บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1) เครื่องวัดปริมาณโลหะหนัก (Flame Atomic Absorption Spectrophotometer)
2) เครื่องอบ (Hot air oven)
3) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4) เครื่องย่อยตัวอย่างพืช (digestion block)
5) เครื่องชั่งน้ำหนัก
6) ชั้นเหล็กที่ติดตั้งอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลาเปิด-ปิด
7) อุปกรณ์เติมอากาศ
8) เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู ขวดใส่สารเคมี

3.2 สารละลายธาตุอาหารพืช (Hoagland's solution)

3.2.1 สารละลายตั้งต้น (Stock solution) ประกอบด้วย

1) ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient)

สารละลายตั้งต้นของธาตุอาหารหลักแสดงตามตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายตั้งต้นแต่ละชนิดให้ชั่งสารให้มีน้ำหนักเท่ากับมวลโมเลกุลละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร (ความเข้มข้น 1 โมลาร์)

ตารางที่ 3.1 สารละลายตั้งต้นธาตุอาหารหลัก (Macronutrient)

สาร	มวลโมเลกุล
1. KH_2PO_4	136.09
2. KNO_3	101.11
3. $Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236.15
4. $MgSO_4.7H_2O$	246.48
5. KCl	74.56

2) สารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 5 ppm

วิธีการเตรียม : ชั่งสาร $FeCl_3.6H_2O$ 13.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

3) ธาตุอาหารรอง (Micronutrient)

วิธีการเตรียม : ชั่งสารทุกชนิดตามตารางที่ 3.2 ละลายในน้ำกลั่นรวมกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ตารางที่ 3.2 สารละลายตั้งต้นธาตุอาหารรอง (Micronutrient)

สาร	น้ำหนัก (กรัม/ลิตร)
1. H_3BO_3	2.86
2. $MnCl_2.4H_2O$	1.81
3. $ZnSO_4.7H_2O$	0.22
4. $CuSO_4.5H_2O$	0.08
5. $H_2MoO_4H_2O$	0.02

3.2.2 สารละลายธาตุอาหารพืชในการทดลอง (10% Hoagland's solution)

สารละลายธาตุอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชในการทดลองจะใช้สารละลาย 10% Hoagland โดยการเตรียมสารละลาย 10% Hoagland ให้ตวงสารละลายตั้งต้นตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 3.3 ผสมกับน้ำกลั่นและปรับประมาตรเป็น 1 ลิตร (ภาพที่ 3.1)

ตารางที่ 3.3 ปริมาตรสารละลายตั้งต้น (stock solutions) ในการเตรียมสารละลาย 10% Hoagland

สาร	มิลลิลิตรต่อลิตร
1. KH_2PO_4	0.1
2. KNO_3	1.0
3. $Ca(NO_3)_2$	1.0
4. $MgSO_4$	0.4
5. Micronutrient	0.2
6. $FeCl_3$	0.2

3.3 สารละลายโลหะหนัก

3.3.1 สารละลายแคดเมียม

เตรียมสารละลายตั้งต้นแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร $CdCl_2.2\frac{1}{2}H_2O$ (มวลโมเลกุลเท่ากับ 228.353) ปริมาณ 1.0155 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร การเตรียมสารละลายตั้งต้นแคดเมียมในการทดลองให้เจือจางสารละลายแคดเมียมให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.3.2 สารละลายสังกะสี

เตรียมสารละลายตั้งต้นสังกะสีที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร $ZnSO_4.7H_2O$ (มวลโมเลกุลเท่ากับ 287.445) ปริมาณ 4.3965 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร การเตรียมสารละลายสังกะสีในการทดลองให้เจือจางสารละลายตั้งต้นสังกะสีให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.3.3 สารละลายตะกั่ว

เตรียมสารละลายตั้งต้นตะกั่วที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร $Pb(NO_3)_2$ (มวลโมเลกุลเท่ากับ 331.2) ปริมาณ 1.598 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร การเตรียมสารละลายตะกั่วในการทดลองให้เจือจางสารละลายตั้งต้นตะกั่วให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.4 สารละลายตั้งต้นสารคีเลต

3.4.1 สารละลายตั้งต้น EDTA

สารลายตั้งต้น EDTA ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถเตรียมได้โดยชั่งสาร Ethylene diaminetetraacitic acid disodium salt (EDTA; $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) (มวลโมเลกุลเท่ากับ 372.24) ปริมาณ 11.07 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับสาร EDTA เพื่อใช้ในการทดลอง ให้เจือจางสารละลายตั้งต้น EDTA ด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.4.2 สารละลายตั้งต้น EDDS

สารลายตั้งต้น EDDS ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถเตรียมได้โดยตวงสารละลาย (S,S)-Ehylene-N,N'-disuccinic acid trisodium salt solution (ความเข้มข้น 35% ในน้ำ) ปริมาตร 2.86 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับสาร EDDS เพื่อใช้ในการทดลอง ให้เจือจางสารละลายตั้งต้น EDDS ด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.4.3 สารละลายตั้งต้นกรดซิตริก

สารลายตั้งต้นกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถเตรียมได้โดยชั่งสาร $HOC(COOH)(CH_2COOH)_2.2H_2O$ (มวลโมเลกุลเท่ากับ 210.14) ปริมาณ 10.94 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับกรดซิตริกเพื่อใช้ในการทดลอง ให้เจือจางสารละลายตั้งต้นกรดซิตริกด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.5 สารละลายตั้งต้นฮอร์โมน

3.5.1 สารละลายตั้งต้น IAA

สารลายตั้งต้น IAA ($C_{10}H_9NO_2$) ที่ความเข้มข้น 10^{-2} M สามารถเตรียมได้โดยชั่งสารปริมาตร 0.17518 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมด้วย ethyl alcohol (10 มล. + 10 มล.) รอจนสารละลายหมดแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับฮอร์โมน เพื่อใช้ในการทดลองให้เจือจางสารละลายตั้งต้นฮอร์โมน ด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.5.2 สารละลายตั้งต้น GA_3

สารลายตั้งต้น GA_3 ($C_{10}H_9NO_2$) ที่ความเข้มข้น 10^{-2} M สามารถเตรียมได้โดยชั่งสารปริมาตร 0.173185 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมด้วย ethyl alcohol (10 มล. + 10 มล.) รอจนสารละลายหมดแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับฮอร์โมน เพื่อใช้ในการทดลองให้เจือจางสารละลายตั้งต้นฮอร์โมน ด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.5.3 สารละลายตั้งต้น NAA

สารลายตั้ง NAA ($C_{12}H_{10}O_2$) ที่ความเข้มข้น 10^{-2} M สามารถเตรียมได้โดยชั่งสารปริมาตร 0.186 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมด้วย ethyl alcohol (10 มล. + 10 มล.) รอจนสารละลายหมดแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอาหารพืชซึ่งมีโลหะหนักร่วมกับฮอร์โมน เพื่อใช้ในการทดลองให้เจือจางสารละลายตั้งต้นฮอร์โมน ด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชให้ได้ความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลอง

3.6 การเพาะเลี้ยงพืช

ราชาวดีบ้าน (*Budleja paniculata*) ที่ใช้ในการทดลองจะถูกเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนด้วยการเพาะชำถุงเพาะชำด้วยวัสดุปลูก ในโรงเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ต้นไม้ที่มีความสูงและน้ำหนักใกล้เคียงกันจะถูกนำไปทำการทดลองต่อไป

3.7 การศึกษาผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของราชาวดีบ้าน

(1) พืชที่ถูกเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ซึ่งมีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง โดยนำพืชออกจากถุงเพาะชำและล้างวัสดุปลูกออกจากรากให้สะอาด และนำพืชไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายแร่ธาตุ (Hoagland's solution) ในห้องปฏิบัติการ

(2) พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กที่มีการติดตั้งชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลา ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเป็น 25±2 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศในสารละลาย และควบคุมระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายธาตุอาหารเป็น 5.5±0.2 พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

(3) พืชที่ผ่านการปรับสภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการจะถูกชั่งน้ำหนักหนักสด วัดความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากก่อนการทดลอง

(4) พืชจะถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมโลหะหนักแตกต่างกัน 3 ชนิด แคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด (IAA, GA_3และ NAA) โดยฮอร์โมนแต่ละชนิดใช้ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ (ต่ำ, กลาง และ สูง) พืชที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมโลหะหนักโดยไม่เติมฮอร์โมนเป็นชุดควบคุม การศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการดูดซับโลหะหนักแต่ละชนิดจะมีทั้งหมด 10 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3.1)

(5) พืชทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กภายใต้สภาวะควบคุม [ตามข้อ (2)] เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อชั่งน้ำหนักสด ความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากหลังการทดลอง จากนั้นพืชจะถูกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นและตัดแยกเป็นส่วนลำต้นและส่วนรากเก็บใส่ซองกระดาษและนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ นำตัวอย่างพืชที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชไป วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม, สังกะสี, และตะกั่ว ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในพืชตามหัวข้อ 3.5

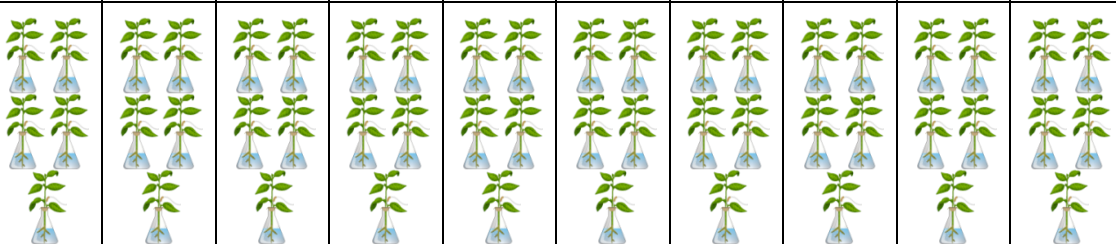
(ก) ผลของฮอร์โมนต่อการสะสมแคดเมียมของพืช

ความเข้มข้นแคดเมียม 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมฮอร์โมน	ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IAA			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน GA_3			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน NAA		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ1	ระดับ 2	ระดับ3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3

(ข) ผลของฮอร์โมนต่อการสะสมสังกะสีของพืช

ความเข้มข้นสังกะสี10มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมฮอร์โมน	ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IAA			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน GA_3			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน NAA		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3

(ค) ผลของฮอร์โมนต่อการสะสมตะกั่วของพืช

ความเข้มข้นตะกั่ว10 มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมฮอร์โมน	ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน IAA			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน GA_3			ระดับความเข้มข้นฮอร์โมน NAA		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3
									

ภาพที่ 3.1 แสดงแผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนแตกต่างกัน 3 ชนิดต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแคดเมียม (ก) สังกะสี (ข) และ ตะกั่ว (ค) ของราชาวดีบ้าน

3.8 การศึกษาผลของสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของราชาวดีบ้าน

(1) พืชที่ถูกเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ซึ่งมีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง โดยนำพืชออกจากถุงเพาะชำและล้างวัสดุปลูกออกจากรากให้สะอาด และนำพืชไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายแร่ธาตุ (Hoagland's solution) ในห้องปฏิบัติการ

(2) พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กที่มีการติดตั้งชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลา ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเป็น 25±2 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศในสารละลาย และควบคุมระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายธาตุอาหารเป็น 5.5±0.2 พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

(3) พืชที่ผ่านการปรับสภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการจะถูกชั่งน้ำหนักหนักสด วัดความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากก่อนการทดลอง

(4) พืชจะถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมโลหะหนักแตกต่างกัน 3 ชนิด แคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารคีเลตแตกต่างกัน 3 ชนิด (EDTA, EDDS และ Citric acid) โดยสารคีเลตแต่ละชนิดใช้ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ (ต่ำ, กลาง และ สูง) พืชที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมโลหะหนักโดยไม่เติมสารคีเลตเป็นชุดควบคุม การศึกษาผลของสารคีเลตต่อการดูดซับโลหะหนักแต่ละชนิดจะมีทั้งหมด 10 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3.2)

