บทที่ 2

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเตรียมพืชทดลอง

พืชทดลองที่ใช้คือแหนแดง (Azolla pinnata R.Br.) โดยเลือกแหนแดงจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ หรือที่เลี้ยงไว้ในเรือนเพาะชำนำมาทำความสะอาดโดยส่องดูด้วยกล้อง Binoccular ขนาดกำลังขยาย 10 X 2 คัดเอาเฉพาะแหนแดงที่เจริญเติบโตดีปราศจากแมลง หนอน และสาหร่ายชนิดอื่น เช่น สาหร่ายสีเขียวที่มักจะเกาะอยู่ตามใบล่าง (lower lobe) นำมาล้างด้วย deionized water 4 - 5 ครั้ง แหนแดงที่ใช้ในการทดลองอยู่ในระยะที่มีสีเขียว colony มีขนาดกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่แหนแดงเริ่มต้นที่มีน้ำหนักสดเท่า ๆ กันลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร มีสารอาหารที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจนซึ่งดัดแปลงมาจากสูตรของ Hoagland (H-N) จำนวน 80 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี

การทำเกลือให้บริสุทธิ์ (Purification of Nutrient Salts)

การทำเกลือให้บริสุทธิ์ปราศจากโลหะอื่นเจือปน ได้ดัดแปลงจากวิธีการ Copper sulfide co-precipitation (Arnon และผู้ร่วมงาน, 1955) เริ่มต้นด้วยการทำ alkaline co-precipitation เพื่อขจัดโคบอลท์ นิคเกิล วานาเดียม และอื่น ๆ ออกโดยใช้ $CuSO_4.7H_2O$ $CaCO_3$ และก๊าซ H_2S ซึ่งเตรียมจาก $FeS + H_2O + HCl$ conc. แล้วตามด้วยการทำ acid co-precipitation เพื่อขจัดโมลิบดินั่มโดยใช้ $CuSO_4.7H_2O$ และก๊าซ H_2S

ในการทดลองนี้ได้ทำเกลือ 4 ชนิดให้บริสุทธิ์ ได้แก่ $MgSO_4$ $CaCl_2$ KCl และ KH_2PO_4 โดยทำตามวิธีการข้างต้นทุกอย่าง ยกเว้นการใช้อากาศพ่นไล่ก๊าซ H_2S ที่เหลืออยู่ในสารละลาย แทนการใช้ก๊าซไนโตรเจน

การทดสอบความบริสุทธิ์ของเกลือ (Dithizone test for total metals)

การทดสอบความบริสุทธิ์ของเกลือ ได้ทำตามวิธีของ Stout and Arnon (1939) ยกเว้นสารเคมีที่ใช้มิได้นำมากลั่นใหม่

ใช้สารละลายของ $ZnSO_4$ ที่มี Zn = 5 X 10^{-6} กรัมต่อลิตร ไว้เป็นมาตรฐานในการเทียบสี โดยถ้าเกลือที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วยังให้สีที่เข้มกว่า แสดงว่ามีโลหะเจือปนเกินกว่าที่ต้องการ เกลือนั้นไม่บริสุทธิ์พอ ต้องทำเกลือให้บริสุทธิ์ซ้ำอีก

ภาชนะและเครื่องใช้ทุกอย่างในการทำเกลือให้บริสุทธิ์ และการทดสอบความบริสุทธิ์ของเกลือ จะต้องล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง แช่ใน HCl 3N ครึ่งชั่วโมง ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา และน้ำกลั่น จากนั้นนำมาแช่ HNO_3 6N ครึ่งชั่วโมง และล้างด้วย deionized water ประมาณ 3 ครั้ง

การหาปริมาณไนโตรเจน

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแหนแดง ทำโดยวิธี colorimetric method ซึ่งมีหลักการสำคัญคือ ไนโตรเจนทั้งหมดจะถูกย่อยสลาย (digest) ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น ให้ไปอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต, $(NH_4)_2SO_4$ แล้วให้ NH_4^+ ทำปฏิกริยากับ Nessler's reagent จะเกิดสีเหลืองขึ้น วัดความเข้มของสีโดยวัด O.D. (optical density)ที่ความยาวคลื่น 520 นาโมมิเตอร์ (nm.) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer แล้วหาค่าไนโตรเจนโดยเทียบกับ standard graph ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต

วิธีปฏิบัติ เริ่มจากการชั่งแหนแดงที่อบแห้งจนน้ำหนักคงที่แล้วมา 20 มิลลิกรัม หรือถ้าเป็น media ที่เลี้ยงแหนแดง จะตั้งบน steam bath เพื่อระเหยเอาน้ำออกไปประมาณ 3 ใน 4 ส่วน แล้วจึง pipette มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Kjeldahl flask ขนาด 30 มิลลิลิตร เติม digestive mixture 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นระยะ ๆ ให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที เติมโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 160 มิลลิกรัม เขย่าตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ลนบนเปลวไฟอ่อน ๆ จนหมดฟอง เติม salt solution 2 มิลลิกรัม นำไปฝังลงในกระบะทรายที่ร้อน 300 – 350 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสาร

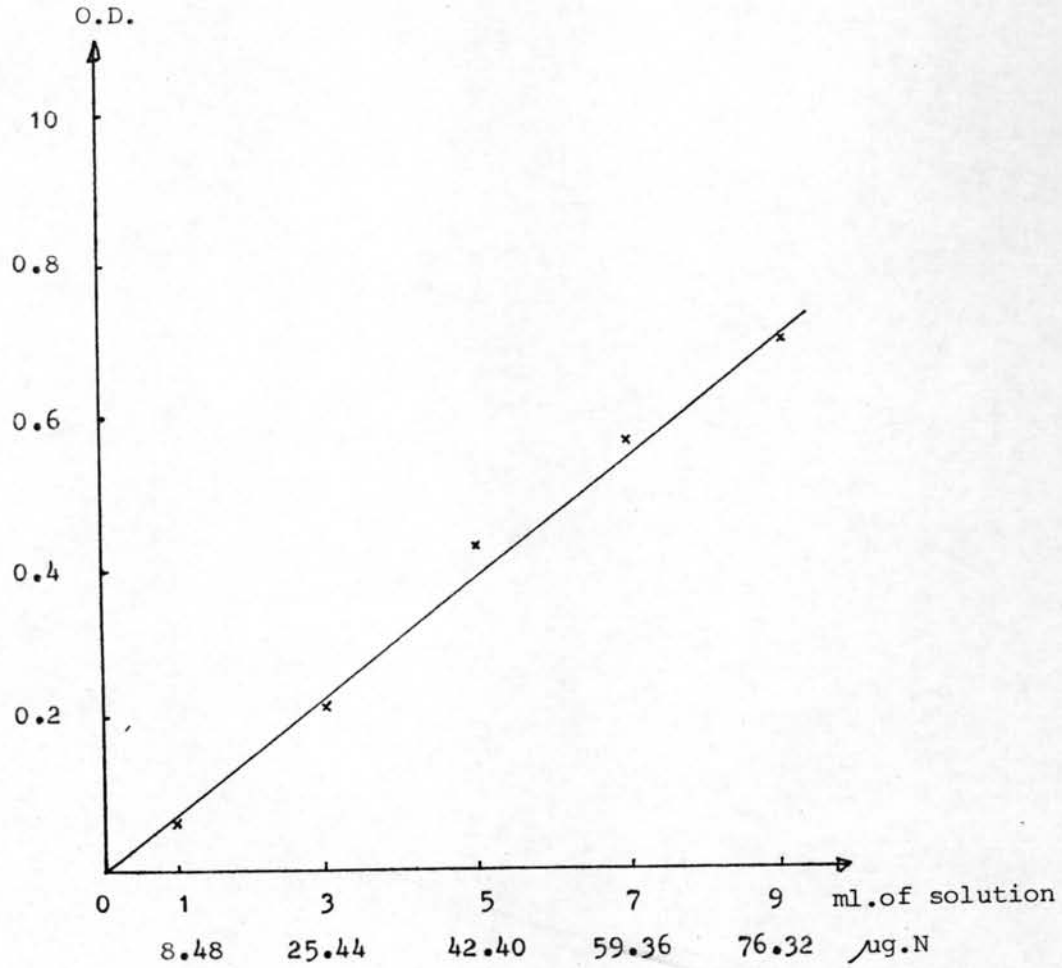
ละลายใส แล้วฝังต่อไปอีกอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง จึงนำออกจากกระบะทราย ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 1

pipette สารละลายที่ได้นี้มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และ Nessler's reagent 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมง วัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนมิเตอร์ หาปริมาณไนโตรเจนเป็นไมโครกรัม (ug) จาก standard graph แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแหนแดง และใน media ต่อไป

