ภาคผนวก

1. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ประยุกต์วิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานไนไตรต์</u>

1. เตรียมหลอดทดลองที่มีไนไตรต์ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, และ 0.1 μmole ในสารละลายมาตรฐาน 1.0 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ KNO_2
2. เติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 โมลาร์ HCl 0.5 มิลลิลิตร
3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.002%(w/v)N-(1-napthyl) ethyllenediamine.2HCl เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที
4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

<u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส</u>

สารผสมสำหรับการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	0.4	0.7
1.0 M Tris-HCl buffer pH 7.5	0.1	0.1
0.1 M KNO_3	0.1	0.1
sample	0.3	-

1. เริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 1.0 มิลลิโมลาร์ NADH 0.1 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10, 20, 30 และ 40 นาที
2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 โมลาร์ HCl 0.5 มิลลิลิตร
3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.002%(w/v)N-(1-napthyl) ethyllenediamine.2HCl เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที
4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. การหาปริมาณโปรตีน

ประยุกต์วิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองให้มีโปรตีนปริมาณ 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 0.1 มิลลิลิตรต่อหลอด

<u>การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน</u>

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	-	0.1
สารละลายโปรตีนมาตรฐาน	0.1	-
10%Deoxycholate	0.4	0.4
2%Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH	3.0	3.0
1%$CuSO_4$+2%Na/K tartrate	0.1	0.1

เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciacalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

<u>การหาปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่าง</u>

เจือจางโปรตีนในสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

3. การวัดปริมาณไนเตรต

โดยประยุกต์วิธีของ Cataldo และคณะ (1975)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานไนเตรต</u>

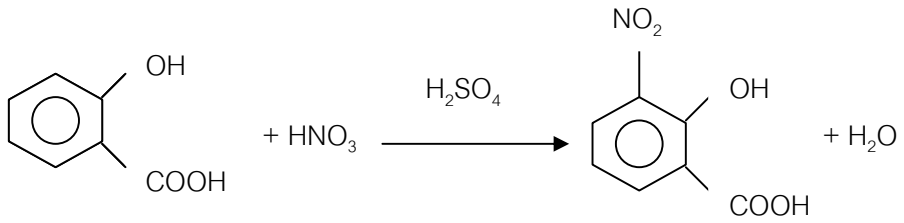
เตรียมหลอดทดลองที่มี KNO_3 เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 ไมโครโมลต่อ 0.2 มิลลิลิตร จากสารละลาย 5 มิลลิโมลาร์ KNO_3

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	-	0.2
KNO_3 ความเข้มข้นต่างๆ	0.2	-
5% Salicylic acid ใน conc. H_2SO_4	0.8	0.8

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม 4 นอร์มอล NaOH 9.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

<u>การวัดปริมาณไนเตรตในสารละลายตัวอย่าง</u>

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้วให้ได้ปริมาณไนเตรตอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ไมครโมลต่อ0.2 มิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณไนเตรตเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานไนเตรต



รูปที่ 37. แสดงปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซาลิซิลิก (สมศักดิ์ มณีพงษ์, 2537)

4. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายใน Illuminated Shaker

<u>สภาวะในการเพาะเลี้ยง</u>

ตั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้ม 175 และ 622 μmole m^{-2} s^{-1}

<u>การเตรียมสาหร่าย</u>

นำสาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อน มาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง แล้วใช้สาหร่ายประมาณ 2 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน Illuminated Shaker

ในกรณีที่เป็นการ subculture ของเซลล์สาหร่าย ให้นำอาหารเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์สาหร่ายมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์สาหร่าย จากนั้นล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่น หรืออาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจึงถ่ายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารใหม่ และทำการ subculture ทุกสัปดาห์

สูตรอาหาร BG-11 สำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ใช้อาหารสูตร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534) โดยเตรียมเป็น stock ความเข้มข้น 20 เท่า เมื่อจะใช้ จึงนำมาเจือจาง ปรับ pH ให้ได้ 7.4และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 3. สูตรอาหาร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534)

สารเคมี	ความเข้มข้น (g/l)
$NaNO_3$	15.0
K_2HPO_4	0.4
$MgSO_4.7H_2O$	0.75
$CaCl_2.2H_2O$	0.36
Citric acid	0.06
Ferric ammonium citrate	0.06
EDTA disodium magnesium salt	0.01
Na_2CO_3	0.02
Trace metal mix A5	1.0 ml

เติมธาตุอาหารเหล่านี้ลงใน Deionized water 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.4 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 4. ส่วนประกอบของ Trace metal mix A5

สารเคมี	ความเข้มข้น (g/l)
H_3BO_4	28.6
$MnCl_2.4H_2O$	18.1
$ZnSO_4.7H_2O$	2.22
$NaMoO_4.2H_2O$	3.9
$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.494

ตารางที่ 5. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกันและให้แสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} HCO_3^-

HCO_3^-(g/l) / วันที่เพาะเลี้ยง	ไม่มี	2	4	6
เริ่มต้น	0.32 ± 0.01^{a}	0.32 ± 0.003^{a}	0.37 ± 0.044^{aa}	0.38 ± 0.002^{aa}
1	0.46 ± 0.008^{b}	0.63 ± 0.025^{bb}	0.66 ± 0.042^{bb}	0.69 ± 0.034^{bb}
2	0.73 ± 0.067^{c}	1.08 ± 0.013^{cc}	1.09 ± 0.046^{cc}	1.10 ± 0.024^{cc}
3	1.04 ± 0.006^{d}	1.23 ± 0.011^{dd}	1.26 ± 0.014^{dd}	1.26 ± 0.001^{dd}
4	1.17 ± 0.011^{e}	1.32 ± 0.001^{ee}	1.32 ± 0.005^{ee}	1.33 ± 0.003^{ee}
5	1.25 ± 0.086^{f}	1.32 ± 0.002^{ff}	1.32 ± 0.002^{ff}	1.32 ± 0.001^{ff}
6	1.32 ± 0.005^{g}	1.33 ± 0.002^{g}	1.34 ± 0.001^{g}	1.34 ± 0.002^{g}
7	1.34 ± 0.003^{h}	1.36 ± 0.004^{h}	1.37 ± 0.003^{h}	1.37 ± 0.001^{h}

^{a}, ^{aa} แสดงความแตกต่างของข้อมูล ในวันเริ่มต้นเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{b}, ^{bb} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{c}, ^{cc} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{d}, ^{dd} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{e}, ^{ee} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{f}, ^{ff} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{g}, ^{gg} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{h}, ^{hh} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล ได้วิเคราะห์ความแตกต่างเฉพาะข้อมูลในวันเดียวกันเท่านั้น (ในแถวเดียวกัน)

ตารางที่ 6. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกันและให้แสง 622 μmole m^{-2} s^{-1} HCO_3^-

HCO_3^-(g/l) / วันที่เพาะเลี้ยง	ไม่มี	2	4	6
เริ่มต้น	0.30 ± 0.009^{a}	0.28 ± 0.002^{a}	0.29 ± 0.001^{a}	0.35 ± 0.015^{aa}
1	0.77 ± 0.038^{b}	0.99 ± 0.058^{bb}	1.05 ± 0.011^{bbb}	1.05 ± 0.009^{bbb}
2	1.08 ± 0.023^{c}	1.29 ± 0.004^{cc}	1.29 ± 0.004^{cc}	1.30 ± 0.003^{cc}
3	1.21 ± 0.005^{d}	1.28 ± 0.009^{dd}	1.30 ± 0.001^{dd}	1.31 ± 0.001^{dd}
4	1.31 ± 0.001^{e}	1.28 ± 0.032^{e}	1.29 ± 0.004^{e}	1.33 ± 0.001^{e}
5	1.30 ± 0.002^{f}			

^{a}, ^{aa} แสดงความแตกต่างของข้อมูล ในวันเริ่มต้นเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{b}, ^{bb}, ^{bbb} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{c}, ^{cc} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{d}, ^{dd} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{e}, ^{ee} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{f}, ^{ff} แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล ได้วิเคราะห์ความแตกต่างเฉพาะข้อมูลในวันเดียวกันเท่านั้น (ในแถวเดียวกัน)

ตารางที่ 7. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกัน และให้แสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} HCO_3^-

NO_3^-(mM) / วันที่เพาะเลี้ยง	1.10	8.82	17.60	35.30
0	0.08 ± 0.003	0.08 ± 0.002	0.10 ± 0.001	0.09 ± 0.003
2	0.22 ± 0.017	0.21 ± 0.013	0.19 ±0.032	0.18 ± 0.044
4	0.40 ± 0.045 [c]	0.41 ± 0.044 [c]	0.39 ±0.056 [c]	0.55 ± 0.052 [cc]
6	0.86 ± 0.090 [d]	0.88 ± 0.038 [d]	1.04 ± 0.024 [dd]	1.02 ± 0.049 [dd]
8	1.18 ± 0.034 [e]	1.23 ± 0.019 [ee]	1.28 ±0.009 [e ee]	
10	1.35 ± 0.012 [f]	1.36 ± 0.002 [f]	1.36 ± 0.003 [f]	

[a], [aa] แสดงความแตกต่างของข้อมูล ในวันเริ่มต้นเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[b], [bb] แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[c], [cc] แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[d], [dd] แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[e], [ee] แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[f], [ff] แสดงความแตกต่างของข้อมูลในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล ได้วิเคราะห์ความแตกต่างเฉพาะข้อมูลในวันเดียวกันเท่านั้น (ในแถวเดียวกัน)

ตารางที่ 8. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายเมื่อใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดต่างกันและใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในการวิเคราะห์

บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด	ค่าแอคติวิตีของ NR (nmole/min/mg.)
MOPS+Chymostatin	1.42 ± 0.001^{a}
MOPS	1.53 ± 0.001^{b}
Tris-HCl+Chymostatin	1.35 ± 0.001^{c}
Tris	1.36 ± 0.001^{c}

a, b, c แสดงความแตกต่างของข้อมูล ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 9. ผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

สารดีเทอร์เจนต์	ค่าแอคติวิตีของ NR เมื่อมีสารดีเทอร์เจนต์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน (nmole/min/mg.)	
	0.1 %	0.4%
CHAPS	0.65 ± 0.070^{b}	0.17 ± 0.003^{e}
Octyl β-D- glucopyranoside	1.29 ± 0.060^{c}	0.21 ± 0.060^{e}
Deoxycholate	0.39 ± 0.115^{a}	0.10 ± 0.016^{d}
Triton X-100	0.27 ± 0.013^{a}	0.24 ± 0.004^{e}
([octyl phenoxy] polyethoxyethanol)	0.33 ± 0.006^{a}	0.47 ± 0.263^{f}
Tween-20	1.13 ± 0.175^{c}	1.11 ± 0.025^{g}
SDS	0.71 ± 0.014^{b}	0.09 ± 0.007^{d}

a, b, c แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%เมื่อใช้สารดีเทอร์เจนต์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1 % (ในคอลัมน์เดียวกัน)

d, e, f, g แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%เมื่อใช้สารดีเทอร์เจนต์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.4 % (ในคอลัมน์เดียวกัน)

ตารางที่ 10. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ NR เมื่อเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

เวลาที่เก็บ (วัน)	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ NR (%) ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน (^{O}C)			
	อุณหภูมิห้อง	4	-20	-80
0	100.00 ± 2.687 [a]	100.00 ± 2.687 [a]	100.00 ± 2.687 [a]	100.00 ± 2.687 [a]
1	69.43 ± 2.801 [b]	109.74 ± 5.749 [bb]	115.00 ± 1.208 [bb]	112.50 ± 4.332 [bb]
2	43.32 ± 3.688 [c]	108.45 ± 4.655 [cc]	110.21 ± 2.587 [cc]	108.84 ± 4.930 [cc]
3	30.57 ± 4.360 [d]	98.05 ± 2.106 [dd]	105.02 ± 2.502 [ddd]	105.11 ± 3.437 [ddd]
7	7.97 ± 2.255 [e]	96.68 ± 2.780 [ee]	95.48 ± 2.540 [ee]	80.07 ± 2.750 [eee]

[a], [aa] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% (ในแถวเดียวกัน)

[b], [bb] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 วัน (ในแถวเดียวกัน)

[c], [cc], [ccc] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 วัน (ในแถวเดียวกัน)

[d], [dd], [ddd] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน (ในแถวเดียวกัน)

[e], [ee], [eee] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน (ในแถวเดียวกัน)

ตารางที่ 11. แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติม FAD, molybdenum และ FAD ร่วมกับ molybdenum ในปฏิกิริยา

สารที่เติมในปฏิกิริยา	ค่าแอคติวิตีของ NR (nmole/min)
ไม่มี	1.06 ± 0.008
10 μM FAD	1.06 ± 0.006
10 μM Molybdenum	1.06 ± 0.006
10 μM FAD+10 μM Molybdenum	1.06 ± 0.004

ไม่มีความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12. ผลของ Mg^{2+} และ PO_4^{3-} ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ความเข้มข้นของสาร (mM)	ค่าแอคติวิตีของ NR (nmole/min) เมื่อมี Mg^{2+} และ PO_4^{3-} ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	
	Mg^{2+}	PO_4^{3-}
0	1.68 ± 0.016	1.68 ± 0.016
2	1.60 ± 0.009 [a]	1.51 ± 0.032 [b]
4	1.59 ± 0.011 [a]	1.48 ± 0.023 [b]
8	1.56 ± 0.014 [a]	1.41 ± 0.015 [bb]
10	1.53 ± 0.015 [aa]	1.37 ± 0.017 [bbb]

[a], [aa] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อมี Mg^{2+} ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ในคอลัมน์เดียวกัน)

[b], [bb], [bbb] แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อมี PO_4^{3-} ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ในคอลัมน์เดียวกัน)