

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แผนการทดลอง

การทดลองเป็นแบบ Factorial Randomized complete block design (RCBD)
จำนวน 3 ซ้ำ การทดลองจะแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เตรียมต้นกล้าของพืชน้ำคือ หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.)Beauv.)
หญ้าหนวดแมว (*Bulbostylis barbata* (Rottb) C.B. Clarke) และหญ้าแดง (*Ischaemum
barbatum* Retz.,*l,rugosum* Salisb .)

ระยะที่ 2 ปรับสภาพแวดล้อมที่ชน้ำโดยนำไปปลูกในสารละลายธาตุอาหารก่อนนำไป
ทดลองปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีแคดเมียมปนเปื้อน

ระยะที่ 3 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ปนเปื้อนแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
และ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6

ระยะที่ 4 วิเคราะห์ปริมาณการดูดซับแคดเมียมในรากพืช ต้นพืชและในสารละลายธาตุ
อาหารที่ใส่แคดเมียม เมื่อปลูกพืชได้ 14 วัน และ 28 วัน พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง ที่
ระยะเวลาปลูก 7 14 21 และ 28 วัน โดยการใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer
พร้อมด้วยวิเคราะห์ทางสถิติโดยกำหนดปัจจัยการทดลอง 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 พืชน้ำจำนวน 3 ชนิด คือ

- หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.)Beauv.)
- หญ้าหนวดแมว (*Bulbostylis barbata* (Rottb) C.B. Clarke)
- หญ้าแดง (*Ischaemum barbatum* Retz.,*l,rugosum* Salisb .)

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายแคดเมียมที่ต่างกัน 6 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15 ,20
และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าความเป็นกรดต่าง ของสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใส่แคดเมียม
กำหนดเท่ากับ 6 เพราะจาก Shchneider et al (2001) ได้สรุปไว้ว่าปฏิกิริยาการดูดซับโลหะ
หนักของพืชน้ำจะดูดได้ดีที่สิ่งแวดล้อมเป็นกรด และโลหะหนักจะละลายได้ดีในสภาพสิ่งแวดล้อมที่
สารละลายค่อนข้างเป็นกรดต่ำกว่า 6

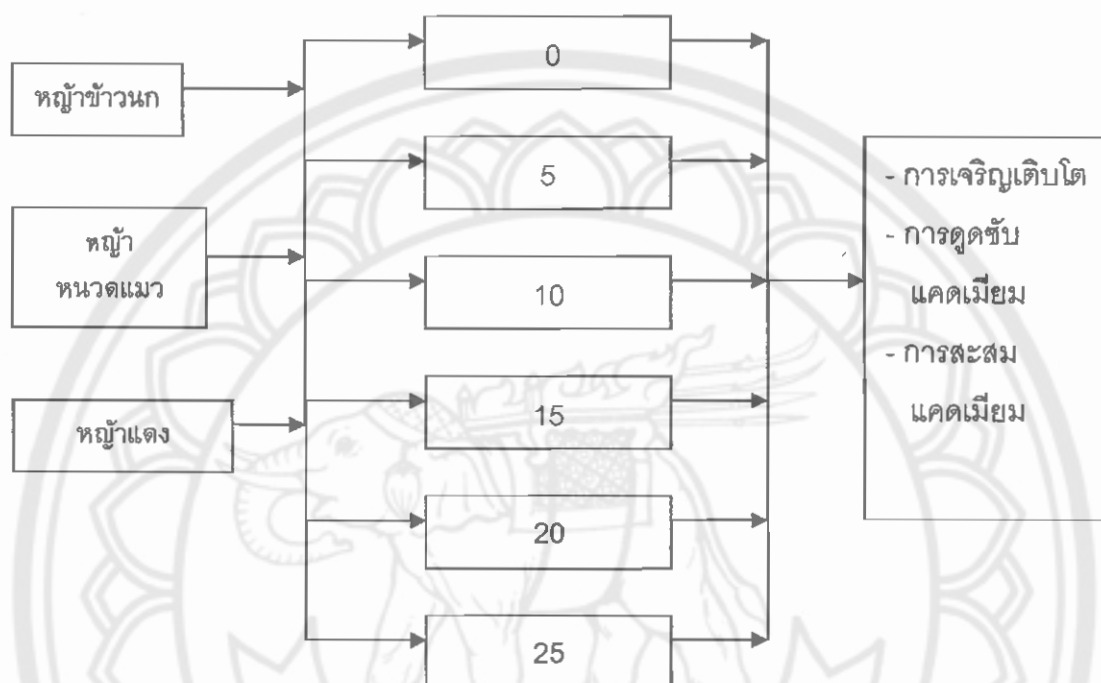
ปัจจัยที่ 1

พืช

ปัจจัยที่ 2

ความเข้มข้นของแคดเมียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง 6



ภาพ 5 แสดงแผนผังการปลูก

2. วัสดุอุปกรณ์

1. สารละลายธาตุอาหารพืช
2. ใช้ภาชนะแก้วทรงสี่เหลี่ยมสูง 25 cm กว้าง 10 cm ยาว 10cm จำนวน 108 อัน
3. ถังพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนขนาด 8 X 12 นิ้ว จำนวน 108 ถัง
4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง ยี่ห้อ Toledo รุ่น MPC 227
5. เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น AA-6200
6. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ รุ่น
7. ขวดปริมาตร
8. บีกเกอร์
9. ขวดสต็อกสีชา

10. คอปเปอร์
11. บีเปต
12. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่าง
13. ถุงพลาสติกใส่ตัวอย่าง
14. ตู้อบ
15. เครื่องย่อยไนโตรเจน
16. Hotplate
17. โถรงบดตัวอย่าง
18. ช้อนพลาสติก
19. ขวดรูปขนมปัง
20. ลูกแก้วกันเดือด
21. กรวย
22. กระดาษกรองเบอร์ 5
23. ตู้ดูดควัน

3. สารเคมี

- 3.1. สารละลายธาตุอาหารพืช (Hoagland's Stock Solution)
- 3.2 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- 3.3 กรด HNO_3 , NaOH
- 3.4 น้ำกลั่นปราศจากไอออน
- 3.5 กรด H_2SO_4 , HClO_4
- 3.6 standard Cd solution

การเตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช และแคดเมียมเพื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร Hoagland's Nutrient Solution

สารละลาย A

- 280 mg (560 mg) H_3BO_3
- 340 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย Deionized water

สารละลาย B

- 0.5 ml H_2SO_4
- ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย Deionized water.

สารละลาย C

- 3.36 g Na_2EDTA
- 2.79 g FeSO_4
- ปรับปริมาตรเป็น 400 ml
- ให้ความร้อน 70°C คนสารดังกล่าวจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลือง
- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

Hoagland's Stock Solution (10 เท่า)

- 4.7 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 2.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3.3 g KNO_3
- 0.6 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- 5 ml solution A
- 0.5 ml solution B
- ปรับปริมาตรเป็น 500 ml โดย Deionized water

Hoagland's Nutrient Solution (1 เท่า)

- 100 มิลลิลิตร ของสารละลาย 10 เท่า
- 5 มิลลิลิตรของ สารละลาย C
- ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml โดย Deionized water
- พร้อมสำหรับใช้ทดลอง

2. เตรียม Stock สารละลายแคดเมียม 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

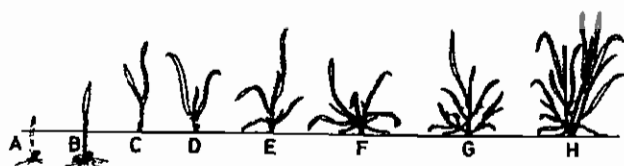
ชั่งแคดเมียมไนเตรท $[Cd(NO_3)_2 \cdot 8H_2O]$ จำนวน 2.744 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized Water) 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีแคดเมียมที่มีแคดเมียมละลายอยู่

ดูดสารละลายจาก Stock 1,000 มิลลิลิตรต่อลิตร นำมาเจือจางด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชที่เตรียมไว้แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 2000 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นคือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ของแต่ละความเข้มข้นด้วยกรดไนตริก (HNO_3) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$)

