บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยโครงการย่อยที่ 1

โครงการย่อยที่ 1 ประกอบไปด้วย 5 การทดลองและมีระเบียบวิธีวิจัยแต่ละการทดลองดังนี้

2.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกและขยายพันธุ์พืชในเรือนเพาะชำ

2.1.1 การคัดเลือกชนิดพืช

การคัดเลือกพืชที่จะปลูกในดินที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมในบริเวณลุ่มน้ำแม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตากมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถปลูกทดแทนข้าวได้ แต่อาจมิได้นำไปบริโภคโดยตรง (2) เป็นพืชที่สามารถตรึงแคดเมียมไว้ในดินหรือในระบบรากได้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการชะล้างแคดเมียมออกจากดิน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกพืชกลุ่มต่อไปนี้

1. กลุ่มพืชเศรษฐกิจขนาดเล็ก ได้แก่ พืชในวงศ์ Lamiaceae คือ โหระพา (*Ocimum basilicum*) และยี่หร่า (*Ocimum gratissimum*) พืชทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นแหล่งผลิตน้ำมันระเหย (essential oil) ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม เครื่องสำอางได้

2. กลุ่มพืชเศรษฐกิจขนาดใหญ่ ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ที่สามารถนำไปผลิตเอทานอลได้

3. พืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วเหลือง ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกในบริเวณนี้อยู่แล้ว สามารถสกัดน้ำมันจากเมล็ดได้ และยังช่วยในการฟื้นฟูสภาพดินด้วย

4. กลุ่มพืชตระกูลหญ้า ได้แก่ หญ้าแฝก และหญ้าเลี้ยงสัตว์ สามารถใช้ปลูกในพื้นที่ เพื่อช่วยตรึงแคดเมียมและป้องกันการชะล้างแคดเมียมออกจากดิน

5. กลุ่มพืชประเภทไม้ยืนต้น ได้แก่ กระถินเทพา และยูคาลิปตัส สามารถใช้ปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยนำเปลือกไม้มาทำเยื่อกระดาษ และยังใช้ในการฟื้นฟูบริเวณที่ปนเปื้อนแคดเมียมได้ (revegetation)

2.1.2 การขยายพันธุ์พืชในเรือนเพาะชำ

นำพืชที่จะใช้ในการทดลองมาทำการขยายพันธุ์ในเรือนเพาะชำจนมีขนาดเหมาะสมก่อนนำไปทำการทดลอง ดังนี้

1. การเพาะเมล็ด นำเมล็ดของพืชมาหว่านในแปลงเพาะขนาด 1x1 ตารางเมตรจนงอกเป็นต้นอ่อน เมื่อต้นอ่อนมีใบประมาณ 2-3 คู่ ย้ายมาเพาะชำในกระถางพลาสติก (∅ 3.5 นิ้ว) รดน้ำสะอาดจนต้นกล้ามีความสูงประมาณ 20 เซนติเมตร เช่น พืชในสกุล *Ocimum* ได้แก่ โหระพา (*Ocimum basilicum*) ยี่หร่า (*O. gratissimum*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*)

2. การปักชำ ทำในกลุ่มของพืชที่มีประสิทธิภาพในการงอกจากกิ่งชำได้ง่าย โดยตัดกิ่งที่สมบูรณ์ ไม่แก่ หรืออ่อนเกินไป ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นนำไปชุบน้ำยาเร่งราก และนำไปปัก

ชำในกระถางพลาสติก (∅ 3.5 นิ้ว) รดน้ำจนต้นกล้าแตกใบ และมีระบบรากที่สมบูรณ์จึงนำไปทดลอง เช่น ต้นอ้อย

3. การแยกหน่อพืชที่ขยายพันธุ์โดยหน่อ โดย นำพืชต้นแม่มาเพาะเลี้ยงจนมีการแตกหน่อ แล้วจึงทำการแยกหน่อเหล่านั้นออกจากกัน และนำมาเพาะชำในกระถางพลาสติกจนมีใบ และรากที่สมบูรณ์จึงนำไปทดลอง เช่น หญ้าแฝก (*Vetiver zizanioides*) หญ้าเลี้ยงสัตว์

4. การเพาะกล้าไม้ยืนต้น โดยนำกล้าไม้จากศูนย์เพาะชำมาเลี้ยงดูต่อ จนมีความสูงประมาณ 20 เซนติเมตร เช่น ต้นยูคาลิปตัส ต้นกระถินเทพา

2.2 การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของพืชชนิดต่างๆ ในการลดการสะสมแคดเมียมโดยใช้สารตรึงโลหะหนัก (soil amendment)

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อยได้แก่

2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารตรึงโลหะหนัก โซเดียมซิลิเคต [Sodium silicate ,Na_2SiO_3] และปุ๋ยขี้วัว ในการลดการสะสมแคดเมียมของต้นโหระพา (*Ocimum basilicum*) ที่ปลูกในดินที่ผสมสารแคดเมียม

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารตรึงโลหะหนัก ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [Hydroxyapatite ,$Ca_5(PO_4)_3OH$] และปุ๋ยขี้วัว ในการลดการสะสมแคดเมียมของ ต้นยี่หร่า (*Ocimum gratissimum*) ที่ปลูกในดินจากบริเวณนาข้าวลุ่มน้ำแม่ตาวที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก (แคดเมียม และสังกะสี)

