บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การเจริญเติบโตและอาการขาดธาตุอาหาร

1.1 วัสดุพันธุ์พืช

หัวพันธุ์หงส์เหิน (*Globba rosea* Gagnep.) ขนาดเล็ก มีรากสะสมอาหารจำนวน 2 ราก เส้นผ่าศูนย์กลางหัว 0.2-0.3 เซนติเมตร ยาว 3.0-4.0 เซนติเมตร จำนวน 120 หัว

1.2 วัสดุปลูก

วัสดุปลูกได้แก่ ทราย

1.3 วัสดุเคมี

สารเคมีสำหรับการเตรียมสารละลายธาตุอาหารดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหาร

ธาตุ	สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
N	NH_4NO_3	140
	$NaNO_3$	60
P	Na_2HPO_4	100
K	K_2SO_4	100
Ca	$CaCl_2$	100
ธาตุอาหารรอง : ยูนิเลท อัตรา 4 กรัม/น้ำ 80 ลิตร = 50 มิลลิกรัมต่อลิตร		

ผสมสารละลายธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ ในถังน้ำขนาด 80 ลิตร ตามกรรมวิธีข้อ 1.5

1.4 อุปกรณ์

1.4.1 เครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้า (EC meter)

1.4.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.4.3 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.4.4 ตู้อบ

1.4.5 ถุงเก็บตัวอย่างพืช

1.4.6 ถุงดำขนาด 4x8 นิ้ว

1.4.7 กระบะปลูกขนาด 1x1 เมตร จำนวน 6 กระบะ

1.5 วิธีการทดลอง

ปลูกหงส์เหินในถุงดำขนาด 4x8 นิ้ว โดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูก นำมาวางเรียงในกระบะปลูก เมื่อต้นเริ่มงอกจึงเริ่มให้สารละลายธาตุอาหารตามกรรมวิธีต่างกันดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ตามตารางที่ 1 (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ขาดไนโตรเจน (-N) ส่วนธาตุอาหารอื่นได้รับเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ขาดฟอสฟอรัส (-P) ส่วนธาตุอาหารอื่นได้รับเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (-K) ส่วนธาตุอาหารอื่นได้รับเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

กรรมวิธีที่ 5 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ขาดแคลเซียม (-Ca) ส่วนธาตุอาหารอื่นได้รับเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

กรรมวิธีที่ 6 ให้พืชได้รับเฉพาะน้ำกลั่นตลอดการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี ให้พืชได้รับสารละลายธาตุอาหารในช่วงเช้า (9.00 น. -10.00 น.) ต้นละ 50 มิลลิลิตรทุกวัน ใช้น้ำชะล้างเกลือที่สะสมในวัสดุปลูกสัปดาห์ละครั้ง ตลอดการทดลอง

1.6 การบันทึกผลการทดลอง

1.6.1 ความสูงของต้น (ซม.) วัดจากโคนต้นถึงปลายใบที่สูงที่สุดโดยรวบใบ

1.6.2 จำนวนใบต่อต้น

1.6.3 จำนวนต้นต่อกอ

1.6.4 อายุเมื่อเริ่มให้ดอก (วัน) (นับจากปลูกจนกระทั่งเริ่มออกดอก)

1.6.5 จำนวนดอกต่อกอ

1.6.6 น้ำหนักแห้ง

1.6.7 อาการผิดปกติเมื่อเกิดการขาดธาตุอาหาร

บันทึกผลการทดลองทุก 2 สัปดาห์ ส่วนน้ำหนักแห้งบันทึกผลใน 4 ระยะของการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะก่อนปลูก ระยะเริ่มงอก ระยะออกดอก และระยะพักตัว

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารสะสมในหงส์เหิน

2.1 วัสดุพันธุ์พืช

นำหงส์เหินที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยแยกเป็น 2 ส่วนได้แก่ 1) ส่วนเหนือดิน ประกอบด้วยใบและดอก และ 2) ส่วนใต้ดิน ประกอบด้วยรากและหัว

