

สกัดตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) ดัดแปลงโดย Chaitrakulsup (1981) โดยชั่งใบส้มที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วย 1.0 N NaOH และ 50% HCl แล้วปรับปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารละลายที่สกัด และเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ TNC

วิเคราะห์ปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962) นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ และสารละลาย ดี-กลูโคส เข้มข้น 0.00 - 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำเป็น standard) ใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ที่เกิดขึ้นให้ละลายจนหมด ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ค่า standard จากสารละลาย ดี-กลูโคส ซึ่งทราบความเข้มข้น แล้วเป็นตัวเปรียบเทียบผลที่ได้แสดงเป็น มิลลิกรัม ดี-กลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

คำนวณหาปริมาณ TNC ในตัวอย่างพืช โดยใช้สูตรดังนี้

$$TNC = \frac{\text{สาร A (mg/ml) x B (mg D-glucose)}}{\text{DW (g) x C (ml)}}$$

สาร A (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) = ค่าความเข้มข้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม ดี-กลูโคส)

C = ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างพืช (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

TNC = ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (มิลลิกรัม ดี-กลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบส้ม

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Yoshida *et al*. (1976) ซึ่งอ้างโดย Hossain *et al*. (2002) โดยเจาะแผ่นใบด้วยที่เจาะกระดาษรูขนาด 0.32 ตารางเซนติเมตร จำนวน 8 ชิ้น (โดยจะชั่งน้ำหนักใบส้มทั้ง 8 ชิ้นนี้เอาไว้ด้วย) แช่ในอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณ Chlorophyll a} = \frac{(12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}) \times V\ (ml)}{(1000 \times gfw)}$$

$$\text{ปริมาณ Chlorophyll b} = \frac{(22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}) \times V\ (ml)}{(1000 \times gfw)}$$

$$\text{ปริมาณ Total Chlorophyll} = \frac{(20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}) \times V\ (ml)}{(1000 \times gfw)}$$

เมื่อ D_{663} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 663 นาโนเมตร

D_{645} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 663 นาโนเมตร

gfw = gram fresh weight (กรัมน้ำหนักสด)

V = ปริมาตรของสารละลายอะซีโตนที่ใช้ในการสกัด (10 มิลลิลิตร)

ปริมาณ Total Chlorophyll = ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในใบส้ม

3.1 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรด (Wet acid digestion) สำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ดัดแปลงโดย Ohyama *et al*., (1985 ; 1986)

ชั่งใบส้มอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืช ปรับอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้นำหลอดทดลองออกมา ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อ ทำซ้ำ ๆ เดิมจนกระทั่งสารละลายใส (หลอดที่ใสแล้วให้แยกออกมาไว้ข้างนอก ไม่ต้องเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย volumemetric flask แล้วเทสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร

3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (Indolphenol method) (Ohyama *et al*., 1985, 1986)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

3.1.1.1 เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

Reagent A : ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 % methyl red 20 มิลลิลิตร (methyl red 0.05 กรัม + 60% ethanol 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ไว้ในที่ไม่โดนแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Reagent B : ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร และชั่ง benzoic acid 2.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร คนโดยใช้ magnetic stirrer ปรับอุณหภูมิที่ 30-40 องศาเซลเซียส ละลายจนหมดเทรวมกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

Reagent C : ชั่ง sodium nitroprusside 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม phenol 10.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 2 สัปดาห์)

Reagent D : ชั่ง NaOH 10 กรัม, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 7.06 กรัม และ $Na_3PO_4.12H_2O$ 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนหมด จากนั้นเติม sodium hypochlorite 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.1.1.2 เตรียมสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 นอร์มอล เพื่อปรับความเป็นด่าง

3.1.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก $(NH_4)_2SO_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ppm เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.1.1.4 ดูดตัวอย่างที่ได้จากการย่อยข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร เติม reagent A 0.5 มิลลิลิตร และเติม reagent B 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาไตเตรตโดยหยดสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 นอร์มอล ลงไปเขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี จากนั้นเติม reagent C 2.5 มิลลิลิตร และเติม reagent D 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามกฎของ Beer's - Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{สาร A (ppm) x B x C (ml)}}{1000 \times \text{DW (g)}}$$

สาร A (ส่วนต่อล้าน) = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (ส่วนต่อล้าน)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

$$B = \frac{\text{ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (มิลลิลิตร)

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างพืชที่ใช้ย่อย (กรัม)

3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et* al., 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟตและอนุมูลโมลิเดต ดังนี้

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

3.1.2.1 เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัส จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

Reagent A : ชั่ง $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองโดยใช้ระบบสุญญากาศช่วย

Reagent B : เตรียมกรดซัลฟูริก 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดความร้อนสูง จึงทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

Reagent C : นำ reagent A มาผสม reagent B โดยเท reagent B ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ค่อยๆ เท reagent A ทีละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

3.1.2.2 เตรียมสารละลาย stanous chloride โดยชั่ง stanous chloride ($SnCl_2.2H_2O$) 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ดูดควัน) โดยเติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

3.1.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.1.2.4 ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม reagent C ขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติม stanous chloride 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การย่อยตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม (Mizukoshi *et* al., 1994)

ชั่งใบส้มอบแห้งบดอะเอียด 0.05 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 0.4 มิลลิลิตร และไนตริก (HNO_3) 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกจนกระทั่งหมดควัน จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งเป็นคราบตะกอนสีขาวติดบริเวณก้นหลอดทดลอง (ระวังอย่าให้ไหม้) นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก (HCl : H_2O ในอัตราส่วน 1 : 4 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วย volumemetric flask เทสารละลายที่ได้ใส่ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

3.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.2.1.2 เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยข้อ 3.2 โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

3.2.1.3 นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 766.5 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

3.2.2.1 เตรียม lantanum oxide โดยชั่ง lantanum oxide 2.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร เติม HCl 37% จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียม จาก $CaCO_3$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lantanum ให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.2.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียม จาก $MgCl_2$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lantanum ให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.2.2.4 เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.2 สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายในข้อ 3.2.2.1 เป็น 25 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนโดยอะตอมของแคลเซียม และแมกนีเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 442.7 และ 285.2 นาโนเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

3.3 การย่อยตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง (Mizukoshi *et* al., 1994)

ชั่งใบส้มอบแห้งบดละเอียด 0.5 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 4 มิลลิลิตร และไนตริก (HNO_3) 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกจนกระทั่งหมดควัน จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งเป็นคราบตะกอนสีขาวติดบริเวณก้นหลอดทดลอง (ระวังอย่าให้ไหม้) นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก (HCl : H_2O ในอัตราส่วน 1 : 4 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วย volumemetric flask เทสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

3.3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก (Fe) จาก $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.3.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมงกานีส (Mn) จาก $MnSO_4.H_2O$ 98% เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของสังกะสี (Zn) จาก $ZnSO_4.7H_2O$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.3.1.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดง (Cu) จาก $CuSO_4.5H_2O$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ส่วนต่อล้าน เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3.3.1.5 ไม่ต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.3 นำไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืน โดยอะตอมของเหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 248.3, 279.5, 213.9 และ 324.8 นาโนเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ในตัวอย่างพืช (ส่วนต่อล้าน) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ปริมาณ Fe/Mn/Zn/Cu ในตัวอย่างพืช (ppm)} = \frac{\text{สาร A (ppm) x B x C (ml)}}{\text{DW (g)}} \times 10000$$

สาร A (ส่วนต่อล้าน) = ค่าความเข้มข้นของปริมาณ Fe/Mn/Zn/Cu ในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (ส่วนต่อล้าน)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

$$B = \frac{\text{ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)}}$$

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (มิลลิลิตร)

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างพืชที่ใช้ย่อย (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของใบส้ม

ทำการเก็บข้อมูลของขนาดใบ (กว้างxยาว) โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และสีใบ ใช้เครื่องวัดสี ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-300 ซึ่งวัดสีออกมาเป็น L* a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

a* , b* = The choromaticity coordinates (hue , chroma)

การวัดสี ใช้ระบบ CIE 1976 (L^* / a^* / b^*) เป็นการวัดสีแบบ 3 มิติ (ภาพที่ 7) ซึ่งในการวัดแต่ละครั้งจะอ่านค่า 3 ค่า ได้แก่

