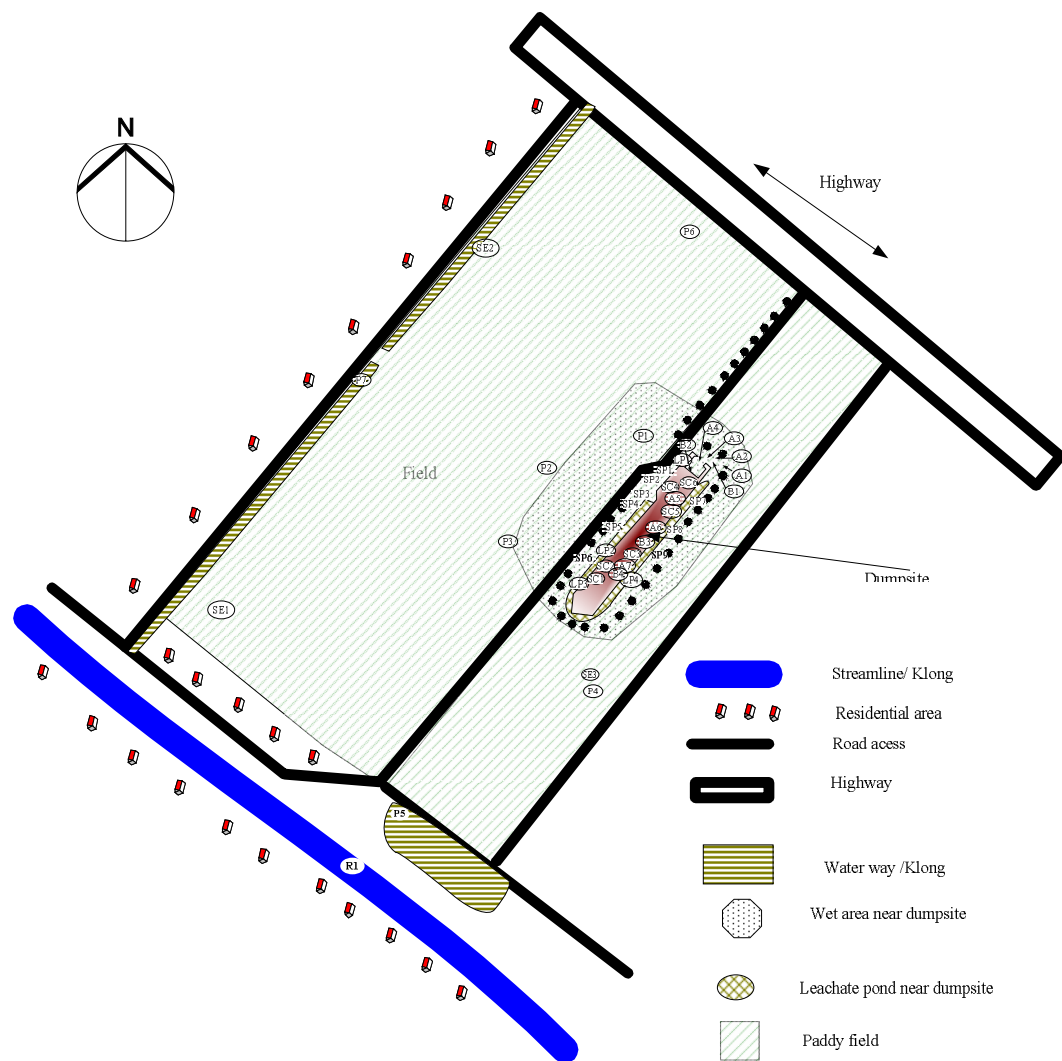


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษา วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ก1 แผนที่พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี



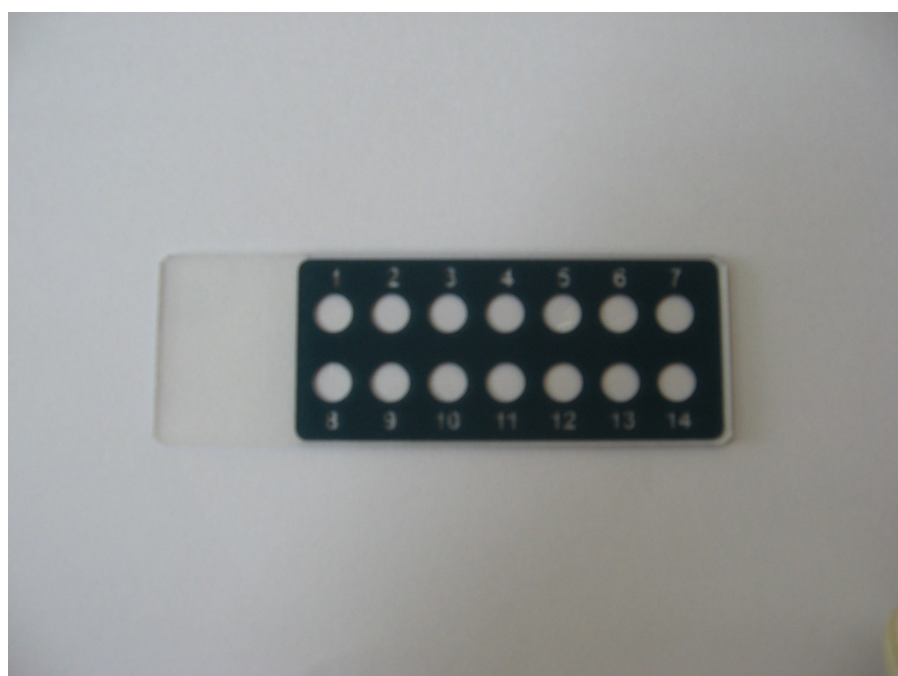
ภาพผนวกที่ ก2 พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ทำการศึกษาดินกลบทับชั้น
สุดท้ายในงานวิจัยครั้งนี้



ภาพผนวกที่ ก3 จุดที่ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย



ภาพผนวกที่ ก4 ขวดซีรัมขนาด 20 และ 118 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ก5 สไลด์หลุมชนิด 14 หลุมที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

ผลการทดลองจากการศึกษาลักษณะดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
และการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิชั่น

ตารางผนวกที่ ๗1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว

Parameter	Soil			
	0-15 cm.	16-30 cm.	31-45 cm.	46-60 cm.
NH_4^+ $\mu\text{g/g (dry soil)}$	3.89 $\pm$ 3.28	5.83 $\pm$ 4.99	4.16 $\pm$ 2.07	6.94 $\pm$ 5.96
NO^-2	0.16 $\pm$ 0.12	2.02 $\pm$ 3.64	1.16 $\pm$ 1.99	0.99 $\pm$ 1.67
NO^3-	9.36 $\pm$ 2.45	6.89 $\pm$ 1.22	7.66 $\pm$ 4.89	8.06 $\pm$ 4.65
Organic Nitrogen	1,457.93 $\pm$ 404.30	1,532.87 $\pm$ 454.37	1,524.13 $\pm$ 415.58	2,329.77 $\pm$ 310.53
TN	1,471.33 $\pm$ 403.63	1,547.60 $\pm$ 453.14	1,537.11 $\pm$ 411.74	2,345.76 $\pm$ 307.65
TP	1,025.56 $\pm$ 1,243.51	628.26 $\pm$ 609.81	780.42 $\pm$ 837.44	707.93 $\pm$ 520.63
TOC	7,738.82 $\pm$ 4,074.12	6,478.80 $\pm$ 2,209.17	9,033.78 $\pm$ 3,079.55	12,812.04 $\pm$ 3,292.54
EPS	1,234.40 $\pm$ 95.61	1,528.80 $\pm$ 384.91	2,507.20 $\pm$ 275.19	2,371.20 $\pm$ 240.67
Biomass	6,504.42 $\pm$ 4,000.76	4,950.00 $\pm$ 2,008.43	6,526.58 $\pm$ 3,242.86	10,440.84 $\pm$ 3,064.54
Moisture Content	16.28 $\pm$ 6.50	22.52 $\pm$ 4.33	25.28 $\pm$ 3.81	26.37 $\pm$ 5.54
Temp ($^{\circ}\text{C}$)	36.40 $\pm$ 3.05	35.20 $\pm$ 4.44	33.40 $\pm$ 4.56	33.80 $\pm$ 3.77
pH	3.09 $\pm$ 0.24	3.82 $\pm$ 0.96	6.27 $\pm$ 0.69	5.93 $\pm$ 0.60

ตารางผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร

Parameter μg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	1.39	1.79	0.92	2.78	2.55
NO ⁻²	0.00	0.07	0.20	0.26	0.26
NO ³⁻	6.84	8.26	13.35	8.68	9.68
Organic Nitrogen	1,808.94	1,950.57	1,104.62	1,379.27	1,056.25
Total Nitrogen	1,817.16	1,960.68	1,119.09	1,390.99	1,068.75
Phosphate	248.03	3,061.35	243.41	1,383.81	191.20
Total Organic Carbon	5,989.50	14,890.40	7,218.80	5,298.90	5,296.50
EPS (mg/g)	1.27	1.38	1.14	1.23	1.16
Biomass	4781.39	14191.05	6460.46	4949.78	4774.10
Moisture Content	11.25	10.69	19.57	23.79	12.95
Temperature (°C)	39.00	36.00	34.00	33.00	40.00
pH	3.18	3.44	2.85	3.07	2.89

ตารางผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 16-30 เซนติเมตร

Parameter	Sample Site				
µg/g (dry soil)	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	0.46	11.09	11.10	2.31	4.16
NO ⁻²	0.07	0.40	0.93	0.20	8.50
NO ³⁻	5.27	6.19	7.34	7.13	8.50
Organic Nitrogen	2,064.28	1,873.17	1,194.14	974.13	1,558.62
Total Nitrogen	2,070.07	1,890.86	1,213.51	983.77	1,579.78
Phosphate	153.22	1,053.96	215.31	1,493.12	225.69
Total Organic Carbon	9,849.00	6,111.40	6,877.00	3,756.90	5,799.70
EPS (mg/g)	2.15	1.44	1.25	1.62	1.19
Biomass	8817.85	5518.96	6107.60	3452.02	5074.54
Moisture Content	23.15	18.69	23.78	28.78	18.15
Temperature (°C)	40.00	33.00	31.00	32.00	40.00
pH	5.37	3.59	3.12	4.05	2.98

ตารางผนวกที่ ๔ ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 31-45 เซนติเมตร

Parameter μg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	3.24	4.63	1.85	3.70	7.40
NO ⁻²	0.13	0.00	0.79	0.20	4.69
NO ³⁻	1.90	6.45	13.76	11.50	4.69
Organic Nitrogen	1,927.25	1,911.06	929.59	1,371.46	1,481.28
Total Nitrogen	1,932.51	1,922.14	945.99	1,386.87	1,498.05
Phosphate	186.72	1,266.94	2,029.43	255.00	164.02
Total Organic Carbon	5,585.60	11,249.40	9,717.20	6,105.40	12,511.30
EPS (mg/g)	2.88	2.67	2.22	2.50	2.27
Biomass	5173.80	10505.81	9353.33	5623.56	11915.17
Moisture Content	28.40	22.10	25.38	29.63	20.89
Temperature (°C)	40.00	32.00	30.00	29.00	36.00
pH	7.19	6.68	5.55	6.25	5.67

ตารางผนวกที่ ข5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 46-60 เซนติเมตร

Parameter µg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	1.39	5.09	2.77	9.25	16.18
NO ⁻²	0.00	0.07	0.40	0.53	3.96
NO ³⁻	3.46	7.82	14.57	10.50	3.96
Organic Nitrogen	2,513.82	2,602.91	1,813.38	2,425.74	2,293.01
Total Nitrogen	2,518.67	2,615.88	1,831.12	2,446.02	2,317.11
Phosphate	190.06	1,247.89	1,218.74	688.01	194.97
Total Organic Carbon	18,104.10	12,397.30	9,163.50	12,945.50	11,449.80
EPS (mg/g)	2.77	2.38	2.20	2.35	2.16
Biomass	16376.17	11904.40	8736.96	12216.65	10739.39
Moisture Content	32.75	20.67	26.76	30.77	20.87
Temperature (°C)	38.00	34.00	30.00	30.00	37.00
pH	6.92	5.95	5.49	5.87	5.41



ภาพผนวกที่ ข1 ขวดซีรัมที่ทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

ตารางผนวกที่ ข6 ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์ก๊าซมีเทนที่ระดับความลึกต่างๆ

Days	Methane Concentration (%)			
	15-30 cm.	16-30 cm.	31-45 cm.	46-60 cm.
0	4.8724	5.5346	5.7486	5.5072
3	4.5822	5.1942	5.3719	5.1442
6	4.3744	5.0113	4.9239	4.8505
9	4.1411	4.7286	4.4990	4.4802
12	3.8830	4.5035	4.0837	4.1198
15	3.7229	4.2618	3.7357	3.8435
18	3.5259	3.9555	3.2273	3.4055
21	3.2491	3.7623	2.7877	2.8471
24	2.8337	3.4285	2.1992	2.3287
27	2.4760	3.1904	1.6426	2.0243
30	2.0206	2.7282	1.2147	1.6869
33	1.7618	2.3802	0.9188	1.4913
36	1.5450	2.2067	0.8232	1.2748
39	1.4834	1.9818	0.7129	1.1576
42	1.3024	1.7993	0.5703	1.0406
45	1.1120	1.6364	0.4902	0.8972
48	0.9185	1.4576	0.3949	0.7616
51	0.8138	1.2599	0.3287	0.6608
54	0.6155	1.1241	0.2490	0.5302
57	0.4216	0.9866	0.2014	0.3711
60	0.3181	0.8359	0.1340	0.3373
63	0.2214	0.7007	0.0624	0.1855
66	0.1573	0.5800	0.0000	0.0656
69	0.0533	0.4894	0.0000	0.0000
72	0.0000	0.3515	0.0000	-
75	-	0.2561	-	-
78	-	0.1447	-	-
81	-	0.0755	-	-
84	-	0.0006	-	-
87	-	0.0000	-	-

การคำนวณการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากเปอร์เซ็นต์ (%) เป็นไมโครโมล (μmol)

การศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ระดับความลึกต่างๆ

สถานะของการทดลอง

ปริมาตรของขวดซีรัมที่ใช้ในการทดลอง 118 มิลลิลิตร (ml)

น้ำหนักเปียกของดิน 10 กรัม (g)

ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 25.28

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.1565)$
 $= 8.435$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2251)$
 $= 7.479$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2528)$
 $= 7.572$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2637)$
 $= 7.363$ กรัม (g)

ความหนาแน่นของดิน 1,111 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (1.11 กรัมต่อมิลลิลิตร)

ปริมาตรของดิน $= 10 \text{ กรัม} / 1.11 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร}$
 $= 9.0090$ มิลลิลิตร (ml)

ปริมาตรของอากาศที่เหลือภายในขวดซีรัม $= 118 - 9.0090$ มิลลิลิตร (ml)
 $= 108.991$ มิลลิลิตร (ml)

อุณหภูมิขณะทดลอง 30 องศาเซลเซียส (303 เคลวิน)

สมมติความดันภายในขวดซีรัมเท่ากับ 1 ความดันบรรยากาศ (atm)
ในระบบปิดสามารถคำนวณหน่วยของก๊าซเป็นโมล (mole) จากสมการ

$$PV = nRT$$

เมื่อ P = Partial pressure หรือ เปอร์เซ็นต์ของก๊าซ

$$R = 82.06 \text{ atm} \cdot \text{ml} / \text{mole} \cdot \text{K}$$

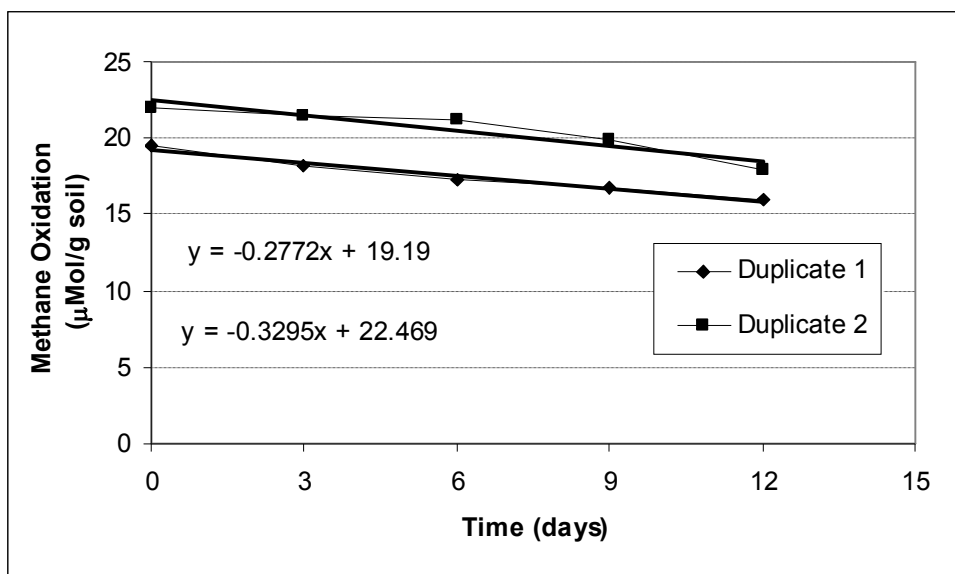
$$K = 303 \text{ K}$$

n = จำนวนโมลของก๊าซ

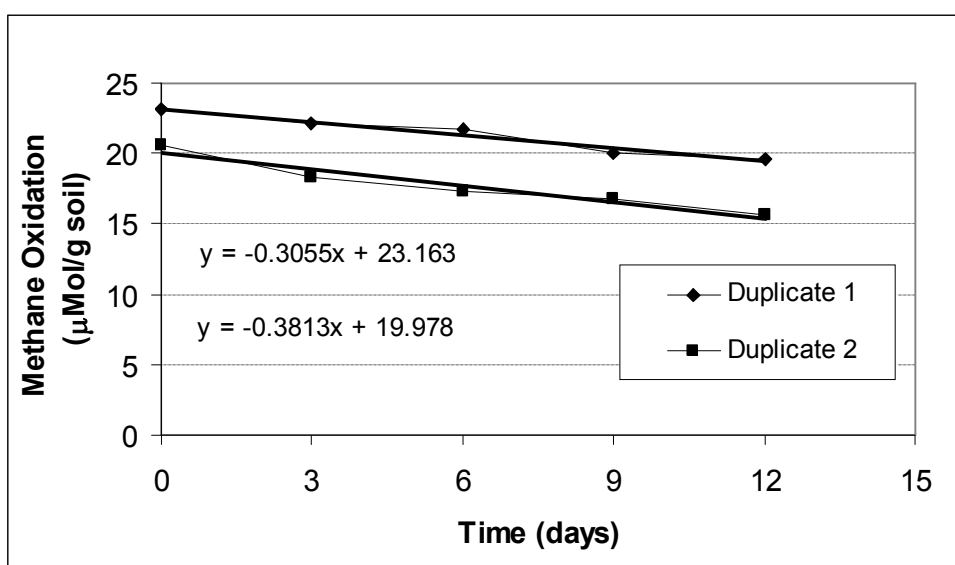
$$\text{จำนวนโมลของก๊าซ CH}_4 \text{ (mole)} = \frac{(A\%)(108.991 \text{ ml})}{82.06 \text{ atm} \cdot \text{ml} / \text{mole} \cdot \text{K}}$$

การคำนวณอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

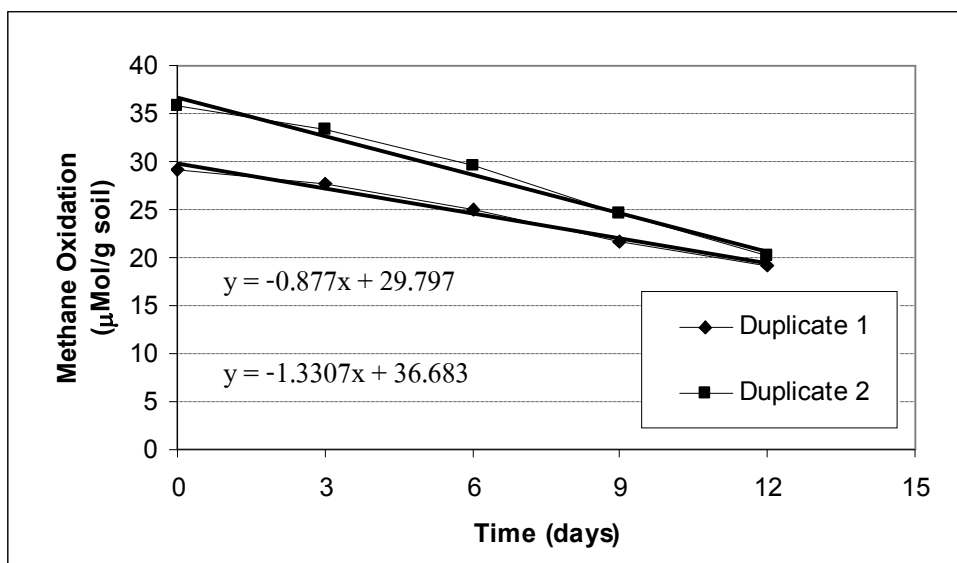
- เริ่มจากการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากเปอร์เซ็นต์ (%) เป็น ไมโครโมล (μmol)
- นำน้ำหนักแห้งของดินที่ระดับความลึกต่างๆมาหารเพื่อเปรียบเทียบต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง)
- และนำข้อมูลในการลดลงของมีเทนต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง) เปรียบเทียบกับเวลา จะได้ Methane Oxidation Rate จากความชันของกราฟดังภาพผนวกที่ ข 2 – ข 21



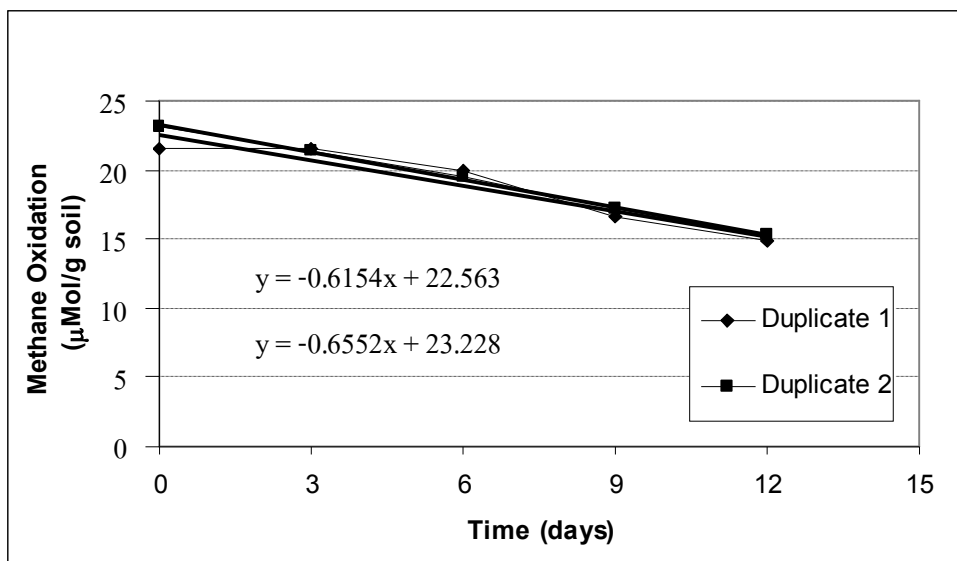
ภาพผนวกที่ ข2 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 0-15 ซม.



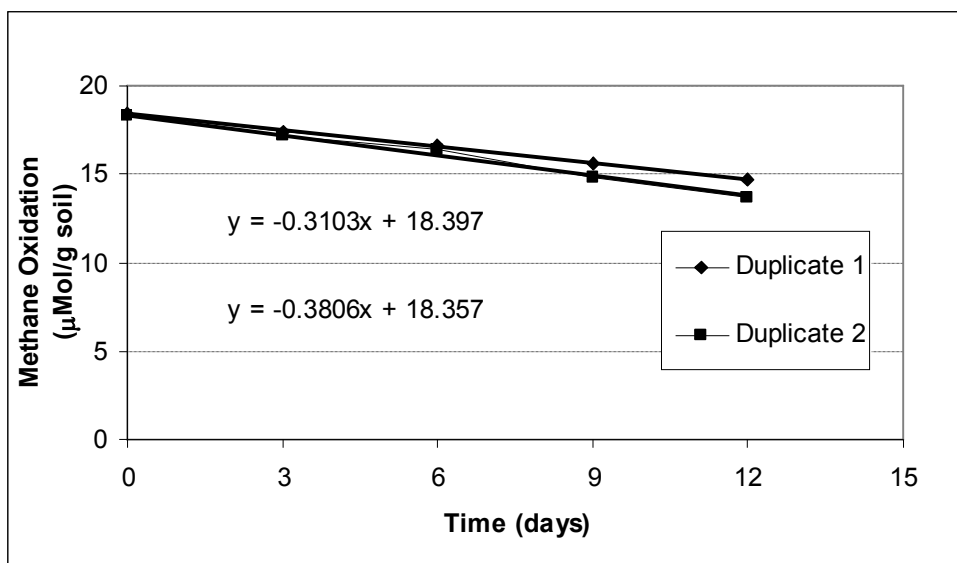
ภาพผนวกที่ ข3 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 15-30 ซม.



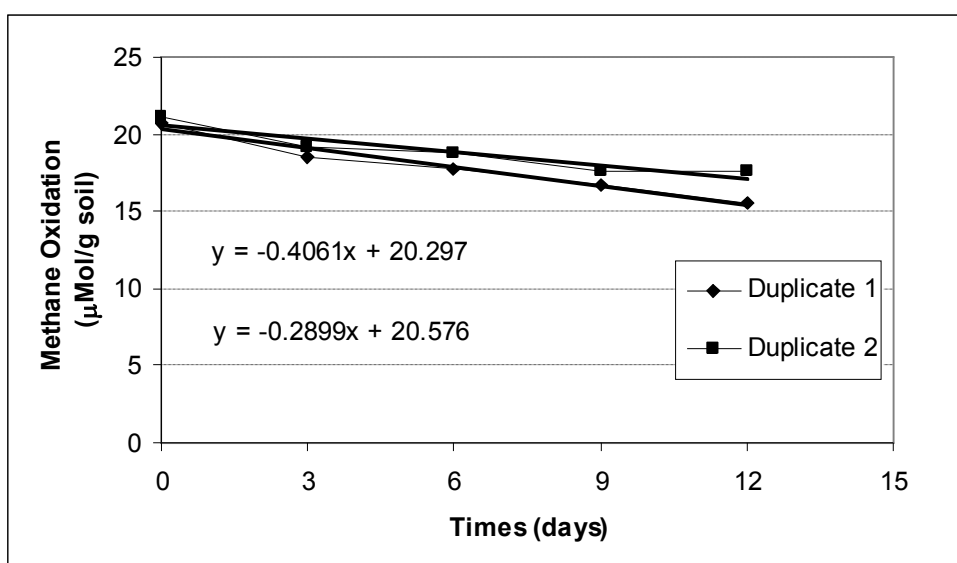
ภาพผนวกที่ ข4 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 31-45 ซม.



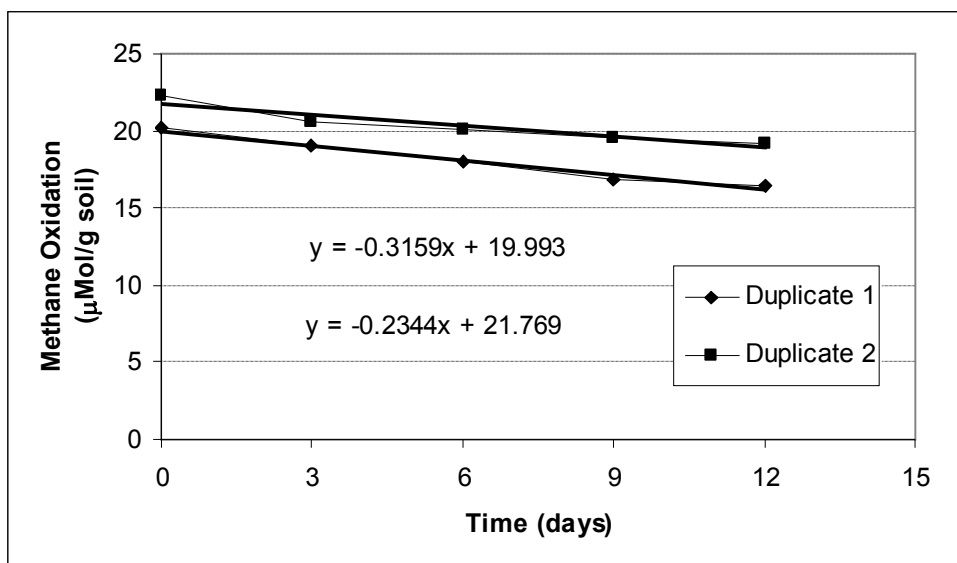
ภาพผนวกที่ ข5 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 46-60 ซม.



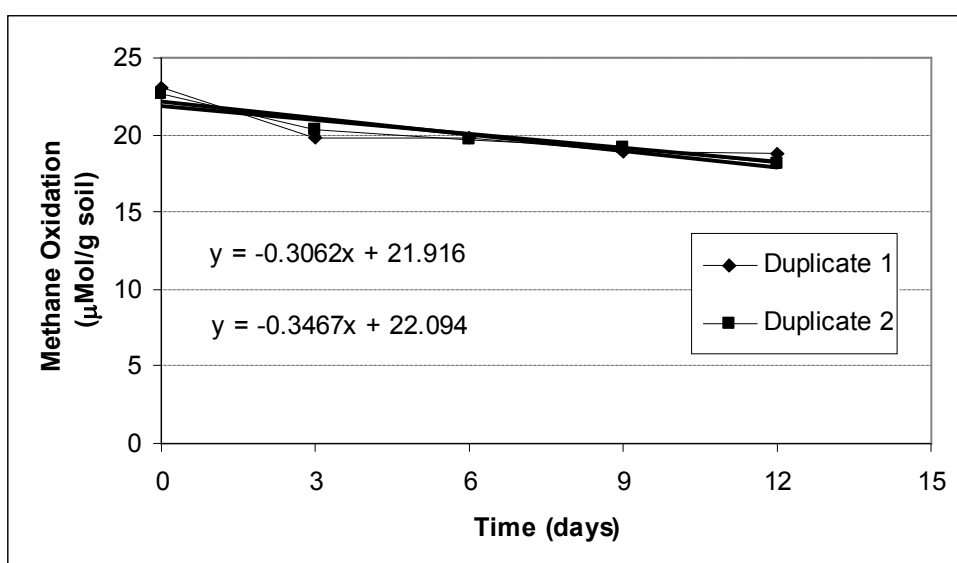
ภาพผนวกที่ ข6 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 0-15 ซม.



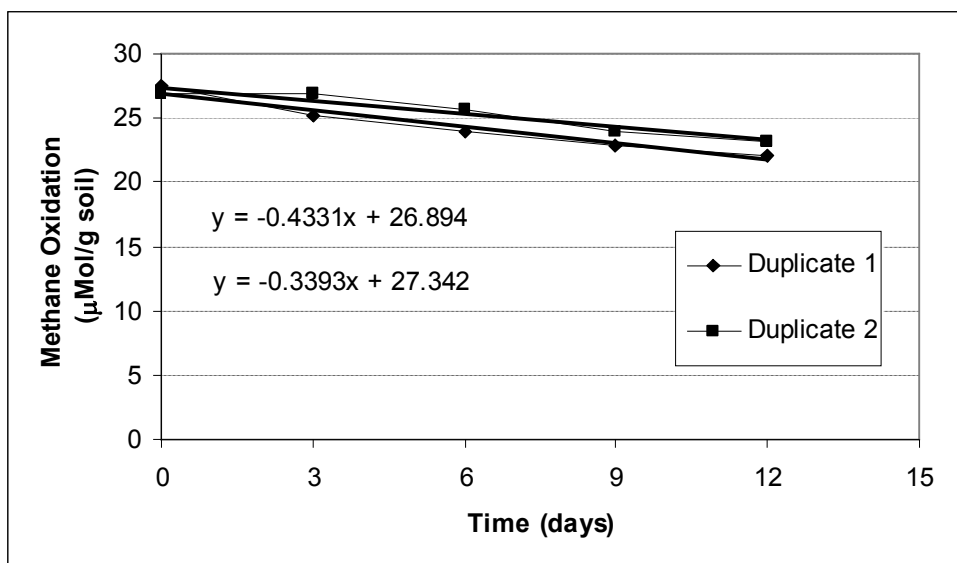
ภาพผนวกที่ ข7 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 15-30 ซม.



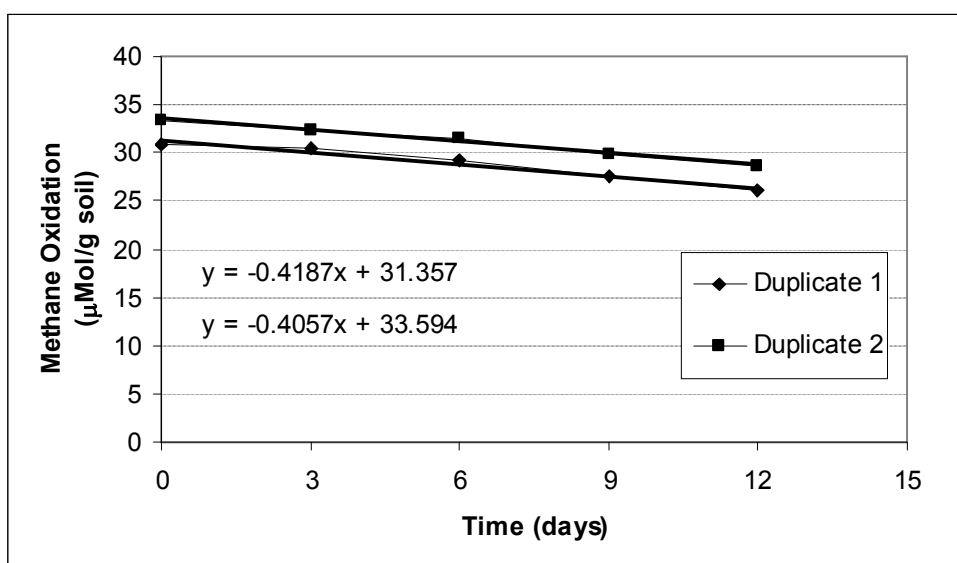
ภาพผนวกที่ ข8 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 31-45 ซม.



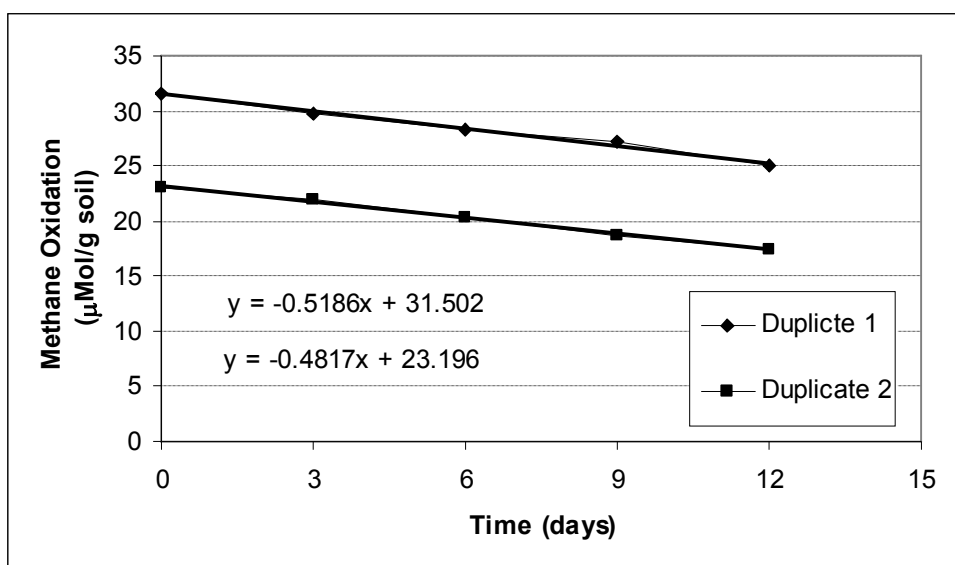
ภาพผนวกที่ ข9 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 46-60 ซม.



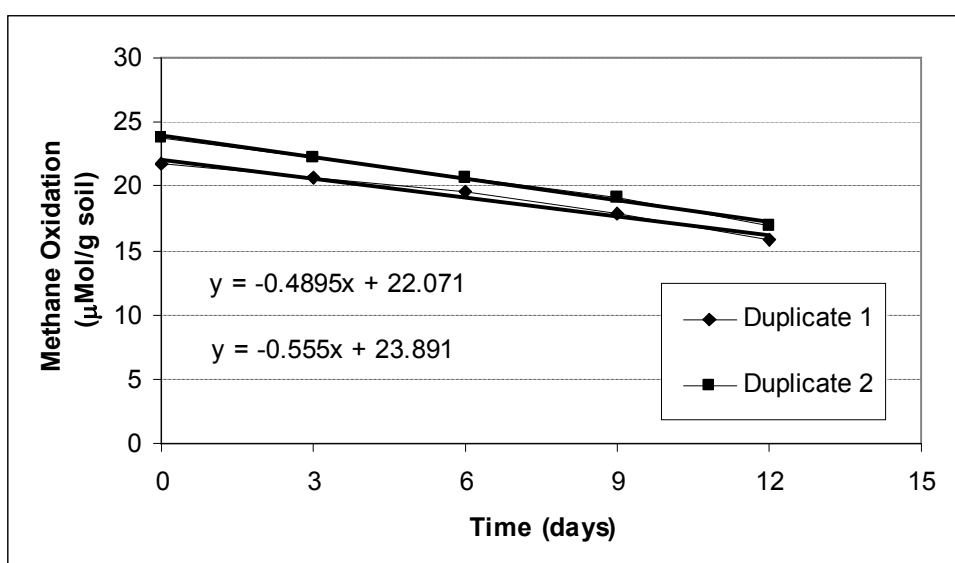
ภาพผนวกที่ ข10 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 0-15 ซม.



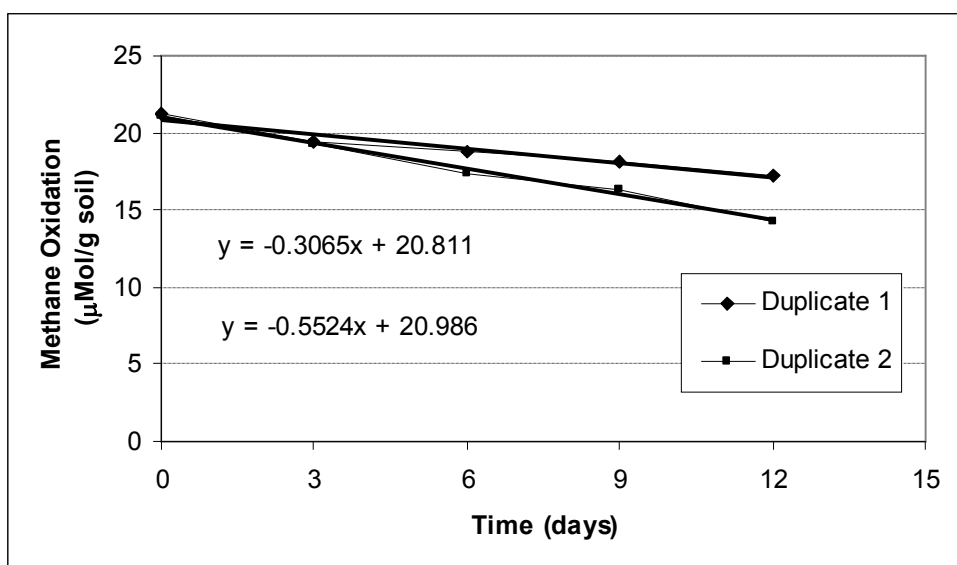
ภาพผนวกที่ ข11 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 15-30 ซม.



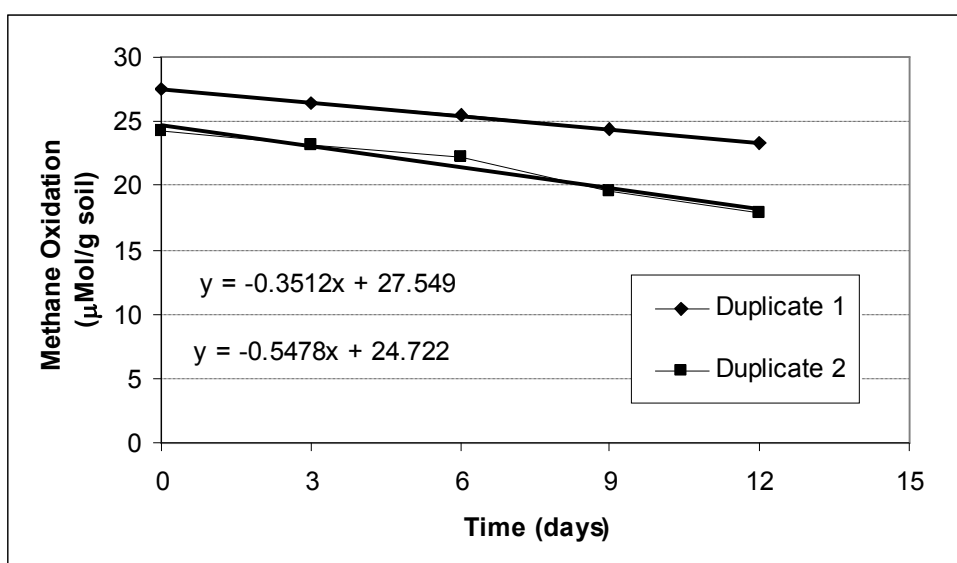
ภาพผนวกที่ ข12 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 31-45 ซม.



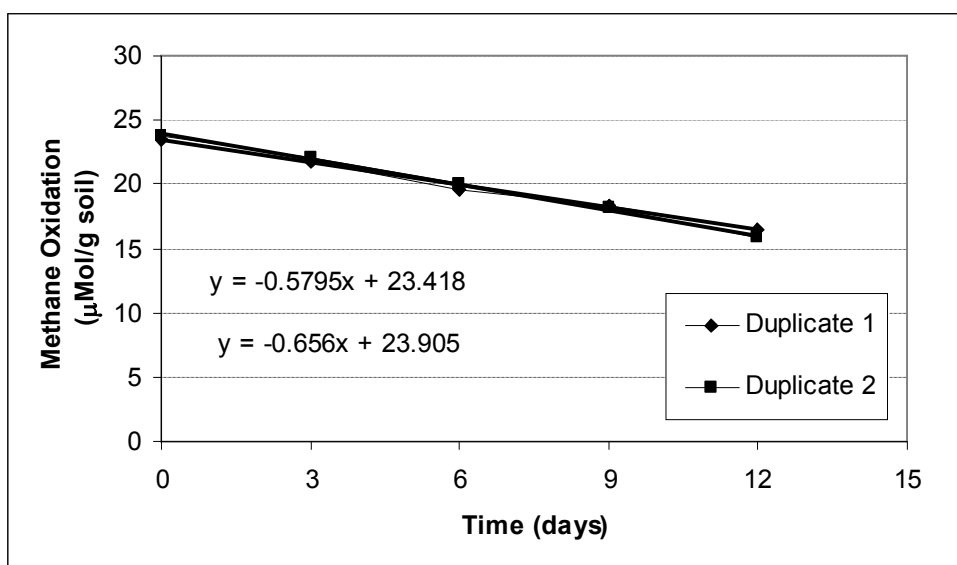
ภาพผนวกที่ ข13 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 46-60 ซม.



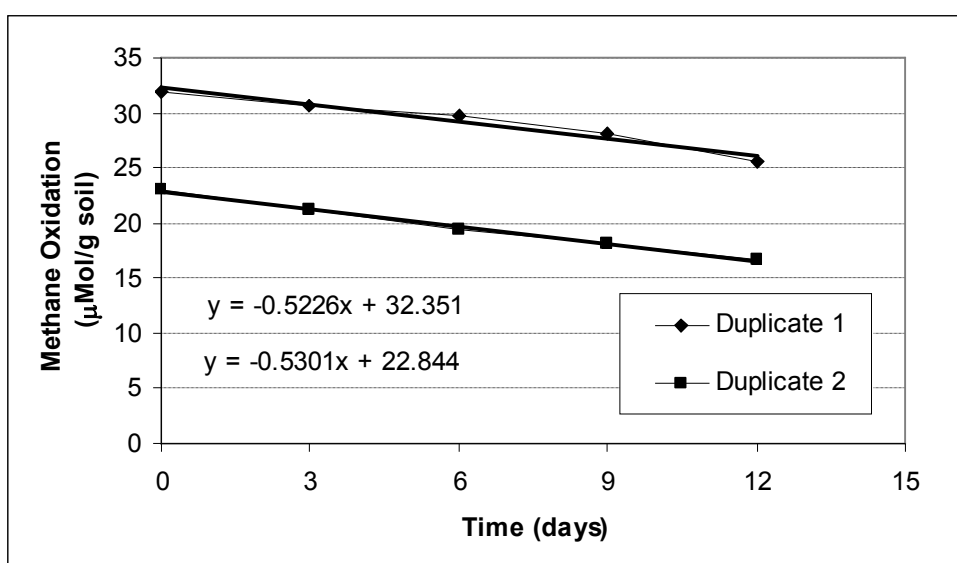
ภาพผนวกที่ ข14 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 0-15 ซม.



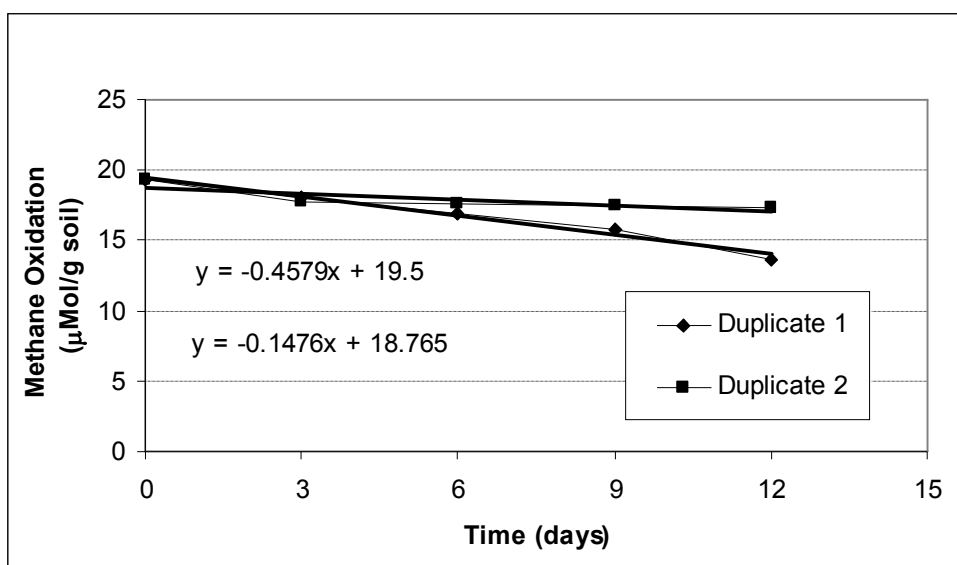
ภาพผนวกที่ ข15 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 15-30 ซม.



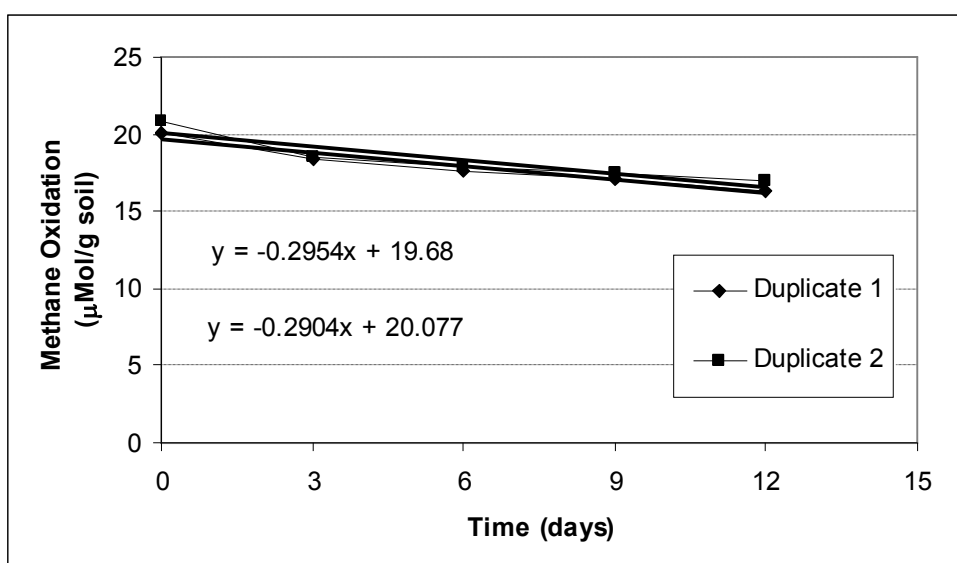
ภาพผนวกที่ ข16 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 31-45 ซม.



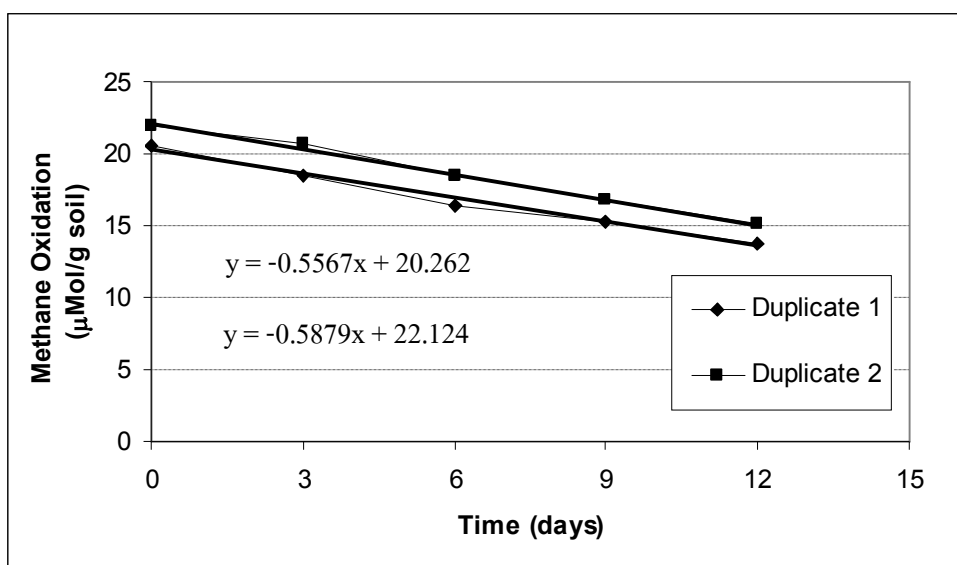
ภาพผนวกที่ ข17 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 46-60 ซม.



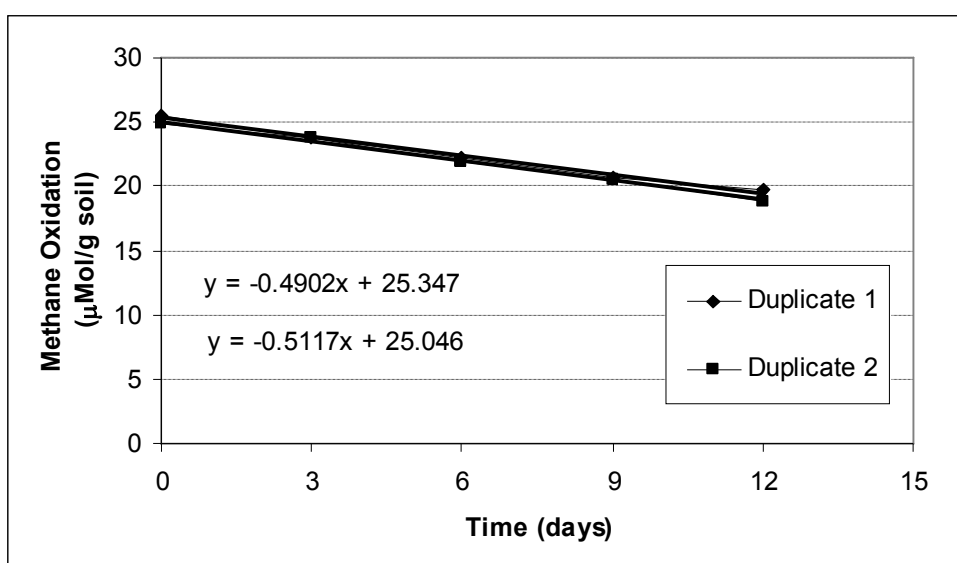
ภาพผนวกที่ ข18 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 0-15 ซม.



ภาพผนวกที่ ข19 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 15-30 ซม.



ภาพผนวกที่ ข20 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 31-45 ซม.



ภาพผนวกที่ ข21 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 46-60 ซม.

ภาคผนวก ค

การศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NMS (NMS : Nitrate Mineral Salts Medium)

ส่วนประกอบ

● $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
● KNO_3	1	กรัม
● $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.717	กรัม
● KH_2PO_4	0.272	กรัม
● $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
● Ferric ammonium EDTA	0.004	กรัม
● Trace element solution	0.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรแล้วจึงนำมาต้มโดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งเดือด ปรับ pH เป็น 8.3 และนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนำไป Autoclave ที่ความดัน 15 psi, อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

การคำนวณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในหน่วย MPN / g soil

สถานะของการทดลอง

น้ำหนักเปียกของดิน 1 กรัม (g) ในสารละลายเจือจาง 9.5 มิลลิลิตร
ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 25.28

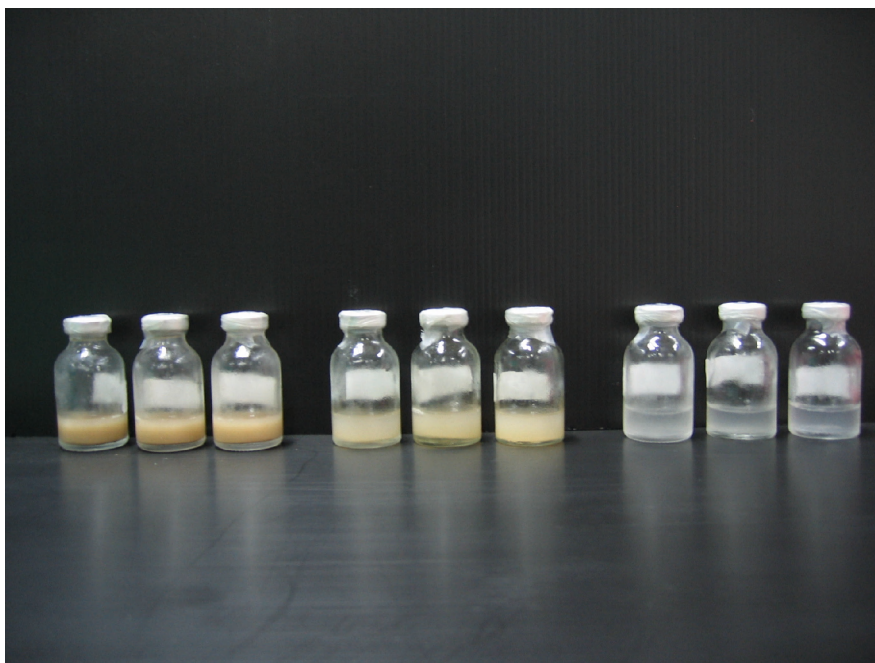
ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.1565)	
	= 0.8435	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2251)	
	= 0.7479	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2528)	
	= 0.7572	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2637)	
	= 0.7363	กรัม (g)

$\text{ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (MPN / ml)} = \frac{\text{จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก}}{[\text{ปริมาณตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) X ปริมาณตัวอย่างในทุกหลอด(ml)}]^{0.5}}$

นำผลการการศึกษาของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ให้ผลการทดลองเป็นบวกและลบมาทำการคำนวณดังสมการด้านบนแล้วจึงคูณด้วยปริมาตรของสารละลายเจือจาง (9.5 มิลลิลิตร) และหารด้วยน้ำหนักแห้งของแต่ละตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค1 การศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นในระบบ 3 ขวด



ภาพผนวกที่ ค2 เปรียบเทียบลักษณะของผลการศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน
ในวันที่ 1 และ 45

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณขดชีรรมที่ให้ผลบวกในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธี
เอ็มพีเอ็นที่ระดับความลึกต่างๆ

Sample	Depth (cm.)	Positive Tube	Concentration
1	0 – 15	3-3-1	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-2	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-2}-10^{-4}$
2	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-0	$10^{-1}-10^{-3}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
3	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-1	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
	46 - 60	3-3-2	$10^{-1}-10^{-3}$
4	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-1	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
5	0 – 15	3-3-1	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-0	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-2-1	$10^{-1}-10^{-3}$

ภาคผนวก ง

การศึกษาและวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

การคำนวณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในหน่วย Cells / g soil

สถานะของการทดลอง

น้ำหนักเปียกของดิน 3 กรัม (g) ในสารละลายเจือจาง 9.5 มิลลิลิตร
ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 25.28

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.1565)$
 $= 2.5305$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2251)$
 $= 2.3247$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2528)$
 $= 2.2416$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2637)$
 $= 2.2089$ กรัม (g)

ปริมาณสารละลายดินเจือจางที่นำมา Fixed Cells 300 ไมโครลิตร (μl)

ปริมาณ Fixed Cell ที่หยดบนสไลด์แบบหลุม 3 ไมโครลิตร (μl)

กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการขยาย 100 เท่า

Field Number ของกล้อง 22

รัศมีของหลุมในสไลด์ 2.5 มิลลิเมตร (mm.)

ขนาดของพื้นที่ที่มองเห็นจากเลนส์ตา $= \pi r^2$
 $= \pi \times (22 / 2 \times 100)^2$

ขนาดพื้นที่ของหลุมในสไลด์ $= \pi r^2$
 $= \pi \times (2.5)^2$

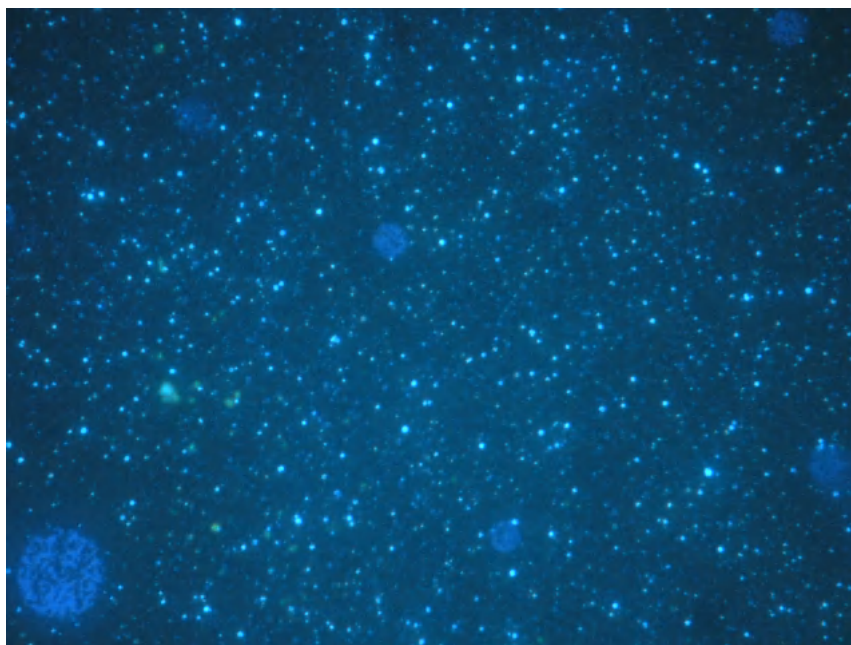
กำหนดจำนวนเซลล์ที่นับได้เฉลี่ยต่อภาพถ่าย $= A$

$$\text{Cell / g soil} = \frac{A \times \pi \times (2.5)^2 \times 9.5 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{l}}{\pi \times (22 / 2 \times 100)^2 \times 3 \mu\text{l} \times 1 \text{ ml} \times \text{dry weight}}$$

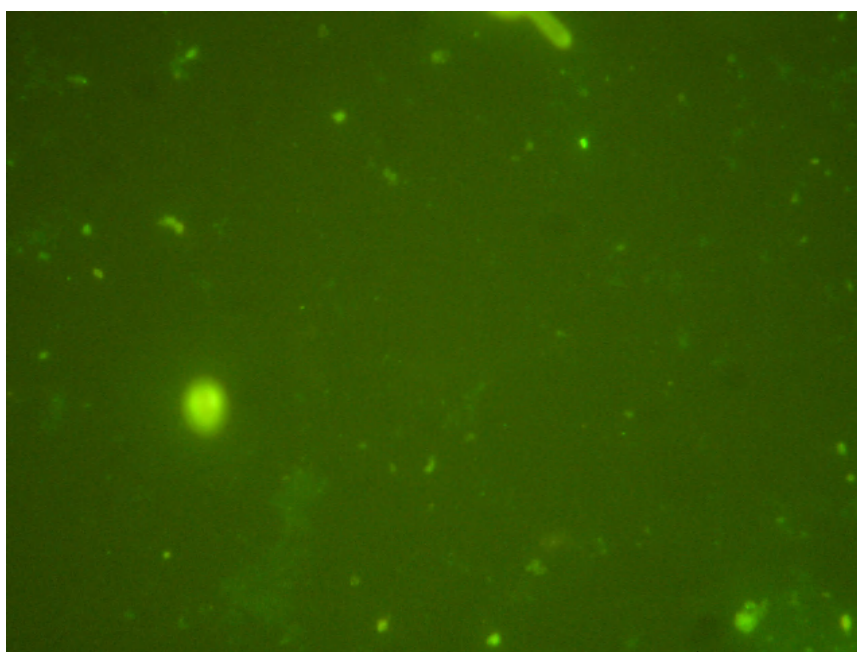
การนับจำนวนเซลล์จากภาพถ่ายในงานฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ในการนับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษานั้นอาศัยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ในการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งโปรแกรมดังกล่าว คือ โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 โดยในการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 , 2 , *Methylocella palustris* , *Methylocapsa acidiphila* , *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* มีวิธีการดังต่อไปนี้

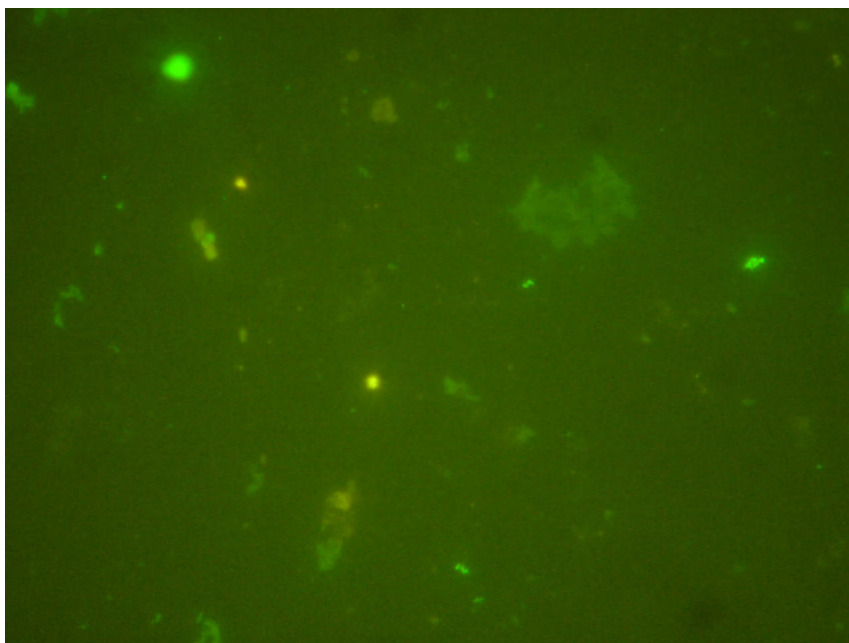
- ใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ในการเปิด File รูปภาพที่ได้จากการถ่ายภาพเซลล์ที่ทำการศึกษาด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน
- เลือกอุปกรณ์เป็นถังน้ำ (Paint Bucket Tool) เพื่อเปลี่ยนตำแหน่งหรือบริเวณที่ไม่มีการเรืองแสงของเซลล์ (บริเวณที่ไม่ใช่เซลล์ที่ต้องการศึกษา) ให้เปลี่ยนเป็นสีดำจนกว่าจะเหลือเฉพาะจุดหรือเซลล์ที่มีการเรืองแสงเท่านั้น
- คลิกเลือก Image ➡ Adjustments ➡ Threshold ที่ร้อยละ 50 เพื่อเปลี่ยนรูปภาพเป็นสีขาวดำ และเลือก Threshold ที่ร้อยละ 50 เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ปรากฏเท่ากับที่เลือกไว้ในตอนแรก
- คลิกเลือกกล่อง Histogram และลากลูกศรให้ครบทั้งภาพเพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ปรากฏ โดยผลการนับจะแสดงอยู่ใน Count ในกล่อง Histogram ดังกล่าว



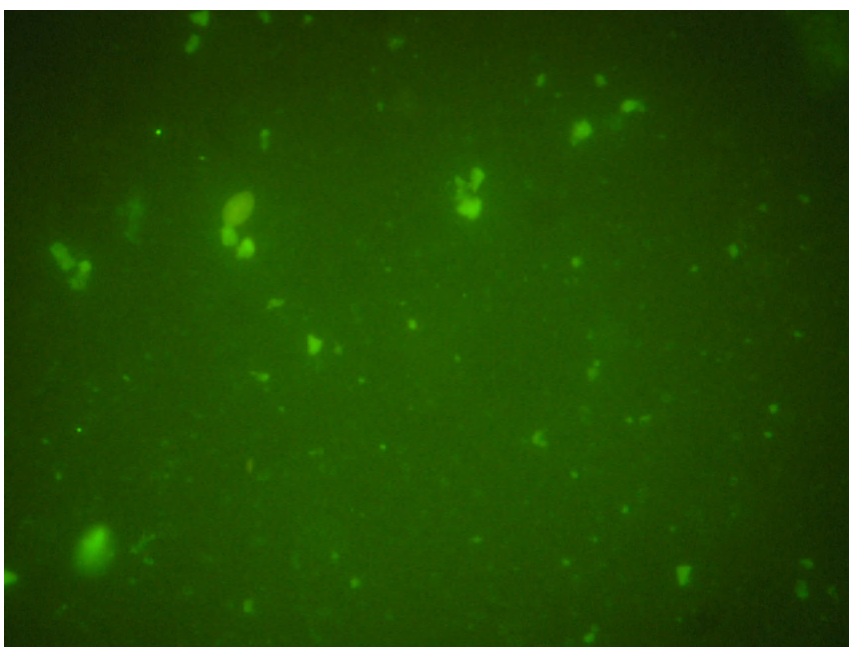
ภาพผนวกที่ ง1 ภาพถ่ายผลการศึกษাপริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้าย
พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย DAPI)



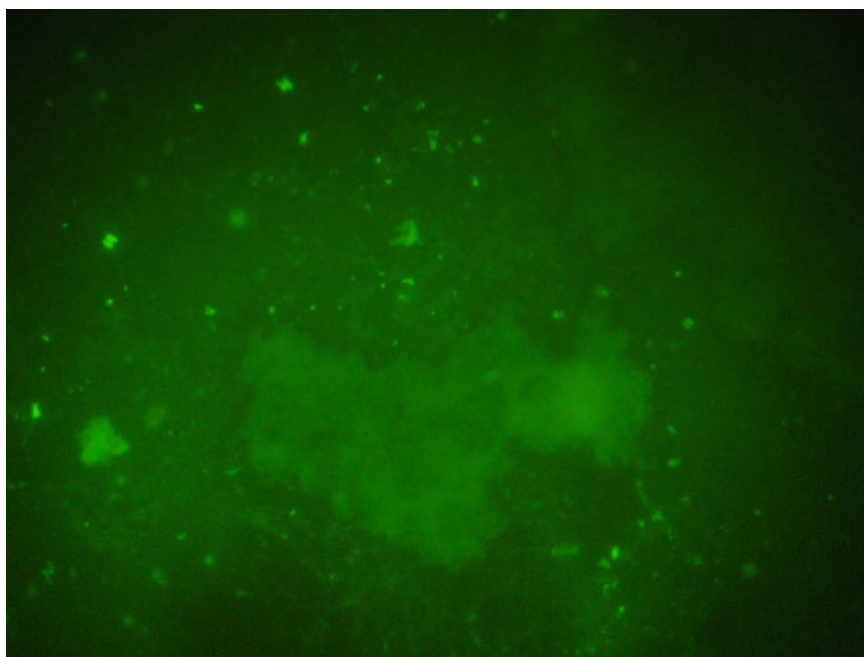
ภาพผนวกที่ ง2 ภาพถ่ายผลการศึกษাপริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในดินกลบทับ
ชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย MY84+MY705)



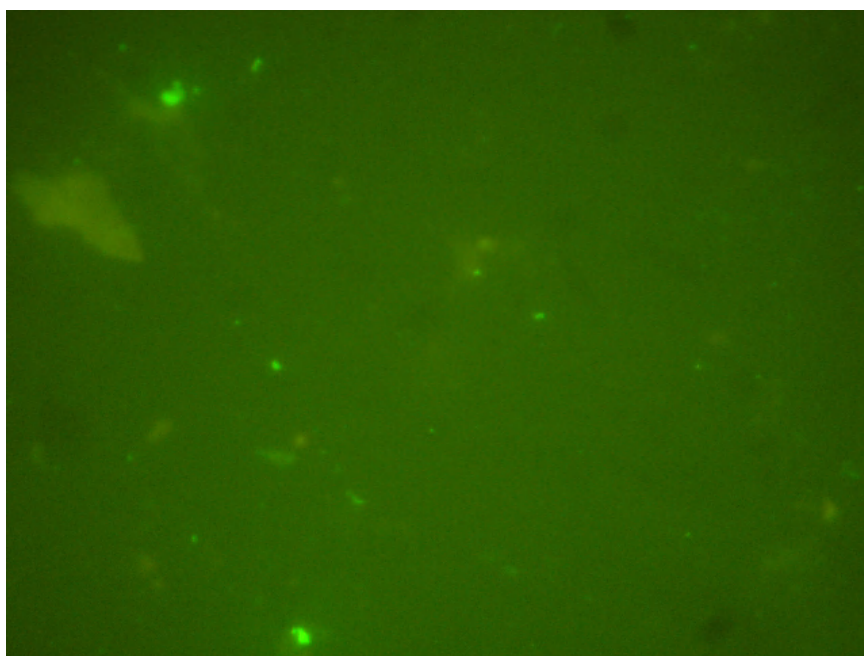
ภาพผนวกที่ ง3 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในดินกลบทับ
ชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย MCA450)



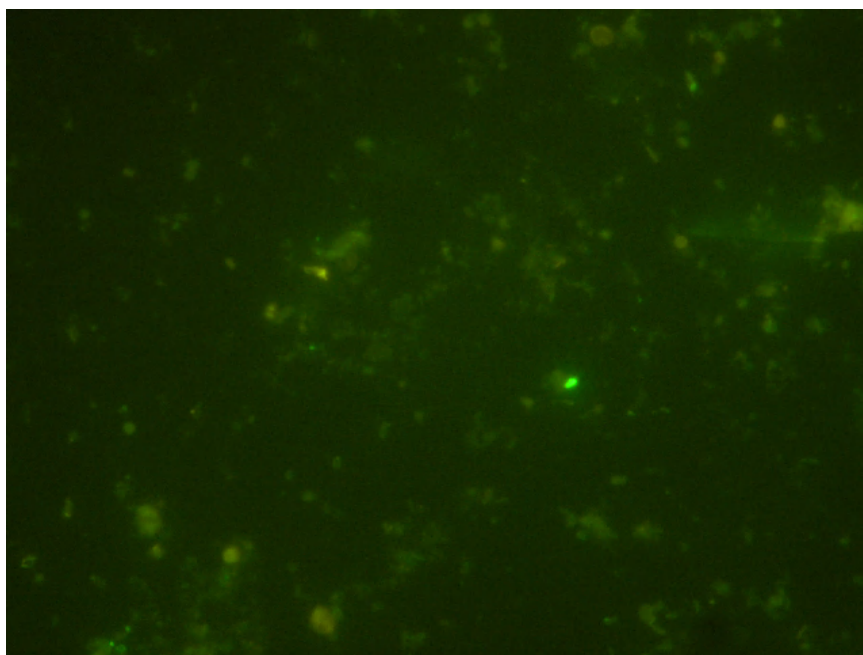
ภาพผนวกที่ ง4 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ *Methylocapsa*
acidiphila ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์
ด้วย Mcaps-1032)



ภาพผนวกที่ ๖5 ภาพถ่ายผลการศึกษากายภาพปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ *Methylocella palustris* ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย Mcells-1026)



ภาพผนวกที่ ๖6 ภาพถ่ายผลการศึกษากายภาพปริมาณเชื้อ *Nitrosomonas spp.* ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย NSM 156)



ภาพผนวกที่ ง7. ภาพถ่ายผลการศึกษากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของ *Nitrobacter* spp. ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้น
สุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย NIT 3)

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

การเตรียม 3X PBS

- NaCl 24 กรัม
- Na₂HPO₄, 7H₂O 3.45 กรัม
- KCl 0.6 กรัม
- KH₂PO₄ 0.6 กรัม
- Milli-Q water 1,000 ml

Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C
นาน 15 นาที