2.2 วัสดุเคมี

2.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน ได้แก่ EDTA.2Na, sodium hydroxide (NaOH), ethanol (C_2H_5OH), methyl red, potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), benzoic acid, sodium nitroprusside, phenol, disodiumhydrogen phosphate (Na_2HPO_4), trisodium phosphate (Na_3PO_4), sodiumhypochlorite (NaClO) และ ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)

2.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่ ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$), sulfuric acid (H_2SO_4), hydrochloric acid (HCl), และ stannous chloride ($SnCl_2$)

2.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียม ได้แก่ La_2O_3

2.3 อุปกรณ์

2.3.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

2.3.2 Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

2.3.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.3.4 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3.5 ตู้อบ

2.3.6 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB-4

2.3.7 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทางเคมี เช่น บีกเกอร์ ปิเปต หลอดทดลอง ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคน กรวย กระบอกตวง เป็นต้น

2.4 วิธีการทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างพืชจากการทดลองที่ 1 ซึ่งได้รับสารละลายธาตุอาหารต่างกัน โดยสุ่มพืชในช่วงการเจริญเติบโตต่างกัน 4 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนปลูก ระยะเริ่มงอก ระยะออกดอก และระยะพักตัว จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาแยกเป็นส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดิน ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งจากนั้นชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูลไว้ แล้วนำตัวอย่างพืชไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลงจึงบันทึกน้ำหนักแห้ง

2.4.1 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรด (Wet Acid Digestion) ดัดแปลงโดย Ohyama *et al.*, (1985 ; 1986)

2.4.1.1 การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืช ปรับอุณหภูมิที่ 180 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม H_2O_2 หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิ 230 °ซ นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติม H_2O_2 หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อ ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.4.1.2 การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (Mizukoshi *et al.*, 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติม $HClO_4$ 0.4 มิลลิลิตร และ HNO_3 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 °ซ เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210°ซ ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมสารละลายเจือจางของไฮโดรครอริก (HCl 1 : H_2O 4 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 °ซ นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร (Ohyama *et al.*, 1985, 1986)

2.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจน (Indolphenol Method)

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

2.4.2.1.1 เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 จากนั้นเติมสารละลายเมทธิลเรด 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

B reagent : ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม และกรดเบนโซอิค 2.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

C reagent : ชั่ง sodium nitroprusside 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่ง NaOH 10 กรัม, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 7.06 กรัม และ $Na_3PO_4.12H_2O$ 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม sodium hypochlorite 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.4.2.1.2 เตรียมสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 N เพื่อปรับความเป็นกรดด่าง

2.4.2.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก $(NH_4)_2SO_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2.4.2.1.4 ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้ในข้อ 2.2.2.1.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาไตรเตรทโดยหยด 1 N NaOH ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 °ซ นาน 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's–Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{สาร A (ppm)} \times B \times A}{1000 \times DW}$$

สาร A มิลลิกรัมต่อลิตร = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืชในข้อ 2.2.1.1

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

2.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et. al.*, 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดตดังนี้

2.4.2.2.1 เตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์

A reagent : ชั่ง $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองโดยใช้ระบบสูญญากาศช่วย

B reagent : เตรียมกรดซัลฟูริก 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

C reagent : นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เท A reagent ทีละน้อย ช้า ๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2.4.2.2.2 เตรียมสารละลาย stanous chloride โดยชั่ง stanous chloride ($SnCl_2.2H_2O$) 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ดูดควัน) โดยเติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

2.4.2.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2.4.2.2.4 ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.1.1 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติม stanous chloride 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

2.4.2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2.4.2.3.2 เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.1.2 โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

2.4.2.3.3 นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

2.4.2.4 วิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม

2.4.2.4.1 เตรียม lantanum oxide โดยชั่ง lantanum oxide 2.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร เติม HCl 37 % 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.4.2.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียม จาก $CaCO_3$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2.4.2.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก $MgCl_2$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2.4.2.4.4 เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.1.2 สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารสะลายในข้อ 2.2.2.4.1 เป็น 25 มิลลิลิตร

2.4.2.4.5 นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนโดยอะตอมของแคลเซียมและแมกนีเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 442.7 นาโนเมตร และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณ เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University