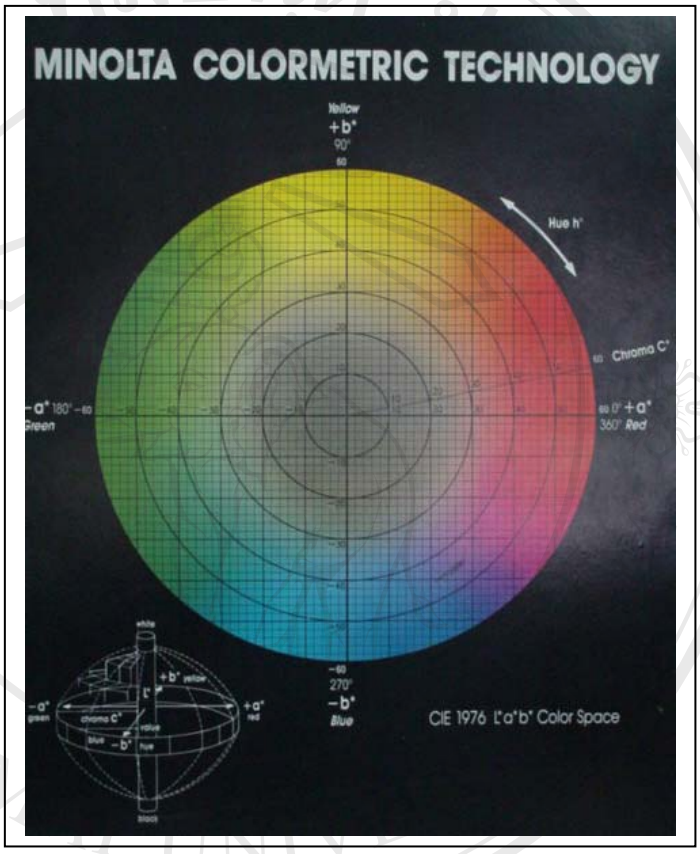
ค่า L^* เป็นค่าความสว่าง มีช่วงตั้งแต่ 0 คือมืดดำ ถึง 100 คือขาวสว่าง

ค่า a^* เป็นค่าสีตามแกนนอน มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีม่วงแดง ถึง -60 คือสีเขียวอมน้ำเงิน

ค่า b^* เป็นค่าสีตามแกนตั้ง มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีเหลือง ถึง -60 คือสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 แผนภูมิเทียบลักษณะความสว่าง ความเข้มของสี และองศาของสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบส้ม

ทำวิเคราะห์หาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบส้ม ตามวิธีการของ ธเนศวร์ (2541)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

5.1 สารเคมีที่ใช้ สารละลายแมนนิทอล (mannitol) เข้มข้น 0.4 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งแมนนิทอลจำนวน 72.8680 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยคนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้แมนนิทอลละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

นำใบส้มไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน (deionized) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และซับด้วยกระดาษทิชชูเบาๆ ให้แห้ง นำใบส้มไปเจาะ ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 15 ชิ้นต่อซ้ำ มาแช่ในสารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้ว จึงนำสารละลายมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโทรไลต์ ด้วยเครื่อง conductivity meter ของบริษัท Hanna รุ่น HI 8819 N จากนั้นเทสารละลายที่นำมาวัดค่าการนำไฟฟ้ากลับที่เดิม แล้วนำตัวอย่างเดิมนี้ไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น Hiclave HV-85 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

เมื่อความดันภายในหม้อนึ่งลดลงเท่ากับศูนย์ ปล่อยให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จึงนำออกมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโทรไลต์อีกครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในใบส้ม ซึ่งคำนวณได้จากสูตรนี้

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ = (a / b) x 100

a = ค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโทรไลต์ที่รั่วไหลออกจากใบส้มก่อนนึ่ง

b = ค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโทรไลต์ทั้งหมดในใบส้มหลังนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดิน

6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนในดิน (%) ได้จาก

ปริมาณไนโตรเจนในดิน (%) = เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน x 0.05 (Anonymous, 2005)

6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในดิน โดยวิธีของ Bray II (ทัศนีย์ และจงรักษ์, 2542)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

6.2.1 เตรียมน้ำยาสกัด Bray II

ชั่ง NH_4F 1.11 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมกับ HCl จำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6.2.2 น้ำยาที่ใช้ในการ develop color ประกอบด้วย

6.2.2.1 Reagent A : เตรียม ammonium molybdate จำนวน 12 กรัม ละลายในน้ำ 250 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย antimony potassium tartrate จำนวน 0.2908 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วเอาสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ ใส่ลงไปใน H_2SO_4 5 N จำนวน 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 2,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดแก้ว ในสภาพที่มืดและเย็น

6.2.2.2 Reagent B : ละลาย ascorbic acid จำนวน 1.056 กรัม ในสารละลาย reagent A จำนวน 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (reagent B ที่เตรียมแล้วจะต้องใช้ทันที และเก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง)

6.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส (P)

ชั่ง KH_2PO_4 (A.R.) จำนวน 0.2195 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์

6.2.4 การสกัด

ชั่ง (ดิน : น้ำยาสกัด Bray II ในอัตรา 1 : 10) ดิน 1 กรัม จะใส่น้ำยาสกัด Bray II 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง checker เป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้นทำการกรองเอาน้ำที่สกัดได้ออกเก็บไว้ในขวดพลาสติกปิดฝา เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำสกัดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดิน

ดูดสารละลายที่กรองได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย reagent B จำนวน 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส โดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 882 นาโนเมตร

นำค่าที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสในดิน (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในดิน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{สาร A (ppm) x B (ml) x C (ml)}}{\text{D (g) x DW (g) x 100}}$$

สาร A (ส่วนต่อล้าน) = ค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายตัวอย่างดินเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ส่วนต่อล้าน)

B = ปริมาตรของสารสกัดดินที่ใช้ (มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

D = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างดินที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

DW = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน (กรัม)

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม (ทัศนีย์ และจงรักษ์, 2542)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

6.3.1 เตรียมน้ำยาสกัด ammonium acetate (NH_4OAc) 1 N

ชั่ง ammonium hydroxide จำนวน 68 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม acetic acid ลงไปจำนวน 57 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 800 มิลลิลิตร เขย่าน้ำยาให้เข้ากันแล้วปรับ pH ของน้ำยาให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายที่เจือจาง (1 N) ของ ammonium hydroxide หรือ acetic acid แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม (K)

ชั่ง KCl (A.R.) จำนวน 1.9103 กรัม ละลายใน ammonium acetate solution ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 5 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด NH_4OAc ลงไปจำนวน 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง checker เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำมากรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำยาสกัด NH_4OAc ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม โดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 766.5 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียมในดิน (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างดิน

6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง (เนตรดาว, 2547)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

6.4.1 เตรียม diethylene triamine pentacetic acid ; (DTPA) จำนวน 1 ลิตร

โดยการชั่งสาร triethanolamine ; (TEA) จำนวน 14.92 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อย แล้วชั่ง DTPA จำนวน 1.9670 กรัม มาละลายในสารละลาย TEA ที่เตรียมไว้ จากนั้นเติม $CaCl_2.2H_2O$ ลงไปอีก จำนวน 1.47 กรัม คนให้ละลายเข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 800 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้เป็น 7.3 ด้วนกรด HCl หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

6.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก (Fe) จาก $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด DTPA จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

6.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมงกานีส (Mn) จาก $MnSO_4.H_2O$ 98% เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด DTPA จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

6.4.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานของสังกะสี (Zn) จาก $ZnSO_4.7H_2O$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด DTPA จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

6.4.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดง (Cu) จาก $CuSO_4.5H_2O$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำยาสกัด DTPA จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดิน จำนวน 10 กรัม ใส่น้ำยาสกัด DTPA จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง checker ประมาณ 2 ชั่งโมง นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ไม่ต้องเจือจางสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำไปอ่านด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer โดย Fe จะอ่านที่ความยาวช่วงคลื่น 248.3 นาโนเมตร ที่ความกว้าง slit เท่ากับ 0.2 นาโนเมตร สำหรับ Mn จะอ่านที่ความยาวช่วงคลื่น 279.8 นาโนเมตร ที่ความกว้าง slit เท่ากับ 0.2 นาโนเมตร ส่วน Zn จะอ่านที่ความยาวช่วงคลื่น 213.9 นาโนเมตร ที่ความกว้าง slit เท่ากับ 0.7 นาโนเมตร และ Cu จะอ่านที่ความยาวช่วงคลื่น 324.8 นาโนเมตร ที่ความกว้าง slit เท่ากับ 0.7 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ มาคำนวณหาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดงในดิน (ส่วนต่อล้าน) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณ Fe/Mn/Zn/Cu (ppm)} = \frac{\text{สาร A (ppm)} \times \text{B (ml)}}{\text{DW (g)}}$$

สาร A (ส่วนต่อล้าน) = ค่าความเข้มข้นของ Fe/Mn/Zn/Cu ในสารละลายตัวอย่างดินเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ส่วนต่อล้าน)

B = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างดินที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำยา DTPA โดยไม่มีการเจือจางสารละลาย (มิลลิลิตร)

DW = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินตามวิธีการของ วิทยา (2537)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

7.1 เตรียมสารละลาย potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) 1 N

โดยการชั่ง potassium dichromate ที่อบแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จำนวน 49.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7.2 เตรียมสารละลาย ferrous sulphate 0.5 N

โดยการชั่ง ammonium ferrous sulphate จำนวน 196.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7.3 เตรียมสารละลาย O-phenanthroline ferrous sulphate indicator 0.025 M

โดยการชั่ง O-phenanthroline จำนวน 1.48 กรัม และ ferrous sulphate จำนวน 0.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดินที่บดและผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย potassium dichromate 1 N จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้สารละลายกับตัวอย่างดินผสมเข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 10 มิลลิลิตร (รินกรดใส่ทีละน้อย เพื่อป้องกันการกระเด็นของอนุภาคดิน ควรเติมกรดในตู้ดูดควัน) แล้วแกว่งขวดไปรอบๆ เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และหยด O-phenanthroline ferrous sulphate indicator 0.025 M ลงไป 3 หยด นำ soil suspension ที่ได้ไปไตเตรทกับสารละลาย ferrous sulphate 0.5 N จนถึงจุดยุติ (end point) ซึ่ง soil suspension จะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลปนแดง จดบันทึกปริมาณของสารละลาย ferrous sulphate ที่ใช้ไป เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณอินทรียวัตถุในดิน

ทำ blank เพื่อใช้หาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลาย ferrous sulphate และปริมาณของ potassium dichromate ที่ถูกรีดิวซ์ (reduced) โดยตัวอย่างดิน ซึ่งทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ได้จากสูตรดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\% \text{ O.M.} = \frac{(\text{meq } K_2Cr_2O_7 - \text{meq } Fe_2SO_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33 \times 1.27}{\text{wt. Of soil sample (g)}}$$

การทดลองที่ 8 การวิเคราะห์ปริมาณ pH ในดิน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ pH ในดินตามวิธีการของ วิทยา (2537)

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัมในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อัตราส่วน 1:1 คนให้เข้ากัน โดยคน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH- meter

การทดลองที่ 9 การวิเคราะห์หาเชื้อ citrus tristeza *closterovirus* (CTV) โดยวิธี enzyme linked immuno sorbent assays ; ELISA ในใบส้มสายน้ำผึ้ง

วิธีการวิเคราะห์

9.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างพืชมา 1 กรัม โดยเอาเฉพาะเส้นกลางใบ แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำตัวอย่างพืชที่ตัดแล้วมาใส่ในโกร่งบด เติม extraction buffer 5 มิลลิลิตร นำไปแช่เย็น 5 นาที จากนั้นนำออกมาบดจนละเอียด เทของเหลวที่ได้ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสมาใส่ไว้ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

9.2 ขั้นตอนการเคลือบ antibody บน plate

เตรียมสารละลาย antibody โดยเติม coating buffer (20 ml) ลงในหลอดทดลอง ใช้ micropipette ที่ตั้งปริมาตรไว้ (20 µl for coating buffer 20 ml) ดูด coating buffer ออก 20 µl แล้วใช้ micropipette ดูด anti CTV antibody 20 µl มาใส่ในหลอดทดลอง ล้าง tip โดยดูดปล่อยสารละลายในหลอดทดลองหลายๆ ครั้ง แล้วนำหลอดทดลองไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้เข้ากันดี จากนั้นใช้ micropipette ตั้งปริมาตรไว้ที่ 200 µl ดูดสารละลาย anti CTV ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมไว้มาใส่ในหลุม หลุมละ 200 µl ตั้ง plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาพ moist chamber เมื่อครบเวลาแล้ว สลัดของเหลวใน plate ทิ้ง แล้วทำการล้าง

9.3 ขั้นตอนการล้าง plate

ใช้ multi-channel pipette ดูด washing buffer มา 120 µl เติมลงไปในหลุม 2 ครั้ง (จะได้หลุมละ 240 µl) แล้วทำการเคาะ plate กับพื้นโต๊ะเบาๆ (รองพื้นด้วยกระดาษชำระ) ประมาณ 100 ครั้ง ระวังอย่าให้ของเหลวกระเด็นออกจากหลุม จับ plate แกว่งวนทางซ้าย 20 ครั้ง และวนทางขวาอีก 20 ครั้ง แล้วสลัด ของเหลวใน plate ทิ้ง นับเป็นการล้าง 1 ครั้ง จากนั้นทำซ้ำอีกจนครบ 3 ครั้ง

