บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่อง pH meter : Delta 340, METTLER TOLEDO
- เครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA - 6300, Shimadsu)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- เตา Hot plate, Hanna Instruments C9800 Reactor
- เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) : VMK - S Linn, Germany
- ตู้อบ (hot air oven): DIN 12880 - KI, METTLER, Germany
- เตาอบ (oven) รุ่น DIN 1288 - KI
- กระดาษกรอง: Whatman No.2, 42, 542
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- หลอดทดลอง (tube)
- หลอดหยด
- ปิเปต (pipette)
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ขวดใส่ตัวอย่าง ขนาด 20 มิลลิลิตร
- กรวยกรอง (filter funnel)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeryer flask)
- ไมโครปิเปต (micro pipette) ขนาด 1000, 5000 ไมโครลิตร
- ชามกระเบื้อง

2. สารเคมีและวัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

- เมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2
- จุลินทรีย์
- ดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมจากดินนาที่บริเวณเทศบาลตำบลแม่กุ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
- กรดไนตริก (HNO_3)
- กรดไฮโดรฟลูออริก (HF)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ 2 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* โดยการเตรียมอาหาร nutrient broth (NB) 49.5 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย ลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำเชื้อแบคทีเรียมาดูการเจริญเติบโตโดยการวัดค่า Optical density (OD) ที่ 600 nm ซึ่งค่า OD จะต้องเท่ากับ 0.5 ก่อนที่จะนำไปเติมลงในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมในการปลูกข้าว โดยการเติมเชื้อลงไปในแต่ละกระถางในการปลูกข้าว 2 % (v/v)

การเตรียมเชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ได้แก่ *Beauveria bassiana* โดยการเตรียมอาหาร potato dextrose broth (PDB) 49 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อราเจริญเป็นเส้นใย จากนั้นเติมเชื้อราลงไปในดินปนเปื้อนแคดเมียมที่จะปลูกข้าวโดยเติมลงไป 2% v/v

การเตรียมต้นกล้า

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 2 ใส่ถุงผ้าดิบแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหุ้มข้าวด้วยกระสอบชุบน้ำคลุมเมล็ดพันธุ์ และรดน้ำให้ชุ่มเป็นเวลา 2 วัน จนรากงอกออกมา 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปหว่านในกระบะดินที่เตรียมไว้ (ดินที่ไม่ปนเปื้อนแคดเมียม) เมื่ออายุกล้า ครบ 30 วัน ก็จะได้นำไปปลูกต่อไป

เตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่มีการเปื้อนแคดเมียมจากดินนาที่บริเวณเทศบาลตำบลแม่กุ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยวิธีการแบบสุ่ม ที่ระดับความลึก 0 - 30 เซนติเมตร เป็นตัวอย่างรวม จากนั้นนำตัวอย่างดินปนเปื้อน มาตากแดด 3 - 4 วัน หลังจากนั้นนำดินมาทุบและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 117 ไมโครเมตร

แผนงานวิจัย

เตรียมดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมใส่ในกระถางที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 21 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ปริมาณ 2,000 กรัม จากนั้นเติมน้ำประปา 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำต้นกล้าที่มีอายุ 30 วัน จำนวน 6 ต้น ปลูกกระถางละ 6 ต้น จากนั้นใส่เชื้อจุลินทรีย์ 2% (v/v) ในกระถาง หลังจากปลูกแล้วทุกๆ วัน เติมน้ำ 300 มิลลิลิตรในแต่ละกระถางทดลอง ซึ่งเงื่อนไขในการทดลองในแต่ละกระถางการทดลองแตกต่างกันมี 5 การทดลอง ดังนี้

กระถางการทดลองที่ 1: ดินที่ไม่ปนเปื้อนแคดเมียม + ต้นกล้า (Control soil)
กระถางการทดลองที่ 2: ดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม + ต้นกล้า (Cd-soil)
กระถางการทดลองที่ 3: ดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม + เชื้อ *Pseudomonas aeroginosa* 2% v/v+ ต้นกล้า
กระถางการทดลองที่ 4: ดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม + เชื้อ *Bacillus subtilis* 2% v/v + ต้นกล้า
กระถางการทดลองที่ 5: ดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม + *Beauveria bassiana* 2% v/v + ต้นกล้า

*โดยแต่การทดลองมีการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในส่วนต่าง ๆ ของข้าว

เก็บตัวอย่างส่วนต่างๆ ของต้นข้าว เช่น ราก ลำต้น เปลือกและเมล็ดข้าว หลังจากเก็บเกี่ยว 90 วัน จากนั้นนำตัวอย่างไปอบด้วยตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก น้ำหนักแห้ง และนำตัวอย่างไปบดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในส่วนต่างของข้าว ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในต้นข้าวจะนำส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่ต้องการวิเคราะห์ มาชั่งน้ำหนัก 0.2 กรัม จากนั้นทำการย่อยด้วยกรด กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และ กรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในอัตราส่วน 1:1 (Harmon

and Lajtha, 1999) และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมที่เหลืออยู่โดยเครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA - 6300, Shimadsu) จากนั้นคำนวณหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมของแคดเมียม/กิโลกรัมของน้ำหนักแห้งของข้าว

วิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในดิน

นำดินมาอบด้วยตู้อบ (oven) ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง 0.5 กรัม เพื่อนำมาย่อยด้วยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ กรดไนตริก (HNO_3) ในอัตราส่วน 3: 1 (McGrath and Cunliffe,1985) และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA - 6300, Shimadsu) จากนั้นคำนวณหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมของแคดเมียม/กิโลกรัมของดิน

ศึกษาผลผลิตของข้าวในรูปน้ำหนักแห้งของข้าวหลังเก็บเกี่ยว

หลังเก็บเกี่ยว 90 วัน นำตัวอย่างของต้นข้าวในแต่ละกระถางมาอบด้วยตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของต้นข้าวเพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของต้นข้าวเมื่อใช้ชนิดของจุลินทรีย์ต่างกันในการเติมในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมในการปลูกข้าว

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมในข้าว

หลังเก็บเกี่ยว 90 วัน ชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัมของราก ลำต้น เปลือก และเมล็ด แล้วนำมาอบที่ตู้อบ (oven) ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเผาที่เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) 550 องศาเซลเซียส จำนวน 4 วัน เพื่อให้เป็นเถ้า (ash) จากนั้นนำไปย่อยด้วย 70% ไนตริก (HNO_3) และ 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Cho et al., 2012 ; Chou, et al., 2011) จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมที่มีอยู่ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA-6300, Shimadsu)

การวิเคราะห์ปริมาณซิลิกอนในข้าว

หลังเก็บเกี่ยว 90 วัน ชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัมของราก และลำต้น เพื่อนำมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาย่อยด้วยกรดผสมของไนเตริก (HNO_3) 3 ml ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 ml และไฮโดรเจนฟลูออไรด์ (HF) 2 ml จากนั้นมาเจือจางด้วย 4% กรดบอริก (boric acid) 100 ml (Ma et al., 2003) จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมที่มีอยู่ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA - 6300, Shimadsu)

ศึกษาผลของระยะเวลาในการดูดซับของสารละลายแคดเมียมด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในระบบกะ (batch)

นำดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม 200 กรัม ใส่น้ำ 1000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้ 4 จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 (whatman No.4) ได้สารละลายแคดเมียมเพื่อนำไปใช้ศึกษาผลของเวลาในการดูดซับแคดเมียมโดยจุลินทรีย์ต่อไป

นำสารละลายแคดเมียม 48 มิลลิลิตร (141 มิลลิกรัม/ลิตร) ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 ml จากนั้นใส่เชื้อจุลินทรีย์ 2 % v/v แล้วนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างๆ ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บไว้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์จุลินทรีย์และส่วนใสออกจากกัน จากนั้นนำส่วนที่เป็นเซลล์ไปย่อยด้วยกรดไนตริก 0.5 มิลลิลิตร และนำส่วนใส (supernatant) ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 หลังจากนั้นนำเพื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีอยู่ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrometer (AA - 6300, Shimadsu) นอกจากนี้พีเอชจะถูกวิเคราะห์ด้วย pH meter ทุก 6 ชั่วโมง

ศึกษาศักยภาพการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์

การทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต ทำโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสูตร Pikovskaya's medium ปริมาตร 49 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าที่เครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 56 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ

ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ (water soluble P) วิธี colorimetric (Fiske and Subbarow, 1925) นอกจากนี้การทดลองยังสังเกตเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของจุลินทรีย์

การศึกษาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร trypticase soy agar (TSA) 10 มิลลิลิตร โดยบ่มเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลวสูตร nitrogen free medium ปริมาตร 49 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่าที่เครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเติม Nessler reagent 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นวัดของเข้มข้นของแอมโมเนียมด้วยเครื่องสเปกโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ 425 นาโนเมตร

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการรายงานค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 15 โดย Descriptive statistical analysis และเปรียบเทียบความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง โดย ONE WAY ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จำแนกกลุ่มโดย Duncan multiple range test