การทำ standard graph ทำโดยใช้สารละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเตรียมโดยนำแอมโมเนียมซัลเฟตมาอบแห้งในตู้อบ (Oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ชั่งสาร 2 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วทำให้เป็น 100 มิลลิลิตร pipette สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมา 1 มิลลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask และย่อยสลายตามวิธีการข้างบนทุกประการ เมื่อได้สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้ว pipette มา 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วจึง pipette มาในปริมาณต่าง ๆ กัน (1 3 5 7 และ 9 มิลลิลิตร) เติม Nessler's reagent 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปวัด O.D. จากจำนวนมิลลิลิตรของสารละลายที่ใช้ คำนวณหาไนโตรเจนเป็นไมโครกรัม นำไปเขียนกราฟกับค่า O.D. ที่วัดได้ ก็จะได้ standard curve

<u>การวัดผลการทดลอง</u>

ทำโดยหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแหนแดง อบแหนแดงในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำออกมาชั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด พร้อมกับหาปริมาณไนโตรเจนของแหนแดงที่อบแห้งจากการทดลองแต่ละหัวข้อ และใน media ของการทดลองชุดสุดท้าย ตามวิธีการหาปริมาณไนโตรเจนดังกล่าวมาแล้ว



กราฟที่ 1 standard graph แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง O.D. (optical density) กับปริมาณไนโตรเจน

ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1. ศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารสูตร H-N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

เนื่องจากแหนแดงเจริญเติบโตได้ดีในสารอาหารสูตร H-N (สุทธพรรณ, 2509) จึงศึกษาต่อไปว่าเมื่อใช้สารอาหารนี้ pH5 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดงอย่างไรบ้าง โดยให้ความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เป็น 0 $\frac{1}{2}$ 1 และ 2 เท่า ของความเข้มข้นปกติ แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 32 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 1.5 มิลลิกรัม) ทำการทดลอง 2 ขวดต่อทุก ๆ ความเข้มข้นของสารอาหาร นำแหนแดงทั้งหมดไว้ที่ชั้นไฟที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ 2 หลอด อยู่สูงจากพื้น 1 ฟุต ความเข้มของแสงประมาณ 3,500 ลักซ์ ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้อง 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เขย่าขวดที่เลี้ยงแหนแดงทุกวันวันละครั้ง เลี้ยงแหนแดงเป็นเวลา 45 วันจึงเก็บผลการทดลอง

2. ศึกษาความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารอาหารสูตร H-N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

ผลจากการทดลองในข้อ 1 พบว่า แหนแดงมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อให้สารอาหารที่มีความเข้มข้นปกติ ฉะนั้นการทดลองในขั้นต่อ ๆ ไปจะเลี้ยงแหนแดงในสารอาหารดังกล่าวที่มี pH 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 และ 9 ปรับ pH โดยใช้ HCl 0.1 N และ NaOH 0.1 N แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 40 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 1.7 มิลลิกรัม) ทำการทดลอง 3 ขวดต่อหนึ่งค่า pH แล้วเลี้ยงไว้ในที่เดียวกันกับข้อ 1 เก็บผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแหนแดงได้ 32 วัน

3. ศึกษาความเข้มของแสงและช่วงเวลาการให้แสง (light intensity และ light duration) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

จากผลการทดลองในข้อ 2 พบว่าสารอาหารสูตร H-N ที่มีความเข้มข้นปกติ ต้องมี pH5 แหนแดงจึงเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ฉะนั้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงใช้สารอาหารสูตร H-N ที่มีความเข้มข้นปกติ และมี pH = 5 สำหรับการทดลองในข้อนี้จะแบ่งเป็นขั้นตอนย่อย ๆ 3 ตอน ดังต่อไปนี้

3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของแหนแดงเมื่อได้รับความเข้มของแสงต่าง ๆ กันดังนี้ 2,000 4,000 6,000 และ 8,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ 3 หลอด ใช้โฟมกั้นแบ่งเป็น 4 ตอน แล้วปรับความเข้มของแสงตามต้องการโดยปิดบางส่วนของหลอดไฟด้วยแผ่นอลูมินั่ม (aluminum foil) และใช้กระดาษขาว-ดำปูที่พื้นในบางตอน ใช้แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70.6 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.53 มิลลิกรัม) ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้อง 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มของแสง

3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแหนแดงเมื่อได้รับความเข้มของแสง และช่วงเวลาการให้แสงต่าง ๆ กัน

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 พบว่าแหนแดงเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อความเข้มของแสงสูง 6,000 และ 8,000 ลักซ์ ฉะนั้นจึงทดลองเพิ่มความเข้มของแสงขึ้นอีก และเลิกใช้ความเข้มของแสง 2,000 ลักซ์ เพราะแหนแดงเจริญเติบโตได้น้อยที่สุด ดังนั้นความเข้มของแสงที่ใช้ในข้อนี้คือ 4,000 6,000 8,000 และ 10,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ 4 หลอด โดยการกั้นเป็นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ช่วงเวลาที่ให้ได้รับแสงคือ 16 20 และ 24 ชั่วโมงต่อวัน ช่วงเวลาที่ไม่ให้รับแสง ทำโดยนำไปใส่กล่องกระดาษและคลุมผ้าดำ ทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวันอาทิตย์ แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70.23 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.51 มิลลิกรัม) อุณหภูมิห้อง 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลาการให้แสง และในแต่ละความเข้มของแสง

3.3 ศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.2 แต่ทดลองใช้หลอดซุปเปอร์-โกร (super-gro) เพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด เพื่อเปรียบเทียบกับหลอดฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากหลอดซุปเปอร์-โกร มีคุณภาพของแสงใกล้เคียงกับแสงในธรรมชาติมากกว่า และคาดว่าจะทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี จึงทำการทดลอง และวัดผลเช่นเดียวกับข้อ 3.2 โดยใช้แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.49 มิลลิกรัม)

เนื่องจากแหนแดงเจริญเติบโตเร็วขึ้น และเพิ่มจำนวนเต็มขวดแก้วเร็วกว่าการทดลองข้อที่ 1 และ 2 จำต้องเก็บผลการทดลองเร็วขึ้นดังนี้

3.1 เก็บผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแหนแดงได้ 25 วัน

3.2 และ 3.3 เก็บผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแหนแดงได้ 21 วัน

4. ศึกษาอุณหภูมิห้องที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

ผลจากการทดลองในข้อ 3 พบว่าแหนแดงเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อได้รับความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่เปิดตลอด 24 ชั่วโมง ฉะนั้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงเลี้ยงแหนแดงในสารอาหารสูตร H-N ที่มีความเข้มข้นปกติ pH5 และเลี้ยงไว้ในที่ ๆ มีความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่เปิดตลอด 24 ชั่วโมง แต่จะไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ กัน 3 ระดับ คือ ในช่วง 23 - 25 27 - 30 และ 34 - 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 8 ขวด ในแต่ละช่วงอุณหภูมิ ใช้แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.34 มิลลิกรัม) เก็บผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแหนแดงได้ 21 วัน

5. ศึกษาปริมาณของธาตุโคบอลท์ (Co) และโมลิบดินัม (Mo) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

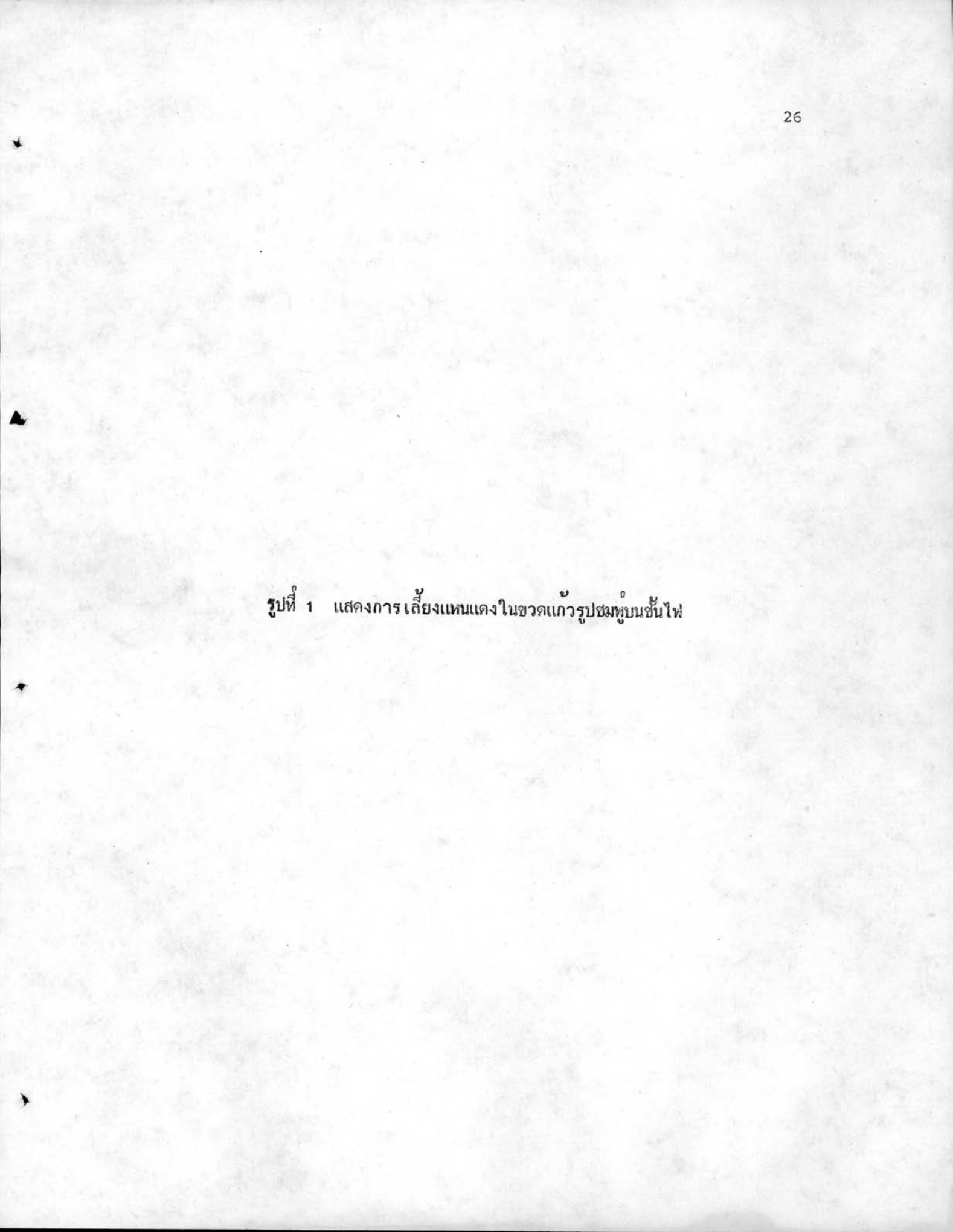
ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

