บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วยงานหลัก 2 งานคือ

3.1 การศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย ในรายงานปีนี้จะประกอบด้วย

3.1.1 การเตรียมสารอินทรีย์และใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพในรอบปีที่ 18 เพื่อรักษางานทดลองอินทรียวัตถุระยะยาวไว้

3.1.2 การศึกษาการเปลี่ยนรูปของอินทรียวัตถุที่ละลายน้ำ (DOM) ที่ได้รับอิทธิพลจากคุณภาพสารอินทรีย์

3.1.3 การสร้างแบบจำลอง (modeling of SOM data) เพื่อศึกษาการสลายตัวและการสะสมอินทรียวัตถุหลังการใส่สารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องระยะยาวในดินทราย

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองการศึกษากิจกรรมและชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพจากดินการทดลองระยะยาว

3.2 การศึกษาอิทธิพลของการใช้ที่ดินในระบบการทำฟาร์มในพื้นที่ลูกคลื่นลอนลาดต่อการเก็บกักและการเคลื่อนย้ายคาร์บอน ซึ่งเป็นการศึกษาวิธีการแยกถ่านและทดสอบวิธีการวิเคราะห์คาร์บอนในถ่านที่ระดับความลึกต่างๆ ของดินในแต่ล่ะการใช้ที่ดิน

3.1 การศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย

3.1.1 การเตรียมสารอินทรีย์และใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพในรอบปีที่ 18

ในการดำเนินการศึกษาระยะยาวของอิทธิพลของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อการเปลี่ยนแปลงและการสะสมอินทรียวัตถุในดินทราย ซึ่งเริ่มใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพหรือองค์ประกอบทางเคมีต่างกันมาตั้งแต่ปี 2538 และทำการใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่างกันนี้ปีละครั้ง ทุกปี ในช่วงระหว่างปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมของทุกปี ที่สถานีทดลองที่สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดขอนแก่น ต. ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ซึ่งเป็นดินทรายชุดโคราช (Kt series, Oxic Paleustults) เป็นตัวแทนของดินเนื้อทรายร่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยปีที่ 18 ใส่สารอินทรีย์เมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 (ภาพผนวกที่ 1)

กรรมวิธีการทดลองมีทั้งหมด 6 กรรมวิธี (ตารางที่ 3.1) ซากถั่วลิสง (groundnut stover) ซึ่งจัดว่ามีคุณภาพสูง กล่าวคือ มีไนโตรเจนสูง แต่มีลิกนินและโพลีฟีนอลส์ต่ำ, ใบ+ก้านมะขามร่วง (tamarind) จัดว่ามีคุณภาพปานกลาง (มีไนโตรเจน ลิกนินและโพลีฟีนอลส์ปานกลาง), ใบพลวงร่วง(dipterocarp) จัดว่ามีคุณภาพต่ำ (มีไนโตรเจนต่ำ แต่มีลิกนินและโพลีฟีนอลส์สูง) และฟางข้าว (rice straw) ซึ่งมีคุณภาพที่แตกต่างออกไป กล่าวคือ มีองค์ประกอบทั้งสามต่ำ แต่มีเซลลูโลสสูงที่สุด สารอินทรีย์ที่ใช้เหล่านี้หาได้ในท้องถิ่น โดยจะทำการเก็บใบพลวงและใบ (+ก้าน) มะขามที่ร่วงหล่นตามฤดูกาล ส่วนฟางข้าว และซากถั่วลิสงได้จากเศษเหลือหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต นำมาตากแห้งแล้วสับเป็นท่อนเล็กๆ ให้มีขนาด 5-10 เซนติเมตร ส่วนใบพลวงร่วงจะใช้เฉพาะใบที่ร่วงหล่นจากต้นใหม่ นำมาตัดให้มีขนาดสี่เหลี่ยมกว้างxยาว เท่ากับ 3x5 เซนติเมตร สุ่มตัวอย่างสารอินทรีย์วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น เพื่อนำมา

คำนวณน้ำหนักแห้งที่แท้จริงของสารอินทรีย์ที่จะใส่ในแปลงทดลอง ส่วนหนึ่งเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป นำเอาสารอินทรีย์ที่เตรียมไว้ใส่ในแปลงทดลองตามกรรมวิธีการทดลอง โดยโรยบนหน้าดินอย่างสม่ำเสมอทั่วพื้นที่แปลงแล้วสับกลบสารอินทรีย์ลึกจากผิวดินประมาณ 15 เซนติเมตร (ภาพผนวกที่ 1)

กำจัดวัชพืช ทุกๆ 2 เดือน (ยกเว้น ในฤดูฝนซึ่งมีปริมาณการเจริญเติบโตของวัชพืชสูงมาก จำเป็นต้องกำจัดวัชพืชทุกๆ เดือน)

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เนื่องจากแปลงมีสภาพลาดเอียงเล็กน้อย มี 6 กรรมวิธี (ตารางที่ 3.1) จำนวน 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 18 แปลงทดลอง ทำการกำจัดวัชพืชในแปลงทดลองก่อนการใส่สารอินทรีย์ วัดขนาดและขึงเชือกรอบแปลงทดลองขนาด 4x4 เมตร และมีพื้นที่สำหรับเก็บตัวอย่างดินอยู่ตรงกลางแปลงทดลองโดยมีขนาดเท่ากับ 2x2 เมตร

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีทดลองของการทดลองภาคสนามในสถานีทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	การทดลองสภาพไร่	อัตรา (ตัน นน. แห้ง ต่อเฮกตาร์ ต่อปี)
1	ไม่ใส่สารอินทรีย์	0
2	ฟางข้าว	10
3	ซากถั่วลิสง	10
4	ฟางข้าว + ซากถั่วลิสง	10+10
5	ใบพลวงร่วง (*Dipterocarpus tuberculatus*)	10
6	ใบ+ก้านมะขามร่วง (*Tamarindus indica*)	10

3.1.2 การทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนรูปของอินทรียวัตถุที่ละลายน้ำ (DOM) ที่ได้รับอิทธิพลจากคุณภาพสารอินทรีย์