9.4 ขั้นตอนการใส่ตัวอย่าง

เติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสกัด โดยดูดเอาแต่ของเหลวใสใส่ลงไปใน plate หลุมละ 200 µl หลุม blank ใส่ extraction buffer 200 µl ส่วนหลุม positive ใส่ตัวอย่างที่สกัดจากใบที่เป็นโรคทริสเตซา 200 µl และใส่ตัวอย่างที่สกัดจากใบที่ไม่เป็นโรค ในหลุม negative หลุมละ 200 µl แล้วตั้ง plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ในสภาพ moist chamber เมื่อครบเวลาให้สลัดของเหลวใน plate ทิ้ง แล้วล้างตามขั้นตอนการล้าง plate

9.5 ขั้นตอนการเติม conjugate

เตรียม anti-IgG conjugated โดยเติม conjugate buffer ลงในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร แล้วใช้ pipette ดูด anti CTV IgG conjugate W/AP 20 µl ใส่ลงในหลอด จากนั้นนำหลอดทดลองไปเขย่าด้วยเครื่อง vertex ให้เข้ากันดี จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลาย anti-IgG conjugated ที่เตรียมไว้มาใส่หลุมที่ต้องการวิเคราะห์หลุมละ 200 µl ตั้งทิ้งไว้ในสภาพ moist chamber ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาก็ทำการสลัดของเหลวใน plate ทิ้ง แล้วล้างตามขั้นตอนการล้าง plate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.6 ขั้นตอนการใส่ substrate

ละลาย Paranitrophenylphosphate ; (PNPP) ใน substrate buffer อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ micropipette ดูดสารละลายที่เตรียมไว้เติมลงใน plate หลุมละ 200 µl แล้วตั้ง plate ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

9.7 ขั้นตอนการอ่านค่าสีใน plate

อ่านด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (ควรเปิดเครื่องที่จะใช้ทำการวิเคราะห์รอก่อนประมาณ 10 นาที) เพื่ออ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density) หากค่า OD ของตัวอย่างที่วัดได้ มีค่าใกล้เคียงหรือมากกว่า ค่า OD ของ positive control แสดงว่าเป็นโรคทริสเตซา

การทดลองที่ 10 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Candidatus* Liberobacter asiaticus โดยวิธี polymerase chain reaction ; PCR ในใบส้มสายน้ำผึ้ง

วิธีการวิเคราะห์

10.1 ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการ (Dellaporta *et al*., 1983) วิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างใบส้มสายน้ำผึ้ง

10.1.1 ตัดเอาเส้นกลางใบส้มสายน้ำผึ้งที่เก็บมาจากที่เดียวกันกับตัวอย่างที่นำมาทำ ELISA โดยตัดด้วยมีดผ่าตัดที่สะอาดแล้ว นำมาชั่งให้ได้ 0.5 กรัม

10.1.2 ตัดเส้นกลางใบให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งบดตัวอย่าง เติมสารละลาย grinding buffer 4 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง แล้วนำไปแช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

10.1.3 หลังจากนั้นบดชิ้นส่วนพืชที่แช่ไว้ให้ละเอียด เทน้ำคั้นที่บดได้ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

10.1.4 นำตัวอย่างไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.1.5 จากนั้นดูดเอาสารละลายเฉพาะส่วนใสด้านบนด้วย micropipette ใส่ลงใน centrifuge tube อันใหม่ แล้วเอาตะกอนทิ้ง หลังจากนั้นนำเอาส่วนใสที่ได้มา ไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอาส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บเอาตะกอนส่วนที่ติดอยู่ก้น tube

10.1.6 จากนั้นทำการละลายตะกอนสีเขียวที่ได้มาด้วย Cetyltrimethylammonium bromide ; (CTAB) buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยจะใช้เครื่อง vortex ช่วยให้ตัวอย่างละลายเข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10.1.7 นำสารละลายที่ได้ไปบ่มไว้ใน heat block ที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้ให้หมั่นเขย่าหลอดทดลองทุกๆ 10 นาที

10.1.8 หลังจากนั้นนำสารละลายตะกอนที่ได้มา เติมสารละลาย chloroform ต่อ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

10.1.9 จะเกิดการแยกชั้นขึ้นมา ดูดเอาเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่ใน centrifuge tube อันใหม่ และเติมสารละลาย isopropanal ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายที่ได้มา แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที

10.1.10 เทเอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง เอาแต่ตะกอน ทำการล้างตะกอนที่ได้มาด้วย 70% ethanal ที่แช่เย็น โดยนำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที

10.1.11 หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาไปอบให้แห้ง โดยนำไปเข้าเครื่อง vacuum ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15-30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex เบาๆ

10.1.12 เก็บตะกอนไว้ แล้วทำการ run 1% agarose gel เพื่อเช็คดูว่าตะกอนเซลล์ที่ได้มามี DNA ที่ต้องการหรือไม่

10.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ GO-DNA โดยเทคนิค PCR (Sdoodee, 1999)

10.2.1. การเตรียมตัวอย่าง

ทำเครื่องหมายไว้บน PCR tube ในแต่ละหลอด จากนั้นเติม mastermix (ตารางที่ 9) หลอดละ 24 ไมโครลิตร เติม DNA ที่สกัดได้ลงไปในหลอดละ 1 ไมโครลิตร และทำ negative control โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 1.0 ไมโครลิตร เช่นกัน

10.2.2. Thermocycling

นำหลอด PCR ที่ได้ทั้งหมดใส่ลงในเครื่อง programable thermal controller PTC-100^{TM} (MJ Research) โดยโปรแกรมการทำงานแต่ละรอบของเครื่องเป็นดังขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 Mastermix ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

Reagent	**25 µl / reaction**
dH_2O	16.65
10 x PCR buffer	2.50
$MgCl_2$ 50 mM	1.25
dNTPs mixed 5 mM	1.00
Primer A2 (20 µM)	1.25
Primer J5 (20 µM)	1.25
Taq DNA polymerase (Invitrogen) (5 u/µl)	0.10

ตารางที่ 10 Thermocyclic ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR

Cycle	**Step**	**Time**	**Temp (°C)**
1	Intial denaturation	3 min	94
2-35	Denaturation	1 min	94
	Annealing	30 sec	60
	Extention	1.5 min	72
36	Denaturation	1 min	94
	Annealing	30 sec	60
	Extention	5 min	72
	Incubate	Hold	4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10.2.3 การประเมิน GO-DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ gel electrophoresis

10.2.3.1. การเตรียม agarose gel

ชั่งผง agarose gal 0.3 กรัม ละลายใน 0.5X Tris-Borate EDTA ; (TBE) buffer 30 มิลลิลิตร ใส่ใน Scott bottle แล้วนำไปหลอมให้ละลายในตู้ไมโครเวฟจนกระทั่งได้สารละลายใส (ระวังอย่าปิดฝาขวดแน่นเกินไป เพราะอาจจะทำให้ขวดระเบิดออกได้ ในขณะที่ทำการหลอมเจลอยู่) หลังจากนั้นตั้งขวดเจลที่หลอมเสร็จแล้ว ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทเจลที่ได้บน gel trays จากนั้นเสียบ comb ขนาด 18 well ลงไป เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ค่อยๆ ดึง comb ออก ระวังอย่าให้ช่อง well ฉีกขาด วางเจลที่ได้ใน electrophoresis gel tank เติม 0.5X TBE buffer จนท่วมเหนือผิวเจล

10.2.3.2. การทำ gel eltrophoresis

ดูดเอา loading dye 1.0 µl หยดบนแผ่นพาราฟิล์มเป็นจุดๆ ห่างกันพอสมควร ดูด PCR product มาจำนวน 9.0 µl หยดลงบน loading dye ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศขึ้นใน well ขณะที่ทำการ load ตัวอย่าง จากนั้นทำการ load ตัวอย่าง โดยใน well แรกของเจลให้ load DNA marker เมื่อ load ตัวอย่างครบแล้วให้ปิดฝา electrophoresis gel tank สังเกตว่าตำแหน่งที่เป็น well ของเจลจะอยู่ด้านที่เป็นขั้วลบของเครื่อง ในการ run gel ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลานาน 90 นาที เมื่อทิ้งให้เครื่องทำงานจะเห็นว่า load dye เคลื่อนที่จากด้านที่เป็นตำแหน่ง well ลงมาด้านล่างของเจล

10.2.3.3. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต (PCR product)

ทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide โดยแช่ไว้นาน 10 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาดนาน 10 นาที ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGRNE ; Gene Genius Bio Immaging System)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved