หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การศึกษาผลของแคตไอออนของโลหะหนักต่อปรากฏการณ์การขาดเหล็กในพืชบางชนิด

วิทยานิพนธ์นี้เลือกศึกษาผลของแคตไอออนของธาตุโลหะหนัก 3 ชนิด ต่อพืช 2 ชนิด ดังนี้

ธาตุโลหะหนักที่เลือกใช้

1. แคดเมียมจากรูป $CdSO_4.8/3\ H_2O$ (Analytical grade, Hannover) เตรียมเป็น Cd-EDTA ที่ระดับความเข้มข้น[1] 0, 10, 20, 40 ppm. สำหรับผักกาด-เขียวกวางตุ้ง และ 0, 20, 30, 40 ppm. สำหรับข้าว

2. นิเกิล จากรูป $NiSO_4.6H_2O$ (Pro analytical grade, Merck.) เตรียมเป็น Ni-EDTA ที่ระดับความเข้มข้น[1] 0, 10, 20, 40 ppm. สำหรับผักกาด-เขียวกวางตุ้ง และ 0, 20, 30, 40 ppm. สำหรับข้าว

3. สังกะสี จากรูป $ZnSO_4.7H_2O$ (Reagent grade, M & B) เตรียมเป็น Zn-EDTA ที่ระดับความเข้มข้น[1] 0, 10, 20, 40 ppm. สำหรับผักกาดเขียวกวางตุ้ง และ 0, 10, 20, 30 ppm. สำหรับข้าว

สารละลายโลหะหนัก -EDTA ในข้อ 1, 2, 3 เตรียมตามวิธีของไววิทย์ พุทธารี (2523)

---

[1] ระดับความเข้มข้นที่ใช้เลือกจากผลการทดลองก่อนการทดลองจริง (pretest) ของพืชแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดพืชที่เลือกใช้

1. ผักกาดเขียวกวางตุ้ง (Edible rape)[1]

Brassica chinensis Jusl. var. parachinensis Tsen & Lee

2. ข้าว (พันธุ์ ก ข. 25)[2]

Oryza sativa Linn

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเพาะเมล็ด

ล้างเมล็ดพันธุ์พืชด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ใน chlorox 10% ที่ใส่ผงซักฟอก 2 - 3 เกล็ด นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาดแล้วแช่ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมง จึงนำมาเพาะในกระบะทราย (ภาพที่ 1) รดด้วยน้ำกลั่นให้เปียกจนทั่ว เมื่อต้นอ่อนเริ่มงอกลดด้วยสารละลายของธาตุอาหารความเข้มข้นปกติตามสูตร Hoagland (ภาคผนวก ก.) (Dunn & Arditti, 1968) จนอายุผักกาดเขียวกวางตุ้งครบ 8 วัน และอายุข้าวครบ 18 วัน หลังงอก (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและความแข็งแรงของต้นอ่อน) จึงย้ายปลูก

2. การย้ายปลูก

คัดต้นอ่อนที่มีขนาดใกล้เคียงกันย้ายลงไปปลูกในสารละลายของธาตุอาหารของ Hoagland โดยให้ macronutrient element มีความเข้มข้นครึ่งความเข้มข้นปกติ บรรจุในกะละมังพลาสติกขนาดจุ 20 ลิตร pH 6 - 6.5 โดยใช้ลำสีพันรอบโคนต้นแต่ละต้นแล้วสอดลงรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3/4 นิ้ว ของแผ่นโฟร์มหนา 1 นิ้ว ที่ปิดอยู่บนกะละมังประมาณ 80 ต้น/กะละมัง พ่นอากาศตลอดเวลา (ภาพที่ 2) จนอายุผักกาดเขียวกว้างตุ้งได้ 28 วัน และข้าวอายุได้ 50 วัน นับจากวันเริ่มเพาะพืชทั้งสองชนิดจึงนำมาทดลอง

เมล็ดพันธุ์ [1] บริษัทเสียไต่ล่งเส่ริมเกษตรกรรม จำกัด

[2] กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร

3. การทดลองให้ธาตุเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายธาตุอาหาร

คัดเอาต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มาแยกปลูกในกะละมังพลาสติกขนาดบรรจุ 20 ลิตร ที่มีสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Hoagland ความเข้มข้นครึ่งความเข้มข้นปกติ และให้ธาตุเหล็กในรูป Fe-EDTA ความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0, 0.25 และระดับความเข้มข้นปกติ 5 ppm. ซึ่งถือเป็น control แต่ละระดับมี 2 ซ้ำ รวมทั้งหมด 6 กะละมัง โดยปลูกพืชจำนวน 6 ต้นต่อกะละมัง ปรับ pH ทุกกะละมังให้อยู่ในช่วง 5.7 - 5.9 พ่นอากาศตลอดการทดลองและคอยเติมน้ำดิไอออไนซ์ (deionized water) ในแต่ละกะละมังเพื่อชดเชยน้ำที่เสียไป เนื่องจาก evapotranspiration

4. การทดลองให้ธาตุโลหะหนักความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายธาตุอาหาร

ทำตามวิธีแบบเดียวกันกับการให้ความเข้มข้นธาตุเหล็กในข้อ 3 แต่ให้ธาตุโลหะหนักความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ แต่ละระดับมี 2 ซ้ำ เช่นกัน รวมเป็น 6 กะละมังต่อหนึ่งชนิดธาตุโลหะหนัก โดยมีความเข้มข้นของธาตุเหล็กในสารละลายธาตุอาหารในระดับปกติ คือ 5 ppm.

5. การเก็บผลการทดลอง

เก็บผลการทดลองเป็น 2 ระยะ คือหลังการทดลองให้โลหะหนักแล้ว 9 วัน และ 15 วัน

6. การวัดผลการทดลอง

6.1 วัดการเจริญเติบโตจากน้ำหนัก ปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณธาตุเหล็กภายในพืช

ในวันแรกของการทดลองให้โลหะหนักในสารละลายธาตุอาหาร เก็บพืชที่มีขนาดใกล้เคียงกับต้นที่นำไปใช้ทดลองจำนวน 6 ต้น แยกเป็นส่วนรากและส่วนต้นโดยถือจากระดับใบเลี้ยง ซึ่งหาน้ำหนักสดแล้วเฉลี่ยเป็นน้ำหนักสดเริ่มต้น ส่วนของต้นนำใบยอด 3 ใบ ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll content) ปริมาณเหล็กทั้งหมด (total iron) และปริมาณเหล็กที่นำไปใช้ได้ (active iron) แล้วเฉลี่ยเป็นค่าปริมาณเริ่มต้น ส่วนของใบที่เหลือจากการวิเคราะห์นำไปรวมกับส่วนของต้นที่เหลือ นำไปอบในตู้อบ (oven) พร้อมกับส่วนราก

ที่อุณหภูมิ 70 - 80 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน จนได้น้ำหนักคงที่สังนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของพืชที่ใช้ทดลองก่อนได้รับโลหะหนัก

เมื่อครบระยะเวลาของการเก็บผลการทดลองหลังจากให้โลหะหนัก เลือกเก็บพืชจำนวน 3 ต้น/กะละมัง นำมาแยกเป็นส่วนรากและส่วนต้นเพื่อหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณเหล็กทั้งหมดและปริมาณเหล็กที่นำไปใช้ได้ทีละต้น ตามวิธีเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว

นำค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณเหล็กทั้งหมดและปริมาณเหล็กที่นำไปใช้ได้ ของทั้งสองระยะเวลาของการเก็บผล นำมาทดสอบความเปลี่ยนแปลงทางสถิติว่าปริมาณลดลงหรือเพิ่มขึ้นแตกต่างจาก control (ซึ่งมีปริมาณธาตุเหล็ก 5 ppm.) อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ รวมทั้งทดสอบความแตกต่างในระหว่างระดับของแต่ละโลหะหนัก และเมื่อระยะเวลาการทดลองต่างกัน (ระหว่าง 9 วัน และ 15 วัน) โดยใช้ t-test และทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กในรูป active iron และ total iron กับปริมาณคลอโรฟิลล์ในชุดเปรียบเทียบโดยใช้สถิติแบบ Linear regression analysis เพื่อดูว่าวิธีการที่ใช้สกัดเหล็กในวิทยานิพนธ์นี้ให้ผลแตกต่างจากวิธีการอื่น ๆ หรือไม่

6.2 วัดการเปลี่ยนแปลง pH ของสารอาหาร

ปรับ pH ของสารละลายธาตุอาหารที่ให้โลหะหนักความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ให้อยู่ในช่วง 5.7 - 5.9 โดยใช้สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์แมล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 มอร์แมล แล้วแต่กรณีแล้วนับเป็น pH เริ่มต้นของการทดลองส่วน pH ที่วัดได้หลังการเก็บผลแต่ละครั้งนับเป็น pH สุดท้ายของการเก็บผล และวัดทุกครั้งด้วย pH มิเตอร์

6.3 บันทึกลักษณะการตอบสนองของพืชต่อโลหะหนัก

บันทึกลักษณะอาการที่เห็นได้ด้วยสายตาและภาพถ่ายจากผลของโลหะหนักในระดับต่าง ๆ ต่อพืช ซึ่งเปลี่ยนแปลงระหว่าง 9 วัน และ 15 วัน แล้วให้เป็นจำนวนเครื่องหมายบวก (+) แทนความรุนแรงตามค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วิเคราะห์ได้โดยกำหนดเป็นช่วงให้เหมาะสมกับจำนวนเครื่องหมายข้างต้น ซึ่งจะแตกต่างกันสำหรับพืชแต่ละชนิดแล้วแต่กรณี

7. วิธีตรวจหาปริมาณคลอโรฟิลล์

1. นำ sample พืชแต่ละต้นในแต่ละ treatment ล้างด้วยน้ำประปา และตามด้วยน้ำกลั่น ซับน้ำให้แห้ง ตัดส่วนต้นและรากตามที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น

2. ตัดส่วน ใบยอดจากส่วนของต้นโดยตัดที่บริเวณก้านใบ นำมาล้างด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล แล้วรีบล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้ง สำหรับผักกาดเขียวกวางตุ้ง, ตัดส่วนของเส้นกลางใบ (mid rib) ออกพร้อมก้านใบ ส่วนข้าว ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะใช้ตัวใบทั้งหมดโดยตัดจากบริเวณเยื่อหุ้มใบ ส่วนของใบที่ได้นำมาหั่นเป็นฝอยขนาด 1 - 2 มิลลิเมตร ด้วยใบมีด stainless steel cutter[1] คลุกเคล้ากันให้ทั่ว เพื่อนำไปใช้สกัดคลอโรฟิลล์, total iron และ active iron ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ชั่งใบพืชที่หั่นฝอยจากข้อ 7(2) มา 0.05 กรัม นำมาบดใน tissue homogenizer ให้ละเอียด แล้วสกัดด้วย acetone 80% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ออกจากใบ แล้วนำไป centrifuge (สกัดจนกว่า residue จะขาว) วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แล้วนำไปวัดหาค่า optical density (O.D.) ด้วยเครื่อง spectrophotometer Beckman 25 เทียบกับ standard acetone 80% ที่ความยาวคลื่น (λ) 652 nm. นำค่า O.D. ที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ใน extract หน่วยเป็น milligram total chlorophyll/gram tissue

จากสูตร (Witham, F.H. et al, 1971)

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ใน extract} = \frac{D652 \times 1000}{34.5} \times \frac{V}{1000 \times W}$$

---

[1] ได้ทดลองเปรียบเทียบเครื่องตัดที่ทำด้วยวัสดุต่าง ๆ กันทั้งที่มีเหล็กเป็นส่วนผสมหรือเป็นเครื่องแก้วล้วน พบว่าไม่มีผลทำให้ปริมาณเหล็กแตกต่างกันในทางสถิติ

เมื่อ D = O.D. ที่วัดได้จากคลอโรฟิลล์ extract ที่ความยาวคลื่นที่กำหนดโดยเฉพาะ ที่นี้คือ 652 nm.

V = ปริมาตรของสารละลาย acetone 80% ที่ล่กัดคลอโรฟิลล์ออกมาภายหลัง centrifuge แล้ว

W = น้ำหนักสดของ sample ในที่นี้คือ 0.05 กรัม

8. วิธีตรวจหาปริมาณเหล็กในรูปที่นำไปใช้ได้[1] (active iron, Fe^{2+}) (ตามวิธีของ Katyal, J.C. & Sharma, B.D., 1980)

1. นำใบพืชที่หั่นฝอยจากข้อ 7(2) มา 0.80 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วขนาดจุ 80 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1-10 o-phenanthroline ความเข้มข้น 1.5% ที่ pH 3.0 จำนวน 8 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้สัดส่วนระหว่าง sample : extractant = 1:10 ใช้แท่งแก้วค่อย ๆ คนให้เข้ากัน แล้วปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 16 - 20 ชั่วโมง

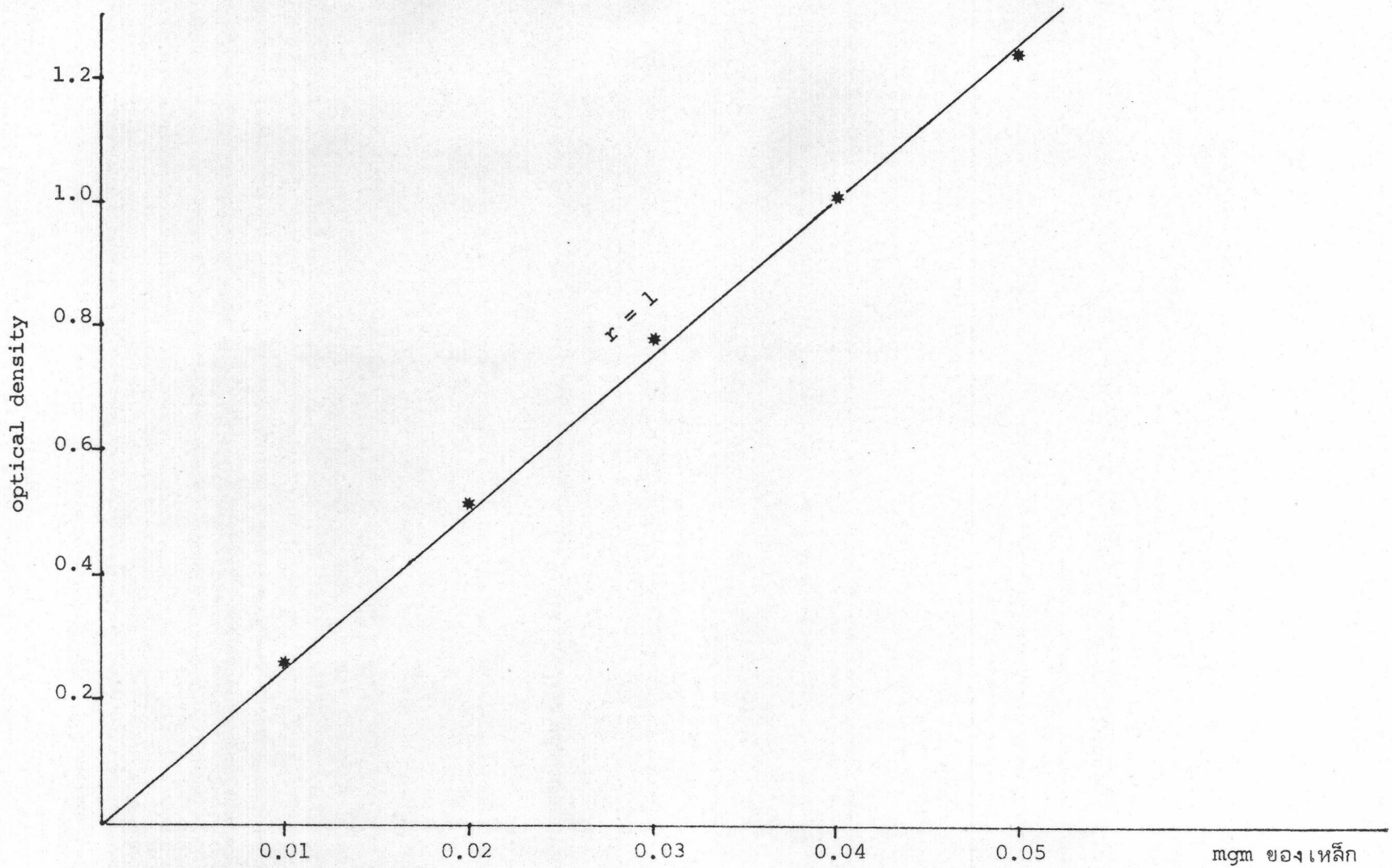
2. นำ extract ที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดหา O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer Beckman 25 ที่ความยาวคลื่น 510 nm.

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของธาตุเหล็ก (standard iron solution) โดยใช้ ferrous ammonium sulphate hexahydrate (Mohr's salt) (ตามวิธีของ Smith, G.F. et al, 1953) แล้วใช้ standard 1-10 o-phenanthroline 1.5% pH 3.0 เป็น blank นำค่า O.D. ที่วัดได้มาเขียนเป็น standard curve (กราฟที่ 1)

4. นำค่า O.D. ที่วัดได้จาก sample มาคำนวณเป็น ppm./dry tissue

---

[1] วิธีเตรียมสารดูตามภาคผนวก ก.



กราฟที่ 1 standard curve ของปริมาณเหล็ก (0.01 - 0.05 mgm) สำหรับ active iron, Fe^{2+} ตามวิธีของ Katyal, J.C. & sharma, B.D. (1980) เมื่อ y = 0.0226 + 24.8200X

9. วิธีตรวจหาปริมาณเหล็กทั้งหมด[1] (total iron)

(ตามวิธีของ A.O.A.C., 1980)

1. นำใบพืชหั่นฝอยจากข้อ 7(2) มา 0.80 กรัม แล้วนำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งและนำมาใช้คำนวณเปรียบเทียบต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง

2. นำ dry tissue มาใส่ลงในถ้วยเคลือบ (porcelain crucible) บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปเผาในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิประมาณ 500 - 550 °ซ. จนได้เถ้าสีขาว แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3. เติมกรดเกลือ HCl (1 + 1)[2] 5 มิลลิลิตร แล้วอุ่นบน steam bath นาน 15 นาที (เพื่อละลายเหล็กและย่อยสลาย pyrophosphate)

4. กรองผ่านกระดาษกรองลงใน volumetric flask ขนาดจุ 100 มิลลิลิตร

5. ส่วนที่เหลือในถ้วยเคลือบล้างอีก 5 ครั้งด้วย HCl (1 + 100) ร้อน ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำร้อนทุกครั้งที่ล้าง

6. dilute ด้วยน้ำกลั่นครบ 100 มิลลิลิตร

การตรวจวัด

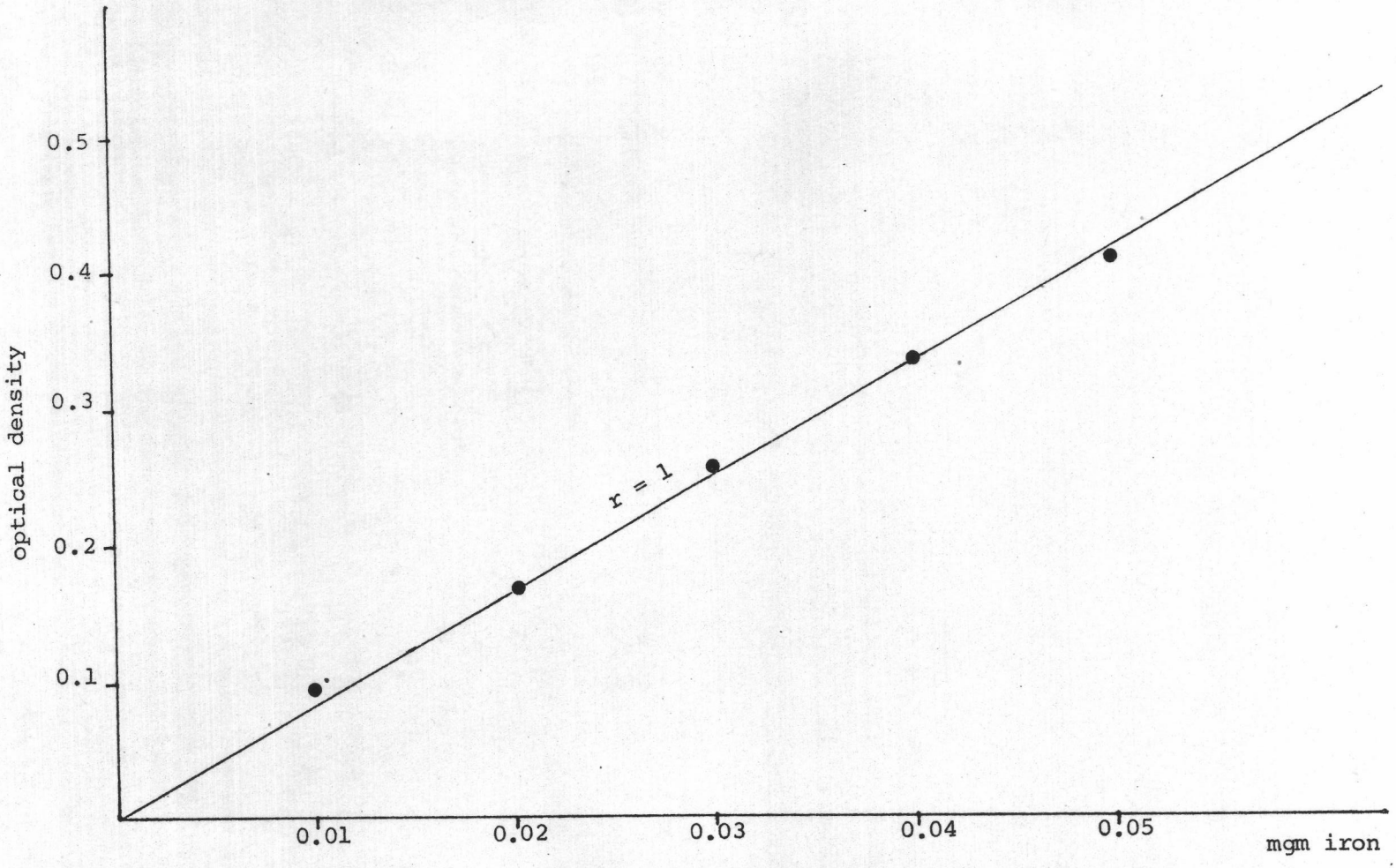
1. ปิเปตสารละลายที่สกัดได้ข้างต้น ปริมาณ 5 หรือ 10 มิลลิลิตรเท่า ๆ กันลงใน volumetric flask ขนาดจุ 25 มิลลิลิตร และใน test tube

2. เติมสารละลาย bromophenol blue indicator 5 หยด ลงใน filtrate ใน test tube แล้วนำไป titrate กับ NaOAc ขนาด 2 โมลาร์ (M) จนกระทั่งสีพอดีกับสีของ buffer pH 3.5 ที่เติม indicator 5 หยด เช่นกัน

---

[1] วิธีการเตรียมสารดูตามภาคผนวก ก.

[2] หมายถึง ส่วนผสมที่ได้จากสารละลายปริมาตร 1 ส่วน กับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ส่วน



กราฟที่ 2 standard curve ของปริมาณเหล็ก (0.01 - 0.05 mgm) สำหรับ total Fe ตามวิธีใน A.O.A.C. (1980) เมื่อ $y = -0.0018 + 8.2400X$

3. เติมสารละลาย hydroquinone 1 มิลลิลิตร และ 1-10 o-phenanthroline 2 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ในข้อ 1 แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 3.5 โดยเติมสารละลาย NaOAc 2M จำนวนเท่ากับที่ titrate ได้ใน test tube แล้ว dilute ครบ 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์

4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดหา O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer Beckman 25 ที่ความยาวคลื่น 510 nm.

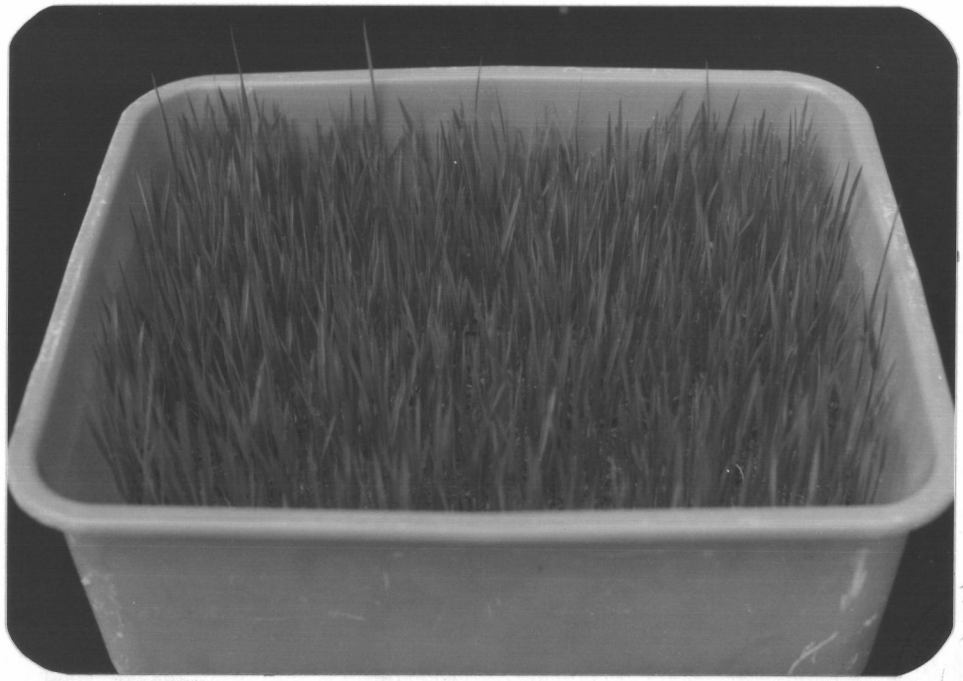
5. เตรียม standard iron solution เช่นเดียวกับในข้อ 8(3) แต่วิธีการเตรียมใช้ตามขั้นตอนข้างต้น และเตรียม blank โดยใช้ HCl (1 + 1) และ HCl (1 + 100) ตามวิธีเดียวกัน นำค่า O.D. ที่วัดได้มาเขียนเป็น standard curve (กราฟที่ 2)

6. นำค่า O.D. ที่วัดได้จาก sample มาคำนวณเป็น ppm./dry tissue

<u>สถานที่ทำการทดลองและเวลา</u>

การเตรียมพืชทดลอง ปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหารในเรือนกระจก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 3) ซึ่งอุณหภูมิภายใต้เรือนกระจกเฉลี่ยเมื่อเวลาเที่ยงวัน = 34 $\pm$ 1 ^{o}C ช่วงเวลาที่ใช้ทำการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 13 ภาคผนวก ข.

สำหรับการวิเคราะห์ผลส่วนใหญ่กระทำในห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 การเพาะเมล็ดพืชในกระบะทราย

ภาพที่ 2 ต้นอ่อนที่ย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland's solution

ภาพที่ 3 สถานที่ใช้ทดลอง