2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารตรึงโลหะหนัก ไดแคลเซียมฟอสเฟต(Dicalcium phosphate,$CaHPO_4.2H_2O$) และซีโอไลต์ [Zeolite, $Na_2Al_2Si_3O_{10}.2H_2O$]ในการลดการสะสมแคดเมียมของกลุ่มพืชเศรษฐกิจ (อ้อย ข้าวโพด ถั่วเหลือง) กลุ่มหญ้า (หญ้าแฝก หญ้าเลี้ยงสัตว์) และกลุ่มไม้ยืนต้น (กระถินเทพา ยูคาลิปตัส) ที่ปลูกในดิน Cd/Zn จากบริเวณลุ่มน้ำแม่ตาว

2.2.1 การทดลองที่ 2.1 ประสิทธิภาพการตรึงแคดเมียมโดยใช้ปุ๋ยโซเดียมซิลิเคต (sodium silicate) และปุ๋ยขี้วัว (cow manure) ในต้นโหระพา

1. ดินที่ใช้ในการทดลอง

- นำดินเกษตรมาผึ่งให้แห้ง และร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร เติมแคดเมียม [$Cd(NO_3)_2\ H_2O$] ลงไปในดินให้มีความเข้มข้น 20 มก/กก
- นำปุ๋ยขี้วัวมาผึ่งให้แห้งและร่อนผ่านตะแกรง (2 มิลลิเมตร) เติมปุ๋ยขี้วัวลงไปในดินที่ได้ผสมสารแคดเมียมไว้แล้วโดยให้มีความเข้มข้นของปุ๋ยขี้วัว 10% และ 20% (น้ำหนัก)
- นำปุ๋ยซิลิเคตมาเติมลงในดินที่ผสมแคดเมียมโดยให้มีความเข้มข้น 10% และ 20% (น้ำหนัก) ตามลำดับ

แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ดินเกษตรที่ไม่มีแคดเมียม

กลุ่มที่ 2 ดินผสมแคดเมียม 20 มก/กก (ดินแคดเมียม) (Cd)

กลุ่มที่ 3 ดินแคดเมียม + 10% ปุ๋ยขี้วัว (CdCw 10%)

กลุ่มที่ 4 ดินแคดเมียม + 20% ปุ๋ยขี้วัว (CdCw 20%)

กลุ่มที่ 5 ดินแคดเมียม + 10% ปุ๋ยซิลิเคต (CdSi 10%)

กลุ่มที่ 6 ดินแคดเมียม + 20% ปุ๋ยซิลิเคต (CdSi 20%)

- นำดินในกลุ่มทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ได้แก่ pH, EC (electrical conductivity), CEC (cation exchange capacity), ปริมาณสารอินทรีย์ (organic matter), ลักษณะของดิน และปริมาณธาตุต่างๆ ได้แก่ ไนโตรเจน โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และแคดเมียม ดังมีรายละเอียดดังนี้

  - pH และ EC ใช้เครื่อง pH meter และ EC meter
  - ปริมาณสารอินทรีย์ (Walkley and Black, 1934)
  - Total N โดย Kjeldhal method
  - Available P โดย Bray II method (Bray and Kurtz, 1945)
  - Available K โดย AAS (atomic absorption spectrophotometer) โดยสกัดด้วย NH_4OAc (ICARDA, 2001)
  - Ca และ Mg โดย AAS สกัดด้วย 1N ammonium acetate pH 7.0 (Pratt, 1965)
  - CEC โดย sodium saturation (Chapman, 1965)
  - Cd, Zn โดย FAAS (flame atomic absorption spectrophotometer) (APHA, 1998)
  - DTPA-extractable Cd และ Zn (Lindsay and Norwell, 1978)

2. พืชที่ใช้ในการทดลอง

นำต้นโหระพาที่เพาะจากเมล็ด มีอายุประมาณ 2 เดือน มีความสูงประมาณ 20 เซนติเมตร มาปลูกในดินกลุ่มต่างๆ โดยใส่ดิน 2 กก ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร (พืช 3 ต้น/กระถาง = 1 replicate) แต่ละกลุ่มทดลองมี 3 replicate นำพืชที่ปลูกแล้วไปเลี้ยงในเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 60% และระยะเวลาที่มีแสง (photoperiod) 12/12 ชม. ทำการรดน้ำพืชทุกวัน โดยกำหนดปริมาณน้ำไม่ให้ล้นออกมาในจานรองกระถาง

3. ระยะเวลาที่เก็บพืชและดิน

ทุกๆ เดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างพืชและดินโดยการสุ่ม (randomized complete block design) นำพืชออกจากกระถาง โดยให้มีการกระทบกระเทือนรากน้อยที่สุด ทำการวัดการเติบโตของพืชโดยชั่งน้ำหนักสด วัดความยาวของส่วนต้นและส่วนราก นำพืชมาล้างด้วยน้ำประปา

และน้ำกลั่น (deionized water) จากนั้นนำดินและพืชมาอบในตู้อบ 85°ซ เป็นเวลา 5 วันจนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของพืช แบ่งออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ ส่วนราก ลำต้น และใบ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม ในส่วนต่างๆ ของพืชและดินโดย aqua regia

4. การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม

พืช นำพืชที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม มาใส่ในหลอดย่อย (digested tube) เติม 10 มิลลิลิตร ของ 2:1 กรดไนตริก:กรดเปอร์คลอริก (aqua regia, Simmons et al., 2005) แล้วนำตัวอย่างไปต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 30 นาที ใน block digester เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200°ซ เป็นเวลาอีก 2 ชม. เพื่อให้แร่ธาตุถูกออกซิไดซ์โดยสมบูรณ์ และพืชละลายหมด จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที เติม 1 มิลลิลิตร Conc. HCl นำกลับไปใส่ใน block digester ที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นเวลาอีก 30 นาที จากนั้นเอาออกจาก block digester เติมน้ำและผสมให้เข้ากัน นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้ไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำจนได้ 25 มิลลิลิตร นำไปใส่ในขวดพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น (4°ซ)

นำสารละลายที่ย่อยแล้ว 25 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมโดยเครื่อง FAAS (Flame atomic absorption spectrophotometer, Variance StectrAA 55B)

ดิน นำดินที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดแล้ว 0.5 กรัมมาใส่ในหลอดย่อย เติม 5 มิลลิลิตร ของ aqua regia (1:3 HNO_3:HCl) ลงไปในแต่ละหลอดและต้มใน block digester ที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 3 ชม. ผสมสารละลายเข้าด้วยกันเป็นระยะๆ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิของ block digester เป็น 105°ซ เป็นเวลา 1 ชม.แล้วเพิ่มเป็น 140°ซ ต้มต่อไปเรื่อยๆ จนสารละลาย aqua regia มีปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตร เมื่อการย่อยสมบูรณ์เติม 5 มิลลิลิตร 5N HCl จากนั้นนำหลอดย่อยออกจาก block digester ทิ้งไว้ให้เย็น และกรองโดยผ่านกระดาษกรอง ไปใส่ในฟลาสก์ 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายไปใส่ในขวดพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น (4°ซ) นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม (total Cd) ในดินโดย FAAS ส่วนปริมาณแคดเมียมที่สกัดได้ (extractable) ซึ่งเป็นปริมาณแคดเมียมที่พืชสามารถดูดซับได้ (bioavailable) จะใช้วิธีการสกัดด้วยสาร DTPA (diethylentriaminopentaacetic acid) โดยวิธีการของ Simmons et al. (2005) นำดินที่อบแห้งแล้ว 5 มิลลิกรัมมาใส่ในฟลาสก์ เติม 25 มิลลิลิตร DTPA ลงไปในฟลาสก์ นำฟลาสก์ไปเข้าเครื่องเขย่าในแนวราบ (orbital shaker) เพื่อให้ดินและ DTPA ผสมกันดี ในอัตราความเร็ว 120-180 กรัม/นาที เป็นเวลา 2 ชม. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง และนำสารละลายไปใส่ในขวดพลาสติก วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมด้วย FAAS

2.2.2 การทดลองที่ 2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารตรึงโลหะหนักไฮดรอกซีอะพาไทต์และปุ๋ยขี้วัวในต้นยี่หร่า

1. ดินที่ใช้ในการทดลอง

ดินที่ใช้ในการทดลองคือดินที่เก็บมาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมที่หมู่บ้านพะเด๊ะ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ที่ความลึก 0-20 เซนติเมตร นำดินดังกล่าวมาผึ่งให้แห้งและร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร

นำดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมและปุ๋ยขี้วัวไปวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ได้แก่ pH, EC, CEC, ปริมาณสารอินทรีย์ สมบัติ ตลอดจนปริมาณแร่ธาตุและโลหะหนัก (N, P, K, Ca, Mg, K, Zn, Cd)

จากการวิเคราะห์ ดินจากแม่สอดมีปริมาณแคดเมียม 67.9 มก/กก และสังกะสี 2886.8 มก/กก ใช้สารตรึงโลหะหนัก 2 ชนิดคือ ปุ๋ยขี้วัว (สารอินทรีย์) และไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite, HA) ผสมกับดินที่มีแคดเมียม โดยมีกลุ่มทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ดินที่มีแคดเมียมและสังกะสี (ดิน Cd/Zn กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 ดิน Cd/Zn + 10% ปุ๋ยขี้วัว (น้ำหนัก)

กลุ่มที่ 3 ดิน Cd/Zn + 20% ปุ๋ยขี้วัว (น้ำหนัก)

กลุ่มที่ 4 ดิน Cd/Zn + 0.75% HA (น้ำหนัก)

กลุ่มที่ 5 ดิน Cd/Zn + 1.5% HA (น้ำหนัก)

ทำการผสมดิน Cd/Zn กับปุ๋ยขี้วัวและ HA ให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการรดน้ำกลั่น และทิ้งไว้ให้แห้งสลับกันไป แล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ได้แก่ pH, EC, CEC, ปริมาณ Cd (ทั้งหมดและที่สกัดได้) ปริมาณ Zn (ทั้งหมดและที่สกัดได้)