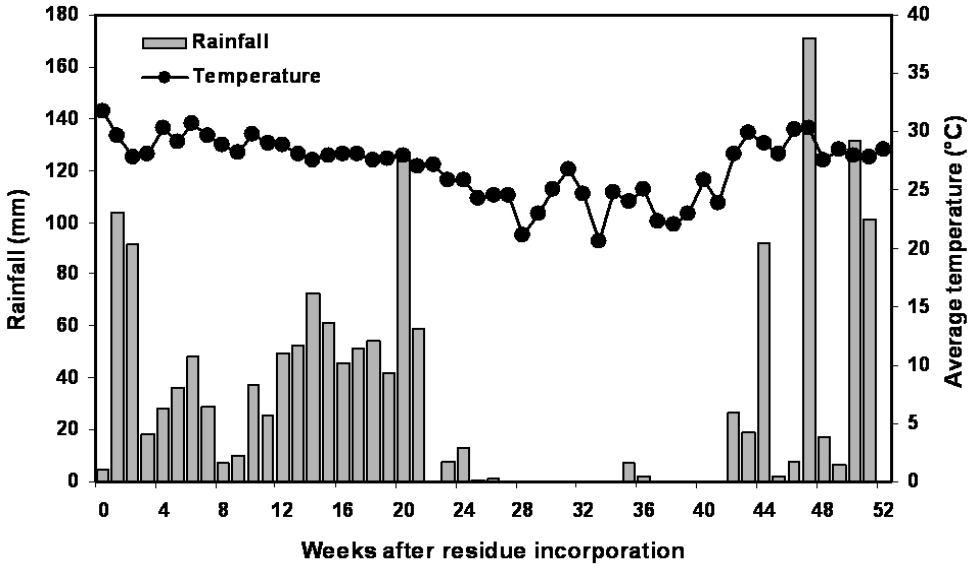
3.1.2.1 ดินและลักษณะหน้าตัดดินที่ศึกษา

ดินที่ใช้ในการทดลองระยะยาว เป็นดินชุดโคราช (Khorat series: isohyperthermic, Typic (Oxyaquic) Kandiustults) ลักษณะหน้าตัดดินดังแสดงในตารางที่ 3.2 และลักษณะสภาพภูมิอากาศในช่วงของการเก็บตัวอย่างดินในปี 2550 แสดงในภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.2 ลักษณะหน้าตัดดินของชุดดินโคราชที่ใช้ศึกษา

Soil depths (cm)	Horizons	Soil texture	Color	Mottle	pH
0-23	Ap	Loamy sand	10 YR 7/4	-	5.5
23-34	E1	Loamy sand	10 YR 5/3	-	5.5
34-53	E2	Sandy loam	10 YR 5/4	-	5.0
53-75	Bt1	Sandy clay loam	10 YR 6/4	-	5.5
75-150	Bt2	Sandy clay loam	10 YR 6/6	10 YR 6/8	5.5

แหล่งที่มา: Puttaso (2011)



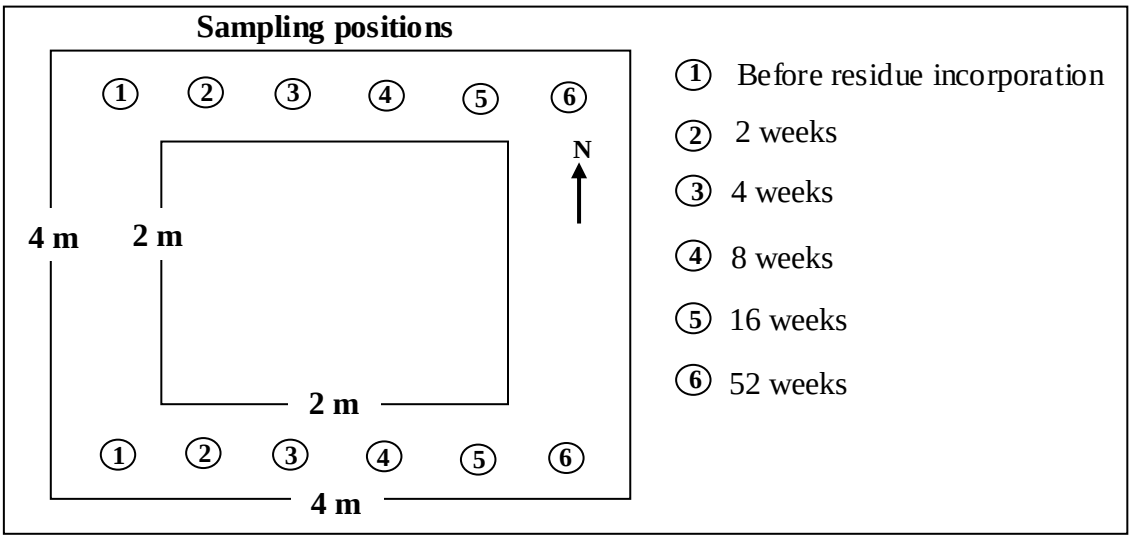
ภาพที่ 3.1 สภาพภูมิอากาศ ปริมาณน้ำฝนรายสัปดาห์ และอุณหภูมิเฉลี่ยรายสัปดาห์ ในการศึกษารอบปีที่ 13 หลังจากการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพ

3.1.2.2 รูปแบบการทดลองและการเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากการทดลองระยะยาวเป็นปีที่ 13 ของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพ โดยแปลงที่เป็นหน่วยทดลองมีขนาด 4x4 ตารางเมตร และมีกรรมวิธีทดลองซึ่งเป็นสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ 6 กรรมวิธี (แสดงในตาราง 3.1) รายละเอียดวิธีการเตรียมสารอินทรีย์แต่ละชนิด และวิธีการใส่สารอินทรีย์ลงไปในแปลงทดลองได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 3.1.1 (การเตรียมสารอินทรีย์และใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพในรอบปีที่ 18)

เก็บตัวอย่างดิน 6 ครั้ง ได้แก่ ก่อนใส่สารอินทรีย์ (สัปดาห์ที่ 0) และที่ 2, 4, 8, 16, และ 52 สัปดาห์หลังใส่สารอินทรีย์ โดยเก็บจาก 2 ตำแหน่งในแปลงทดลอง (ภาพที่ 3.2) เก็บที่ความ

ลึกดินต่อไปนี้ 0-15, 15-30, 30-60, 60-80 และ 80-100 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินมาสกัดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนดิน:น้ำ = 1:5 เพื่อสกัดอินทรีย์คาร์บอนส่วนที่ละลายน้ำ (water soluble organic carbon) ซึ่งจะเรียกในที่นี้ว่า คาร์บอนส่วนที่ละลายได้ (dissolved organic C – DOC) วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ DOC ในสารสกัดโดยใช้เครื่อง TOC analyzer Shimadzu 5000A (ภาพผนวกที่ 2)



ภาพที่ 3.2 แผนผังการเก็บตัวอย่างดิน

3.1.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance-ANOVA) ของทุกตัวชี้วัดที่ศึกษาตามแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่าสถิติที่เหมาะสมได้แก่ Least Significant Difference (LSD) และ Standard Error of the Difference (SED) รวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation–SD) ใช้โปรแกรมทางสถิติได้แก่ Statistix 8.0 (Analytical Software, 2003)

3.1.3 การสร้างแบบจำลอง (modeling of SOM data) เพื่อศึกษาการสลายตัวและการสะสมอินทรียวัตถุหลังการใส่สารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องระยะยาวในดินทราย

3.1.3.1 การได้มาซึ่งข้อมูลในการสร้างแบบจำลอง

ข้อมูลที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่างกันได้มาจากข้อมูลการศึกษาการสลายตัวของสารอินทรีย์ในปีที่ 13 ส่วนการสร้างแบบจำลองการสะสมอินทรียวัตถุในดินใช้ข้อมูลการสลายตัวของอินทรีย์คาร์บอนในดินจากกรรมวิธีการควบคุมของการศึกษาระยะยาวเป็นเวลา 17 ปี โดยการทดลองเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ.2538 ถึงปี พ.ศ. 2555 ซึ่งมีพื้นที่ศึกษา วิธีการศึกษา และการทดลองดังหัวข้อที่ 3.1.1 (การเตรียมสารอินทรีย์และใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพในรอบปีที่ 18)

3.1.3.2 การศึกษาอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์

ในการทดลองของปีที่ 13 (พ.ศ. 2550) ได้ดำเนินการศึกษาการสลายตัวของสารอินทรีย์โดยเทคนิคถุงตาข่าย (litter bag technique) ที่ได้จากการเตรียมถุงบรรจุซากสารอินทรีย์ และการเตรียมสารอินทรีย์เพื่อชั่งน้ำหนักตามกรรมวิธีการทดลอง เพื่อบรรจุลงถุงตาข่ายพลาสติกสีดำขนาด 20×20 เซนติเมตร ที่มีขนาดรู 3×3 มิลลิเมตร

การฝังถุงตาข่าย นำถุงตาข่ายซึ่งบรรจุสารอินทรีย์ที่เตรียมไว้มาฝังในแปลงทดลองห่างจากบริเวณขอบแปลง 30 เซนติเมตร ภายในพื้นที่ 4×4 เมตร ตามกรรมวิธีการทดลอง โดยฝังลึกประมาณ 15 เซนติเมตร จากผิวหน้าดิน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างถุงตาข่าย เก็บหลังการฝังถุงตาข่ายเป็นเวลา 1, 2, 4, 8, 16, 26 และ 52 สัปดาห์ เก็บกรรมวิธีละ 2 ถุงต่อครั้ง ถ้าหากสุ่มได้ถุงที่ถูกสัตว์ในดินทำลายจะสุ่มใหม่ ถุงตาข่ายที่เก็บได้นำมาแยกส่วนที่ไม่ใช่สารอินทรีย์ออก แล้วกำจัดเศษดินที่ติดมากับถุงตาข่าย โดยใช้แปลงปัดเศษดินที่ติดมาจากแปลง พยายามเอาเศษดินออกมาให้มากที่สุดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน หลังจากนั้นนำสารอินทรีย์ไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C ชั่งและบันทึกน้ำหนักซากสารอินทรีย์ที่เหลือจากการสลายตัวในแต่ละครั้งหลังใส่สารอินทรีย์

3.1.3.3 การสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์

นำข้อมูลน้ำหนักแห้งจากการศึกษาการสลายตัวของสารอินทรีย์จากปีที่ 13 มาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อที่จะทำนายอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่ใส่ลงสู่ดินที่มีคุณภาพต่างกัน มีขั้นตอนการสร้างดังนี้

ก. การหาสมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้อธิบายกระบวนการสลายตัวของสารอินทรีย์[1/]

ในขั้นตอนนี้เป็นการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการสลายตัวของสารอินทรีย์ของการทดลองระยะยาวในปีที่ 13 มาสร้างกราฟเพื่อศึกษารูปแบบการสลายตัวของสารอินทรีย์แต่ละชนิด จากนั้นลองใช้สมการทางคณิตศาสตร์ได้แก่ สมการเส้นตรง, โพลิโนเมียล และเอ็กซ์โพเนนเชียล ทั้งนี้เพื่อศึกษาว่าสมการใดจะสามารถฟิตกราฟการสลายตัวของสารอินทรีย์ได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า R^2 ซึ่งเป็นค่าที่หมายถึง อัตราของความแปรปรวนอันสืบเนื่องมาจากอิทธิพลของตัวแปรอิสระ (ไพศาล,2535) ค่า R^2 จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์หรือค่าที่ได้จากการคาดการณ์มีความเบี่ยงเบนออกจากค่าข้อมูลจริงน้อย ซึ่งค่า R^2 สามารถหาค่าได้จากสูตรที่แสดงในกล่องที่ 1

สูตรการหาค่า R^2

$$R^2 = \frac{\sum(Yi-Y)^2 - \sum(Yi-Yc)^2}{\sum(Yi-Y)^2}$$

เมื่อ Y_i = ค่าข้อมูลจริง

Y_c = ค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์

Y = ค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจริง

กล่องที่ 1 วิธีการหาค่า R^2
ที่มา : ไพศาล (2535)

[1/] สารอินทรีย์ หมายถึง เศษซากพืชที่ได้หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรในที่นี้ได้แก่ ฟางข้าว ใบพลวงและใบมะขาม อินทรียวัตถุหมายถึง สิ่งที่ได้จากการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่ใส่ลงในดิน

รูปแบบของสมการทางคณิตศาสตร์ที่ศึกษาเพื่อนำมาอธิบายการสลายตัวของสารอินทรีย์ เป็นดังนี้

$y = We^{kt}$ _____ สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล

$y = ax+b$ _____ สมการเส้นตรง

$y = a_0+a_1x+a_2x^2+.....a_n x^n$ _____ สมการโพลิโนเมียล

สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล $y = We^{kt}$

เมื่อ y = น้ำหนักที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาของสารอินทรีย์

W = น้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์

K = อัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์

T = เวลาที่สลายตัวในช่วงต่างๆ

สมการเส้นตรง $y = ax+b$

เมื่อ y = น้ำหนักที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาของสารอินทรีย์(ตัวแปรตาม)

a = ค่าคงตัวที่แสดงความชันเส้นตรง

x = ตัวแปรต้น

b = จุดที่เส้นตรงตัดแกน y

สมการโพลิโนเมียล $y = a_0+a_1x+a_2x^2+.....a_n x^n$

เมื่อ y = น้ำหนักที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาของสารอินทรีย์(ตัวแปรตาม)

a = ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการเปลี่ยนแปลงของ x ที่มีต่อ y

x = ตัวแปรต้น

a_0 = ค่าของ y เมื่อ x=0

ข. การสร้างแบบจำลองโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential) ซึ่งมีขั้นตอนในการสร้างดังต่อไปนี้

