

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง Gas Chromatography, GC-430, Bruker
2. เครื่องวัดการสังเคราะห์พืช, chlorophyll fluorescence (Chlorophyll fluorescence with FMS-2 portable pulse –modulated fluorometer , Hansatech Instrument, England)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. โหลสุญญากาศ
5. พาราฟิล์ม
6. อลูมิเนียมฟรอยด์
7. เข็มฉีดยา ขนาด 10 μ L
8. เข็มสุญญากาศ ขนาด 10 mL
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
10. ปีกเกอร์ ขนาด 250 mL
11. ขวดแก้ว
12. เพลทอลูมิเนียม
13. ตู้อบความร้อน (Hot oven) Model: UNB 500 (memmert) อุณหภูมิ 60 °C
14. เครื่องหมุนเหวี่ยง
15. กระดาษกรองเบอร์ 2 (Whatman)
16. ขวดรูปชมพู่
17. กรวยกรอง
18. เครื่องปั่น
19. กระบอกตวง
20. ถ้วยกระเบื้อง
22. แผ่นสไลด์
23. น้ำยาเคลือบเล็บ
24. ใบมีด
25. น้ำกลั่น
26. ถุงดำ
27. ตู้ให้แสงไฟ
28. เครื่องเขย่า (shaker)

สารเคมีและพืชที่ใช้ในการวิจัย

1. สารโทลูอีน จากบริษัท เมอร์ค จำกัด
2. สารเอทิลเบนซีน จากบริษัท เมอร์ค จำกัด
3. ต้นพืช 12 ชนิด ได้แก่ กวนอิมเงิน เพชรน้ำหนึ่ง โกสน กวนอิมทอง เศรษฐีเรือนนอก หางหงษ์ ลิ้นมังกรเขียว ลิ้นมังกรขอบทอง ลิ้นมังกรครีบลาวาฬ ลิ้นมังกรจักรพรรดิ กุหลาบหิน และว่านหางจระเข้

การเตรียมพืช

เตรียมพืช 12 ชนิด โดย แบ่งเป็นพืช C3 มี 6 ชนิด ได้แก่ กวนอิมเงิน เพชรน้ำหนึ่ง โกสน กวนอิมทอง เศรษฐีเรือนนอก และหางหงษ์ ส่วนพืช CAM มี 6 ชนิด ได้แก่ ลิ้นมังกรเขียว ลิ้นมังกรขอบทอง ลิ้นมังกรครีบลาวาฬ ลิ้นมังกรจักรพรรดิ กุหลาบหิน และว่านหางจระเข้ (ตารางที่ 3.1) จากนั้นใช้ทิชชูและอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มส่วนของรากของพืชทุกชนิด

ตารางที่ 3.1 ชื่อพืชที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์
CAM	
ว่านหางจระเข้	<i>Aloe vera</i>
ครีบลาวาฬ	<i>Sansevieria masoniana</i>
ลิ้นมังกรขอบทอง	<i>Sansevieria trifasciata</i>
ลิ้นมังกรเขียว	<i>Sansevieria hyacinthoides</i>
ลิ้นมังกรจักรพรรดิ	<i>Sansevieria ehrenbergii</i>
กุหลาบหิน	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) ชื่อพืชที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์
C3	
กววมเงิน	<i>Dracaena deremensis</i>
โกสน	<i>Codiaeum variegatum</i>
เศรษฐีเรือนนอก	<i>Chlorophytum comosum</i> ,
กววมทอง	<i>Dracaena sanderiana</i>
เพชรน้ำหนึ่ง	<i>Cordyline fruticosa</i>
หางหงส์	<i>Aglaonema commutatum</i>

การเตรียมโหลอื่น และเอทิลเบนซินในการทดลอง

การทดลองต้องการเตรียมโหลอื่น และ เอทิลเบนซินเริ่มต้น 20 ppm โดยปริมาตรโหลอื่น และ เอทิลเบนซิน (หน่วยเป็นไมโครลิตร) ที่การฉีดในโหลอากาศที่คำนวณจากสมการที่ 2-3 (Treesubsuntorn and Thiravetyan, 2012) โดย ใส่พืชที่เตรียมไว้ในโหลสุญญากาศ จากนั้นปิดฝาโหลสุญญากาศ โดยใช้พาราฟินพันรอบโหลสุญญากาศ โดยภายในโหลสุญญากาศมีอุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส ความดัน 760 มิลลิกรัมปรอท ซึ่งอุณหภูมิและความดันสามารถใช้คำนวณความเข้มข้นมวลอากาศ (mole concentration) ได้ ดังสมการที่ 1 (Treesubsuntorn and Thiravetyan, 2012)

$$M_c = 24.47 \times (760/P) \times (T+273.15)/298.15 \quad (1)$$

$$\text{ppm} = 10^6 \times W/M_w \times M_c/V \quad (2)$$

$$\rho = W/V_b \quad (3)$$

M_c = ความเข้มข้นมวลอากาศ (โมล)

P = ความดัน (mmHg)

T = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

M_w = น้ำหนักมวลโมเลกุลของโทลูอิน หรือ เอทิลเบนซีน

V = ปริมาตรของโหลสุญญากาศ (15.6 ลิตร)

W = น้ำหนักของโทลูอิน หรือ เอทิลเบนซีน (g)

P = ความหนาแน่นของโทลูอิน หรือ เอทิลเบนซีน (g/ml)

V_b = ปริมาตรของโทลูอินหรือ เอทิลเบนซีน (ml)

การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดโทลูอิน และ เอทิลเบนซีนด้วยพืช CAM และ พืช C3

1. คัดเลือกต้นพืชที่สมบูรณ์ของแต่ละชนิดมาชนิดละ 3 ต้น จากนั้นนำต้นพืชมาวัดพื้นที่ใบ โดยให้อยู่ในช่วง 125-135 ตารางเซนติเมตร
2. นำต้นพืชที่เตรียมไว้มาหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟรอยล์บริเวณกระถางให้มิดชิด
3. ทำความสะอาดโหลสุญญากาศ แล้วนำต้นพืชที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟรอยล์ใส่ลงในโหลสุญญากาศที่มีปริมาตร 15.6 ลิตร จากนั้นทำการปิดฝาโหลสุญญากาศ โดยใช้พาราฟิล์มพันรอบโหลสุญญากาศ
4. เตรียมสารโทลูอินและเอทิลเบนซีน ที่ความเข้มข้น 20 ppm ฉีดลงในโหลสุญญากาศที่มีต้นพืชอยู่ จากนั้นจึงปล่อยทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อให้โทลูอินและเอทิลเบนซีนกระจายตัวอยู่ในสถานะสมดุลในโหลสุญญากาศ
5. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอินและเอทิลเบนซีน ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) โดยเก็บตัวอย่างอากาศจากโหลสุญญากาศ 0.3 มิลลิลิตร และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ โทลูอิน และ เอทิลเบนซีน ด้วยเครื่อง GC โดยในแต่ละตัวอย่างเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ
5. ใช้ค่า Peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC มาคำนวณเพื่อนำค่าที่ได้ไปทำกราฟ
6. นำไปวิเคราะห์จำนวนของปากใบ (stomata number) ด้วยกล้อง light microscope กำลังขยาย (40x)
7. แล้วนำมาวิเคราะห์การสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ด้วย chlorophyll fluorescence (Chlorophyll fluorescence with FMS-2 portable pulse -modulated fluorometer , Hansatech Instrument, England)



ภาพที่ 3.1 หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำมาใส่โหลสุญญากาศ

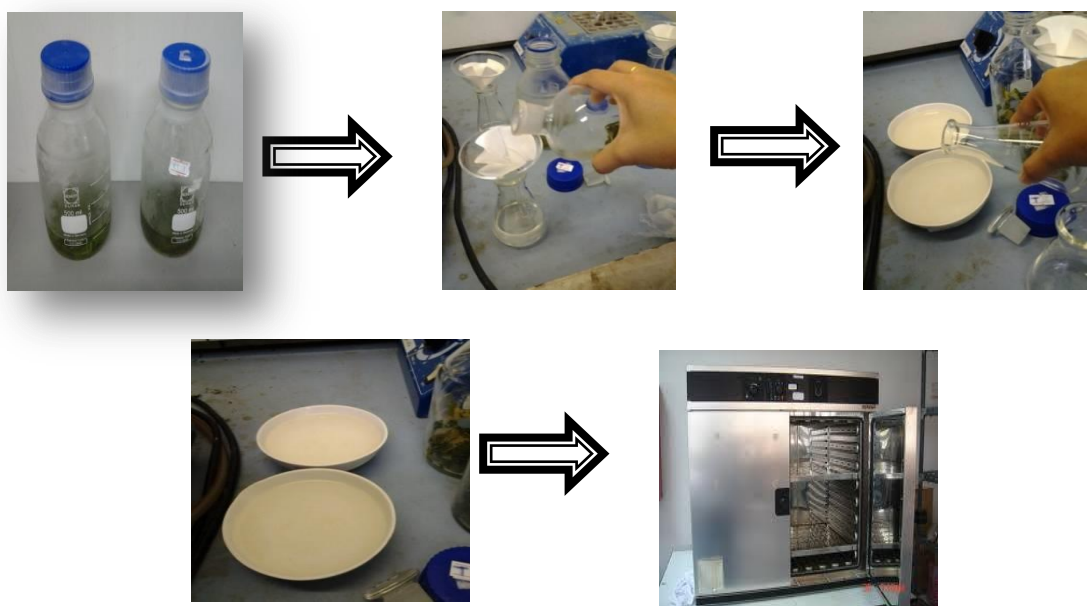


ภาพที่ 3.2 เครื่อง GC (Gas Chromatography, GC-430, Bruker)

การสกัดแว็กซ์ (Crude wax extraction) จากพืช CAM และ พืช C3

1. นำใบทั้ง 12 ชนิดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ
2. นำใบพืชที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดแก้วสุญญากาศ แล้วเติมเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดให้ มิดชิด แล้วพันด้วยพาราฟิล์มอีกรอบทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน โดยให้อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส

3. จากนั้นนำตัวอย่างกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 และนำส่วนของเหลวที่ไหลผ่านกระดาษกรองไว้ระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน จึงนำไปอบ 1 วัน ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
4. ตัวอย่างเย็นลงจึงนำไปใส่เตาซีเคเตอร์แล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยบันทึกน้ำหนักด้วยทศนิยม 4 ตำแหน่ง



ภาพที่ 3.3 การสกัดแวกซ์

การนับจำนวนปากใบของพืช CAM และ C3

1. ทำการกรีดปากใบของพืชทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยทั้งใบต้องกรีดบริเวณโคนใบ กลางใบ และส่วนปลายใบ (กรีดให้บางที่สุด)
2. นำส่วนที่กรีดได้แล้ว มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 4x
3. บันทึกจำนวนปากใบที่นับได้

ผลของระบบการปลูกพืชชนิด C3, ชนิด CAM และ พืช C3+พืช CAM ในสภาวะปกติ สภาวะไม่มีแสง และสภาวะมีแสง ต่อประสิทธิภาพการบำบัดโทลูอินและเอทิลเบนซีน

1. หลังจากได้พืชที่สามารถบำบัดเอทิลเบนซีนได้ประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว การทดลองจึงเลือกพืชชนิด C3 ที่สามารถบำบัดเอทิลเบนซีนได้สูงสุด มา 1 ชนิด และเลือกพืชชนิด CAM ที่สามารถบำบัดเอทิลเบนซีนได้สูงสุด มา 1 ชนิด

2. จากนั้นออกแบบระบบทดลอง โดยนำพืช C3 มา 2 ต้น , พืช CAM มา 2 ต้น และ C3 กับ CAM อย่างละ 1 ต้น ใส่โหลสุญญากาศโดยใช้ฟาราฟินพันรอบโหลสุญญากาศ จากนั้นหุ้มรากด้วย

พืชและอลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil) โดยออกแบบการทดลองให้ปลูกพืชในสภาวะปกติ สภาวะที่มีแสง และในสภาวะที่ไม่มีแสง

3. ฉีดโทลูอิน ความเข้มข้นประมาณ 5 ppm ส่วน เอทิลเบนซินความเข้มข้น 15 ppm ในโหลสุญญากาศ ปล่อยทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงเพื่อให้สารอยู่ในสภาวะสมดุลในโหลสุญญากาศ และจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างอากาศ 0.3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ โทลูอิน และเอทิลเบนซินที่เหลือยู่ด้วยเครื่อง GC โดยในแต่ละตัวอย่างเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ

4. นำพืชที่เก็บตัวอย่างแล้วมาส่องดูการเปิด ปิด ของปากใบด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. นำค่า Peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC มาคำนวณเพื่อนำค่าที่ได้

ไปทำกราฟ



ภาพที่ 3.4 ระบบการปลูกพืช ชนิดC3 , ชนิดCAM และ พืชC3 + พืชCAM ในสภาวะปกติ สภาวะมีแสง และสภาวะไม่มีแสง

การวิเคราะห์โทลูอิน และเอทิลเบนซินด้วย GC

เก็บตัวอย่างโทลูอิน และเอทิลเบนซินในโหลสุญญากาศหลังจากการทดลองด้วยพืชแต่ละชนิด จำนวน 0.3 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography, shimadzu 14 B) โดยหน่วยที่วิเคราะห์จะอยู่ในรูป ppm และความแตกต่างระหว่าง ปริมาณเบนซินที่เหลือยู่ในระบบควบคุม และ โทลูอิน เอทิลเบนซินที่เหลือยู่ที่บำบัดแล้วโดยใช้พืชชนิดต่างๆ คือ ปริมาณโทลูอิน เอทิลเบนซินที่พืชได้ดูดซับ (สมการที่ 4) และสามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 5 (Treesubstorn and Thiravetyan, 2012)

$$\Delta \text{ppm} = \text{ppm}_{\text{control}} - \text{ppm}_{\text{treatment}} \quad (4)$$

$$W = \Delta \text{ppm} \times (V/M_C) \times (M_W/10^6) \quad (5)$$

ระบบควบคุม

$\text{ppm}_{\text{control}}$ = ความเข้มข้นของโทลูอิน หรือ เอทิลเบนซีนที่เหลือยู่ใน

พืช

$\text{ppm}_{\text{treatment}}$ = ความเข้มข้นของโทลูอิน เอทิลเบนซีนที่เหลือยู่ที่บำบัดด้วย

M_c = ความเข้มข้นของมวลอากาศ

M_w = มวลโมเลกุลโทลูอิน หรือ เอทิลเบนซีน

W = น้ำหนักของโทลูอินหรือ เอทิลเบนซีนที่ถูกดูดซับด้วยพืช

V = ปริมาตรของระบบ

การวิเคราะห์สถิติ

จะวิเคราะห์สถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 16 โดยจะวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัย Remediation Lab มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร