

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่าง

- เมล็ดทานตะวัน สายพันธุ์แปซิฟิก 33 (แปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ สระบุรี)

2.1.2 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลาย APW (artificial pond water)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, AR Grade : Analytical Carlo Erba, France)
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, AR Grade : Merck, Germany)
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- 2-มอร์โฟลิโนอีเทนซันโฟนิคแอซิดโมโนไฮเดรต (2-Morpholinoethanesulfonic acid Monohydrate, Mes) ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Merck, Germany)
- อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3 , AR Grade: Baker Analyzed, USA)
- แคดเมียมคลอไรด์ (CdCl_2 , AR Grade : Merck, Germany)
- อาร์ซีนิกออกไซด์ (As_2O_3 , AR Grade : Merck, Germany)

2.1.3 สารเคมีสำหรับซัพพลีเมนต์

- แพลทินัมคลอไรด์ ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Fluka, Switzerland)
- ทองโพแทสเซียมไซยาไนด์ (AuKCN , AR Grade : Degussa, Germany)
- เลดอะซิเตต ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, AR Grade : Baker Analyzed, USA)

2.1.4 สารเคมีอื่นๆ ที่จำเป็น

- บัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.00, 7.00 และ 10.00 (AR Grade : Merck, Germany)
- อะซิโตน (CH_3COCH_3 , AR Grade : Carlo Erba, France)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl, AR Grade : BDH, England)

- โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ไฮเตอร์) (hypochlorite as available chlorine 6% w/w)

2.1.5 อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดทานตะวัน

- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.0 เซนติเมตร
- ตู้อัด
- ปากคีบปลายแหลม (forceps)
- เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

2.1.6 อุปกรณ์สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออนรอบ ๆ รากทานตะวัน

- ระบบไวเบรติงโพรบ (vibrating probe system)
ประกอบด้วย
 - ออสซิลเลเตอร์ (osillator) ทำหน้าที่จ่ายสัญญาณรูปไซน์ (sine)
 - ไวเบรเตอร์แอสเซมบลี (vibrator assembly) ทำหน้าที่ให้อิเล็กโทรดสั่นกลับไปกลับมา
 - PSD (phase sensitive detector) ทำหน้าที่รับสัญญาณและใช้ปรับเฟสของสัญญาณ
 - 3D micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan)
 - เครื่องขยายสัญญาณ (preamplifier)
 - เครื่องกรองสัญญาณ (filter)
- ฟาราเดย์เคจ (Faraday cage)
- เครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder, Kipp & Zonen, BD41, Holland)
- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (inverted microscope, Olympus, CK40, Tokyo, Japan)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope, Olympus, SZH10, Tokyo, Japan)
- โพรบ (parylence-coated stainless-steel electrode, MicroProbe, Clarkburg, MD, USA) สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน
- มัลติมิเตอร์ (multimeter, Fluke 87, USA)
- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 เซนติเมตร สูง 1.0 เซนติเมตร

- เครื่องวัดสภาพน้ำไฟฟ้า (conductivity meter, Jenway model 4310, England)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Corning model 220, England)

2.1.7 อุปกรณ์สำหรับเตรียมไมโครอิเล็กโทรดเปรียบเทียบ

- ลวดเงิน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.33 ± 0.05 มิลลิเมตร และ 1.70 ± 0.05 มิลลิเมตร (silver wire purity 99.99%, Advent Research Materials Ltd., England)
- กระดาษทราย
- ไมโครปิเปต (micropipette) ทำจากหลอดแก้ว (Borosilicate with filament) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.58 มิลลิเมตรและเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 1.00 มิลลิเมตร (Clark Electromedical Instruments, England)
- ปืนกาวซิลิโคนและกาวซิลิโคน
- ตัวต้านทานปรับค่าได้
- แบตเตอรี่ 1.5 โวลต์
- สายไฟ
- เครื่องให้ความร้อนและคนของเหลวด้วยแท่งแม่เหล็ก (hotplate/stirrer, Framo®-Geratetechnik, Typ M21/1, Germany)
- ทรงกระบอกสำหรับยึดไมโครปิเปต

2.1.8 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอิเล็กโทรดอ้างอิง

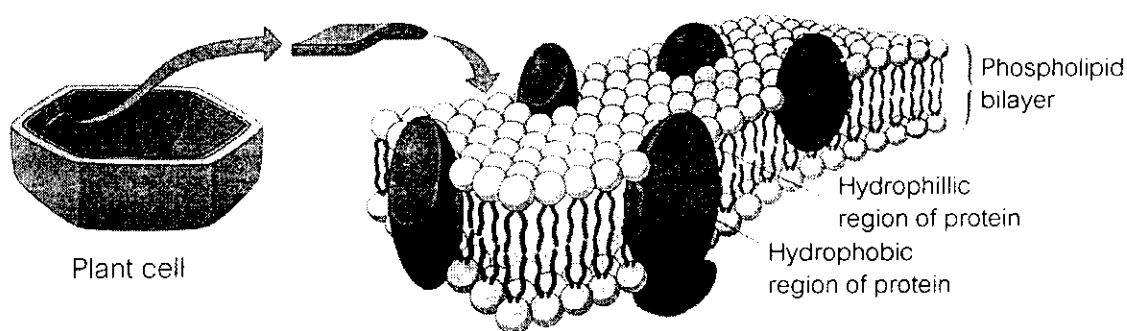
- ลวดแพลทินัม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 ± 0.05 มิลลิเมตร ยาว 4.0 ± 0.1 เซนติเมตร
- แบตเตอรี่ 9 โวลต์

2.1.9 วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

- ซิลิโคนกรีส (silicone grease, Bayer-silicone, Fluka, Switzerland) สำหรับตรึงรากานตะวันในงานเพาะเชื้อ
- กระดาษบันทึกข้อมูล (chart recorder paper) สำหรับบันทึกสัญญาณ
- นาฬิกาจับเวลา (Casio HS-5, Korea)
- เครื่องชั่ง (Mettler PJ300 : Mettler, Switzerland)
- เครื่องแก้ว (pyrex)

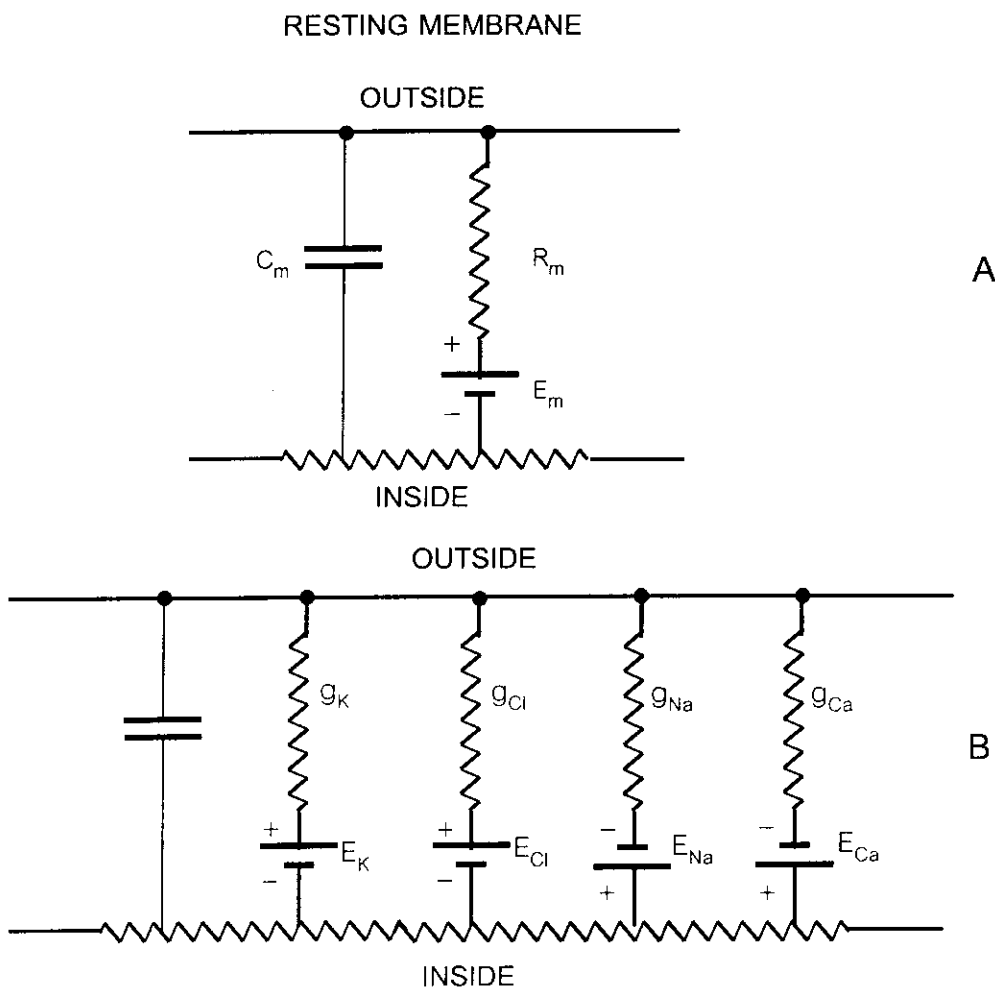
2.2 หลักการและทฤษฎี

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เซลล์เมมเบรน (cell membrane) (ภาพประกอบ 6) จะทำหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ควบคุมความแตกต่างระหว่างส่วนประกอบของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ โดยเซลล์เมมเบรนจะมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (selective permeable membrane) โดยที่องค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นโปรตีน จะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เมมเบรน (Moore *et al.*, 2000) หน้าที่สำคัญของโปรตีนคือทำให้เกิดแชนเนล (channel) ซึ่งชนิดของแชนเนล อาจจะเป็นแบบนอนซีเล็กทีฟ (nonselective) หรือ ซีเล็กทีฟ (selective) ที่พบโดยส่วนใหญ่คือแชนเนลแบบไอออนซีเล็กทีฟ (ion selective) ที่ยอมให้ไอออนบางชนิดผ่านได้ แต่ไม่ยอมให้ไอออนชนิดอื่นผ่าน เมื่อเกิดการเคลื่อนที่เข้า-ออกของไอออนต่างๆ ผ่านเซลล์เมมเบรน จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไอออน (ionic current) หรือ ฟลักซ์ไอออน (ion fluxes)



ภาพประกอบ 6 ฟลูอิด โมเซอิก โมเดล (Fluid mosaic model) ของโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน
(ภาพจาก Moore และคณะ, 2000)

เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายนอกและภายในเซลล์มีความแตกต่างกัน ทำให้ไอออนชนิดต่างๆ เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนในลักษณะเดียวกันกับการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในวงจรไฟฟ้า ซึ่งสามารถเขียนวงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนได้ดังภาพประกอบ 7



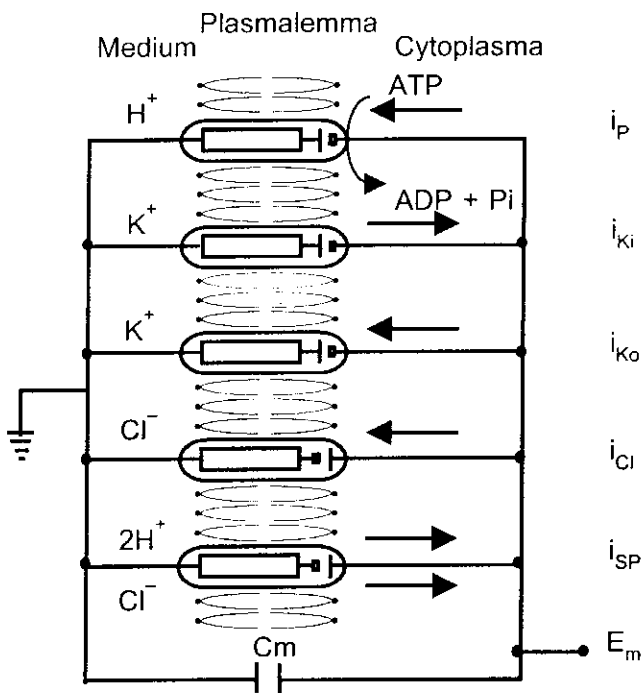
ภาพประกอบ 7 วงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรน A) เมมเบรนที่มีตัวเก็บประจุและตัวต้านทานไฟฟ้าต่อขนานกันอยู่ B) แชนเนลของไอออนต่างๆ ของเมมเบรนที่แทนด้วยตัวเก็บประจุและตัวต้านทานไฟฟ้า (ภาพปรับปรุงจาก Sperelakis, 2001)

ในวงจрдังกล่าวประกอบด้วยค่าความต้านทานของเมมเบรน (R_m) และค่าความจุไฟฟ้าของเมมเบรน (C_m) ต่อขนานกัน ในขณะที่ศักย์เมมเบรน (E_m) ต่ออนุกรมอยู่กับความต้านทานของเมมเบรนดังภาพประกอบ 7A และในเมมเบรนยังประกอบด้วยแชนเนลชนิดต่างๆ เพื่อให้ไอออนเคลื่อนที่ผ่าน ไอออนหลักที่สำคัญคือ K^+ , Cl^- , Na^+ และ Ca^{2+} การต้านการเคลื่อนที่ของไอออนเหล่านี้ประกอบกันเป็นความต้านทานของเมมเบรน และสามารถเขียนแทนด้วย R_K , R_{Cl} , R_{Na} และ R_{Ca} ต่อขนานกันอยู่ (ภาพประกอบ 7B) และเป็นแชนเนลเฉพาะไอออนแต่ละชนิด ค่าความต้าน

ทานของแชนเนลเหล่านี้บางครั้งจะเขียนในรูปของความนำไฟฟ้าของแต่ละไอออน (g_K , g_{Cl} , g_{Na} , g_{Ca}) และศักย์ไฟฟ้าที่ทำให้ไอออนเหล่านี้เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนคือศักย์สมมูลของแต่ละไอออน (E_K , E_{Cl} , E_{Na} , E_{Ca}) ซึ่งสามารถหาค่าได้จากสมการเนิสต์ (Nernst Equation) (Sperelakis, 2001)

$$E_i = \frac{-RT}{zF} \ln \frac{C_i}{C_o}$$

- เมื่อ E_i = ศักย์สมมูล
 R = ค่าคงตัวของแก๊ส = $8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
 T = อุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)
 F = ค่าคงตัวฟาราเดย์ = $96,487 \text{ C mol}^{-1}$
 C_i = ความเข้มข้นของไอออนภายในเซลล์
 C_o = ความเข้มข้นของไอออนภายนอกเซลล์



ภาพประกอบ 8 วงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเซลล์เมมเบรนของ *Egeria densa* (ภาพจาก Buschmann และคณะ, 1996)

ในเซลล์เมมเบรนของพืชแต่ละชนิดอาจมีแชนเนลหลักแตกต่างกันออกไปบ้าง ดังนั้นจึงมีโมเดลของวงจรไฟฟ้าที่แทนเมมเบรนของพืชแตกต่างกันออกไป วงจรที่ใช้เป็นตัวแทนของเมมเบรนของเซลล์พืชในขณะนี้คือวงจรในภาพประกอบ 8 (Bushmann *et al.*, 1996) ซึ่งประกอบด้วยโปรตอนปั๊ม (H^+ -proton pump) แชนเนลขาเข้าและแชนเนลขาออกของ K^+ แชนเนลขาออกของ Cl^- และแชนเนลขาเข้าของ $2H^+-Cl^-$ ซิมพอร์เตอร์ (symporter) ซึ่งจะช่วยให้ Cl^- 1 ไอออนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับ H^+ 2 ไอออน ซึ่งศักย์สมมูลของแชนเนลเหล่านี้จะแทนได้ด้วยแบตเตอรี่ ลูกศรในภาพแสดงการเคลื่อนที่ของไอออน เนื่องจากทิศทางไหลของกระแสไฟฟ้าคือทิศทางไหลของประจุบวก ดังนั้นจากวงจรกระแสไฟฟ้า i_p จากโปรตอนปั๊ม i_{K_o} จากโพแทสเซียมขาออก i_{Cl} ใน i_{sp} จาก $2H^+-Cl^-$ ซิมพอร์เตอร์จึงเป็นกระแสไฟฟ้าที่มีทิศออกจากเซลล์ ในขณะที่ส่วนที่เหลือทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เซลล์ กระแสไฟฟ้าสุทธิที่ไหลเข้าหรือออกจากเซลล์คือผลต่างระหว่างกระแสไฟฟ้าไอออนที่เข้าและออกจากเซลล์

วิธีหนึ่งที่ใช้ในการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนสุทธิภายนอกเซลล์ คือการวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างจุดสองจุดที่กระแสไฟฟ้าไอออนไหลผ่าน (Jaffe and Nuccitelli, 1977) เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านเซลล์จะไหลผ่านสารละลายภายนอกเซลล์ด้วย (ภาพประกอบ 1)

ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้สามารถนำมาคำนวณค่ากระแสไฟฟ้าไอออนได้ โดยพิจารณาจากกฎของโอห์ม (Miller *et al.*, 1986)

$$\bar{J} = \frac{\bar{E}}{\rho}$$

เมื่อ \bar{J} = ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า (A/m^2)
 \bar{E} = สนามไฟฟ้า (V/m)
 ρ = สภาพต้านทานของสารละลาย (Ωm)

กระแสไฟฟ้าไอออน \bar{J} ที่ไหลผ่านสารละลายจะทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า ΔV และหากระยะทางระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสอง Δr มีค่าน้อย สนามไฟฟ้าในระยะ Δr นี้จะมีค่าคงที่

โดย
$$\bar{E} = \frac{-\Delta V}{\Delta r} \hat{e}_E$$

\hat{e}_E เป็นเวกเตอร์หนึ่งหน่วยในทิศทางของสนามไฟฟ้า

เครื่องหมายลบ (-) แสดงว่าสนามไฟฟ้ามีทิศไปในทิศที่ศักย์ไฟฟ้าลดลง

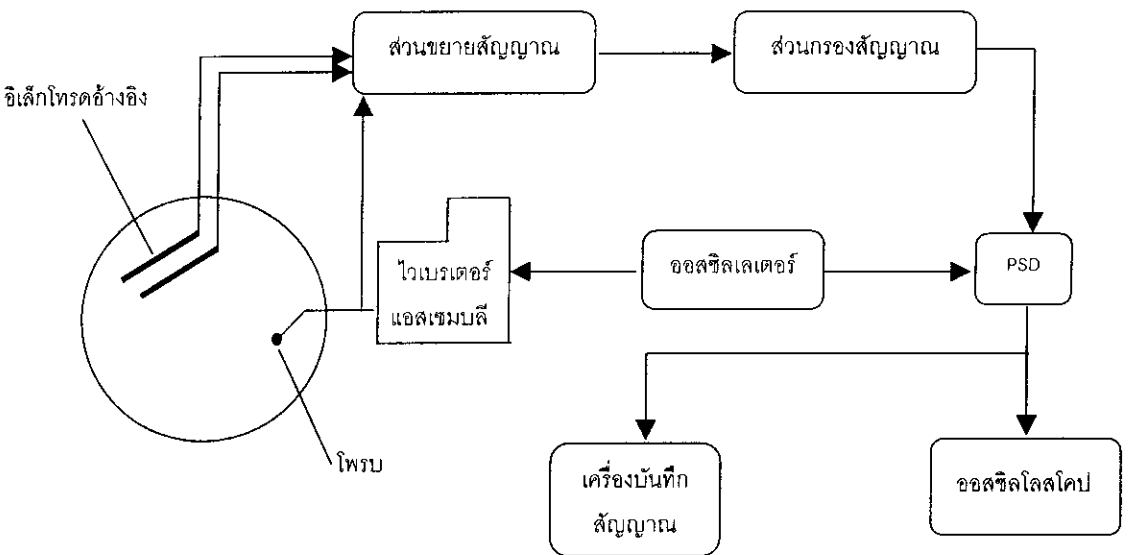
ดังนั้น

$$\bar{J} = \frac{-\Delta V}{\rho \Delta r} \hat{e}_E$$

นั่นคือเมื่อทราบค่าสภาพต้านทาน ρ จะสามารถคำนวณค่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า \bar{J} ได้ จากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า ΔV ที่วัดระหว่างจุดสองจุดที่อยู่ห่างกัน Δr และยิ่ง Δr เล็กลงเท่าใด ค่าความหนาแน่นกระแส \bar{J} ก็จะสามารถได้ใกล้ค่าจริงมากขึ้น แต่ ΔV ที่วัดได้ก็จะลดลงเช่นกัน การวัด ΔV ส่วนใหญ่ จะใช้ซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์อิเล็กโทรด (Ag/AgCl electrode) ที่อยู่ในไมโครปิเปตแก้ว (glass micropipette) อิเล็กโทรดชนิดนี้ส่วนใหญ่มีขีดจำกัดในการตรวจวัด ประมาณ 10 ไมโครโวลต์ (Nuccitelli, 1983) ทำให้ไม่สามารถวัดกระแสไฟฟ้าไอออนปริมาณน้อยๆ ได้ ขีดจำกัดในการตรวจวัดของอิเล็กโทรดถูกกำหนดโดยสัญญาณรบกวน (noise) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความต้านทานของอิเล็กโทรด ถ้าความต้านทานของอิเล็กโทรดลดลงสัญญาณรบกวนจะลดลงด้วย (Jaffe and Nuccitelli, 1974) ในระบบไวเบรติงโพรบจะลดความต้านทานของอิเล็กโทรดได้โดยเพิ่มพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรด ด้วยการชุบอิเล็กโทรดด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ ทำให้เกิดสารประกอบแพลทินัมแบล็ค ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุนที่มีพื้นที่ผิวมาก ทำให้ความต้านทานของอิเล็กโทรดลดลงซึ่งทำให้สัญญาณรบกวนลดลงด้วย เป็นผลให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณที่วัดได้ ต่อสัญญาณรบกวนของอิเล็กโทรด (signal-to-noise ratio) ดีขึ้น (Jaffe and Nuccitelli, 1974) ส่วนการสั้นของอิเล็กโทรดจะทำให้อิเล็กโทรดสามารถวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าปริมาณน้อย (ไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร) ในระยะทางสั้นๆ ได้

2.3 หลักการทำงานของระบบไวเบรติงโพรบ

ระบบไวเบรติงโพรบเป็นระบบที่ใช้วัดกระแสไฟฟ้าปริมาณน้อย (ไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร) ทั้งในระดับเซลล์และออร์แกนซีม ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังภาพประกอบ 9 ในงานวิจัยนี้ศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนรอบรากทานตะวัน โดยใช้ระบบไวเบรติงโพรบแบบ 2 มิติ คืออิเล็กโทรดจะวัดสัญญาณจากกระแสไฟฟ้าในแนวแกน x และในแนวแกน y ได้พร้อมกัน โดยออสซิลเลเตอร์ (oscillator) จะจ่ายสัญญาณรูปซายน์ (sine) ให้กับไวเบรเตอร์แอสเซมบลี (vibrator assembly) ซึ่งทำให้โพรบสั่นกลับไปกลับมาระหว่างการวัดความต่างศักย์ไฟฟ้า สามารถปรับความถี่และระยะทางของการสั่นของโพรบโดยการปรับความถี่ (frequency) และแอมพลิจูด (amplitude) ของออสซิลเลเตอร์ ตามลำดับ เมื่อมีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านสารละลายในตำแหน่งของโพรบ กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างจุดสองจุดของการสั่นของโพรบ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นนี้จะถูกวัดโดยโพรบ



ภาพประกอบ 9 ระบบไวเบรติงโพรบ (จุฬารัตน์, 2544)

ในการวัดจะให้โพรบสั่นกลับไปกลับมาเป็นระยะทางประมาณ 20-25 ไมโครเมตรด้วยความถี่ในช่วง 200-500 เฮิรตซ์และ 500-600 เฮิรตซ์ สำหรับแกน x และแกน y ตามลำดับ เนื่องจากโพรบจะสั่นในลักษณะของสัญญาณรูปซายน์ สัญญาณที่วัดได้ก็จะมีลักษณะเป็นสัญญาณรูปซายน์ซึ่งมีความถี่เท่ากับความถี่ของการสั่น สัญญาณนี้จะถูกขยายสัญญาณก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ PSD (phase sensitive detector) พร้อมกับ สัญญาณอ้างอิงจากออสซิลเลเตอร์ที่ทำให้โพรบสั่น

สัญญาณที่วัดได้นี้จะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ไฟฟ้าในสารละลายและการปรับเฟสของสัญญาณที่ PSD สัญญาณจะมีค่ามากที่สุดเมื่อเฟสของสัญญาณที่ได้จากโพรบถูกปรับให้อยู่ในเฟสเดียวกับสัญญาณอ้างอิงจากออสซิลเลเตอร์เรียกสัญญาณอินเฟส (in phase) นอกจากสัญญาณนี้ระบบ PSD ยังสามารถแสดงสัญญาณที่ต่างเฟสจากสัญญาณจริงๆ ไป 90° ได้ เรียกสัญญาณนี้ว่า ควอดเรเซอร์ (quadrature) สัญญาณควอดเรเซอร์นี้จะใช้ตรวจสอบว่าสัญญาณอินเฟสที่วัดได้เป็นสัญญาณจากกระแสไฟฟ้าไอออนจริงหรือไม่ ทั้งนี้จากหลักการที่ว่าหากมีการปรับเฟสของสัญญาณอินเฟสให้ถูกต้องแล้วควอดเรเซอร์จะมีค่าเป็นศูนย์และไม่มีการเปลี่ยนแปลง นั่นคือมีค่าเป็นศูนย์ตลอดเวลา หากสัญญาณนี้มีการเปลี่ยนแปลงจากศูนย์มากกว่า 10% ของสัญญาณอินเฟส แสดงว่าสัญญาณอินเฟสที่วัดได้ไม่ได้เกิดจากกระแสไฟฟ้าไอออนแต่เกิดจากเหตุอื่น เช่น โพรบชนกับผิวของเซลล์หรือสารแขวนลอยในสารละลาย (ถ้ามี) สัญญาณที่ผ่าน PSD จะถูกเฉลี่ยด้วยค่าคงตัวเวลา 3 วินาที สัญญาณที่วัดได้นี้จะแสดงบนออสซิลโลสโคปและถูกบันทึกบนเครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder)

ในงานวิจัยนี้ใช้ระบบไวเบรติงโพรบวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าในสารละลายที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเข้า-ออกรากทานตะวันในสารละลาย สำหรับการทดลองนี้ใช้สารละลาย APW (artificial pond water) เนื่องจาก APW มีส่วนประกอบที่ไม่ซับซ้อนคือประกอบด้วยไอออนเพียง 4 ชนิดได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียมและคลอไรด์ แต่เพียงพอต่อการงอกของราก (Weisenseel *et al.*, 1979) จึงทำให้ง่ายต่อการศึกษารูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะต่างๆ

2.4 การเตรียมสารละลาย APW (artificial pond water)

2.4.1 การเตรียมสารละลาย APW pH 6.00

สารละลาย APW ที่ใช้เพาะเมล็ดและศึกษารูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนรอบรากทานตะวันในสภาวะปกติ ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1.0 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ และ MES (2-Morpholinoethane sulfuric acid Monohydrate) 1.0 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH ของสารละลายด้วย Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) 10% 5% และ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยหยด Tris ลงในสารละลาย APW จนกระทั่งสารละลาย APW มี pH 6.00 ± 0.05 (Meyer and Wesenseel, 1997) สารละลายนี้มีสภาพนำไฟฟ้า 205 ± 15 (ไมโครโอห์ม-เซนติเมตร)⁻¹ มีสภาพต้านทาน $(4.9 \pm 0.4) \times 10^3$ โอห์ม-เซนติเมตร

2.4.2 การเตรียมสารละลาย APW pH 4.50

เนื่องจากสารประกอบของอลูมิเนียมจะละลายได้ดีที่ pH ต่ำๆ (Kinraide, 1991) และเป็นพิษต่อพืชเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ($\text{pH} < 5.5$) ดังนั้นจึงเลือกศึกษาผลของอลูมิเนียมในสารละลาย APW $\text{pH} 4.50 \pm 0.05$ (Duriex, 1993; Takano and Shimmen, 1999; Kiegle *et al.*, 2000) ที่มีส่วนประกอบของโซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 ในการปรับ pH ใช้ Mes 1.0 มิลลิโมลาร์และ Tris 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยหดยดสารละลายทั้งสองในขณะวัด pH จนกระทั่งได้สารละลาย APW $\text{pH} 4.50 \pm 0.05$ มีสภาพนำไฟฟ้า 216 ± 12 (ไมโครโอห์ม-เซนติเมตร)¹ มีสภาพต้านทาน $(4.6 \pm 0.4) \times 10^3$ โอห์ม-เซนติเมตร

2.4.3 การเตรียมสารละลาย APW เพื่อศึกษาผลของสารพิษ

ในการศึกษาผลของสารพิษ เลือกศึกษาผลของอลูมิเนียม แคดเมียมและอาร์ซีนิก ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันว่ามีผลกับรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนและอัตรายีดของรากอย่างไร ในการเตรียมสารละลาย APW เพื่อศึกษาผลของสารพิษดังกล่าว มีส่วนประกอบทางเคมีและระดับ pH ดังตาราง 1

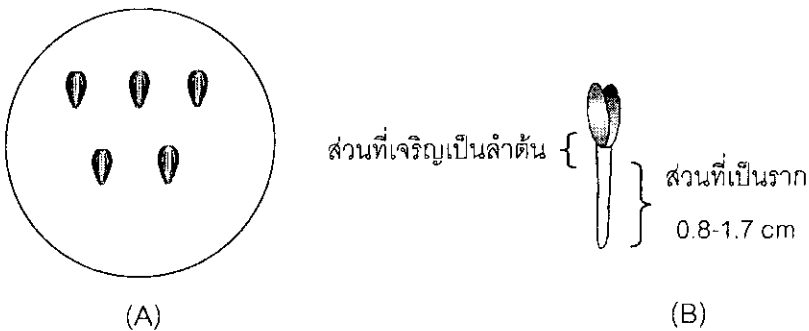
ตาราง 1 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเตรียมสารละลาย APW ที่มีสารพิษชนิดต่างๆ เพื่อศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะปกติและผลของสารพิษที่มีต่อรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออน

สารละลายที่ใช้ในการศึกษา กระแสไฟฟ้าไอออน	ความเข้มข้นของสารเคมี (มิลลิโมลาร์)							ค่า pH
	NaCl	KCl	CaCl ₂	MES	AlCl ₃	CdCl ₂	As ₂ O ₃	
APW	1.0	0.1	0.1	1.0	-	-	-	4.50*
APW + อลูมิเนียม 100 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.1	1.0	0.1	-	-	4.50
APW + อลูมิเนียม 10 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.1	1.0	0.01	-	-	4.50
APW + อลูมิเนียม 1 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.1	1.0	0.001	-	-	4.50
APW + อลูมิเนียม 10 ไมโครโมลาร์ ที่มีแคลเซียม 0.2 มิลลิโมลาร์	1.0	0.1	0.1 + 0.1	1.0	0.01	-	-	4.50
APW + แคดเมียม 100 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.1	1.0	-	0.1	-	4.50*
APW + แคดเมียม 1 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.1	1.0	-	0.001	-	6.00
APW + อาร์ซีนิก 10 ไมโครโมลาร์	1.0	0.1	0.2	1.0	-	-	0.01	6.00

หมายเหตุ * สารละลาย APW และสารละลายแคดเมียม 100 ไมโครโมลาร์เตรียมทั้ง pH 4.50 และ pH 6.00

2.5 การเพาะเมล็ดทานตะวัน

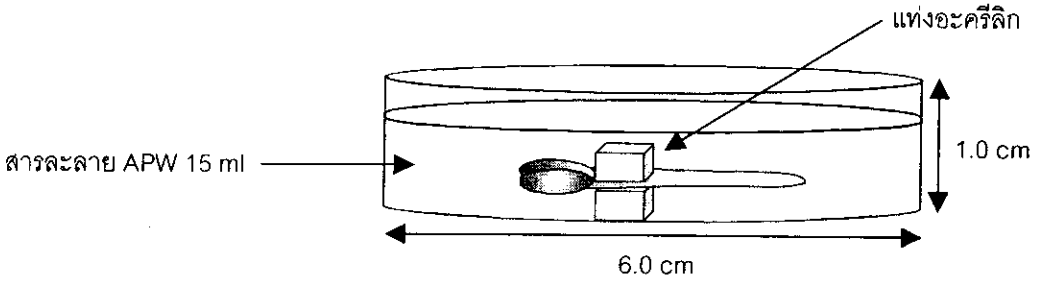
จากการทดลองเพาะเมล็ดทานตะวันสายพันธุ์แปซิฟิก 33 ในห้องปฏิบัติการพบว่า เมล็ดทานตะวันสายพันธุ์แปซิฟิก 33 มีเปอร์เซ็นต์การงอก 70% รากที่ได้มีลักษณะตรงและแข็งแรง จึงได้ใช้สายพันธุ์นี้ในการทดลอง โดยนำเมล็ดทานตะวัน จำนวน 10 เมล็ด มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง นำเมล็ดไปวางบนกระดาษทิชชูที่ชุ่มด้วยสารละลาย APW pH 6.00 ในจานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.0 เซนติเมตร ในแต่ละจานวางเมล็ดเพื่อให้รากงอกในแนวเดียวกันจำนวน 5 เมล็ดต่อจาน (ภาพประกอบ 10) จากนั้นจึงปิดทับด้วยกระดาษทิชชู แล้วหยดสารละลาย APW pH 6.00 จนกระดาษทิชชูชุ่ม ปิดฝาจานเพาะเชื้อ ยึดด้วยเทปกาวแล้วเก็บในตู้มืด ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส โดยวางจานเพาะเชื้อในแนวตั้งเพื่อให้รากงอกตามแรงโน้มถ่วงของโลก เป็นเวลา 40 ± 2 ชั่วโมง จะได้รากที่ตรงมีความยาวประมาณ 0.8-1.7 เซนติเมตร จำนวน 6-8 ราก



ภาพประกอบ 10 (A) การวางเมล็ดเพื่อให้รากงอกในแนวตั้ง
(B) ความยาวรากทานตะวันที่ต้องการ

2.6 การเตรียมรากทานตะวันสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

นำกล้าทานตะวันที่มีรากตรง ยาว 1.1-1.7 เซนติเมตร มาแกะเปลือกออกและใช้กระดาษทิชชูชุ่มน้ำเช็ดทำความสะอาด ตีรกรากทานตะวันระหว่างแท่งอะคริลิก (ภาพประกอบ 11) ใช้ซิลิโคนกรีดเป็นตัวยึดเพื่อให้รากอยู่ในตำแหน่งที่ต้องการในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 เซนติเมตร สูง 1.0 เซนติเมตร เติมสารละลาย APW สภาวะต่างๆ ที่ต้องการศึกษา 15 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 30 นาที ในกรณีศึกษารูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนรอบๆ รากทานตะวันในสภาวะปกติ และ 60 นาทีในกรณีศึกษาผลของสารพิษ เพื่อให้รากปรับสภาพก่อนวัดกระแสไฟฟ้าไอออน



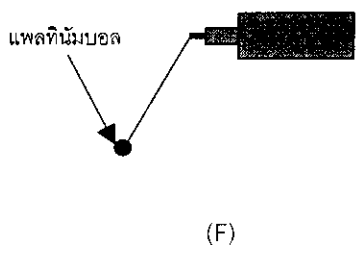
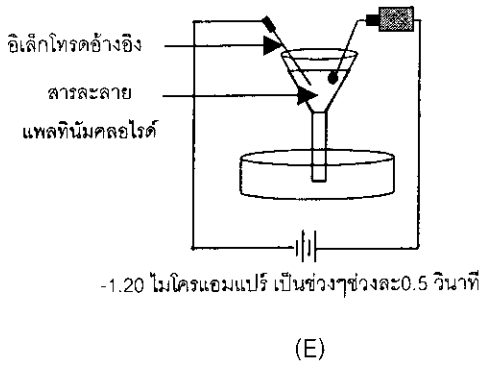
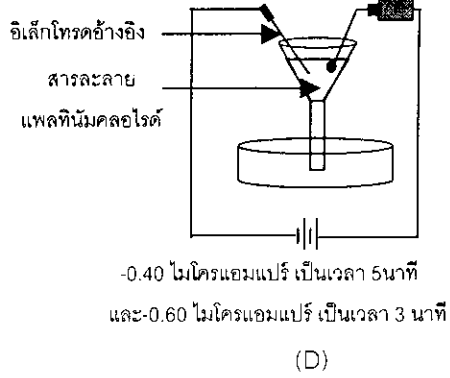
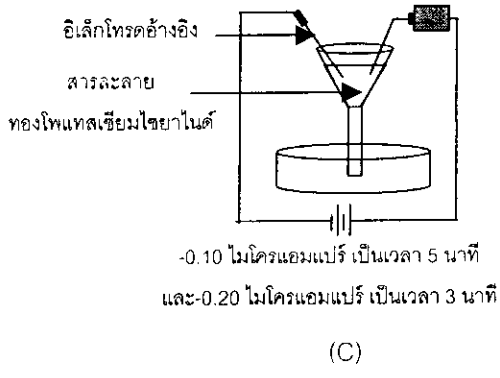
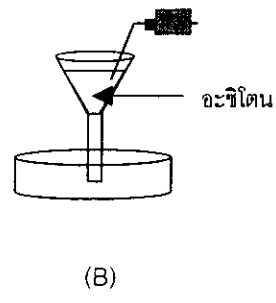
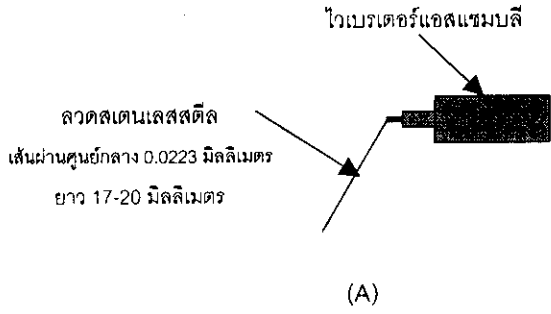
ภาพประกอบ 11 รากทานตะวันที่ตั้งสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

2.7 การเตรียมโพรบสำหรับวัดกระแสไฟฟ้า

โพรบทำจากสแตนเลสตีล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.0223 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 17-20 มิลลิเมตร เคลือบด้วยฉนวนตลอดทั้งเส้น (parlyene-coated stainless-steel electrode) ยกเว้นส่วนปลายที่ไม่มีฉนวนเคลือบยาว 5 ไมโครเมตร ปลายโพรบส่วนนี้คือส่วนที่ซุบเพื่อใช้ในการวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าโดยซุบโพรบสองชั้น ชั้นแรกซุบด้วยทองและชั้นถัดไปซุบด้วยแพลทินัมแบล็ค ในการซุบครั้งแรกใช้ทองโพแทสเซียมไซยาไนด์ เริ่มโดยต่อโพรบเข้ากับไวเบรเตอร์แอสซิมบลี (ภาพประกอบ 12A) ทำความสะอาดปลายโพรบด้วยการแช่ในอะซิโตนเป็นเวลา 5 นาที (ภาพประกอบ 12B) ซุบโพรบด้วยสารละลายทองโพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้กระแสไฟฟ้า -0.10 ไมโครแอมแปร์ เป็นเวลา 5 นาทีแล้วเพิ่มกระแสเป็น -0.20 ไมโครแอมแปร์ เป็นเวลา 3 นาที (ภาพประกอบ 12C) ในขั้นตอนนี้จะทำให้ปลายโพรบมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร ซุบครั้งที่สองด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ โดยสารละลายประกอบด้วย เลดอะซิเตต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแพลทินัมคลอไรด์ 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้กระแสไฟฟ้า -0.40 ไมโครแอมแปร์เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น -0.60 ไมโครแอมแปร์ เป็นเวลา 3 นาที (ภาพประกอบ 12D) ทำให้ได้ทรงกลมปลายโพรบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโตขึ้นเป็น 20 ไมโครเมตร ขั้นตอนสุดท้ายให้กระแสไฟฟ้าเป็นช่วงๆ ช่วงละ 0.5 วินาที ด้วยขนาดกระแสไฟฟ้า -1.20 ไมโครแอมแปร์ ประมาณ 8 ครั้ง (ภาพประกอบ 12E) จะได้ทรงกลมปลายโพรบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 12F)

หลังจากนั้นทดสอบค่าความจุของโพรบด้วยชุดตรวจจอบในระบบไวเบรติงโพรบ โดยค่าความจุต้องไม่น้อยกว่า 2 นาโนฟารัด โพรบจึงจะสามารถใช้ได้ เนื่องจากความจุของโพรบแปรผันตรงกับ

พื้นที่ผิว คือถ้าพื้นที่ผิวมาก ค่าความจุก็จะมากด้วย ทำให้ความต้านทานของอิเล็กโทรดลดลงซึ่งทำให้สัญญาณรบกวนลดลง เป็นผลให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณที่วัดได้ต่อสัญญาณรบกวนของอิเล็กโทรด (signal-to-noise ratio) ดีขึ้น (Jaffe and Nuccitelli, 1974)

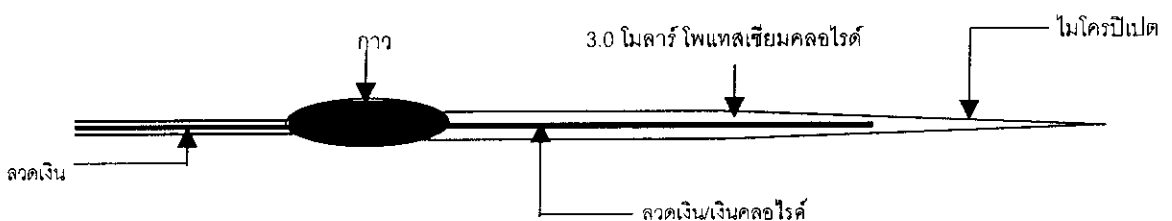


ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการชุบโพรบสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน (A) ลักษณะของโพรบมองจากด้านข้างก่อนผ่านขั้นตอนการชุบ (B) ทำความสะอาดโพรบด้วยอะซิโตน (C) ชุบในสารละลายทองโพแทสเซียมไฮยาไนด์ (D) และ (E) ชุบด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ (F) ลักษณะของโพรบเมื่อผ่านการชุบแล้ว (จุฬารัตน์, 2544)

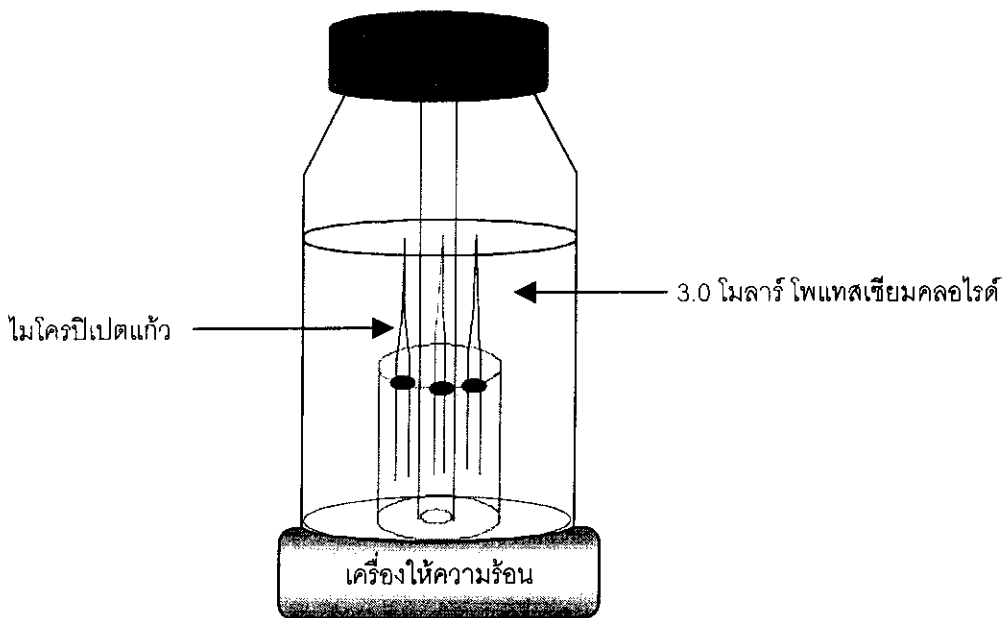
2.8 การเตรียมไมโครอิเล็กทรอนิกส์เปรียบเทียบ

ก่อนการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนด้วยโวลต์เมตริกโพรบ ต้องปรับเทียบโพรบ (calibrate) สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าก่อนวัดตัวอย่างจริงทุกครั้ง โดยจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ทราบค่าผ่านไมโครอิเล็กทรอนิกส์ จากนั้นโพรบจะวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่จ่ายให้ ดังนั้นจึงต้องเตรียมไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (ภาพประกอบ 13) เพื่อจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ทราบค่าในการปรับเทียบสัญญาณ

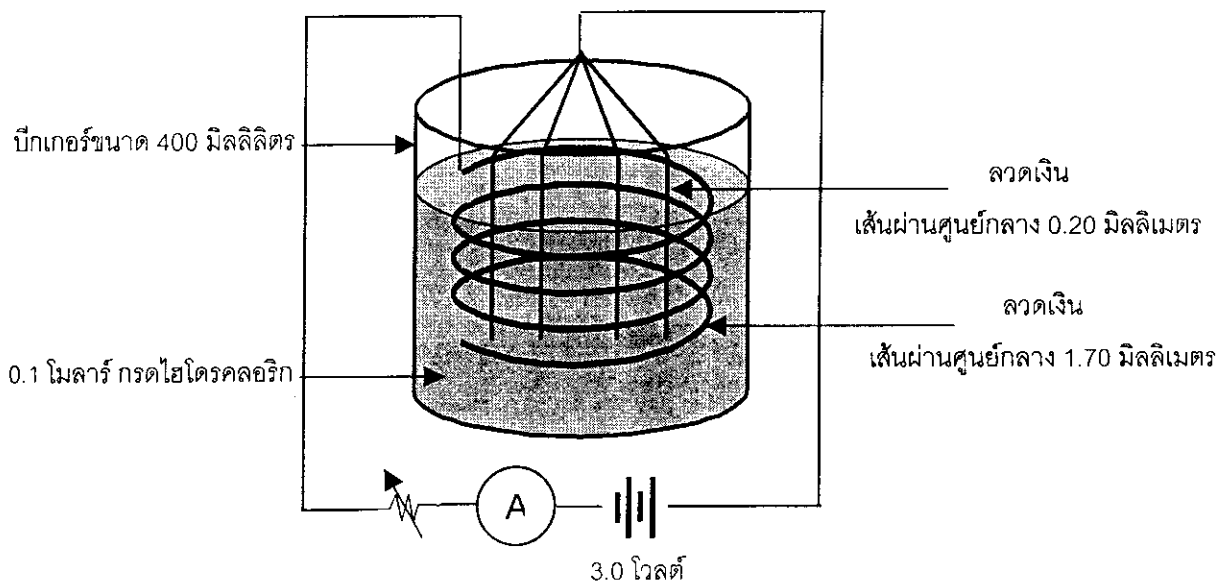
การเตรียมไมโครอิเล็กทรอนิกส์เปรียบเทียบ อาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เตรียมไมโครปิเปตแก้ว โดยนำไมโครปิเปตแก้ว มาต้มในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ จนเดือดเพื่อไล่อากาศออก (ภาพประกอบ 14) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้สารละลายเข้าไปแทนที่อากาศในไมโครปิเปตแก้ว แล้วแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 2 เตรียมหลอดอิเล็กทรอนิกส์ โดยนำหลอดเงินที่มีเทฟลอนหุ้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.30 ± 0.05 มิลลิเมตร ความยาว 10.00 เซนติเมตร ปอกเทฟลอนที่ปลายทั้งสองข้างออก ด้านหนึ่งปอกเทฟลอนออก 1.00 เซนติเมตร เสริมแล้วบัดกรีต่อกับขั้วไฟฟ้า อีกด้านหนึ่งปอกเทฟลอนออก 3.00 เซนติเมตรแล้วขัดด้วยกระดาษทรายเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางจะลดลงเหลือ 0.20 ± 0.05 เซนติเมตร แล้วทำความสะอาดด้วยอะซิโตน จากนั้นชุบปลายหลอดด้านดังกล่าวด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ โดยให้กระแสไฟฟ้าขนาด 1.0 มิลลิแอมป์ต่อเส้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจะเกิดขึ้นของเงินคลอไรด์ (AgCl) เคลือบอยู่บนหลอด โดยชุบครั้งละ 4 เส้น (ภาพประกอบ 15) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วชุบใหม่อีกครั้ง หลังจากนั้นนำหลอดมาแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพ ขั้นตอนที่ 3 ประกอบไมโครอิเล็กทรอนิกส์เปรียบเทียบ โดยค่อยๆ นำหลอดเงินคลอไรด์ที่เตรียมในขั้นตอนที่ 2 สอดเข้าไปในไมโครปิเปตแก้วที่เตรียมในขั้นตอนที่ 1 โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วยึดหลอดและไมโครปิเปตแก้วไว้ด้วยกันด้วยกาวซิลิโคน จากนั้นนำมาเก็บในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์



ภาพประกอบ 13 ไมโครอิเล็กทรอนิกส์เปรียบเทียบ



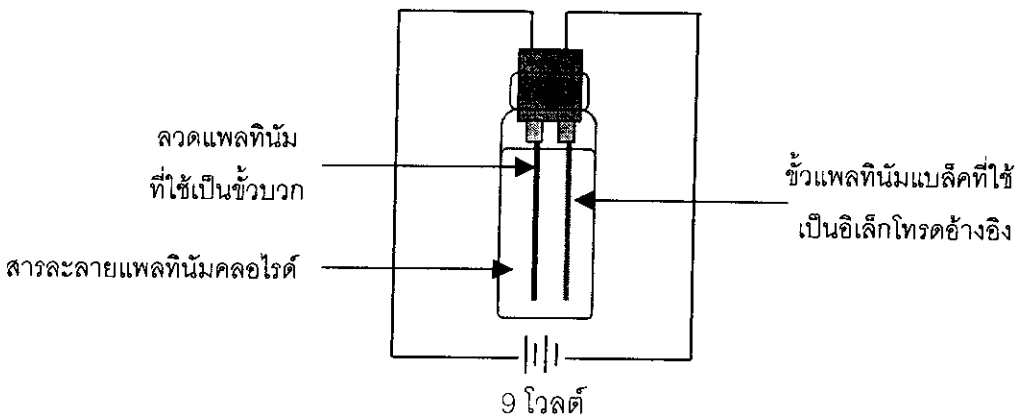
ภาพประกอบ 14 การต้มไมโครปีเปตแก้วในสารละลาย 3.0 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์



ภาพประกอบ 15 การจัดอุปกรณ์สำหรับหุงไมโครอิเล็กทรอนิกส์

2.9 การเตรียมอิเล็กโทรดอ้างอิง

นำลวดแพลทินัมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 ± 0.05 มิลลิเมตร ยาว 4.0 ± 0.1 เซนติเมตร จำนวน 3 เส้น มาทำความสะอาดด้วยอะซิโตน โดยใช้ลวดแพลทินัมเส้นหนึ่งเป็นขั้วบวก และใช้ลวดอีกเส้นหนึ่งเป็นขั้วลบ โดยชุบลวดแพลทินัมที่ละเส้นด้วยสารละลายแพลทินัมแบล็คเป็นเวลา 10 วินาที ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 9 โวลต์ (ภาพประกอบ 16) จนได้ลวดแพลทินัมแบล็คจำนวน 2 เส้น ใช้เป็นอิเล็กโทรดอ้างอิง

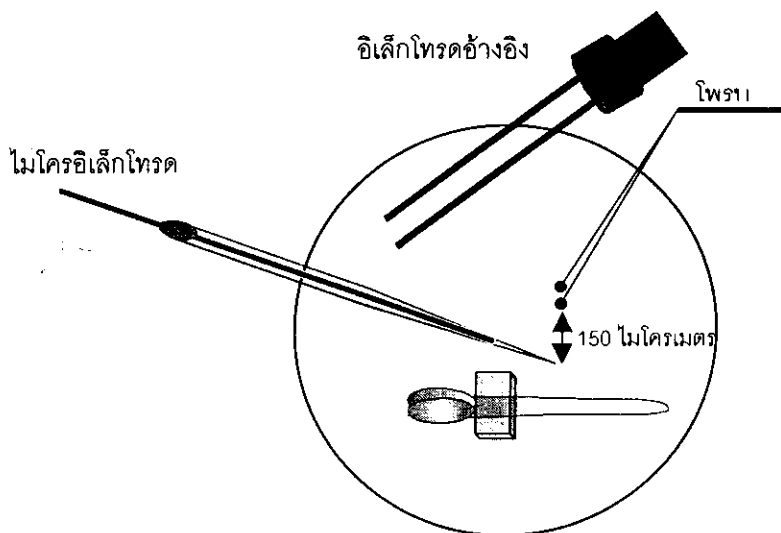


ภาพประกอบ 16 การจัดอุปกรณ์เพื่อชุบอิเล็กโทรดอ้างอิง

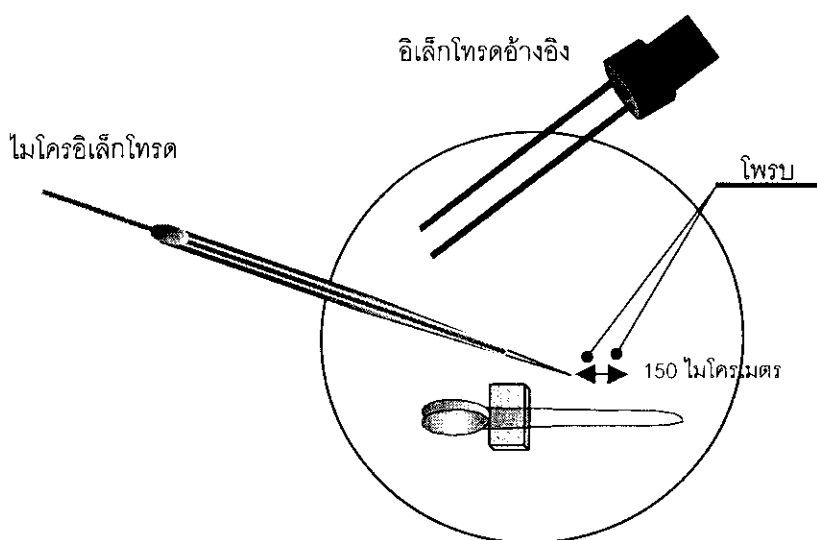
2.10 การปรับเทียบโพรบ

ในการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนรอบรากทานตะวันจะใช้ระบบไวเบรติงโพรบแบบ 2 มิติ คือ วัดกระแสไฟฟ้าในแนวแกน x และแนวแกน y พร้อมกัน (โพรบสั้นทั้งในแนวแกน x และแกน y พร้อมๆ กัน) ดังนั้นจึงต้องปรับเทียบโพรบทั้งสองแนวแกน เริ่มจากปรับเทียบโพรบในแนวแกน y โดยจัดให้ปลายของไมโครอิเล็กโทรดอยู่ระดับเดียวกับโพรบ ห่างจากโพรบ 150 ไมโครเมตรในแนวแกน y (ดูภาพประกอบ 17) จากนั้นให้กระแสไฟฟ้า +30 นาโนแอมแปร์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงให้กระแสไฟฟ้า -30 นาโนแอมแปร์เป็นเวลา 30 วินาที สำหรับการปรับเทียบในแนวแกน x จะมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการปรับเทียบในแนวแกน y (ดูภาพประกอบ 18) การให้กระแสไฟฟ้าบวกและลบก็เพื่อให้มีสัญญาณปรับเทียบที่ตรงกระแสไฟฟ้าที่แตกต่างกัน โพรบจะวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากกระแสไฟฟ้าที่ให้ดังกล่าว และบันทึกไว้ที่เครื่องบันทึกสัญญาณ ขนาดของความต่าง

ศักย์ไฟฟ้าใช้สำหรับเทียบขนาดของกระแสไฟฟ้า ส่วนค่าบวกและลบใช้เทียบทิศกระแสไฟฟ้า (ดูภาพประกอบ 19)



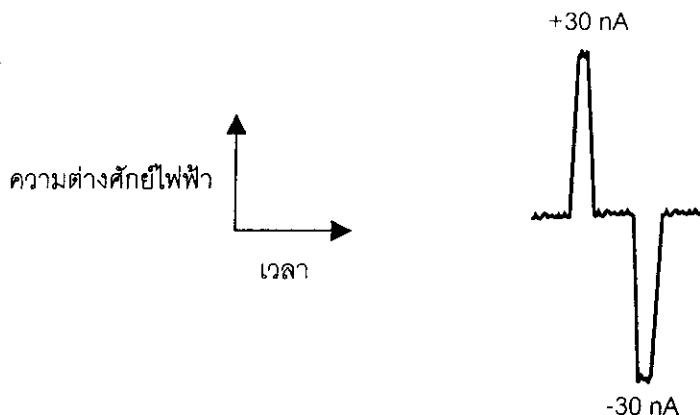
ภาพประกอบ 17 การปรับเทียบโพรบในแนวแกน y โพรบจะสั้นทั้งในแนวแกน x และแนวแกน y แต่รูปนี้แสดงเฉพาะในแนวแกน y



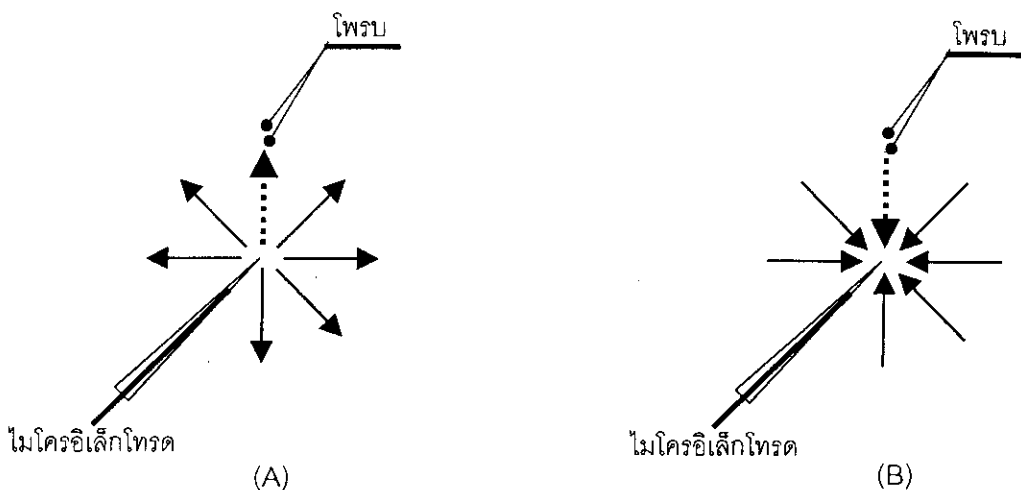
ภาพประกอบ 18 การปรับเทียบโพรบในแนวแกน x โพรบจะสั้นทั้งในแนวแกน x และแนวแกน y แต่รูปนี้แสดงเฉพาะในแนวแกน x

เมื่อวัดกระแสไฟฟ้าตามความยาวของรากทานตะวัน ค่าที่วัดได้คือความต่างศักย์ไฟฟ้า สามารถเปลี่ยนค่าเป็นกระแสไฟฟ้าได้โดยเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้กับสัญญาณเปรียบเทียบใน

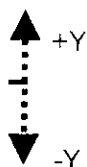
แนวแกน x และแนวแกน y ที่บันทึกไว้ สำหรับทิศของกระแสไฟฟ้าไอออนพิจารณาจากค่าบวกหรือลบของความต่างศักย์ประกอบกับทิศกระแสไฟฟ้าตามภาพประกอบ 20 และภาพประกอบ 21 ตามลำดับ



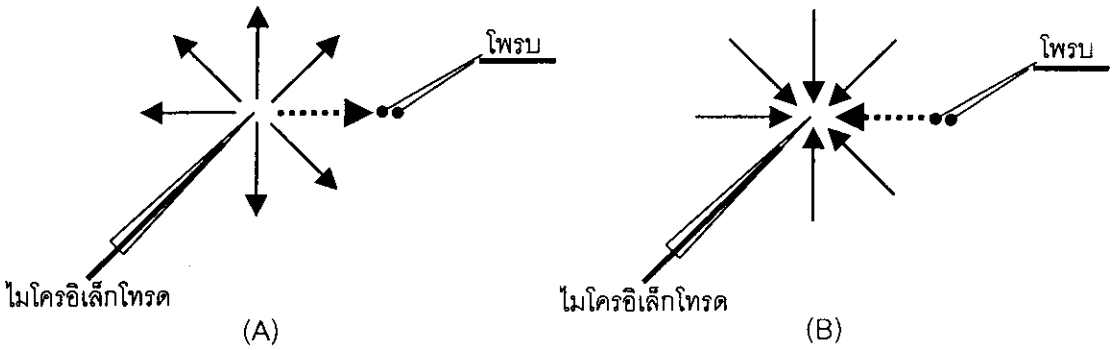
ภาพประกอบ 19 ขนาดของความต่างศักย์ไฟฟ้าเนื่องกระแสไฟฟ้า +30 นาโนแอมแปร์และ -30 นาโนแอมแปร์



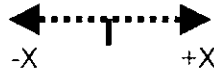
หมายเหตุ พิจารณาตามลูกศรเส้นประ



ภาพประกอบ 20 ทิศของกระแสไฟฟ้าเมื่อปรับเทียบในแกน y (A) ไมโครอิเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าทิศ +y +30 นาโนแอมแปร์ (ออกจากไมโครปิเปต) กระแสไฟฟ้าผ่านไพเพตจากด้านล่างขึ้นด้านบน (B) ไมโครอิเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าทิศ -y -30 นาโนแอมแปร์ (เข้าสู่ไมโครปิเปต) กระแสไฟฟ้าผ่านไพเพตจากด้านบนลงด้านล่าง



หมายเหตุ พิจารณาตามลูกศรเส้นประ

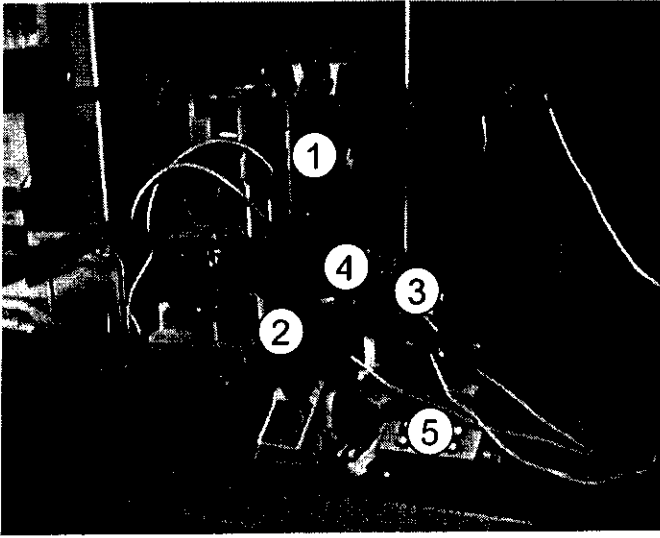


ภาพประกอบ 21 ทิศของกระแสไฟฟ้าเมื่อปรับเทียบในแกน x (A) ไมโครอิเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าทิศ $+x + 30$ นาโนแอมแปร์ (ออกจากไมโครปิเปต) กระแสไฟฟ้าผ่านโพรบจากซ้ายไปขวา (B) ไมโครอิเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าทิศ $-x - 30$ นาโนแอมแปร์ (เข้าสู่ไมโครปิเปต) กระแสไฟฟ้าผ่านโพรบจากขวาไปซ้าย

2.11 การวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

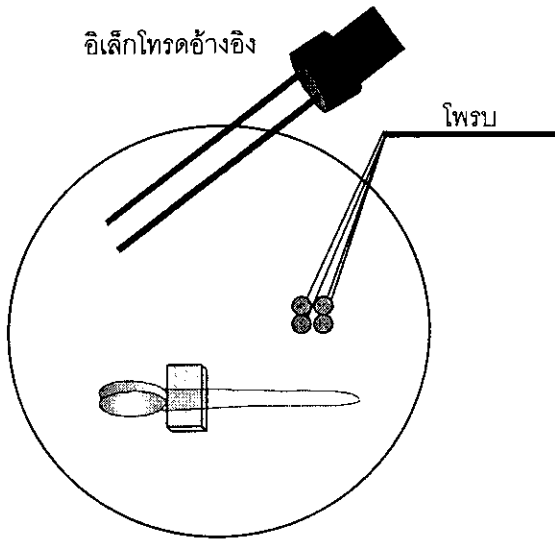
ในการวัดกระแสไฟฟ้าไอออน เริ่มโดยวางจานเพาะเชื้อที่มีรากทานตะวันบนฐานของกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (ภาพประกอบ 22) แล้วจุ่มอิเล็กโทรดอ้างอิงลงในสารละลาย จากนั้นเลื่อนโพรบให้อยู่ในระนาบเดียวกับราก โดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ นำอิเล็กโทรดปรับเทียบวางในระดับเดียวกับโพรบแล้วปรับเทียบสัญญาณทั้งด้านแกน x และแกน y โดยวางไมโครอิเล็กโทรดให้ห่างจากโพรบเป็นระยะ 150 ไมโครเมตร ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เสร็จแล้วนำไมโครอิเล็กโทรดออกจากจานเพาะเชื้อ ดังนั้นยังคงเหลือเฉพาะอิเล็กโทรดอ้างอิง โพรบและรากทานตะวันในจานเพาะเชื้อ ดังแสดงในภาพประกอบ 23

เนื่องจากรากทานตะวันมีขนาดใหญ่จึงต้องใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ซึ่งใช้สำหรับมองภาพบริเวณกว้าง เพื่อดูตำแหน่งและลักษณะของราก และใช้สเกลของเลนส์ใกล้ตาของกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กำหนดตำแหน่งที่จะวัดกระแสไฟฟ้าไอออน โพรบซึ่งต่ออยู่กับชุดไวเบรเตอร์ ที่ยึดไว้กับอุปกรณ์จับยึดอิเล็กโทรด (3D micromanipulator) จะถูกเลื่อนให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการโดยการปรับอุปกรณ์จับยึดอิเล็กโทรดด้วยมือ



- ① → กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- ② → กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท
- ③ → อุปกรณ์จับยึดอิเล็กโทรด
- ④ → โพรบสำหรับวัด
- ⑤ → สวิตช์ปรับความถี่และแอมพลิจูด

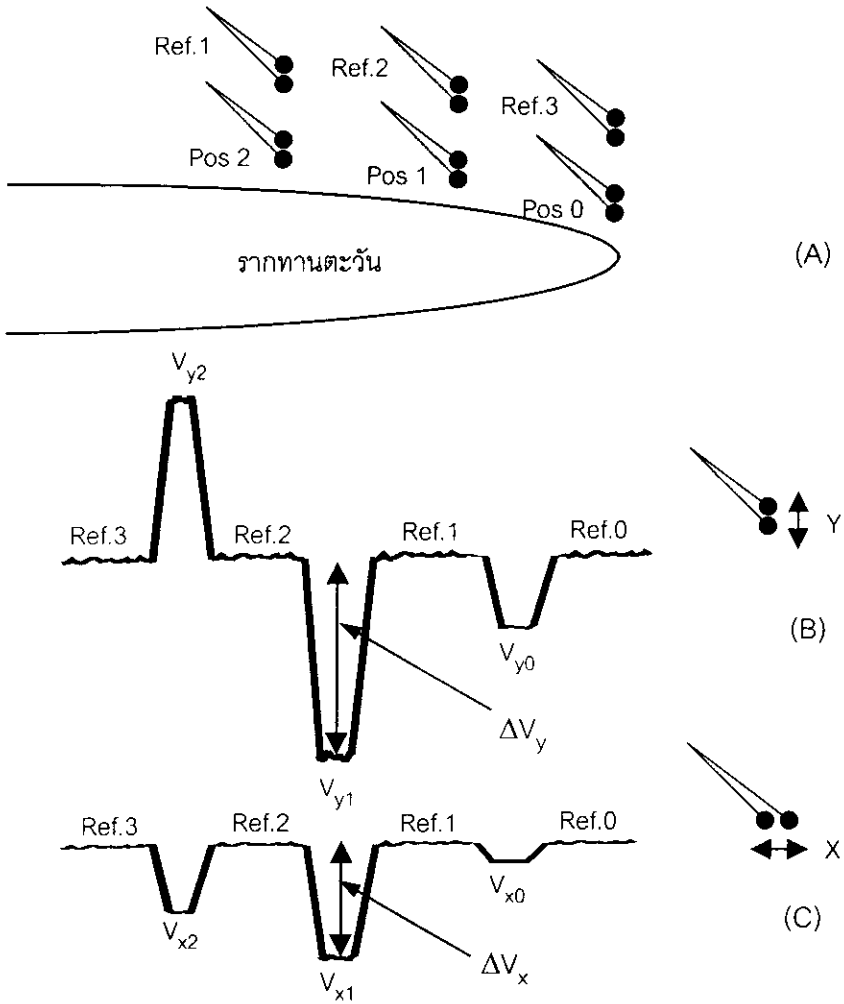
ภาพประกอบ 22 ภาพรวมของชุดอุปกรณ์ระบบไวเบรติงโพรบ



ภาพประกอบ 23 โพรบที่สั้นทั้งแกน x และแกน y อิเล็กโทรดอ้างอิงและรากทานตะวันในสารละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

วัดกระแสไฟฟ้าไอออนตำแหน่งแรกที่ปลายราก และวัดกระแสไฟฟ้าไอออนทุกๆ 500 ไมโครเมตร ตลอดความยาวรากทั้งหมด 22 ตำแหน่ง ในการวัดแต่ละตำแหน่ง เริ่มจากเลื่อนโพรบห่างออกจากผิวรากประมาณ 2,000 ไมโครเมตรเพื่อใช้เป็นจุดอ้างอิง (เป็นตำแหน่งที่คาดว่ากระแสไฟฟ้าไอออนเป็นศูนย์) หลังจากนั้นจึงเลื่อนโพรบเข้าหาผิวรากตำแหน่งที่ต้องการวัดกระแสไฟฟ้า โดยห่างจากผิวราก 150 ไมโครเมตร ถ้ามีกระแสไฟฟ้าไอออนบริเวณดังกล่าวจะทำให้มีการ

เปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่แสดงในภาพประกอบ 24 จากการวัดแต่ละตำแหน่ง จะได้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าในแนวแกน x (แกนที่ขนานกับความยาวราก) และแนวแกน y (แกนที่ตั้งฉากกับความยาวราก) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาขนาดและทิศทางของกระแสไฟฟ้าไอออน โดยเปรียบเทียบกับสัญญาณเปรียบเทียบ และนำค่าที่ได้จากทั้งสองแนวแกนมารวมกันแบบเวกเตอร์จะได้กระแสไฟฟ้ารวมของแต่ละตำแหน่ง



ภาพประกอบ 24 วิธีการวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าด้วยระบบไมโครดิงโทรบ ขณะวัดไมโครดิงโทรบ ล้วนทั้งในแนวแกน y และแกน x เลื่อนอิเล็กโทรดระหว่างตำแหน่งที่ไม่มีกระแสไฟฟ้า (Ref.) กับตำแหน่งใกล้ราก 0 หรือ 1 หรือ 2 ซึ่งมีระยะห่างจากปลายราก 0, 250 และ 500 μm ตามลำดับ (A) แสดง ΔV ($\Delta V_y = V_y - \text{Ref.}y$ และ $\Delta V_x = V_x - \text{Ref.}x$) ที่วัดได้ซึ่งเกิดจากกระแสไฟฟ้าไอออนที่วัดได้ในแกน y (B) และแกน x (C)

2.12 การคำนวณผล

เนื่องจากค่าที่วัดได้จากระบบไวเบรติงโพรบคือความต่างศักย์ไฟฟ้า จึงต้องแปลงค่าดังกล่าวเป็นค่ากระแสไฟฟ้าไอออน (ความหนาแน่นกระแส) ที่ตำแหน่งนั้นๆ โดยใช้วิธีการเทียบค่าความต่างศักย์ที่วัดได้กับความต่างศักย์ที่ใช้เป็นสัญญาณปรับเทียบ โดยให้ V_{xx} และ V_{yy} เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการปรับเทียบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าขนาด 30 นาโนแอมแปร์ ซึ่งวัดที่ตำแหน่ง $r = 150$ ไมโครเมตร จากแหล่งจ่ายสัญญาณ ซึ่งคิดเป็นขนาดความหนาแน่นกระแส J ได้จากสมการ

$$J = \frac{I}{4\pi r^2}$$

โดย J = ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการปรับเทียบ
 r = ระยะห่างระหว่างไมโครอิเล็กทรอนิกส์และไวเบรติงโพรบ
 I = กระแสไฟฟ้าที่ให้ขณะปรับเทียบ

ดังนั้น

$$J = \frac{30 \text{ nA}}{4\pi(150 \mu\text{m})^2} = 10.6 \mu\text{A/cm}^2$$

ให้ V_{x1} และ V_{y1} เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้าในแนวแกน x และแนวแกน y ที่วัดได้ที่ตำแหน่งใดๆ ดังนั้นสามารถคำนวณค่าความหนาแน่นกระแสได้จาก

$$J_x = \frac{V_{x1}}{V_{xx}} \times 10.6 \mu\text{A/cm}^2$$

และในทำนองเดียวกัน

$$J_y = \frac{V_{y1}}{V_{yy}} \times 10.6 \mu\text{A/cm}^2$$

(J_x และ J_y แทน ขนาดของความหนาแน่นกระแสในแนวแกน x และแนวแกน y ตามลำดับ)

อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าในขณะปรับเทียบโพรบในแนวแกน y ซึ่งควรจะมีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านในแนวแกน y เท่านั้น กลับพบว่ามีความต่างศักย์ไฟฟ้าจากช่องสัญญาณแกน x เกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการสั้นของโพรบในแนวแกน x มีแนวเอียงเล็กน้อย (นั่นคือสั้นในแนว ↗) ดังนั้นจึงต้องนำค่าศักย์ไฟฟ้าจากช่องสัญญาณ x มาร่วมพิจารณาด้วย โดยให้ V'_x เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากช่องสัญญาณ x ขณะปรับเทียบโพรบโดยผ่านกระแสไฟฟ้าในแนวแกน y ซึ่งค่านี้จะเป็นสัดส่วนกับสัญญาณปรับเทียบในช่องสัญญาณ y หรือ V_{yy} ในการวัดจริงค่า V_{x1} ที่ได้

จากช่องสัญญาณ x จะมีส่วนหนึ่งที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าในแนวแกน y ซึ่งต้องหักลบออกไป และสามารถหาค่าสัญญาณที่เพิ่มเข้ามาได้จาก

$$V_{x1}'' = V_{y1} \left(\frac{V_x'}{V_{yy}} \right)$$

ดังนั้นค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ถูกตัดของแกน x คือ

$$V_{x2} = V_{x1} - V_{x1}''$$

หรือ

$$V_{x2} = V_{x1} - \frac{V_{y1} V_x'}{V_{yy}}$$

ส่วนทิศของกระแสไฟฟ้านั้นพิจารณาจากค่าบวกหรือลบของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายให้ขณะปรับเทียบโพรบ โดยให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่าบวกกับกระแสไฟฟ้าที่มีทิศในแนว $+x$ หรือ $+y$ และให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่าลบกับกระแสไฟฟ้าที่มีทิศ $-x$ และ $-y$ ดังนั้นเมื่อวัดได้ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นบวกจึงหมายถึงกระแสไฟฟ้ามีทิศในแนว $+x$ หรือ $+y$ และในทางตรงกันข้ามถ้าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้มีค่าเป็นลบหมายถึงกระแสไฟฟ้ามีทิศในแนว $-x$ หรือ $-y$

ตัวอย่างการคำนวณ J_x และ J_y

ให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการปรับเทียบ

$$V_{xx} = 1.60 \text{ V}$$

$$V_{yy} = 1.35 \text{ V}$$

$$V_{x1}' = 0.25 \text{ V}$$

และสมมติว่าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้คือ

$$V_{x1} = -0.53 \text{ V}$$

$$V_{y1} = -0.60 \text{ V}$$

เมื่อพิจารณาแกน y

ความต่างศักย์ไฟฟ้า (V_{yy}) 1.35 V มีความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า $10.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$

\therefore ความต่างศักย์ไฟฟ้า (V_{y1}) -0.60 V มีความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า

$$\frac{10.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2}{1.35\text{V}} \times (-0.60\text{V})$$

ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า (J_y) ที่ได้คือ $-4.71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ นั่นคือมีขนาด $4.71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ในทิศ $-y$

เมื่อพิจารณาแกน x

เนื่องจากสัญญาณในแนวแกน x ตอนปรับเทียบโพรบถูกรบกวนจากการสั้นในแนวแกน y ด้วยขนาด $V_x' = 0.70$ โวลต์

ดังนั้นในการคำนวณจะต้องหักลบสัญญาณรบกวนนี้ออกก่อนนำไปคำนวณความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า ดังนี้

ให้ V_{x1}'' = ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากการรบกวน

V_{x2} = ความต่างศักย์ที่หักลบสัญญาณรบกวนแล้ว

จะได้
$$V_{x2} = V_{x1} - \frac{V_y V_x'}{V_{yy}}$$

ดังนั้น
$$V_{x2} = -0.53 - \frac{(0.25)(-0.60)}{1.35} = -0.42V$$

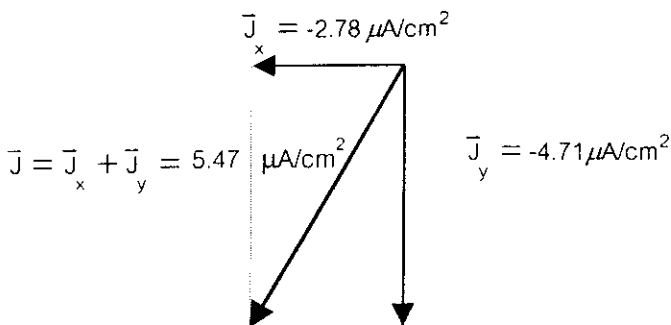
ความต่างศักย์ไฟฟ้า (V_{xx}) 2.80 V มีความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า $10.6 \mu A/cm^2$

∴ ความต่างศักย์ไฟฟ้า (V_{x2}) -0.42 V มีความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า

$$\frac{10.6 \mu A/cm^2}{1.60V} \times (-0.42)V$$

ความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า (J_x) ที่ได้คือ $-2.78 \mu A/cm^2$ นั่นคือมีขนาด $2.78 \mu A/cm^2$ ในทิศ -x

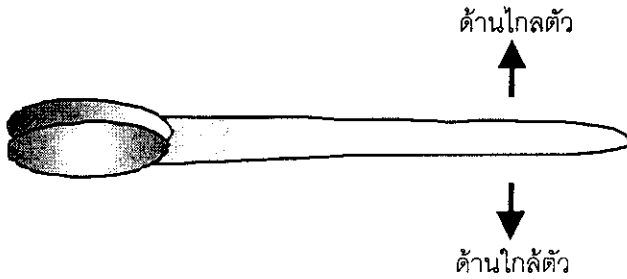
ในการหากระแสไฟฟ้าไอออนรวมแต่ละตำแหน่งของการวัด ทำได้โดยนำความหนาแน่นกระแสไฟฟ้าในแนวแกน x และแกน y ที่คำนวณได้มารวมกันแบบเวกเตอร์ ตัวอย่างเช่น ที่ความยาว 0.10 มิลลิเมตรจากปลายรากด้านไกลตัว มี $J_x = -2.78 \mu A/cm^2$ และ $J_y = -4.71 \mu A/cm^2$ เมื่อนำมารวมกันแบบเวกเตอร์จะได้ดังภาพประกอบ 25 ซึ่งแสดงทั้งขนาดและทิศทาง



ภาพประกอบ 25 การรวมกันแบบเวกเตอร์ของกระแสไฟฟ้าในแนวแกน x, J_x และแนวแกน y,

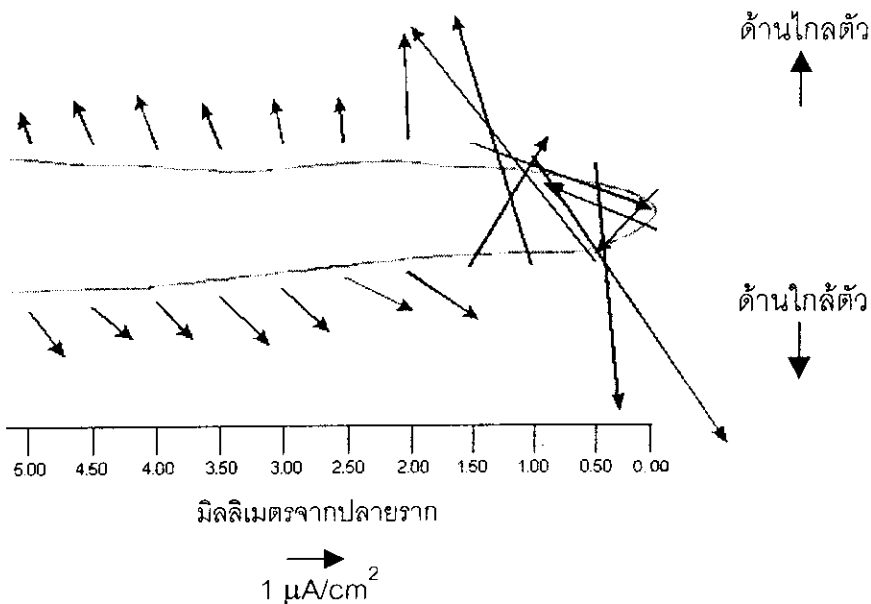
J_y ได้เป็นกระแสไฟฟารวม $J_x + J_y$

การวัดกระแสไฟฟ้าไอออน ในสภาวะปกติในสารละลาย APW pH 6.00 จะวัดกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งต่างๆ รอบรากทานตะวันทั้งด้านใกล้ตัวและด้านใกล้ตัวผู้วัด (ภาพประกอบ 26) แต่ในการศึกษาผลของสารพิษ จะวัดกระแสไฟฟ้าไอออนด้านใกล้ตัวผู้วัดเพียงด้านเดียว เพื่อลดเวลาที่ใช้ในการวัดทั้งสภาวะปกติและสภาวะที่มีสารพิษก่อนที่รากจะงอตามแรงโน้มถ่วง



ภาพประกอบ 26 ภาพกล้าทานตะวันแสดงตำแหน่งด้านใกล้ตัวและด้านใกล้ตัวผู้วัด

ตาราง 2 และ 3 แสดงตัวอย่างผลการทดลองและค่ากระแสไฟฟ้าที่คำนวณได้ หลังจากนั้นนำกระแสไฟฟ้าจากตาราง 2 และ 3 ที่รวมกันแบบเวกเตอร์แล้ว (ตามภาพประกอบ 25) มาวาดลงที่ตำแหน่งต่างๆ ของการวัดรอบภาพของรากทานตะวันที่วาดโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ระหว่างการทดลองจะได้ผลดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 ตัวอย่างการเขียนทิศทางและขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออน

2.13 การศึกษารูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนรอบรากทานตะวันในสภาวะปกติ (ในสารละลาย APW pH 6.00 ± 0.05)

ในการศึกษารูปแบบของกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 6.00 ± 0.05 ใช้รากทานตะวันอายุ 42 ± 1 ชั่วโมง ยาว 11.5-16.5 มิลลิเมตร มาตรึงและแช่ในสารละลาย APW pH 6.00 ± 0.05 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้รากปรับสภาพ หลังจากนั้นจึงปรับเทียบโพรบ แล้ววัดกระแสไฟฟ้าไอออนตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว โดยวัดทั้ง 2 ด้านของราก คือ ด้านใกล้ตัวและด้านไกลตัว จากนั้นนำผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่ได้มาแปลผลและทดสอบค่าทางสถิติ

2.14 ผลของเวลาต่อรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออน

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า ในพืชที่กำลังเจริญเติบโตรูปแบบกระแสไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงตามเวลา (Iwabuchi *et al.*, 1989; Hush and Overall, 1989) ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเวลาที่มีต่อรูปแบบกระแสไฟฟ้า เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากสารละลายที่มีสารพิษ เพื่อใช้ยืนยันว่าผลที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องจากสารพิษไม่ใช่ผลของเวลา โดยวัดกระแสไฟฟ้าไอออนจากรากทั้งในสารละลาย APW pH 6.00 และในสารละลาย APW pH 4.50 ทุกชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยนำรากทานตะวันอายุ 40 ± 2 ชั่วโมง ความยาวราก 1.10-1.30 เซนติเมตร มาตรึงและแช่รากไว้ในสารละลาย APW pH 6.00 หรือสารละลาย APW pH 4.50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงปรับเทียบโพรบ แล้ววัดกระแสไฟฟ้าไอออนตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว โดยวัดเฉพาะด้านใกล้ตัว เสร็จแล้วเปลี่ยนสารละลายใหม่ แช่รากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดกระแสไฟฟ้าซ้ำในชั่วโมงที่ 2, 3 และ 4 จากนั้นนำผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่ได้มาแปลผล และทดสอบค่าทางสถิติ ที่เลือกความยาวรากดังกล่าวเนื่องจากรากที่มีความยาวมากกว่านี้จะจ่อเร็วกว่า ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองได้ตลอด 4 ชั่วโมง

2.15 ศึกษาผลของสารพิษต่อรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออน

ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของอลูมิเนียม (Al^{3+}) แคดเมียม (Cd^{2+}) และอาร์ซีนิก (As^{3+}) ที่มีต่อรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออน เนื่องจากสารโลหะดังกล่าวมีพิษต่อคน สัตว์ และพืช โดยใช้อลูมิเนียม ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ แคดเมียม ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโคร

โมลาร์ และอาร์ซินิก ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ในสารละลาย APW ที่ระดับ pH ต่างๆ (ตาราง 1) แล้ววัดกระแสไฟฟ้ารอบรากทานตะวันในสภาวะที่ได้รับสารพิษเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ โดยวัดกระแสไฟฟ้าไอออนตามความยาวของรากทานตะวันด้านไกลตัวผู้วัดเพียงด้านเดียวเท่านั้น เริ่มจากรากกระแสไฟฟ้าไอออนตามความยาวของรากทานตะวันด้านไกลตัวผู้วัด หลังจากแช่รากทานตะวันในสารละลาย APW ที่ไม่มีสารพิษ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มจากตำแหน่งที่ 1 คือที่ปลายรากและวัดทั้งหมด 22 ตำแหน่งในแต่ละรากตามความยาวของราก ห่างกันตำแหน่งละ 500 ไมโครเมตร ใช้เวลาวัดทั้ง 22 ตำแหน่ง ประมาณ 20 นาที จากนั้นเปลี่ยนสารละลาย APW เป็นสารละลาย APW ที่มีสารพิษและแช่รากไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะวัดกระแสไฟฟ้าไอออนทั้ง 22 ตำแหน่งซ้ำอีกครั้ง และวัดซ้ำอีก 2 ครั้งในชั่วโมงที่ 2 และ 3 พร้อมกับวัดอัตราการยืดทุกชั่วโมง

2.15.1 ผลของอลูมิเนียม

เริ่มทดลองโดยแช่รากทานตะวันในสารละลาย APW pH 4.50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดกระแสไฟฟ้าไอออน เสร็จแล้วเปลี่ยนสารละลาย โดยดูดเอาสารละลาย APW ปกติออกจากจานเพาะเชื้อ แล้วเติมสารละลาย APW ที่มีอลูมิเนียม pH 4.50 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ความเข้มข้นต่างๆ โดยระวังไม่ให้โพรบและรากทานตะวันได้รับความกระทบกระเทือน แล้วแช่รากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้รากปรับสภาพ หลังจากนั้นวัดกระแสไฟฟ้าไอออน เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง วัดกระแสไฟฟ้าซ้ำอีกครั้งและวัดซ้ำอีกครั้งในชั่วโมงถัดไป แล้วนำผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่ได้มาแปลผล และทดสอบค่าทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบกระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะที่ได้รับอลูมิเนียมกับสภาวะปกติที่ไม่ได้รับอลูมิเนียม

2.15.2 ผลของแคดเมียม

ดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.15.1 คือวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะปกติก่อน แล้วเปลี่ยนเป็นสารละลายแคดเมียม แตกต่างเพียงศึกษาผลของแคดเมียมทั้งที่ระดับ pH 4.50 และ pH 6.00

2.15.3 ผลของอาร์ซินิก

ดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.15.1 คือวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะปกติสารละลาย APW pH 6.00 ก่อน แล้วเปลี่ยนเป็นสารละลายอาร์ซินิก pH 6.00 ตามลำดับ

2.16 การหาอัตรายืดของรากทานตะวัน

จากการดูรากทานตะวันผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พิจารณาบริเวณหมวกรากหาตำแหน่งที่มีลักษณะแตกต่างจากส่วนอื่นๆ เช่น มีเส้นขุยหรือมีรอยบางอย่าง เพื่อให้เป็นจุดอ้างอิง บันทึกตำแหน่งดังกล่าวของราก โดยให้ตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งเริ่มต้นของจุดสังเกต พร้อมทั้งบันทึกเวลาเริ่มต้นด้วย หลังจากวัดกระแสไฟฟ้าไอออนแล้ว จึงสังเกตว่าตำแหน่งดังกล่าวนี้มีการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ที่ใด ให้ถือเป็นตำแหน่งสุดท้ายของจุดสังเกต และบันทึกเวลาสุดท้าย คำนวณหาอัตราการยืดของรากโดย

$$\text{อัตรายืดของราก} = \frac{\text{ตำแหน่งสุดท้ายของจุดสังเกต} - \text{ตำแหน่งเริ่มต้นของจุดสังเกต} (\mu\text{m})}{\text{เวลาสุดท้าย} - \text{เวลาเริ่มต้น} (\text{min})}$$

2.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้ทดลองวัดกระแสไฟฟ้าไอออนรอบรากทานตะวันในสภาวะต่างๆ จำนวนหลายราก จากผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนพบว่า ในขณะที่อยู่ในสภาวะเดียวกันรากมีรูปแบบของกระแสไฟฟ้าที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีทางสถิติมาทดสอบผลการวัดกระแสไฟฟ้าทั้งหมด

2.17.1 ทิศของกระแสไฟฟ้า

ในการพิจารณาว่าที่ตำแหน่งใดๆ ของรากทานตะวัน กระแสไฟฟ้าไอออนมีทิศเข้าหรือออกจากราก ทำโดยทดสอบผลการวัดกระแสไฟฟ้าของทุกรากที่ตำแหน่งนั้นๆ ด้วยวิธีทางสถิติว่าตำแหน่งดังกล่าวกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าหรือออกจากรากอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้ "การทดสอบสัดส่วนของประชากรกลุ่มเดียว" (Testing proportion of one population) (อภิญา, 2531; กัลยา, 2541) แบบทางเดียว โดยกำหนดสมมติฐานทดสอบให้ H_0 เป็นสมมติฐานนิเสธและ H เป็นสมมติฐานอื่น ดังนี้

H_0 : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าทิศเข้าสู่รากและออกจากรากไม่แตกต่างกัน นั่นคือสัดส่วน

ประชากร $\pi = 0.5$

ในกรณีที่คาดว่าทิศของกระแสไฟฟ้านำจะเข้าสู่รากมากกว่าออกจากราก จะให้

H : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าทิศเข้าสู่รากมากกว่ากระแสไฟฟ้าทิศออกจากราก นั่นคือ

สัดส่วนของประชากร $\pi > 0.5$

ส่วนในกรณีที่คาดว่าทิศของกระแสไฟฟ้าน่าจะออกจากรากมากกว่าเข้าสู่ราก จะให้

H : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าที่ศออกจากรากมากกว่ากระแสไฟฟ้าที่ศเข้าสู่ราก นั่นคือ

สัดส่วนของประชากร $\pi > 0.5$

โดยสถิติทดสอบคือ

$$Z = \frac{\hat{p} - \pi}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$$

เมื่อ \hat{p} เป็นสัดส่วนของตัวอย่าง โดยที่ $\hat{p} = x/n$

โดย x คือจำนวนรากที่กระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่ราก

n คือจำนวนรากทั้งหมดที่ทดลอง

π คือสัดส่วนของประชากร = 0.5 ตาม H_0

หากค่า Z ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต (ตาราง 4) จะปฏิเสธ H_0

ตัวอย่าง กรณีกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 6.00 ที่ความยาว 1.5 มิลลิเมตร จากปลายราก ด้านไกลตัวผู้วัด พบกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากจำนวน 47 รากจากทั้งหมด 49 ราก นั่นคือ $x = 47$, $n = 49$

จะได้ $\hat{p} = 47/49 = 0.96$

แทนค่าในสถิติทดสอบ

$$\begin{aligned} Z &= \frac{0.96 - 0.5}{\sqrt{\frac{0.5(1-0.5)}{49}}} \\ &= 6.43 \end{aligned}$$

ค่า Z ที่คำนวณได้คือ 6.43 ซึ่งมีค่าเป็นบวกและมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวทั้งที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ($Z = 1.65$), $\alpha = 0.01$ ($Z = 2.33$), และ $\alpha = 0.001$ ($Z = 3.09$) (ตาราง 4) สรุปว่าปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.001$

แปลความหมายได้ว่า ที่ความยาว 1.5 มิลลิเมตรจากปลายราก กระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9 เปอร์เซนต์

ตัวอย่าง กรณีกระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 6.00 ที่ระยะ 4.0 มิลลิเมตรจากปลายราก ด้านใกล้ตัวผู้วัด พบกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากจำนวน 5 ราก จากทั้งหมด 49 ราก นั่นคือ $x = 5, n = 49$

จะได้ $\hat{p} = 5/49 = 0.12$

แทนค่าในสถิติทดสอบ

$$Z = \frac{0.10 - 0.5}{\sqrt{\frac{0.5(1-0.5)}{49}}} = -5.86$$

ค่า Z ที่คำนวณได้คือ -5.86 ซึ่งมีค่าเป็นลบและมีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวทั้งที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ($Z = -1.65$), $\alpha = 0.01$ ($Z = -2.33$) และ $\alpha = 0.001$ ($Z = -3.09$) (ตาราง 4) สรุปว่าปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.001$

แปลความหมายได้ว่า ที่ความยาว 4.0 มิลลิเมตรจากปลายราก กระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่าง กรณีไม่สามารถระบุได้ว่ากระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากหรือออกจากราก

จากผลการวัดกระแสไฟฟ้าในสารละลาย APW pH 6.00 ที่ระยะ 2.5 มิลลิเมตรจากปลายราก ด้านใกล้ตัวผู้วัด พบกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากจำนวน 29 ราก จากทั้งหมด 49 ราก นั่นคือ $x = 29, n = 49$

จะได้ $\hat{p} = 29/49 = 0.59$

แทนค่าในสถิติทดสอบ

$$Z = \frac{0.59 - 0.5}{\sqrt{\frac{0.5(1-0.5)}{49}}} = 1.29$$

ค่า Z ที่คำนวณได้คือ 1.29 ซึ่งมีค่าเป็นบวกแต่มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวทั้งที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ($Z = 1.65$) (ตาราง 4) สรุปว่ายอมรับ H_0 ที่ $\alpha = 0.05$

แปลความหมายได้ว่า ที่ความยาว 2.5 มิลลิเมตรจากปลายรากกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากและออกจากรากด้วยจำนวนที่ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 4 ค่าวิกฤติเมื่อกำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) ต่างๆ กันของการทดสอบสัดส่วนของประชากรกลุ่มเดียวแบบทางเดียว

α	ค่าวิกฤติ	ระดับความเชื่อมั่น
0.05	$Z_{0.05} = \pm 1.65$	95 เปอร์เซ็นต์
0.01	$Z_{0.01} = \pm 2.33$	99 เปอร์เซ็นต์
0.001	$Z_{0.001} = \pm 3.09$	99.9 เปอร์เซ็นต์

2.17.2 ผลของสารพิษ

เนื่องจากค่ากระแสไฟฟ้าไอออนที่วัดได้ในสภาวะที่ไม่มีและมีสารพิษเป็นค่าที่วัดได้จากกรากเดียวกัน หรือตำแหน่งเดียวกัน หรืออาจกล่าวได้ว่าตัวอย่างสองกลุ่มมีความสัมพันธ์กัน จึงทดสอบผลของสารพิษด้วยวิธี "การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของประชากรสองกลุ่ม กรณีข้อมูลแบบจับคู่ (paired t test)" (กัลยา, 2541) สถิติทดสอบ ที่ใช้คือ

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}} \quad \text{โดยที่ } df = n-1$$

โดยที่ \bar{d} แทนผลต่างเฉลี่ยของขนาดกระแสไฟฟ้าของตัวอย่าง

μ_d แทนค่าเฉลี่ยจริงของผลต่างของตัวอย่าง ตามที่ตั้งไว้ตามสมมุติฐาน คือ

$\mu_d = 0$ กรณีตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีขนาดกระแสไฟฟ้าไม่แตกต่างกัน

$\mu_d \neq 0$ กรณีตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีขนาดกระแสไฟฟ้าแตกต่างกัน

S_d แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง

n แทน จำนวนของตัวอย่างทั้งหมด

df แทน degree of freedom = $n-1$

ตัวอย่าง ต้องการทดสอบว่าขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนในแต่ละรากที่วัดได้จากรากทานตะวันในสารละลาย APW pH 4.50 มีขนาดแตกต่างจากกระแสไฟฟ้าที่วัดได้หลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียมความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือไม่ โดยวัดกระแสไฟฟ้าทั้งหมด 22 ตำแหน่งวัด จากรากเดียวกัน สามารถพิจารณาได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ตั้งสมมุติฐานทดสอบ ให้ H_0 เป็นสมมุติฐานนิเสธ และ H เป็นสมมุติฐานอื่น โดย

H_0 : กระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติและหลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองและการเขียนกราฟเบื้องต้นทำให้ทราบแนวโน้มของขนาดของกระแสไฟฟ้า กรณีแนวโน้มกระแสไฟฟ้าหลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดมากกว่ากระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติจะให้

H : กระแสไฟฟ้าหลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดมากกว่ากระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติ

ขั้นตอนที่ 2 หาผลต่างของขนาดกระแสไฟฟ้า, d_j ระหว่างในสารละลาย APW pH 4.50 (X_1) กับในสารละลายอลูมิเนียม (X_2) ที่ตำแหน่งต่างๆ ($j = 1, 2, \dots, 22$) (ตาราง 5)

$$\text{จาก} \quad d_j = X_{2j} - X_{1j}$$

ขั้นตอนที่ 3 หาค่าเฉลี่ยของผลต่างขนาดกระแสไฟฟ้าของตัวอย่าง จาก

$$\bar{d} = \frac{\sum d_j}{n} = \frac{28.56}{22} = 1.30$$

ขั้นตอนที่ 4 หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จาก

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_j - \bar{d})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{48.49}{22-1}} = 1.52$$

ขั้นตอนที่ 5 แทนค่าในสถิติทดสอบ

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_d / \sqrt{n}} = \frac{1.30 - 0}{1.52 / \sqrt{22}} = 4.01$$

ขั้นตอนที่ 6 นำค่า t ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ (ตาราง 7) จากตัวอย่างค่า t จากการคำนวณคือ 4.01 ซึ่งมีค่าเป็นบวกและมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวที่ $df = 21$ ทั้งที่

ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ($t_\alpha = 1.721$) และ $\alpha = 0.01$ ($t_\alpha = 2.518$) และ $\alpha = 0.001$ ($t_\alpha = 3.527$) สรุปรว่าปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.001$

แปลความหมายได้ว่า ขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนหลังจากรบกวนตามวันได้รับอุณหภูมิเย็น 1 ชั่วโมง มีขนาดมากกว่ากระแสไฟฟ้าไอออนที่สภาวะปกติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001

ตาราง 5 ตัวอย่างการคำนวณค่าทดสอบทางสถิติของขนาดกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 4.50 และสภาวะที่มีอุณหภูมิเย็น 1 ไมโครโมลาร์ pH 4.50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตำแหน่ง ที่	ความยาว จากปลายราก (มิลลิเมตร)	APW pH 4.50 X_{1j}	อุณหภูมิเย็น pH 4.50 X_{2j}	ค่า ความแตกต่าง $d_j = x_{2j} - x_{1j}$	$d_j - \bar{d}$	$(d_j - \bar{d})^2$
1	0.0	0.52	0.94	0.42	-0.88	0.77
2	0.5	0.90	2.05	1.15	-0.15	0.02
3	1.0	3.22	1.44	-1.78	-3.08	9.48
4	1.5	4.25	4.75	0.50	-0.80	0.64
5	2.0	2.89	6.16	3.27	1.97	3.89
6	2.5	1.30	5.94	4.64	3.34	11.17
7	3.0	0.48	3.14	2.66	1.36	1.85
8	3.5	0.84	1.93	1.09	-0.21	0.04
9	4.0	1.08	1.37	0.29	-1.01	1.02
10	4.5	1.14	1.63	0.49	-0.81	0.65
11	5.0	1.14	1.37	0.23	-1.07	1.14
12	5.5	1.52	1.37	-0.15	-1.45	2.10
13	6.0	1.93	1.35	-0.58	-1.88	3.53
14	6.5	1.46	1.68	0.22	-1.08	1.16
15	7.0	1.25	2.49	1.24	-0.06	0.00
16	7.5	1.88	2.16	0.28	-1.02	1.04
17	8.0	0.70	2.11	1.41	0.11	0.01
18	8.5	0.59	2.49	1.90	0.60	0.36
19	9.0	0.48	3.17	2.69	1.39	1.94
20	9.5	0.32	2.92	2.60	1.30	1.69
21	10.0	0.12	3.45	3.33	2.03	4.13
22	10.5	0.19	2.85	2.66	1.36	1.85
ผลรวม				28.56		48.49

ตัวอย่าง ต้องการทดสอบขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนที่วัดได้จากรากทานตะวัน เฉพาะตำแหน่งที่ 14 นั่นคือที่ระยะ 6.5 มิลลิเมตรจากปลายราก ในสารละลาย APW pH 4.50 ว่าจะมีขนาดแตกต่างจากกระแสไฟฟ้าที่วัดได้หลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียมความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือไม่ จากรากทานตะวันทั้งหมด 20 ราก สามารถพิจารณาได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ตั้งสมมุติฐานทดสอบ ให้ H_0 เป็นสมมุติฐานอิสระและ H เป็นสมมุติฐานอื่น โดย

H_0 : กระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติและหลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองและการเขียนกราฟเบื้องต้นทำให้ทราบแนวโน้มของขนาดของกระแสไฟฟ้า กรณีแนวโน้มกระแสไฟฟ้าไอออนบริเวณตำแหน่งที่ 14 หลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดน้อยกว่ากระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติจะให้

H : กระแสไฟฟ้าหลังจากรากทานตะวันได้รับอลูมิเนียม 1 ชั่วโมงมีขนาดน้อยกว่ากระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติ

ขั้นตอนที่ 2 หาผลต่างของขนาดกระแสไฟฟ้า d_j ระหว่างในสารละลาย APW pH 4.50 (X_1) กับในสารละลายอลูมิเนียม (X_2) ของแต่ละราก ($j = 1, 2, 3, \dots, 20$) (ตาราง 6)

$$\text{จาก} \quad d_j = X_{2j} - X_{1j}$$

ขั้นตอนที่ 3 หาค่าเฉลี่ยของผลต่างขนาดกระแสไฟฟ้าของตัวอย่าง จาก

$$\bar{d} = \frac{\sum d_j}{n} = \frac{-8.76}{20} = -0.44$$

ขั้นตอนที่ 4 หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จาก

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (d_j - \bar{d})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{6.13}{20-1}} = 0.56$$

ขั้นตอนที่ 5 แทนค่าในสถิติทดสอบ

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}} = \frac{-0.44 - 0}{0.56 / \sqrt{20}} = -3.51$$

ขั้นตอนที่ 6 นำค่า t ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ (ตาราง 7) ค่า t จากการคำนวณคือ -3.51 ซึ่งมีค่าเป็นลบและมีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวที่ $df = 19$ ทั้งที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ($t_{\alpha} = 1.725$) และ $\alpha = 0.01$ ($t_{\alpha} = 2.528$) สรุปว่าปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.01$

แปลความหมายได้ว่า ขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนที่ตำแหน่ง 14 หรือระยะ 6.5 มิลลิเมตร จากปลายรากของรากทานตะวันหลังจากได้รับอนุมิเนียม 1 ชั่วโมง มีขนาดน้อยกว่ากระแสไฟฟ้าที่สภาวะปกติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ตาราง 6 ตัวอย่างการคำนวณค่าทดสอบทางสถิติของขนาดกระแสไฟฟ้าไอออนแต่ละตำแหน่งในสารละลาย APW pH 4.50 และสภาวะที่มีอนุมิเนียม 10^{-6} โมลาร์ pH 4.50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

รากที่	APW pH 4.50 X_{1j}	อนุมิเนียม pH 4.50 X_{2j}	ค่า ความแตกต่าง $d_j = x_{2j} - x_{1j}$	$d_j - \bar{d}$	$(d_j - \bar{d})^2$
1	1.24	0.71	-0.52	-0.09	0.01
2	1.60	0.12	-1.48	-1.05	1.10
3	0.25	0.27	0.02	0.46	0.21
4	0.85	0.08	-0.77	-0.33	0.11
5	1.29	0.84	-0.45	-0.01	0.00
6	0.57	0.30	-0.26	0.17	0.03
7	0.68	1.27	0.59	1.03	1.05
8	0.53	0.12	-0.41	0.02	0.00
9	0.68	0.18	-0.50	-0.06	0.00
10	0.39	0.11	-0.28	0.16	0.03
11	0.92	0.15	-0.77	-0.34	0.11
12	0.97	0.64	-0.32	0.11	0.01
13	0.29	0.64	0.35	0.78	0.61
14	1.10	0.17	-0.93	-0.49	0.24
15	1.61	0.32	-1.29	-0.85	0.72
16	1.54	1.67	0.13	0.56	0.32
17	0.63	0.54	-0.09	0.35	0.12
18	0.74	0.36	-0.38	0.06	0.00
19	2.47	0.97	-1.50	-1.06	1.13
20	0.56	0.68	0.13	0.57	0.32
ผลรวม			-8.76		6.13

ตาราง 7 ค่าวิกฤติของการแจกแจงแบบที (t) เมื่อ $df = n-1$ และ α คือค่าระดับความเชื่อมั่น

df	α					
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.310
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.326
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.213
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396
Inf.	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090