<u>ข(1) การสร้างแบบจำลองโดยอาศัยรูปแบบทั่วไปของสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล</u>

สมมุติฐานของการสร้าง: สารอินทรีย์มีองค์ประกอบทางเคมีหลักส่วนเดียว ดังนั้นค่าอัตราการสลายตัวจึงมีค่าเดียว ซึ่งรูปแบบสมการเป็นดังนี้

$$Wt= W_0e^{-kt}$$

เมื่อ Wt คือน้ำหนักที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาของสารอินทรีย์, W_0 คือ น้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์, k คือ อัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์ และ t คือเวลาที่สลายตัวในช่วงต่างๆ

ข(2) การสร้างแบบจำลองโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม

สมมติฐานของการสร้างแบบจำลอง: ในสารอินทรีย์ประกอบด้วยองค์ประกอบหลักที่เข้าสู่กระบวนการย่อยสลาย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่ายและส่วนที่เปลี่ยนแปลงยาก ดังนั้นค่าอัตราการย่อยสลายตัวของสารอินทรีย์ (k) จึงมีสองค่าด้วย ซึ่งมีรูปแบบของสมการทางคณิตศาสตร์คือ

$$Wt = W_{0(1)}e^{-k_1 t} + W_{0(2)}e^{-k_2 t}$$

เมื่อ $W_{0(1)}$ คือ น้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ในส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่าย, $W_{0(2)}$ คือน้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ในส่วนที่เปลี่ยนแปลงยาก, k_1 คือ อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในส่วนที่ย่อยสลายง่าย และ k_2 คือ อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในส่วนที่ย่อยสลายยาก

จากการสร้างแบบจำลองโดยใช้สมการข้างต้นได้ตั้งสมมุติฐานในความเป็นไปได้ของค่าสัมประสิทธิ์แต่ละตัวในสมการว่า ค่าสัมประสิทธิ์อัตราการย่อยสลายของส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่าย (k_1) มีค่ามากกว่าส่วนที่เปลี่ยนแปลงยาก (k_2) ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารอินทรีย์ไม่เหมือนกันและปริมาณขององค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงง่าย ($W_{0(1)}$) กับส่วนที่เปลี่ยนแปลงยาก ($W_{0(2)}$) ไม่เท่ากันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างแบบจำลองของ Sitompul and Listyarini (1992) ที่พบว่า k_1=-3.4 มีค่าอัตราการย่อยสลายมากกว่า k_2=-0.18 นั่นคือสารอินทรีย์ในส่วนที่ย่อยสลายง่าย (Rapidly decomposible carbon; RDC) จะมีอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าส่วนที่ย่อยสลายช้า (Slowly decomposible carbon; SDC) นั่นเอง และสัดส่วนของส่วนที่ย่อยสลายง่าย (RDC) เท่ากับ 0.7 และสัดส่วนของส่วนที่ย่อยสลายยาก (SDC) เท่ากับ 0.3

การฟิตสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 และฟังก์ชัน solver มีรายละเอียดในการสร้างดังนี้

ข(2.1) กำหนดจำนวนค่าสัมประสิทธิ์ของการสลายตัวเป็น 2 ค่า (k_1 และ k_2) ตามสมมุติฐานโดยกำหนดค่า $k_1>k_2$ โดยกำหนดให้ k_1=-3.4 และ k_2=-0.18 ตามงานของ Sitompul and Listyarini (1992) และค่าน้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ (W_0) ในส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่าย ($W_{0(1)}$) และเปลี่ยนแปลงยาก ($W_{0(1)}$)

ข(2.2) ใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 คำนวณตามรูปแบบของสมการเอ็กซ์โพเนนเชียลคือ $W_t = W_{0(1)}e^{-k_1 t} + W_{0(2)}e^{-k_2 t}$ จะทำให้ได้ค่า W_t จากการคำนวณ (estimate ; Y_C)

ข(2.3) นำค่าข้อมูลจริง (Y_i) ของการสลายตัวสารอินทรีย์มาลบออกจากค่าที่ได้จากการคำนวณ (Y_C) โดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียลแล้วยกกำลังสอง จากนั้นนำผลรวมของแต่ละค่ามารวมกันจะได้ค่าความแปรปรวน ($\sum(Y_i - Y_c)^2$) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแปรปรวนของข้อมูล ถ้ามีค่ามากแสดงว่าค่าที่ได้จากการคาดการณ์มีความแปรปรวนมากจากค่าเฉลี่ยของข้อมูลจริง

ข(2.4) ฟิตกราฟการสลายตัวของสารอินทรีย์จากค่าข้อมูลจริงและค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยกำหนดให้ค่าข้อมูลจริงเป็นจุด และค่าที่ได้จากการคำนวณเป็นเส้น

ข(2.5) ปรับเปลี่ยนค่าสัมประสิทธิ์ของการย่อยสลาย (k) และค่าน้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ทั้งสองส่วน เพื่อให้ค่าความแปรปรวน ($\sum(Y_i - Y_c)^2$) มีค่าน้อยที่สุด ทั้งนี้เพื่อลดความแปรปรวนของค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ และเพื่อฟิตสมการให้

ค่าที่ได้จากการคาดการณ์ใกล้เคียงกับค่าข้อมูลจริง การปรับค่าเพื่อให้ค่าความแปรปรวนให้น้อยที่สุด อาศัยฟังก์ชัน solver ช่วย

ข(2.6) หาค่า R^2 (coefficient of determination) ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจว่าแบบจำลองใช้ได้ดีหรือไม่ ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งสามารถหาได้ตามสูตรที่อ้างไว้ในกล่องที่ 1

ค) การสร้างแบบจำลองเอ็กซ์โพเนนเชียลโดยการใช้ค่าอัตราการย่อยสลายเฉลี่ย (k เฉลี่ย)

สมมุติฐาน: สารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสารอินทรีย์แต่ละชนิดส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่ายเป็นสารที่เป็นกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งส่วนที่ย่อยสลายยากจะมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารกลุ่มเดียวกัน แต่สัดส่วนแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสารอินทรีย์

โดยมีข้อสมมุติคือ สารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สลายตัวง่ายและที่สลายตัวยากไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ดังนั้นอัตราการย่อยสลายในส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่าย (k_1) ในทุกสารอินทรีย์จะเท่ากัน และอัตราการย่อยสลายในส่วนที่เปลี่ยนแปลงยาก (k_2) ก็จะเท่ากันในทุกสารอินทรีย์ แต่ $W_{0(1)}$ และ $W_{0(2)}$ ไม่เท่ากันในสารอินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งมีรายละเอียดการสร้างแบจำลองดังต่อไปนี้