4. ขั้นตอนการทดลอง

1. คัดเลือกหญ้าข้าวนก หญ้าหนวดแมว และหญ้าแดง จากพื้นที่ที่ไม่มีการปนเปื้อน ที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโต (Stage) หลังจากงอกออกมาจากเมล็ดเป็นช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้น และใบ (vegetative growth) และหญ้าทั้งสามชนิดเป็นวัชพืชใบแคบ ทำการคัดเลือกต้นที่มีใบ 4-5 ใบ (ช่วง E)



ภาพ 6 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของวัชพืชใบแคบตระกูลหญ้า (ใบเลี้ยงเดี่ยว)

ที่มา : พรชัย , 2540 หน้า 35

2. นำมาปลูกในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่ได้ผสมแคดเมียมเป็นเวลา 7 วัน เพื่อปรับสภาพพืช (Akkasit & Pomsawan , 2004)

4.2 การเตรียมแปลงทดลอง

4.2.1 เตรียมแปลงทดลอง โดยใช้ภาชนะทรงสี่เหลี่ยม จำนวน 108 ชุด รองด้วยถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน

4.2.2 ใส่สารละลายธาตุอาหารพืชที่ผสมสารละลายแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง 6 แต่ละภาชนะปลูก

4.3 การปลูกพืชทดลอง

นำพืชน้ำที่ได้จากการปรับสภาพปลูกในภาชนะปลูก (ไม่ให้ผิวแก้วสัมผัสกับสารละลาย) คลุมภาชนะปลูกด้วยกระดาษสีดำ ไม่ให้แสงผ่านเข้าไปถึงสารละลาย นำต้นหญ้าที่ปลูกไว้ในโรงเรือนที่มีแสง และอุณหภูมิปกติ เป็นระยะเวลา 28 วัน

4.4 การวิเคราะห์สารละลายธาตุอาหารพืช

4.4.1 ทำสต็อกสารละลายธาตุอาหารพืชเอาไว้เป็น Blank เก็บไว้เปรียบเทียบ

4.4.2 วัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลายธาตุอาหารที่ปนเปื้อนแคดเมียมเมื่อปลูกพืชได้ระยะเวลา 7 วัน , 14 วัน, 21วัน และ 28 วัน

4.4.3 เก็บตัวอย่างสารละลายธาตุอาหารที่ปนเปื้อนแคดเมียมที่ระยะเวลา 7วัน, 14 วัน , 21 วัน และ 28 วัน นำไปตรวจหาปริมาณแคดเมียม โดยการย่อยตัวอย่างแบ่งเป็น

4.4.4 ย่อยตัวอย่างสารละลายธาตุอาหารพืช ด้วยกรด Conc.HNO₃ กรองแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปหาปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น AA-6200)

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในพืชทดลอง

4.5.1 นำพืชที่ปลูกไว้ 14 วัน ของการทดลองและ 28 วัน นำมาซึ่งน้ำหนักสดและบันทึกหลังจากนั้นอบ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น

4.5.2 ชั่งน้ำหนักแห้งของพืชแต่ละชนิด แต่ละส่วนไว้ แล้วนำไปบด ด้วยโกร่ง แล้วนำแต่ละตัวอย่างไปย่อยด้วย conc.HNO₃ และ Conc.HClO₄ กรองตัวอย่างแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร (19 th Edition 1995 Standard Methods for the Examination of water and Wastewater) แล้วนำไปหาปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น AA-6200)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ศึกษาวางแผนการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS โดยใช้วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของแต่ละ Treatment โดยใช้วิธี Randomized complete block design (RCBD) พืชน้ำจำนวน 3 ชนิด และทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทดสอบรายคู่โดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยความเข้มข้นแคดเมียม และชนิดของพืชน้ำ ที่มีผลต่อการดูดซับแคดเมียม และวิเคราะห์ถดถอยแบบขั้นตอน (Stepwise Multiple Regression Analysis) ระดับความเชื่อมั่นที่ (0.05)