บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ในการทดลอง

ห้องปฏิบัติการมลพิษทางอากาศ (AG 2302) ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ระยะเวลาทำการศึกษา

ศึกษาผลของก๊าซโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของข้าว โดยศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส ปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และปริมาณรวมของแอสคอเบต โดยทำการทดลองในระหว่าง เดือนสิงหาคม – เดือนธันวาคม 2547

การวางแผนการทดลอง

1. การทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomize Complete Block Design: RCBD) โดยการทดลองมี 2 บล็อก 1 บล็อกประกอบด้วยการทดลองโอโซน 40 ppb, 70 ppb และ charcoal-filtered;CF (โอโซนน้อยกว่า 10 ppb)
2. การเก็บตัวอย่างพืช แบ่งเป็น 5 ช่วง ตามช่วงอายุการเจริญเติบโตของข้าว
    - 2.1 ก่อนทำการรมก๊าซโอโซน อายุ 23 วัน
    - 2.2 30 วัน ระยะแตกกอ (Tillering)
    - 2.3 60 วัน ระยะกำเนิดช่อดอก (Panicle initiation)
    - 2.4 90 วัน ระยะออกดอก (Flowering)
    - 2.5 120 วัน ระยะเก็บเกี่ยว (Harvesting)
3. การควบคุมสภาพแวดล้อมและปัจจัยการเจริญเติบโต
    - 3.1 การใส่ปุ๋ย สูตร 16-20-0 (อายุ 20 วัน) และ สูตร 46-0-0 (อายุ 50 วัน)
    - 3.2 อุณหภูมิในตู้ chamber ประมาณ 28-38 องศาเซลเซียส วัดอุณหภูมิด้วย portable temperature printer C 8510 10 channel ยี่ห้อ Comark

3.3 ความเข้มแสงในตู้ chamber ประมาณ 300-350 PPFD โดยใช้ หลอดไฟ high intensity discharge lamp 400 watts 3.5 Amps E40 Type KRC400/t/h/960/E40 ยี่ห้อ Kolorarc

3.4 กรองอากาศด้วย charcoal-filtered

3.5 ให้พืชได้รับแสงเป็นเวลา 12 ชม./วัน ทั้ง 3 กลุ่ม และสัมผัสก๊าซโอโซนเป็นเวลา 8 ชม./วัน ใน 2 กลุ่มคือ กลุ่ม 40 ppb และ 70 ppb โดยใช้ ozone generator Model OZ-3020 เป็นเครื่องสำหรับผลิตก๊าซโอโซน และใช้ ozone monitor No. 129 2B Technologies,Inc Model 202 ในการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของปริมาณโอโซนในแต่ละ chamber

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. **การทดลองระยะที่1 การคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ sensitive และ resistance ต่อก๊าซโอโซน** (Screening)

1.1 คัดเลือกพันธุ์ข้าวมาจำนวน 24 พันธุ์ เพาะเมล็ดในตู้ chamber ที่ควบคุมสภาพ อากาศ ด้วย charcoal-filtered;CF (โอโซนน้อยกว่า 10 ppb)

1.2 แยกต้นข้าวที่มีอายุได้ 2 สัปดาห์ลงกระถาง จำนวน 144 กระถาง แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 72 กระถาง และกลุ่มทดลอง 72 กระถาง (พันธุ์ละ 6 กระถาง ; กลุ่มควบคุม 3 กระถางและกลุ่มทดลอง 3 กระถาง)

1.3 กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 72 กระถาง วางในตู้ chamber ที่มีอากาศบริสุทธิ์ โดยมีการควบคุมสภาพภายใน charcoal-filtered;CF (โอโซนน้อยกว่า 10 ppb)

1.4 กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองกับก๊าซโอโซน (Ozone treatment) จำนวน 72 กระถางวางในตู้ chamber ที่มีความเข้มข้นของก๊าซ โอโซน 70 ppb (Lyons et.al.1999) เป็นเวลา 2 สัปดาห์

1.5 ศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นที่สัปดาห์เริ่มต้นและสัปดาห์ที่ 2 ดังนี้

1.5.1 อาการบาดเจ็บที่มองเห็นได้ (visible injury)

1.5.2 น้ำหนักแห้ง (biomass)

1.5.3 การแตกกอ (tiller)

1.6 คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีอาการเสียหาย หรือมีการตอบสนองสูงต่อก๊าซโอโซน และมีการตอบสนองต่ำมาอย่างละ 1 พันธุ์

2. **การทดลองระยะที่2**

เตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ได้จากการคัดเลือกในการทดลองระยะที่1 ในตู้ chamber ที่มีการควบคุมสภาพภายใน charcoal-filtered;CF (โอโซนน้อยกว่า 10 ppb)

2.2 เมื่อต้นข้าวมีเริ่มมีใบอ่อน 2 ใบ (อายุประมาณ 20 วัน) ทำการแยกพืชลงปลูกในกระถาง ขนาด 8 นิ้ว จำนวน 90 กระถาง กระถางละ 2 ต้น

2.3 แบ่งพืชแต่ละพันธุ์เป็น 3 กลุ่ม ใส่ใน chamber ที่มีความเข้มข้นของก๊าซโอโซนที่ 40 ppb (Schraudner et al.,1997) 70 ppb (Lyons et al.,1998) และ charcoal-filtered;CF (โอโซนน้อยกว่า 10 ppb)

2.4 เมื่อพืชมีอายุ 23 วันเริ่ม รมก๊าซโอโซน 8 ชั่วโมง/วัน (Maggs & Ashmor,1998) จนถึงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยว (120 วัน)

2.5 เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาที่กำหนด ทำการทดลองโดยหาปริมาณการทำงานของ SOD ปริมาณของ H_2O_2 และ Total ascorbate ในห้องปฏิบัติการ

3. **การวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ**

3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของ Superoxide dismutase (SOD)

การวิเคราะห์ใช้วิธีที่ Worthing ซึ่งเป็นวิธีที่สำคัญของ Winterbourn และคณะ(1975)

3.1.1 นำใบข้าวมาชั่งให้ได้ 0.1 กรัมน้ำหนักสด โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง capacity 101 g ยี่ห้อ Mettler Toledo บดให้ละเอียดเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น

50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.8) 2 มิลลิลิตร สารละลายกรดเอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะเซติก (EDTA) 0.1 มิลลิโมลาร์ และ 100 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักโพลิไวนิลไพโรไลโดน (polyvinylpyrolidone)

3.1.2 นำไปเซนติฟิวที่ 19,000 รอบ โดยใช้เครื่องยี่ห้อ SORVALL รุ่น Biofuge Stratos เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวใสที่อยู่ด้านบนเพื่อนำไปวิเคราะห์

3.1.3 ปิเปตสารละลายลงในหลอดทดลองดังนี้ สารละลายกรดเอทธิลีนไดเอมีน เตตระอะเซติกในไซยาไนด์ (EDTA/cyanide) 0.2 มิลลิลิตรไนโตรบลูเตตระโซลัม 0.1 มิลลิลิตรและสารละลาย ตัวอย่าง 5 µl ลงใน ependrop tupe

3.1.4 ปรับสารละลายในหลอดให้มีปริมาตรเป็น 3.0 มิลลิลิตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

3.1.5 ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ประมาณ 5 – 8 นาที ที่อุณหภูมิมาตรฐาน

3.1.6 เติมไรโบฟลาวิน (riboflavin) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในกล่องเป็นเวลา 12 นาที

3.1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-visible spectroscopy ยี่ห้อ HACH รุ่นDR 4000 ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

3.1.8 หาปริมาณการทำงานของเอนไซม์ SOD โดยคำนวณจากสูตร

การคำนวณ (Calculation)

Units /ug.fw = 1000/(μg enzyme resulting in ½ max.hibition)

หมายเหตุ ;

1. ตัวอย่างควรใส่ตั้งแต่ 0.1 – 10 ไมโครกรัมและหลอดที่ใช้ควรบรรจุได้ประมาณ 100 ไมโครกรัม จึงจะทำให้การยับยั้งทำงานได้ประสิทธิภาพสูงสุด

2. กล่องสำหรับวางหลอดทดลองในขั้นตอนที่ 3.1.6 ต้องมีความเข้มแสงที่สม่ำเสมอ ควรมีขนาดยาว 4 ฟุต กว้าง 8 นิ้วและสูง 6 นิ้ว ติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ขนาด 40 วัตต์ บุด้วยฟรอยด์โดยรอบ

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)(Bioxytech,1998)

3.2.1 นำตัวอย่างใบข้าวชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.1 กรัมน้ำหนักสด โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง capacity 101 g ยี่ห้อ Mettler Toledo

3.2.2 บดให้ละเอียดแล้วเติม 100 นาโนโมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และเซนติฟิวที่ 18,000 รอบ โดยใช้ centrifuge ยี่ห้อ SORVALL รุ่น Biofuge Stratos ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวใสที่อยู่ด้านบนไปเป็นตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.3 นำ 1 ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ใส่ลงใน 10 ปริมาตรของสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (working reagent) ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 – 30 นาที

3.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV-visible spectroscopy ยี่ห้อ HACH รุ่น DR 4000 ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

3.3.5 คำนวณหาปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จาก standard curve

เตรียมสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (Working reagent)

1. 25 มิลลิโมลาร์ของแอมโมเนียมไอรอน (II) ซัลเฟต และ 2.5 โมลาร์ ของกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร

2. 100 มิลลิโมลาร์ของซอบิทอลและ 125 ไมโครโมลาร์ ของไซลีนอลออเรนจ์ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

3. นำสารในข้อ 1 จำนวน 1 ปริมาตรผสมกับสารในข้อ 2 จำนวน 100 ปริมาตร โดยเตรียมเฉพาะที่ต้องการใช้วิเคราะห์ในวันนั้น

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard preparation)

1. เตรียม 25 มิลลิโมลาร์ Standardize H_2O_2 stock solution โดยนำ 28 ไมโครลิตรของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ปรับให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย น้ำกลั่นปราศจากไอออน

2. เจือจางสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 มิลลิโมลาร์ด้วยอัตราส่วน 1/250 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนได้ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ของสารละลายมาตรฐาน (สูงที่สุด)

3. เจือจางสารละลายมาตรฐานจาก100 ไมโครโมลาร์ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

3.3 **การวิเคราะห์หาปริมาณ** Total ascorbate (Schupp&Renneberg, 1988, Takahama & Onki, 1992)

การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1. Extraction buffer 100 ml

6%metaphosphoric acid (6 g)+ 2.5 mM EDTA (0.0921 g) ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml

2. Assay buffer (pH 6.8) 100 ml (1 M KPO_4)

KH_2PO_4 (3.402 g) + K_2HPO_4(4.355 g) ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml (เตรียมในวันที่จะทำการทดลอง)

3. 100 mM DTT(1,4-Dithio-DL-Threitol) ; ละลาย DTT 16 mg ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ml

4. Ascorbate oxidase ; ละลาย ascorbate oxidase 1 mg ในสารละลาย assay buffer (pH 6.8) ปริมาตร 170 µl

วิธีการทดลอง

1. นำใบพืชน้ำหนักประมาณ 0.1 g มาบดให้ละเอียดกับสารละลาย extraction buffer แล้วนำไป centrifuge โดยใช้ ยี่ห้อ SORVALL รุ่น Biofuge Stratos ที่ 4 องศาเซลเซียส 10,000 รอบ

2. วัดค่าการดูดกลืนแสง โดย UV-visible spectroscopy ยี่ห้อ HACH รุ่น DR 4000 ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร

ปริมาณ Dehydroascorbate (DHA)

1. extract ของสารตัวอย่าง 50 µl + สารละลาย assay buffer (pH 6.8) 945µl วัดค่าดูดกลืนแสง (set sero ด้วยสารละลาย Assay buffer (pH 6.8) ก่อนเติมสารละลายตัวอย่าง)

2. เติม สารละลาย ascorbate oxidase ทิ้งไว้ 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง

ปริมาณ Ascorbic acid (AA)

1. extract ของสารตัวอย่าง 50 µl + สารละลาย สารละลาย assay buffer(pH 6.8) 945µl วัดค่าดูดกลืนแสง (set sero ด้วยสารละลาย assay buffer (pH 6.8) ก่อนเติมสารละลายตัวอย่าง)

2. เติมสารละลาย 100 mM DTT ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลปริมาณ SOD, H_2O_2 และ Total ascorbate มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version10.0 เพื่อทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละ treatment โดยใช้วิธีของ Duncan's new Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

อุปกรณ์/สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

1. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว จำนวน 144 กระถาง
2. กระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว จำนวน 90 กระถาง
3. ถุงพลาสติก
4. ขวดโพลีทีน (polythene)
5. เมล็ดพันธุ์ข้าว 24 พันธุ์
6. ตู้ Chamber ขนาด 70x120x120
7. หลอดเอปเพนดอร์ฟ (Eppendorf tubes)
8. อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์
9. ถังโฟม
10. cuvett
11. micro pipet

สารเคมี

1. แอมโมเนียมไอรอนซัลเฟต (Ammonium Iron Sulphate)
2. โพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Potassium phosphate buffer (pH 7.8))
3. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
4. น้ำตาลซอบิทอล (Sorbitol)
5. สารละลายไซลีนอลออเรนจ์ (Xylenol Orange in water)
6. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ (30 % H_2O_2)
7. ไนโตรบลูเตตระโซลัม (NBT)
8. ไรโบฟลาวิน (Ribroflavin)
9. สารละลายกรดเอทธิลีนไดเอมีนเตตระอะเซติก ในไซยาไนด์(EDTA/Cyanide)
10. โพลิไวนิลไพโรไลโดน (Polyvinylpyrrolidone(PVPP))
11. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
12. กลีเซอร์รอล (Glycerol)
13. แอสคอเบต (Ascorbate)
14. ไดไทโอไททรอล (1,4-Dithio-DL-Threitol)
15. เมทาฟอสฟอริกเอซิด (Metaphosphoric acid)