ค(1) นำข้อมูลที่การสลายตัวของสารอินทรีย์แต่ละชนิดซึ่งได้จากการศึกษาในระยะยาวซึ่งเป็นการศึกษาในปีที่ 13 มาใช้สำหรับฟิตสมการในโปรแกรม Microsoft Excels 2007

ค(2) นำค่าอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ ถั่วลิสง ฟางข้าว ใบพลวง และใบมะขาม จากแบบจำลองที่สร้างขึ้นในข้อ 2(ข) การสร้างแบบจำลองโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ค่าอัตราการสลายตัวเฉลี่ย 2 ค่า คือ k_1 และ k_2

ค(3) นำค่าอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์เฉลี่ยทั้ง 2 ค่ามาใส่ในโปรแกรม Microsoft Excels 2007 รวมทั้งกำหนดน้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ทั้ง 2 ส่วน ($W_{0(1)}$ และ $W_{0(2)}$) ลงไปด้วย

ค(4) ใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 คำนวณตามรูปแบบของสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล $Wt=W_{0(1)}e^{-k_1 t} + W_{0(2)}e^{-k_2 t}$ จะทำให้ได้ค่าจากการคำนวณ (estimate; Y_C)

ค(5) นำค่าข้อมูลจริง (Y_i) ของการสลายตัวสารอินทรีย์มาลบออกจากค่าที่ได้จากการคำนวณ (Y_C) โดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล แล้วยกกำลังสองจากนั้นนำผลรวมของแต่ละค่ามารวมกันจะได้ค่าความแปรปรวน ($\sum(Y_i - Y_C)^2$) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแปรปรวนของค่าคาดการณ์กับค่าข้อมูลจริง ถ้ามีค่ามากแสดงว่าค่าที่ได้จากการคาดการณ์มีความแปรปรวนจากค่าเฉลี่ยของข้อมูลจริงมาก

ค(6) ใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 คำนวณค่าความแปรปรวนของข้อมูลจริง ทั้งนี้เพื่อที่จะนำค่าความแปรปรวนนี้มาใส่ในการฟิตสมการ

ค(7) ฟิตกราฟการสลายตัวของสารอินทรีย์จากค่าข้อมูลจริงและค่าที่ได้จากคำนวณโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยกำหนดให้ค่าข้อมูลจริงเป็นจุด และค่าที่ได้จากการคำนวณเป็นเส้นโดยใส่ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้จากการคำนวณในข้อ ค(6) เข้าไปด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ค่าที่ได้จากการคำนวณอยู่ในช่วงความแปรปรวนของข้อมูลจริง

ค(8) ปรับค่าน้ำหนักเริ่มต้นของสารอินทรีย์ทั้งสองส่วนเพื่อให้ค่าความแปรปรวนมีค่าน้อยที่สุดทั้งนี้เพื่อลดความแปรปรวนของค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์

และเพื่อฟิตสมการให้ค่าที่ได้จากการคาดการณ์ใกล้เคียงกับค่าข้อมูลจริง การปรับค่าเพื่อให้ค่าความแปรปรวนให้น้อยที่สุดอาศัยฟังชัน solver ช่วย

ค(9) หาค่า R^2 (coefficient of determination) ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจว่าแบบจำลองใช้ได้ดีหรือไม่ ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 มากแสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งสามารถหาค่าได้ตามสูตรที่อ้างในกล่องที่ 1

3.1.3.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการสะสมอินทรียวัตถุในดิน[2/]

ในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการสะสมของอินทรียวัตถุในดินได้นำเอาข้อมูลการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินจากกรรมวิธีควบคุมที่ไม่เคยได้รับสารอินทรีย์ใดๆ เลยดังที่อ้างในตารางที่ 3.1 เป็นเวลาตั้งแต่ปีที่ 2 ของการทดลองจนถึงปีที่ 17 มารวมกับแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่ได้พัฒนาขึ้นในหัวข้อ ค) การสร้างแบบจำลองเอ็กซ์โพเนนเชียลโดยการใช้ค่าอัตราการย่อยสลายเฉลี่ย (k เฉลี่ย) หน้า 32 ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างดังนี้

3.1.3.4(ก) การสร้างแบบจำลองการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินโดยอาศัยรูปแบบทั่วไปของสมการเอ็กซ์โพเนนเชียลเทอมเดียว

สมมติฐาน: อินทรียวัตถุในดินมีส่วนเดียวดังนั้นค่าอัตราการสลายตัวจึงมีค่าเดียว ซึ่งรูปแบบสมการเป็นดังนี้

$$Wt = W_0 e^{-kt}$$

เมื่อ Wt คือน้ำหนักที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาของอินทรียวัตถุ, W_0 คือ น้ำหนักเริ่มต้นของอินทรียวัตถุ, k คือ อัตราการสลายตัวของอินทรียวัตถุ และ t คือเวลาที่สลายตัวในช่วงต่างๆ

3.1.3.4(ข) การสร้างแบบจำลองการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม

การสมมติฐาน: อินทรียวัตถุประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่เปลี่ยนแปลงง่ายและเปลี่ยนแปลงยาก ดังนั้นอัตราการย่อยสลายตัวของอินทรียวัตถุในดิน (k) จึงมีสองส่วนด้วย ดังนั้นรูปแบบของสมการทางคณิตศาสตร์ คือ

$$Wt = W_{0(1)} e^{-k_1 t} + W_{0(2)} e^{-k_2 t}$$

ขั้นตอนในการสร้างแบบจำลองมีรายละเอียดเช่นเดียวกับการสร้างแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์ในหัวข้อที่ ข(2) การสร้างแบบจำลองโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม หน้า 31 โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษาปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดในดิน (total organic carbon; TOC) จากแปลงควบคุมที่ได้จากการศึกษาทดลองการใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่างกันในระยะยาว ทั้งนี้เพื่อศึกษาการสลายตัวของอินทรียวัตถุที่อยู่ในดินว่ามีอัตราการสลายตัวอย่างไร

3.1.3.4(ค) การสร้างแบบจำลองการสะสมอินทรียวัตถุโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม

สมมติฐาน: การสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินมีลักษณะเหมือนกับการสลายตัวของสารอินทรีย์

ขั้นตอนการสร้างแบบจำลองการสะสมอินทรียวัตถุในดินเป็นการนำแบบจำลองการสสายตัวของสารอินทรีย์ มารวมกับข้อมูลการสะสมคาร์บอนอินทรีย์ในดิน ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์แต่ละชนิดหลังใส่สารอินทรีย์ว่าลดลงอย่างไร และอินทรียวัตถุในดินที่เหลืออยู่จะสลายตัวลดลงเป็นไปตามแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นส่วนเริ่มต้นได้ดีหรือไม่ ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างดังนี้

1) นำแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่างกัน ได้แก่ ถั่วลิสง ฟางข้าว ใบพลวงร่วง และใบ+ก้านมะขามร่วง มาใช้เป็นข้อมูลเริ่มต้นปีแรกในการสร้างแบบจำลองการสะสมอินทรียวัตถุในดินหลังการใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่างกัน

2) นำข้อมูลการสะสมปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดในดินจากปีที่ 2 ถึงปีที่ 17 มาใส่เข้าไปกับแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์แต่ละชนิดตามข้อ ข(2) การสร้างแบบ จำลองโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล 2 เทอม (หน้า 31) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะมีข้อมูลจากการทดลองจริง 2 ส่วน เพื่อนำมาสร้างแบบจำลองการสะสมอินทรียวัตถุในเวลา 17 ปีหลังใส่สารอินทรีย์

3) ใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 คำนวณตามรูปแบบของสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล $Wt=W_{0(1)}e^{-k_1 t} + W_{0(2)}e^{-k_2 t}$ จะทำให้ได้ค่าจากการคำนวณ (estimate; Y_C) โดยใช้ค่าจากแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์แต่ละชนิด

4) ใช้โปรแกรม Microsoft Excels 2007 คำนวณค่าความแปรปรวนของข้อมูลจริงโดยใช้ standard deviation ทั้งนี้เพื่อที่จะนำค่าความแปรปรวนนี้มาใส่ในการฟิตสมการ

5) ฟิตกราฟการสลายตัวของสารอินทรีย์จากค่าข้อมูลจริงและค่าที่ได้จากคำนวณโดยใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยกำหนดให้ค่าข้อมูลจริงเป็นจุด และค่าที่ได้จากการคำนวณเป็นเส้น โดยใส่ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้จากการคำนวณในข้อ 4) ข้างต้น จากโปรแกรม Microsoft Excels 2007 เข้าไปด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ค่าที่ได้จากการคำนวณอยู่ในช่วงความแปรปรวนของข้อมูลจริง

6) หาค่า R^2 (coefficient of determination) ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจว่าแบบจำลองใช้ได้ดีหรือไม่ ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งหาได้ตามสูตรที่อ้างไว้ในกล่องที่ 1

3.1.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า R^2 (coefficient of determination) จากแบบจำลองที่ใช้สมการทางคณิตศาสตร์ที่ศึกษาได้แก่ สมการเส้นตรง สมการโพลิโนเมียล และสมการเอ็กซ์โพเนนเชียล รวมทั้งค่า R^2 ที่ได้จากการสร้างแบบจำลองการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่ใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียลแบบ 1 เทอม, 2 เทอม ปกติ และแบบที่ใช้ค่า k_1 เดียวกันและจากแบบจำลองการสะสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินที่ใช้สมการเอ็กซ์โพเนนเชียลแบบ 1 เทอม และ 2 เทอม มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี LSD โดยใช้โปรแกรม statistic 8

3.1.4 การศึกษากิจกรรมและชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพจากดินการทดลองระยะยาว

3.1.4.1 การศึกษาหน้าที่ของจุลินทรีย์โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ

การศึกษาประชากรเชื้อราที่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ของจุลินทรีย์จากการใส่สารอินทรีย์เป็นระยะเวลายาวนาน (การทดลองที่ 1) และการตอบสนองของเอนไซม์ต่อการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพที่ใส่เพิ่มเข้าไปใหม่ (การทดลองที่ 2) ดำเนินการทดลองโดยการบ่มดินในโหลบ่ม (incubation jar) วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 3 block ทำการเก็บตัวอย่างดิน (หน่วยทดลอง) แต่ละช่วงการบ่ม โดยดำเนินการทดลองบ่มดินในโหลบ่มที่ห้องบ่ม (incubation room) ของสาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อวันที่ 7 ตุลาคม ถึง 2 ธันวาคม พ.ศ. 2553

และจากการศึกษานี้ทางกลุ่มวิจัยสามารถตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง ซึ่งได้แนบไว้ในภาคผนวก ข

การทดลองที่ 1

การทดลองนี้เป็นการศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของจุลินทรีย์ และกิจกรรมของเอนไซม์ของดินที่ได้รับสารอินทรีย์ต่างคุณภาพ (กรรมวิธีการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1) มาตั้งแต่ปี 2538 (ปีที่ทำการศึกษาในโครงการนี้ครอบคลุม 2 ปี คือ 2552-2553 ซึ่งเป็นปีที่ 15-16) โดยดำเนินการศึกษาระยะยาวสถานีทดลองที่สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดขอนแก่น ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ซึ่งเป็นดินชุดโคราช นำตัวอย่างดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มาก่อน (control treatment) นับถึงปีที่ 15 (และ ปีที่ 16 การที่ต้องใช้ดินจาก 2 ปีมารวมกันเนื่องจากมีดินปีที่ 15 ไม่เพียงพอ) เรียกดินนี้ว่า control soil (หรือ C soil) และนำตัวอย่างดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์มาเป็นระยะเวลานาน (เรียกว่า native soil หรือ N-soil) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ดินที่มีการใส่ซากถั่วลิสง (NGN), ฟางข้าว (NRS), ใบพลวงร่วง (NDP) และใบ+ก้านมะขามร่วง (NTM) (ตารางที่ 3.3) แต่ละหน่วยการทดลองทำการบ่มดินปริมาณ 600 กรัม ซึ่งเป็นดินผึ่งลมให้แห้ง (air dried soil) ในการให้น้ำเพื่อรักษาความชื้นจะอยู่บนฐานของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (water holding capacity : WHC) ที่ 60% ของดินแห้ง โดยปริมาณน้ำที่ต้องเติมในกรรมวิธี C, NGN, NRS, NDP และ NTM เท่ากับ 8.16%, 8.26%, 8.20%, 7.91% และ 8.32% ตามลำดับ หลังจากให้น้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำจากผิวดินซึมเข้าสู่ภายในดิน หลังจากนั้นจะเริ่มนับเป็น 0 วัน หน่วยทดลองแต่ละหน่วยจะบ่มในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ^{0}C และให้น้ำเมื่อความชื้นของแต่ละหน่วยทดลองลดลง โดยความถี่และช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินภายใต้กระบวนการย่อยสลายของสารอินทรีย์ สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ นำตัวอย่างดินมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C และนำดินจากการบ่มนี้ (ดินแห้ง) 10-15 กรัมมาทำแห้งที่อุณหภูมิ -50 ^{0}C (freeze dry) เพื่อสำหรับนำไปศึกษาในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

การทดลองที่ 2

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการตอบสนองของกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการใส่สารอินทรีย์เพิ่มเข้าไปใหม่ สารอินทรีย์เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ในการทดลองภาคสนามซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่หาได้ในท้องถิ่น ได้แก่ ฟางข้าว (RS) และซากถั่วลิสง (GN) ที่สามารถหาได้หลังการเก็บเกี่ยว และใบไม้ที่ร่วง

จากต้นได้แก่ ใบพลวง (DP) และใบ+ก้านมะขาม (TM) สารอินทรีย์ที่นำมาใช้นี้จะต้องแห้ง (ผึ่งแดด) ฟางข้าว (RS) และซากถั่วลิสง (GN) นำมาตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร ในขณะที่ใบพลวงร่วงตัดให้มีขนาด(กว้างXยาว) เท่ากับ 1X1 เซนติเมตร และใบ+ก้านมะขามร่วง ให้ตัดก้านมะขามให้มีขนาด 1-3 เซนติเมตร กรรมวิธีการทดลองประกอบด้วย การนำตัวอย่างดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มาก่อน เรียกดินนี้ว่า control soil (หรือ C soil) นำดิน C soil มาใส่สารอินทรีย์ที่มีคุณภาพแตกต่างกัน 4 ชนิดลงไปใหม่ได้แก่ฟางข้าว (rice straw; เรียกว่า C+RS), ซากถั่วลิสง (groundnut; C+GN), ใบพลวงร่วง (dipterocarp; C+DP) และใบ+ก้านมะขามร่วง (tamarind; C+TM) (ตารางที่ 3.3)

ผสมคลุกเคล้าสารอินทรีย์ให้ทั่วทั้งดิน (น้ำหนักของสารอินทรีย์ที่ใส่เข้าไปอยู่ในช่วง 2.42-2.67 กรัมต่อกิโลกรัมดินแห้ง) **ขั้นตอนการเตรียมหน่วยทดลองเหมือนการทดลองที่ 1** คือ นำดิน (ดินแห้ง) C-soil มา 600 กรัม รักษาความชื้น (water holding capacity : WHC) ที่ 60% ของดินแห้ง ดังนั้นปริมาณน้ำที่ต้องเติมในกรรมวิธี C+ สารอินทรีย์ที่เพิ่มเข้าไปใหม่ เท่ากับ 8.16% หลังจากให้น้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำจากผิวดินซึมเข้าสู่ภายในดิน หน่วยทดลองแต่ละหน่วยจะถูกเก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ^{0}C และให้น้ำเมื่อความชื้นของแต่ละหน่วยทดลองลดลง ความถี่และช่วง เวลาของการเก็บตัวอย่างขึ้นอยู่กับกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินภายใต้กระบวนการย่อยสลายของสารอินทรีย์

เก็บตัวอย่างดิน ที่ 0, 3, 7, 14, 28 และ 56 วัน หลังการบ่ม สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ นำตัวอย่างดินมาแช่แข็งที่อุณหภูมิที่ -20 ^{0}C และนำดินจากการบ่มนี้ (ดินแห้ง) 10-15 กรัมมาทำแห้งที่อุณหภูมิที่ -50 ^{0}C เพื่อสำหรับนำไปศึกษาในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

ตารางที่ 3.3 กรรมวิธีทดลองบทบาทของจุลินทรีย์ดินในการสะสมและแลกเปลี่ยนอินทรียวัตถุในดิน: การศึกษาผลของสารอินทรีย์ต่างคุณภาพในดินทรายภายใต้สภาวะการบ่ม

ลำดับ	กรรมวิธีทดลอง[1/]
การทดลองที่ 1	
1	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C)
2	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ฟางข้าว (NRS)
3	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ซากถั่วลิสง (NGN)
4	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ใบพลวงร่วง (NDP)
5	ดินจากแปลงทดลองที่มีการใส่ใบ+ก้านมะขามร่วง (NTM)
การทดลองที่ 2	
6	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ฟางข้าว (C+RS)
7	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ซากถั่วลิสง (C+GN)
8	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ใบพลวงร่วง (C+DP)
9	ดินจากแปลงทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ + ใบ+ก้านมะขามร่วง (C+TM)

[1/]C = control soil (C soil), RS = rice straw, GN = groundnut, DP = dipterocarp, TM = tamarind และ N = native soil (N soil)

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในดินจากกรรมวิธีทดลองต่างๆ ทำ 3 ซ้ำ โดยเอนไซม์ที่วิเคราะห์เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายตัวและหมุนเวียนคาร์บอน ได้แก่

เอนไซม์ β-glucosidase วัดโดยวิธีของ Tabatabai (1982); Eivazi and Tabatabai (1988) อ้างตาม Alef and Nammipieri, (1995) ทำได้โดยการเติมสารตั้งต้น (substrate) คือ *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside ลงในดินภายใต้สภาวะการบ่มที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 ^{0}C จากนั้นวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ *p*-nitrophenol (*p*NP) ซึ่งมีสีเหลืองโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 400 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีขึ้นอยู่กับผลผลิตที่เกิดขึ้น การทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ในการย่อยสารตั้งต้น (substrate) เพื่อให้เกิดผล คือ *p*-nitrophenol

เอนไซม์ invertase การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ invertase ในดินได้รับการศึกษาโดย Ross (1983) และวิธีของ Schinner and Von mersi (1990) อ้างถึงโดย Stemmer et al. (1999) ที่ทำการบ่มดินร่วมกับ substrate คือซูโครส จากนั้นวัดผลผลิตคือน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ Molybdenum blue method (Somogyi-Nelson method) หรือ Berliner blue reaction (Schiner and Von mersi, 1990) จากนั้นวัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) โดยกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอเตสหนึ่งหน่วยคือจำนวนมิลลิกรัมสมมูลย์ของกลูโคสที่เกิดขึ้นต่อกรัมของ substrate ต่อหน่วยเวลาภายใต้สภาวะการบ่ม (incubated) ที่กำหนด

เอนไซม์ phenoloxidase และ peroxidase การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในการทดลองนี้ใช้วิธีของ Hendel et al. (2005) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความถูกต้อง โดยใช้ substrate คือ L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) เป็นตัวรับอิเลคตรอน (electron-donating substrate) L-DOPA มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้และพร้อมที่จะถูกออกซิไดส์ จึงเป็น substrate ที่นิยมใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น ซากพืช อินทรียวัตถุในดิน หรือน้ำทะเล เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase จะมีสีแดง โดยสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลิตภัณฑ์และสามารถวัดคุณสมบัติของการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ขณะเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สามารถทำควบคู่กันกับกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) เพื่อเป็นสารตั้งต้น (substrate)