2. พืชที่ใช้ในการทดลอง

นำต้นยี่หร่า (*Ocimum gratissimum*) ที่เพาะจากเมล็ดอายุประมาณ 2 เดือน สูงประมาณ 20 เซนติเมตร มาปลูกในดินทดลองกลุ่มต่างๆ โดยกลุ่มควบคุมคือ ดิน Cd/Zn ที่ไม่มีสารตรึงโลหะหนัก ใส่ดิน 2 กิโลกรัมในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร (พืช 3 ต้น/กระถาง = 1 replication) แต่ละกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมี 3 replicate นำพืชที่ปลูกแล้วไปเลี้ยงในเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 60% และระยะเวลาที่มีแสง (photoperiod) 12/12 ชั่วโมง รดน้ำพืชทุกวันโดยกำหนดปริมาณน้ำไม่ให้ล้นออกมาในจานรองกระถาง เติมปุ๋ยที่เป็นสารละลาย 50% Hoagland สัปดาห์ละครั้งเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของพืช

3. ระยะเวลาที่เก็บพืช

ทุกๆ เดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างพืชและดินโดยการสุ่ม (randomized complete block design) นำพืชออกจากกระถาง โดยให้มีการกระทบกระเทือนรากน้อยที่สุด ทำการวัดการเติบโตของพืชโดยชั่งน้ำหนักสด วัดความยาวของส่วนต้นและส่วนราก นำพืชมาล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น (deionized water) จากนั้นนำดินและพืชมาอบในตู้อบ 85°ซ เป็นเวลา 5 วันจนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของพืช แบ่งออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ ส่วนราก ลำต้น และใบ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม ในส่วนต่างๆ ของพืชและดินโดย aqua regia

4. การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี

พืช นำพืชที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม มาใส่ในหลอดย่อย (digested tube) เติม 10 มิลลิลิตร ของ 2:1 กรดไนตริก:กรดเปอร์คลอริก (aqua regia, Simmons et al., 2005) แล้วนำตัวอย่างไปต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 30 นาที ใน block digester เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200°ซ เป็นเวลาอีก 2 ชม.เพื่อให้แร่ธาตุถูก

ออกซิไดซ์โดยสมบูรณ์ และพืชละลายหมด จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที เติม 1 มิลลิลิตร Conc. HCl นำกลับไปใส่ใน block digester ที่อุณหภูมิ 200°ซ เป็นเวลาอีก 30 นาที จากนั้นเอาออกจาก block digester เติมน้ำและผสมให้เข้ากัน นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้ไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำจนได้ 25 มิลลิลิตร นำไปใส่ในขวดพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น (4°ซ)

นำสารละลายที่ย่อยแล้ว 25 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีโดยเครื่อง FAAS (Flame atomic absorption spectrophotometer, Variance SpectrAA 55B)

ดิน นำดินที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดแล้ว 0.5 กรัมมาใส่ในหลอดย่อย เติม 5 มิลลิลิตร ของ aqua regia (1:3 HNO_3:HCl) ลงไปในแต่ละหลอดและต้มใน block digester ที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 3 ชม. ผสมสารละลายเข้าด้วยกันเป็นระยะๆ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิของ block digester เป็น 105°ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วเพิ่มเป็น 140°ซ ต้มต่อไปเรื่อยๆ จนสารละลาย aqua regia มีปริมาตรเหลือ 1 มิลลิลิตร เมื่อการย่อยสมบูรณ์เติม 5 มิลลิลิตร 5N HCl จากนั้นนำหลอดย่อยออกจาก block digester ทิ้งไว้ให้เย็น และกรองโดยผ่านกระดาษกรอง ไปใส่ในฟลาสก์ 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายไปใส่ในขวดพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น (4°ซ) นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี (total Cd) ในดินโดย FAAS ส่วนปริมาณแคดเมียมและสังกะสีที่สกัดได้ (extractable) ซึ่งเป็นปริมาณแคดเมียมและสังกะสีที่พืชสามารถดูดซับได้ (bioavailable) จะใช้วิธีการสกัดด้วยสาร DTPA (diethylentriaminopentaacetic acid) โดยวิธีการของ Simmons et al. (2005) นำดินที่อบแห้งแล้ว 5 มิลลิกรัมมาใส่ในฟลาสก์ เติม 25 มิลลิลิตร DTPA ลงไปใน ฟลาสก์ นำฟลาสก์ไปเข้าเครื่องเขย่าในแนวราบ (orbital shaker) เพื่อให้ดินและ DTPA ผสมกันดี ในอัตราความเร็ว 120-180 กรัม/นาที เป็นเวลา 2 ชม. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง และนำสารละลายไปใส่ในขวดพลาสติก วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีด้วย FAAS

2.2.3 การทดลองที่ 2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารตรึงโลหะหนัก (ไดแคลเซียมฟอสเฟต และซีโอไลต์) ในการลดการสะสม Cd ในกลุ่มพืชเศรษฐกิจ

1. ดินที่ใช้ในการทดลอง

ดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินที่ปนเปื้อน Cd ในบริเวณหมู่บ้านพะเด๊ะ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ที่ความลึก 0-20 เซนติเมตร นำดินมาตากให้แห้ง และร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร

สารตรึงโลหะหนักที่ใช้ผสมดินคือ ไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate) และซีโอไลต์ (Zeolite) ซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่าย ทำการผสมสารตรึงโลหะหนักกับดิน Cd โดยใช้ปริมาณ 5% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยมีกลุ่มทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ดินที่ไม่ปนเปื้อน Cd (กลุ่มควบคุม 1)

กลุ่มที่ 2 ดินที่ปนเปื้อน Cd (กลุ่มควบคุม 2)

กลุ่มที่ 3 ดิน Cd + ซีโอไลต์ 5%

กลุ่มที่ 4 ดิน Cd + ไดแคลเซียมฟอสเฟต 5%

ทำการผสมดิน Cd กับซีโอไลต์และไดแคลเซียมฟอสเฟตให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยการรดน้ำและทิ้งให้แห้งสลับกันไป (wet and dry cycle) นำดินกลุ่มต่างๆ ไปวิเคราะห์ pH, EC, CEC, ปริมาณสารอินทรีย์ (OM) ปริมาณธาตุอาหารและโลหะหนัก (N, P, K, Ca, Mg, Cd) ตามวิธีในการทดลอง ที่ 2.2

2. พืชที่ใช้ในการทดลอง

นำพืชที่ได้ขยายพันธุ์แล้ว (การทดลองที่ 1) ได้แก่ ถั่วเหลือง หญ้าแฝก หญ้าเลี้ยงสัตว์ อ้อย ข้าวโพด ยูคาลิปตัส กระถินเทพา มาปลูกในดิน (ข้อ 1) ที่ได้หมักแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใส่ดิน 2 กิโลกรัมในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว (พืช 1 ต้น/กระถาง = replicate) แต่ละกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมี 3 replicate นำพืชที่ปลูกแล้วไปเลี้ยงในเรือนควบคุมอุณหภูมิ (25-28° ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ระยะเวลาที่มีแสง 12/12 ชั่วโมง) เติมปุ๋ยออสโมโคต (Osmocote, N:P:K = 14:14:14) 2 กรัม/กระถาง รดน้ำทุกวันโดยกำหนดปริมาณน้ำไม่ให้ล้นออกมาจากกระถาง

3. ระยะเวลาที่เก็บพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชและดินทุกเดือน เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยการสุ่ม (randomized complete block design) วัดการเติบโตของพืชโดยชั่งน้ำหนักสด วัดความยาวรากและลำต้น นำพืชมาล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นแล้วอบในตู้อบ 85°ซ เป็นเวลา 4 วันจนมีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้ง แบ่งพืชออกเป็นส่วนราก ลำต้น และใบ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในส่วนต่างๆ ของพืชและดินโดยวิธี aqua regia

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ Cd

การวิเคราะห์ปริมาณ total Cd ในตัวอย่างพืชและดิน ตลอดจนปริมาณ extractable Cd ใช้วิธีการเดียวกับ การทดลองที่ 2.2

2.3 การทดลองที่ 3 การทดลองบำบัดแคดเมียมในน้ำและตะกอนดิน โดยใช้พืชน้ำและพืชในพื้นที่ชุ่มน้ำที่ไม่ใช่พืชท้องถิ่นในระดับห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง

1. ขยายพันธุ์พืชน้ำและพืชในพื้นที่ชุ่มน้ำโดยนำพืชมาเลี้ยงและขยายพันธุ์ในเรือนเพาะชำ โดยแบ่งพืชเป็น 2 กลุ่มคือ พืชลอยน้ำ (floating plant) และพืชโผล่เหนือน้ำ (emerged plant) โดยในการทดลองนี้ได้เลือกพืชลอยน้ำ 3 ชนิดคือ จอกหูหนู (*Salvinia cucullata* Roxb) สาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle) ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) ส่วนพืชโผล่เหนือน้ำมี 3 ชนิด ได้แก่ คล้าน้ำช่อห้อย (*Thalia geniculata* L.) อะเมซอนใบกลม (*Echinodorus cordifolius* (L.) Griseb) และป็อปปี้น้ำหรือฝิ่นน้ำ (*Hydrocleys nymphoides* Bush)

2. นำพืชมาทดลองปลูกในน้ำและตะกอนดิน ที่มีแคดเมียมปนเปื้อนในเรือนเพาะชำ โดยพืชน้ำปลูกในน้ำที่มีความเข้มข้นแคดเมียม 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพืชโผล่พ้นน้ำซึ่งเป็นพืชที่เติบโตได้ในพื้นที่ชุ่มน้ำปลูกในถังพลาสติกขนาด 5 ลิตรที่มีตะกอนดินปริมาณ 5 กิโลกรัมและมีแคดเมียมที่ระดับ

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยอัตราส่วนระหว่างน้ำกับตะกอนดินเท่ากับ 1:2 ระยะเวลาการทดลองสำหรับพืชลอยน้ำ 14 วัน และสำหรับพืชโผล่พ้นน้ำ 30 วัน