5.1 ศึกษาว่าการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดงต้องการธาตุ Co และ Mo หรือไม่ โดยจะให้ Co ในรูปของ $CoCl_2$ และ

Mo ในรูปของ Na_2MoO_4 อย่างละ 10 ไมโครกรัม/ลิตร (ตามสูตรอาหารของ Hoagland ซึ่งมี Mo 10 ไมโครกรัม/ลิตร การทดลองในครั้งนี้ใช้เกลือที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (P) เตรียมสารอาหารโดยใช้น้ำกลั่น (glass distilled water) ที่ผ่านการกรอง (deionized water) มาแล้ว เติม micronutrients (A4) เติม A4 + Mo เติม A4 + Co และเติม A4 + Mo + Co อย่างละ 1 ชุด และใช้เกลือที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (U) เติม A4 + Mo ไว้เปรียบเทียบด้วย ความเข้มข้นของสารอาหารเป็นปกติ มี pH 5 เลี้ยงไว้ในที่ ๆ มีความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ซึ่งเปิดตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องระดับปานกลาง คือ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับผลการทดลองในข้อ 4 ใช้แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.66 มิลลิกรัม) ทำการทดลอง 5 ขวดในแต่ละการทดลอง เมื่อเลี้ยงแหนแดงไปได้ 14 วัน ปรากฏว่าแหนแดงเจริญเติบโตเต็มขวด จึงเปลี่ยนภาชนะจากขวดไปเป็น petri-dish ทรงสูง แล้วเก็บผลการทดลองเมื่อเลี้ยงได้ 23 วัน

5.2 ศึกษาปริมาณของธาตุทั้ง 2 ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการตรึงก๊าซไนโตรเจนของแหนแดง

ผลจากการทดลองข้อ 5.1 ทราบว่าแหนแดงต้องการธาตุทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงเลี้ยงแหนแดงในเกลือที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เติม Co และ Mo ที่มีความเข้มข้น 0 1 10 100 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/ลิตร โดยปรับความเข้มข้นของตัวแปรทั้งสองนี้จนได้ครบ 36 treatments เลี้ยงไว้ในสภาพเช่นเดียวกับข้อ 5.1 ใช้แหนแดงเริ่มต้นมีน้ำหนักสด 70 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง 3.24 มิลลิกรัม) เนื่องจากแหนแดงเพิ่มจำนวนจนเต็มขวดได้ภายในเวลา 18 วัน จึงเก็บผลการทดลองในวันที่ 18



รูปที่ 1 แสดงการเลี้ยงแหนแดงในขวดแก้วรูปชมพู่บนชั้นไฟ

หอสมุดกลาง