3.1.4.2 การศึกษาโครงสร้าง (ชนิดและประชากร) ของประชากรราโดยใช้ทางชีวโมเลกุล

คัดเลือกตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่างจากแปลงทดลองระยะยาว ได้แก่ ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มาเป็นระยะเวลา 16 ปี (control soil หรือ C-soil) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์อย่างต่อเนื่องปีละครั้งมาเป็นระยะเวลา 16 ปี ได้แก่ 1) native rice straw (NRS) 2) native groundnut (NGN) 3) native dipterocarp (NDP) และ 4) native tamarind (NTM) นำมาสกัด DNA โดยใช้ชุด kit (Fast DNA Spin Kit) จากนั้นวัดปริมาณของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง nanodrop จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่สนใจคือ 18s rDNA ที่พบในกลุ่ม fungi mushroom และ actinomycetes โดยใช้ primer forward คือ FF390 และ primer reverse คือ FR1 ซึ่งมีลำดับเบสคือ FF390: cgataacgaacgaga cct, rev: aggtctcgttcgttatcg; FR1: alccattcaatcggtalt, rev: altaccgattgaatgglt เพิ่มจำนวนชิ้นยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มชิ้นยีน โดยสภาวะที่ใช้คือ denaturation step: 94°c/30sec; annealing step: 50°c/30sec; elongation step: 70°c/min จำนวน 45 cycle ใช้ SYBR เป็น

fluorescent label จากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณ gene copies (log_{10} copies g^{-1} soil DW) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีการทดลอง (ภาพผนวกที่ 3)

วิเคราะห์โครงสร้างประชากรรา (fungal community structure) โดยใช้เทคนิค terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ในการบอกความแตกต่างของ community โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 2 ชนิด คือ HAE III และ MSP I ในการตัดลำดับเบสของ PCR product ในตำแหน่งลำดับเบส C | CGG และ GG|CC สำหรับเอนไซม์ HAE III และ MSP I ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบ community pattern โดยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำหรับงานทางชีวโมเลกุลได้แก่ Peak Scanner V1.0 และ Primer เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทั้งชนิดและปริมาณของ fungal community ระหว่างกรรมวิธีการทดลอง โดยคำนวณความสูงและพื้นที่ใต้ peak และวิเคราะห์ความคล้ายคลึง (similarities) ของ fungal community ในกรรมวิธีที่ใส่สารอินทรีย์ชนิดเดียวกัน และระหว่างกรรมวิธีที่ใส่สารอินทรีย์ต่างชนิดกันโดยใช้เทคนิค Bray-Curtis และ non-metric multi dimentional scaling

3.2 การศึกษาอิทธิพลของการใช้ที่ดินในระบบการทำฟาร์มในพื้นที่ลูกคลื่นลอนลาดต่อการเก็บกักและการเคลื่อนย้ายคาร์บอน ซึ่งเป็นการศึกษาวิธีการแยกถ่านและทดสอบวิธีการวิเคราะห์คาร์บอนในถ่านที่ระดับความลึกต่างๆ ของดินในแต่ละการใช้ที่ดิน

เนื่องจากคาร์บอนส่วนหนึ่งที่มีความเสถียรคือคาร์บอนที่อยู่ในรูปของถ่าน (charcoal carbon) หรือคาร์บอนดำ (black carbon - BC) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิธีการแยกถ่านและทดสอบวิธีการวิเคราะห์คาร์บอนในถ่านที่ระดับความลึกต่างๆ ของดินในแต่ละการใช้ที่ดิน วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ BC ในดินนั้น ยังเป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งนักปฐพีวิทยายังคงอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนา **ในปีที่รายงานนี้จึงเป็นการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวกับการวิธีการวิเคราะห์ เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ BC ในดินต่อไป** โดยการจำแนกวิธีการวิเคราะห์คาร์บอนในถ่านในดินได้จำแนกออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ การสันดาปแห้ง การสันดาปเปียก และการผสมผสานทั้งสองวิธีเข้าด้วยกัน

3.2.1 การสันดาปแห้ง (dry combustion)

เป็นการวิเคราะห์ปริมาณถ่านในดินโดยใช้ความร้อนในการแยกอินทรีย์คาร์บอนส่วนที่ไม่ใช่ถ่านออกไป วิธีการที่เสนอคือ วิธีของ Makoto et al. (2011) ที่ได้ใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 375^{O}C และ 450 ^{O}C โดยอยู่บนหลักการที่ว่าอินทรีย์คาร์บอน (ที่ไม่ใช่ถ่าน) มากกว่า 99.85% จะสูญเสียไปที่ 375^{O}C ส่วนที่เหลือจากการใช้อุณหภูมินี้ คือ BC ดังนั้นหลังจากขจัดคาร์บอนส่วนไม่ใช่ถ่านแล้ว จึงเพิ่มความร้อนเป็นที่ 450 ^{O}C โดยคาดว่า BC ที่เหลืออยู่ที่ความร้อนระดับนี้มีน้อยกว่า 10% เครื่องมือที่ใช้วัดคาร์บอน คือ Elemental analyzer

3.2.2 การสันดาปเปียก (wet oxidation)

เป็นการวิเคราะห์ BC ที่ให้ BC ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) คล้ายกับการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในดิน (Skjemstad and Taylor, 1999)

3.2.3 การวิเคราะห์ถ่านด้วยวิธีผสมผสาน

เป็นการผสมผสานวิธีการสันดาปเปียกและแห้งเข้าด้วยกัน หลักการคือกำจัดคาร์บอนที่ไม่ใช่ส่วนของถ่านออกไปด้วยวิธีสันดาปเปียก สารเคมีที่ใช้แตกต่างกันออกไป เช่น กรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่ปราศจากออกซิเจน (O_2-free trifluoroacetic acid, TFA: $C_2HF_3O_2$) (Gelinas et al., 2001) หรือใช้ส่วนผสมระหว่างเปอร์ออกไซด์และกรดไนตริกแบบไม่เข้มข้น (peroxide/weak nitric acid) (Kurth et al., 2006) เป็นต้น วิธีการหนึ่งที่จะนำเสนอในที่นี้คือ วิธีของ Kurth et al. (2006) เป็นวิธีการที่เรียกว่า peroxide/weak nitric acid method ซึ่งได้ใช้ 30% H_2O_2 ร่วมกับ 1*M* HNO_3 เพื่อกำจัดคาร์บอนที่ไม่ใช่ถ่านออกไป และถือว่าคาร์บอนที่เหลืออยู่คือ BC แล้วนำคาร์บอนที่เหลืออยู่นี้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง elemental analyzer