3. เมื่อครบกำหนด 14 วัน สำหรับพืชลอยน้ำและ 30 วันสำหรับพืชโผล่พ้นน้ำ ได้ทำการเก็บพืชเพื่อวัดการเจริญเติบโต และปริมาณแคดเมียมที่สะสมอยู่ในส่วนรากและส่วนเหนือรากของพืชแต่ละชนิด เพื่อดูประสิทธิภาพของพืชในการลดแคดเมียมในน้ำและตะกอนดิน รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่เหลืออยู่ในน้ำและตะกอนดิน โดยการนำน้ำ ตะกอนดินนำไปสกัดด้วยกรดไนตริกส่วนพืชนำไปสกัดด้วยกรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 2:1 และวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมโดยใช้ เครื่อง AAS

4. นำพืชลอยน้ำทั้ง 3 ชนิดในสภาพที่เป็นเซลแห้งมาใช้เป็นวัสดุดูดซับในการทดลองที่ 5 ส่วนพืชโผล่พ้นน้ำที่มีประสิทธิภาพในการสะสมแคดเมียมที่ดีที่สุด จะนำมาใช้ทดลองในระบบบึงประดิษฐ์ในระดับเรือนทดลองต่อไป

5. การทดลองประสิทธิภาพของพืชในการบำบัดแคดเมียมในตะกอนดินโดยระบบบึงประดิษฐ์แบบ surface flow โดยนำพืชที่มีความสามารถในการลดปริมาณแคดเมียมในตะกอนดินที่ดีที่สุดที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความสามารถของพืชชนิดนี้ในการลดปริมาณแคดเมียมในตะกอนดินที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา โดยทำการคัดเลือกตะกอนดินจากพื้นที่ศึกษามา 3 จุดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันมาทดลอง ในระบบบึงประดิษฐ์ในเรือนทดลอง โดยระบบน้ำที่ใช้เป็นระบบน้ำไหลบริเวณผิวหน้า (surface flow)

6. เมื่อครบกำหนด 45 วัน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน และพืช (แยกส่วน shoot และ root)ในชุดทดลองและชุดควบคุมเพื่อนำมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม (วิธีการเช่นเดียวกับการวิจัยในปีที่ 1)โดยใช้ AAS

2.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับพืชในกระบวนการบำบัดแคดเมียม

2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสกุลแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่คัดแยกได้จากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

นำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่คัดแยกได้จากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม 2 สายพันธุ์คือ TM6 และ TN6 (นำมาจากโครงการวิจัยระยะที่ 1) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมทั้ง 2 สายพันธุ์ มาจำแนกจีนัสและสปีชีส์โดยการหาลำดับเบส 16S rDNA สำหรับการเพิ่มชิ้น DNA ใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) และนำ DNA fragment ที่ได้ไปหาลำดับเบส เพื่อนำลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมมา

เปรียบเทียบกับลำดับเบสของกลุ่ม จุลินทรีย์จากฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al., 1997) เพื่อให้ทราบจีนัสของแบคทีเรีย

2.4.2 การศึกษาการเจริญและการสร้าง Exopolymers ที่ระยะเวลาต่างๆ ของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม

นำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียม 3 สายพันธุ์มาตรวจวัดการเจริญ และตรวจวัดปริมาณการสร้าง Exopolymers เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้าง Exopolymers ได้สูงสุด สำหรับวิธีการตรวจวัดการเจริญโดยนำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับแบคทีเรียนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นก่อนนำมาถ่ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใหม่ให้มีค่าความขุ่นเซลล์ OD600 ~ 0.1 และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บเซลล์ที่เวลา 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ มาวัดค่าความขุ่นเซลล์ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร

สำหรับวิธีการตรวจวัดปริมาณ Exopolymers ที่สร้างจากแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาตกตะกอน Exopolymers โดยใช้ Absolute ethanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเก็บตะกอน Exopolymers (Kunito et al., 2001) และนำ Exopolymers ที่สกัดได้ไปตรวจวัดปริมาณในรูปของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois et al., 1956) โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณ Exopolymers ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

2.4.3 การตรวจวัดการสร้างสาร Indole-3-acetic acid (IAA) ในแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymers

นำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymers ที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสาร IAA โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Sheng และคณะ (2008) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนเติม Tryptophan ที่ปราศจากเชื้อในปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำสารแขวนลอยแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (Salkowski's reagent ประกอบด้วย Conc. H_2SO_4 150 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ 0.5 M $FeCl_3.6H_2O$ 7.5 มิลลิลิตร) (Gordon and Weber, 1951) และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

จนเปลี่ยนเป็นสีชมพู และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร IAA ที่ความเข้มข้น 5-60 เพื่อคำนวณปริมาณ IAA

2.4.4 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymers ในการเคลื่อนที่ (Mobilization) หรือละลาย (Solubilization) แคดเมียมออกจากดินที่ปนเปื้อน