(5) พืชทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กภายใต้สภาวะควบคุม [ตามข้อ (2)] เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อชั่งน้ำหนักสด ความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากหลังการทดลอง จากนั้นพืชจะถูกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นและตัดแยกเป็นส่วนลำต้นและส่วนรากเก็บใส่ซองกระดาษและนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ นำตัวอย่างพืชที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชไป วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม, สังกะสี, และตะกั่ว ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในพืชตามหัวข้อ 3.5

(ก) ผลของสารคีเลตต่อการสะสมแคดเมียมของพืช

ความเข้มข้นแคดเมียม 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมสารคีเลต	ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDTA			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDDS			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต Citric acid		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3

(ข) ผลของสารคีเลตต่อการสะสมสังกะสีของพืช

ความเข้มข้นสังกะสี 10 มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมสารคีเลต	ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDTA			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDDS			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต Citric acid		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3

(ค) ผลของสารคีเลตต่อการสะสมตะกั่วของพืช

ความเข้มข้นตะกั่ว 10 มิลลิกรัมต่อลิตร									
ไม่เติมสารคีเลต	ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDTA			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต EDDS			ระดับความเข้มข้นสารคีเลต Citric acid		
	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3

ภาพที่ 3.2 แสดงแผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของสารคีเลตแตกต่างกัน 3 ชนิดต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแคดเมียม (ก) สังกะสี (ข) และตะกั่ว (ค) ของราชาวดีบ้าน

3.9 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของราชาวดีบ้าน

3.9.1 ปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมแคดเมียมของราชาวดีบ้าน

(1) พืชที่ถูกเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ซึ่งมีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง โดยนำพืชออกจากถุงเพาะชำและล้างวัสดุปลูกออกจากรากให้สะอาด และนำพืชไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายแร่ธาตุ (Hoagland's solution) ในห้องปฏิบัติการ

(2) พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กที่มีการติดตั้งชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลา ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเป็น 25±2 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศในสารละลาย และควบคุมระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายธาตุอาหารเป็น 5.5±0.2 พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

(3) พืชที่ผ่านการปรับสภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการจะถูกชั่งน้ำหนักหนักสด วัดความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากก่อนการทดลอง

(4) พืชจะถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด (IAA, GA_3และ NAA) ร่วมกับสารคีเลตแตกต่างกัน 3 ชนิด (EDTA, EDDS และ Citric acid) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตพิจารณาจากผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองส่วนที่ 1 (ข้อ 13.2) และ ส่วนที่ 2 (ข้อ 13.3) พืชที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่เติมสารคีเลตและฮอร์โมนเป็นชุดควบคุม ซึ่งจะมีทั้งหมด 16 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3.3)

(5) พืชทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กภายใต้สภาวะควบคุม [ตามข้อ (2)] เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อชั่งน้ำหนักสด ความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากหลังการทดลอง จากนั้นพืชจะถูกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นและตัดแยกเป็นส่วนลำต้นและส่วนรากเก็บใส่ซองกระดาษและนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ นำตัวอย่างพืชที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในพืชตามหัวข้อ 3.5

ชนิดสารคีเลต / ชนิดฮอร์โมน	สารคีเลต			
	ไม่เติมสารคีเลต	EDTA	EDDS	Citric acid
ไม่เติมฮอร์โมน				
IAA				
GA_3				
NAA				

ภาพที่ 3.3 แสดงแผนการทดลองเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแคดเมียมของราชาวดีบ้านที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมฮอร์โมนพืช (IAA, GA_3 และ NAA) ร่วมกับสารคีเลต (EDTA, EDDS และ Citric acid)

3.9.2 ปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสังกะสีของราชาวดีบ้าน

(1) พืชที่ถูกเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ซึ่งมีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง โดยนำพืชออกจากถุงเพาะชำและล้างวัสดุปลูกออกจากรากให้สะอาด และนำพืชไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายแร่ธาตุ (Hoagland's solution) ในห้องปฏิบัติการ

(2) พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กที่มีการติดตั้งชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลา ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเป็น 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศในสารละลาย และควบคุมระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายธาตุอาหารเป็น 5.5 ± 0.2 พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

(3) พืชที่ผ่านการปรับสภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการจะถูกชั่งน้ำหนักหนักสด วัดความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากก่อนการทดลอง

(4) พืชจะถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด (IAA, GA_3 และ NAA) ร่วมกับสารคีเลตแตกต่างกัน 3 ชนิด (EDTA, EDDS และ Citric acid) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตพิจารณาจากผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองส่วนที่ 1 (ข้อ 13.2) และ ส่วนที่ 2 (ข้อ 13.3) พืชที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่เติมสารคีเลตและฮอร์โมนเป็นชุดควบคุม ซึ่งจะมีทั้งหมด 16 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3.4)

(5) พืชทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กภายใต้สภาวะควบคุม [ตามข้อ (2)] เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อชั่งน้ำหนักสด ความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากหลังการทดลอง จากนั้นพืชจะถูกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นและตัดแยกเป็นส่วนลำต้นและส่วนรากเก็บใส่ซองกระดาษและนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ นำตัวอย่างพืชที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชไปวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในพืชตามหัวข้อ 3.5

ชนิดสารคีเลต / ชนิดฮอร์โมน	สารคีเลต			
	ไม่เติมสารคีเลต	EDTA	EDDS	Citric acid
ไม่เติมฮอร์โมน				
IAA				
GA_3				
NAA				

ภาพที่ 3.4 แสดงแผนการทดลองเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสังกะสีของราชาวดีบ้านที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมฮอร์โมนพืช (IAA, GA_3และ NAA) ร่วมกับสารคีเลต (EDTA, EDDS และ Citric acid)

3.9.3 ปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมตะกั่วของราชาวดีบ้าน

(1) พืชที่ถูกเพาะชำเป็นเวลา 8 – 10 สัปดาห์ ซึ่งมีขนาดลำต้นใกล้เคียงกันจะถูกเลือกมาใช้ในการทดลอง โดยนำพืชออกจากถุงเพาะชำและล้างวัสดุปลูกออกจากรากให้สะอาด และนำพืชไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายแร่ธาตุ (Hoagland's solution) ในห้องปฏิบัติการ

(2) พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กที่มีการติดตั้งชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างพร้อมชุดควบคุมเวลา ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเป็น 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศในสารละลาย และควบคุมระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายธาตุอาหารเป็น 5.5 ± 0.2 พืชจะถูกปรับสภาพในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

(3) พืชที่ผ่านการปรับสภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการจะถูกชั่งน้ำหนักหนักสด วัดความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากก่อนการทดลอง

(4) พืชจะถูกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนภาชนะแก้วที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด (IAA, GA_3และ NAA) ร่วมกับสารคีเลตแตกต่างกัน 3 ชนิด (EDTA, EDDS และ Citric acid) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตพิจารณาจากผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองส่วนที่ 1 (ข้อ 13.2) และส่วนที่ 2 (ข้อ 13.3) พืชที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่เติมสารคีเลตและฮอร์โมนเป็นชุดควบคุม ซึ่งจะมีทั้งหมด 16 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3.5)

(5) พืชทั้งหมดจะถูกเพาะเลี้ยงบนชั้นเหล็กภายใต้สภาวะควบคุม [ตามข้อ (2)] เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจะถูกเก็บเกี่ยวเพื่อชั่งน้ำหนักสด ความยาวลำต้นและราก เพื่อบันทึกน้ำหนัก ความยาวลำต้นและรากหลังการทดลอง จากนั้นพืชจะถูกล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นและตัดแยกเป็นส่วนลำต้นและส่วนรากเก็บใส่ซองกระดาษและนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ นำตัวอย่างพืชที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในพืชตามหัวข้อ 3.5

ชนิดสารคีเลต / ชนิดฮอร์โมน	สารคีเลต			
	ไม่เติมสารคีเลต	EDTA	EDDS	Citric acid
ไม่เติมฮอร์โมน				
IAA				
GA_3				
NAA				

ภาพที่ 3.5 แสดงแผนการทดลองเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมตะกั่วของราชาวดีบ้านที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายธาตุอาหารซึ่งเติมตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนพืช (IAA, GA_3 และ NAA) ร่วมกับสารคีเลต (EDTA, EDDS และ Citric acid)

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

(1) ตัวอย่างพืชอบแห้งซึ่งถูกบดเป็นผงละเอียดจะถูกนำไปย่อย โดยชั่งตัวอย่างพืช 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วทดลองและเติมสารละลายผสมของกรดไนตริก (HNO_3) และกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ด้วยอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

(2) หลอดแก้วจะถูกนำไปใส่เครื่องให้ความร้อน (heat block) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 200 องศาเซลเซียส จนกระทั่งการย่อยสมบูรณ์ นำหลอดแก้วออกจากเครื่องให้ความร้อนและวางลงบนที่วางหลอดแก้วทิ้งไว้ให้เย็นลง และเติมกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน และนำหลอดทดลองวางบนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) นำหลอดทดลองออกจากเครื่องให้ความร้อน วางลงบนที่วางหลอดแก้วทิ้งไว้ให้เย็น และเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเป็น 25 มิลลิลิตร และกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 42 เก็บสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองในขวดพลาสติก

(4) สารละลายตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก (Flame atomic absorption spectrophotometer; FAAS)

(5) ปริมาณโลหะหนักในพืชสามารถคำนวณโดยใช้สูตร

$$M = \frac{A \times V}{W}$$

เมื่อ M = ความเข้มข้นโลหะหนักที่พืชสะสม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

A = ความเข้มข้นโลหะหนักที่วัดได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก (มิลลิกรัมต่อลิตร)

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W =น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้เตรียมสารละลายตัวอย่าง (กรัม)

3.11 การวิเคราะห์ผลการศึกษา / สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการศึกษา

3.11.1 การเจริญเติบโตของพืช

การเจริญเติบโตของพืชจะถูกแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก ความยาวลำต้น และความยาวรากของพืชที่เพิ่มขึ้นระหว่างการทดลอง โดยน้ำหนัก (กรัม) ความยาวลำต้น (เซนติเมตร) และความยาวราก (เซนติเมตร) ที่เพิ่มขึ้นของพืชแต่ละต้นคำนวณได้ดังนี้

น้ำหนักพืช = น้ำหนักพืชหลังการทดลอง – น้ำหนักพืชก่อนการทดลอง

ความยาวลำต้น = ความยาวลำต้นหลังการทดลอง – ความยาวลำต้นก่อนการทดลอง

ความยาวราก = ความยาวรากหลังการทดลอง – ความยาวลำต้นก่อนการทดลอง

3.11.2 อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโลหะหนักในส่วนยอดและส่วนราก (Translocation factor; TF)

อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของโลหะหนักในส่วนยอด (ลำต้นและใบ) และราก เป็นค่าที่ใช้แสดงความสามารถของพืชในการลำเลียงโลหะหนักจากรากไปสะสมในส่วนยอดของพืช (Mattina *et al*., 2003) โดยคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$TF = \frac{C_{shoot}}{C_{root}}$$

เมื่อ C_{shoot} = ความเข้มข้นโลหะหนักในส่วนยอด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

C_{root} = ความเข้มข้นโลหะหนักในสารราก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

3.11.3 อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโลหะหนักในพืชและสารละลาย (Bioaccumulation coefficient; BC)

อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโลหะหนักในพืชและสารละลาย สามารถแสดงอัตราการดูดซับโลหะหนักจากสารละลาย (Nanda-Kumar *et al*., 1995) โดยคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$BC = \frac{C_{plant}}{C_{solution}}$$

เมื่อ BC = อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโลหะหนักในพืชและสารละลาย

C_{plant} = ความเข้มข้นโลหะหนักในพืช (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

$C_{solution}$ = ความเข้มข้นโลหะหนักในสารละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.11.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาผลของฮอร์โมนพืชและผลของสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของราชาวดีบ้านมีแบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) จึงใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD test โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 18.0

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของฮอร์โมนพืชและสารคีเลตต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของราชาวดีบ้านมีแบบแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลที่มี 2 แฟกเตอร์ (Two – Factor Completely Randomized Experiment) จะสามารถศึกษาผลของปัจจัยทั้งสอง (สารคีเลตและฮอร์โมน) ต่อการเจริญเติบโต และการสะสมโลหะหนักของพืชได้ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 18.0