เก็บดินบริเวณสวนสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ก่อนนำมาบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้ เนื้อดิน (Soil texture) pH ของดิน ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity; EC) ความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchange capacity; CEC) ปริมาณสารอินทรีย์ (Organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ฟอสฟอรัส (Available P) โพแทสเซียม (Extractable K) และแคลเซียม (Extractable Ca) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามคู่มือของสำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน (2547) และนำดินมาเติมแคดเมียมไนเตรท ($Cd(NO_3)_2$) โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นในรูปของแคดเมียมไอออนในดินเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผึ่งดินในที่ร่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อให้แคดเมียมเสถียรอยู่ในดินตามวิธีการของ Sheng และคณะ (2008) หลังจาก 3 สัปดาห์นำดินที่เตรียมได้ไปสกัดด้วย Aqua regia (อัตราส่วน HCl : HNO_3 = 3:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) และย่อยด้วยเครื่อง Microwave digester ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในดิน (Total cadmium) โดยใช้เครื่อง Flame Atomic absorption spectroscopy (FAAS)

นำดินที่เตรียมได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ก่อนนำไปทดสอบการเคลื่อนที่หรือการละลายของโลหะหนักในดิน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Rajkumar และ Freitas (2008) โดยสามารถแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลองดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ดินที่เติมแคดเมียม (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 ดินที่เติมแคดเมียม + *Ralstonia* sp. TAK1
- ชุดการทดลองที่ 3 ดินที่เติมแคดเมียม + *Arthrobacter* sp. TM6

เติมเซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymers คือ *Ralstonia* sp. TAK1 และ *Arthrobacter* sp. TM6 (OD_{600} ~ 1.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของตัวอย่างดินที่เติมแคดเมียมในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนเติม Deionized water เพื่อสกัดแคดเมียมที่ละลายน้ำออกมาจากดิน และนำสารแขวนลอยดินไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อแยกเก็บส่วน

ดินไปตรวจวัดปริมาณแคดเมียมโดยใช้เครื่อง FAAS และนำส่วนน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำส่วนน้ำใสไปตรวจวัดปริมาณแคดเมียมโดยใช้เครื่อง FAAS

2.4.5 การศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการเจริญของต้นยี่หร่าและหญ้าแฝก

นำดินที่เก็บจากสวนสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นจุดควบคุมที่ไม่มีการปนเปื้อนของแคดเมียม มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ก่อนนำมาบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และนำมาเติมแคดเมียมไนเตรท ($Cd(NO_3)_2$) โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นในรูปของแคดเมียมไอออนในดินเท่ากับ 25 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผึ่งดินในที่ร่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อให้แคดเมียมเสถียรอยู่ในดิน และนำดินที่เตรียมได้ไปตรวจวัดปริมาณแคดเมียมที่มีอยู่ในดินโดยใช้เครื่อง FAAS

เตรียมต้นกล้ายี่หร่า (*Ocimum gratissimum* หรือ African basil) โดยการเพาะเมล็ด อายุประมาณ 3 เดือน มีความสูงของต้นประมาณ 30 เซนติเมตร และต้นกล้าหญ้าแฝก (*Vetiveria nemoralis* A. Camus; Nakhonsawan ecotype) อายุประมาณ 1 ปี ซึ่งได้รับจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทรายอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยมีการตัดรากและใบบางส่วนให้เหลือความสูงของต้นประมาณ 40 เซนติเมตร และนำต้นยี่หร่าและหญ้าแฝกปลูกในดินน้ำหนัก 2.5 กิโลกรัม ที่ใส่ในกระถางพลาสติกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 25 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น โดยแบ่งชุดการทดลองของพืชแต่ละชนิดดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินที่ไม่เติมแคดเมียม
- ชุดการทดลองที่ 2 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินที่เติมแคดเมียม 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 ต้นยี่หร่าที่ปลูกในดินที่เติมแคดเมียม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำกระถางไปวางในโรงเรือนที่ใช้แสงธรรมชาติ รดน้ำทุกวัน สังเกตความผิดปกติของใบพืช เช่น ใบเหลือง และศึกษาผลของความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการเจริญของยี่หร่าและหญ้าแฝกโดยตรวจวัด ความสูงของต้นพืช (ส่วนเหนือดิน) น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของพืชในช่วงเริ่มปลูกพืชในดินที่เติมแคดเมียม และหลังจากปลูกพืชในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 2 สัปดาห์

2.4.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง Exopolymers ต่อการส่งเสริมยี่หร่าและหญ้าแฝกในการดูดซับแคดเมียมจากดิน (Phytoextraction) ในระดับเรือนทดลอง

เก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนแคดเมียมบริเวณริมลำห้วยแม่ตาว หมู่บ้านพะเด๊ะ (จุดที่ T4-1 พิกัด X460090 Y1843397) ตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ก่อนนำมาบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้ เนื้อดิน (Soil texture) pH ของดิน ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (CEC) ปริมาณสารอินทรีย์ (Organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ฟอสฟอรัส (Available P)

โพแทสเซียม (Extractable K) และแคลเซียม (Extractable Ca) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามคู่มือของสำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน (2547) รวมทั้งตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในดิน โดยการสกัดด้วย Aqua regia และย่อยด้วยเครื่อง Microwave digester ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมโดยใช้เครื่อง FAAS

เตรียมต้นกล้ายี่หร่าโดยการเพาะเมล็ด อายุประมาณ 3 เดือน ที่มีความสูงของต้นประมาณ 30 เซนติเมตร และต้นกล้าหญ้าแฝก อายุประมาณ 1 ปี ตัดรากและใบบางส่วนให้เหลือความสูงของต้นประมาณ 40 เซนติเมตร เช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการเจริญของยี่หร่าและหญ้าแฝก ตรวจวัด น้ำหนักแห้งและปริมาณแคดเมียมของต้นยี่หร่า แบ่งเป็นส่วนราก ลำต้น และใบ และต้นหญ้าแฝก แบ่งเป็นส่วนรากและใบ (ส่วนเหนือดิน) ในวันแรกที่นำมาปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม โดยปลูกพืชในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร ที่มีดินปนเปื้อนแคดเมียมกระถางละ 2.5 กิโลกรัม

เตรียมเซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมแต่ละสายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจนเซลล์เข้าสู่ระยะ Exponential phase (ประมาณ 4 ชั่วโมง) และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาแขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 50 mM ที่ปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ OD600 ~ 0.2 และนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเติมในชุดการทดลองตามปริมาณที่กำหนด

แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม
- ชุดการทดลองที่ 2 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม + 2% เซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมสายพันธุ์ที่ 1
- ชุดการทดลองที่ 3 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม + 2% เซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมสายพันธุ์ที่ 2
- ชุดการทดลองที่ 4 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม + 1% เซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมสายพันธุ์ที่ 1 + 1% เซลล์แบคทีเรียต้านทานแคดเมียมสายพันธุ์ที่ 2
- ชุดการทดลองที่ 5 ต้นยี่หร่าหรือหญ้าแฝกที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม + EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (อัตราส่วนประมาณ 1:1 ของปริมาณแคดเมียมในดิน)

นำกระถางของแต่ละชุดการทดลองที่ปลูกพืชกระถางละ 1 ต้นมาวางในโรงเรือนทดลองที่ใช้แสงธรรมชาติ และรดน้ำพืชทุกวัน และเก็บตัวอย่างดินและพืชในแต่ละกระถางในสัปดาห์ที่ 2 หลังการปลูกพืชในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม นำตัวอย่างดินที่เก็บไปตรวจวัดปริมาณแคดเมียม ส่วนตัวอย่างพืชแต่ละชนิดนำมาล้างดินออกให้สะอาดด้วยน้ำประปาและล้างซ้ำด้วย Deionized water วัดความสูงของต้นแล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง และนำแต่ละส่วนของพืชไปบดและสกัดด้วย Aqua regia และย่อยด้วยเครื่อง Microwave digester ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.42 เพื่อนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่สะสมในแต่ละส่วนของพืช

2.5 การทดลองที่ 5 การบำบัดแคดเมียมโดยการใช้ชีวมวลเป็นวัสดุในการดูดซับ (Biosorbents)

2.5.1. การบำบัดแคดเมียมในน้ำโดยใช้วัสดุชีวมวล

1) การคัดเลือกวัสดุดูดซับ โดยในงานวิจัยนี้ใช้วัสดุดูดซับได้แก่เซลล์แห้งที่ตายแล้วของส่วนต่างๆของพืชลอยน้ำทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองที่ 3 และวัสดุทางเกษตรในพื้นที่ศึกษาได้แก่ ซังข้าวโพด แกลบ และใบอ้อย

2) เตรียมวัสดุชีวมวลในข้อ 1 โดยนำมาล้างให้สะอาดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดและผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 μm เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

3) เตรียมสารละลายที่มีแคดเมียมที่ความเข้มข้น 100 มิลิกรัมต่อลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำวัสดุแต่ละชนิดที่เตรียมในข้อ 2 ชนิดละ 1 กรัม แยกใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายแคดเมียมความเข้มข้น 100 มิลิกรัมต่อลิตร

4) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำสารละลายส่วนที่ใสไปวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมโดยใช้เครื่อง AAS วัสดุชีวมวลที่มีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณแคดเมียมในสารละลายเหลือน้อยที่สุดจะนำไปทดลองในลำดับต่อไป

2.5.2 การบำบัดแคดเมียมในตะกอนดินโดยใช้วัสดุชีวมวล

นำวัสดุดูดซับที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในขั้นตอนที่ 1 มาทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับแคดเมียมในตะกอนดิน โดยตะกอนดินที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มี 2 ประเภทคือตะกอนดินที่ใช้ในการทดลองที่ 3 ที่ได้ผสมแคดเมียมให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ก่อนนำมาศึกษาและตะกอนดินที่ได้จากพื้นที่ศึกษาที่ใช้ในการทดลองระบบบึงประดิษฐ์ในเรือนทดลองซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 44.65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1) เตรียมวัสดุดูดซับที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับที่ใช้ศึกษาการดูดซับแคดเมียมในน้ำ (ข้อ 2.5.1)

2) นำวัสดุดูดซับที่ได้มาผสมกับตะกอนดินทั้ง 2 ประเภทในอัตราส่วน 1:2 (โดยน้ำหนัก) ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน

3) นำตะกอนดินในข้อ 2 มาประเภทละ 10 กรัม แยกใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

4) นำสารละลายในข้อ 3 มาวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม ซึ่งเป็นส่วนที่ถูกปล่อยออกมาจากอนุภาคดินที่ผสมตัวดูดซับโดยเครื่อง AAS เพื่อดูประสิทธิภาพของวัสดุดูดซับ