

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่าง

- เมล็ดทานตะวันสายพันธุ์แปซิฟิก – 33 (บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ สระบุรี)

2.1.2 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลาย APW (artificial pond water)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, AR Grade : Analytical Carlo Erba, France)
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, AR Grade :Merk, Germany)
- แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (CaCl₂.2H₂O, AR Grade :Analytical Carlo Erba, France)
- โซเดียมซัลเฟต (Na₂SO₄ , AR Grade :Merk, Germany)
- โพแทสเซียมซัลเฟต (K₂SO₄ , AR Grade :Merk, Germany)
- แคลเซียมซัลเฟต (CaSO₄ , AR Grade :Merk, Germany)
- อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃, AR Grade: Fluka, Switzerland)
- ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris – Hydroxymethyl – aminomethane) (C₄H₁₁NO₃, AR Grade: Fluka, Switzerland)
- 2-มอร์โฟลิโนอีเทนซัลโฟนิกแอซิดโมโนไฮเดรต(2-Morpholinoethansulfonic acid Monohydrate)(C₆H₁₃NO₄.H₂O, AR Grade: Fluka, Switzerland)

2.1.3 สารเคมีสำหรับซุบอเล็กโทรด

- แพลทินัมคลอไรด์ (H₂PtCl₆.H₂O, AR Grade: Fluka, Switzerland)
- ทองโพแทสเซียมไซยาไนด์ (AuKCN, AR Grade: Degussa, Germany)
- เลดอะซิเตต ((CH₃COO)₂Pb.3H₂O, AR Grade: Baker Analyzed, USA)

2.1.4 สารเคมีอื่น ๆ ที่จำเป็น

- สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.0, pH 7.0 และ pH 10.0 (AR Grade: Merk, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl, AR Grade: BDH, England)
- อะซิโตน (Acetone) (CH₃COCH₃, AR Grade: Carlo Erba, France)

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

2.1.5 อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดทานตะวัน

- จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.00 ± 0.05 เซนติเมตร
- ตู้มีด
- เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
- ปีกเกอร์ขนาด 10 และ 30 มิลลิลิตร (PYREX, USA)
- กระดาษทิชชู

2.1.6 อุปกรณ์สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

- ระบบไวเบรติงโพรบ (Vibrating probe system) ประกอบด้วย
 - ออสซิลเลเตอร์ (osillator) ทำหน้าที่จ่ายสัญญาณรูปซายน์ (sine)
 - ไวเบรเตอร์แอสเซมบลี (vibrator assembly) ทำหน้าที่ให้อิเล็กโทรดสั่นกลับไปกลับมา
 - PSD (phase sensitive detector) ทำหน้าที่รับสัญญาณและปรับเฟสของสัญญาณ
 - ส่วนขยายสัญญาณ (preamplifier)
 - ส่วนกรองสัญญาณ (filter)
 - อุปกรณ์จับยึดไวเบรเตอร์แอสเซมบลีที่เชื่อมต่อกับโพรบ 3 มิติ (3D micromanipulator)(Narishige, Tokyo, Japan)
 - เครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder: Kipp & Zonen, BD41,Holland)
 - กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (inverted microscope, Olympus, CK40, Tokyo, Japan)
 - กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope, Olympus, SZ,Tokyo, Japan)
 - โพรบ (parylene –coated stainless-steel electrode, Microprobe, Clarkburg, MD, USA)
 - มัลติมิเตอร์ (multimeter, Fluke 87, USA)
 - ฟาราเดย์เคจ (Faraday cage)

2.1.7 อุปกรณ์สำหรับเตรียมไมโครอิเล็กโทรดปรับเทียบ

- ลวดเงินเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.33 ± 0.05 มิลลิเมตร ยาว 10.00 ± 0.05 เซนติเมตร (silver wire purity 99.99 %, Advent Research Materials Ltd., England)
- ไมโครปิเปต (micropepette) ทำจากหลอดแก้ว (Borosilica with filament) เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 1.00 ± 0.05 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.58 ± 0.05 มิลลิเมตร (Clark Electromedical Instruments, England)
- เครื่องให้ความร้อนและคนของเหลวด้วยแรงแม่เหล็ก (hotplate/ magnetic stirrer, Framo –Geratetechnik, Typ M21/1, Germany)

2.1.8 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอิเล็กโทรดอ้างอิง

- ลวดแพลทินัมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 ± 0.05 มิลลิเมตร ยาว 4.00 ± 0.05 เซนติเมตร
- แบตเตอรี่ขนาด 9 โวลต์

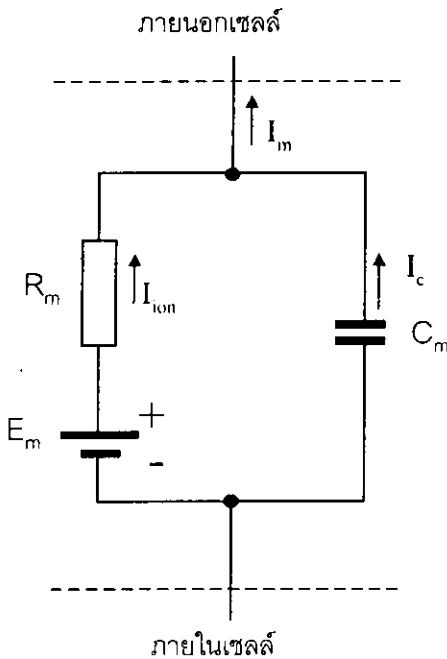
2.1.9 วัสดุและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น

- เครื่องวัดสภาพนำไฟฟ้า (conductivity meter, Jenway model 4310, England)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Corning model 220, England)
- เครื่องชั่ง (Mettler PJ300: Mettler, Switzerland)
- กระดาษบันทึกสัญญาณ (chart recorder paper)

2.2 หลักการและทฤษฎี

การเคลื่อนที่ของไอออนผ่านผนังเมมเบรนของเซลล์เกิดเนื่องจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ การเคลื่อนที่ของไอออนเหล่านี้จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไอออน กระแสไฟฟ้าปริมาณน้อยที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องนี้มีขนาดอยู่ในระดับไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร โดยกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะเกี่ยวข้องกับกลไกบางอย่างของเซลล์สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น การนำอาหารเข้าสู่เซลล์ การส่งสัญญาณภายในและระหว่างเซลล์ รวมทั้งควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์พืชและสัตว์ (Jaffe and Nuccitelli, 1974; Jaffe *et al.*, 1977) กระแสไฟฟ้าที่ไหลเข้า – ออกเมมเบรนที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของไอออนที่มีความเข้มข้นต่างกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์มีลักษณะเช่นเดียวกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของ

อิเล็กตรอนในวงจรไฟฟ้าที่มีศักย์ไฟฟ้าต่างกัน หากพิจารณากระแสไฟฟ้าไอออนสุทธิที่ผ่านเมมเบรนสามารถจำลองวงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนอย่างง่ายได้ดังภาพประกอบ 6 วงจรดังกล่าวประกอบด้วยความต้านทานของเมมเบรน (R_m) ต่ออนุกรมกับแบตเตอรี่ซึ่งมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับศักย์เมมเบรน (E_m) ซึ่งคือ ความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และเนื่องจากศักย์เมมเบรนนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงไป การเปลี่ยนแปลงจะเป็นฟังก์ชันกึ่งของเวลาซึ่งลักษณะดังกล่าวแทนด้วยตัวเก็บประจุ (C_m) ดังแสดงในภาพ



ภาพประกอบ 6 วงจรไฟฟ้าอย่างง่ายที่สมมูลกับเมมเบรน

(ปรับปรุงจาก Ronto and Tarjan, 1999)

ดังนั้นกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านจากภายในเซลล์ผ่านเมมเบรนไปยังภายนอกคือ

$$I_m = I_{ion} + I_c \quad (1)$$

โดย I_m = กระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านเมมเบรน

I_{ion} = กระแสไฟฟ้าเนื่องจากการเคลื่อนที่ของไอออนชนิดต่างๆ ผ่านเมมเบรน

และ I_c = กระแสไฟฟ้าที่ผ่านตัวเก็บประจุของเมมเบรน

จากการศึกษาสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์ชนิดต่างๆ ทำให้ทราบถึงชนิดของไอออนที่เป็นส่วนสำคัญของกระแสไฟฟ้าไอออน ตัวอย่างเช่นในเซลล์ประสาทของสัตว์ Na^+ K^+ และ Cl^- เป็นไอออน

ที่สำคัญและสามารถเขียนวงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนได้ดังภาพประกอบ 7 การยอมให้ไอออนผ่านเข้าออกเมมเบรนจะขึ้นกับค่าความต้านทานของเมมเบรนต่อไอออนชนิดนั้นๆ คือ R_{Na} , R_K และ R_{Cl} และศักย์ไฟฟ้าที่ทำให้ไอออนเหล่านี้เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนคือศักย์สมดุลของแต่ละไอออน (E_{Na} , E_K และ E_{Cl}) โดยศักย์สมดุลนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไอออนระหว่างภายในและภายนอกของเมมเบรนซึ่งเป็นไปตามสมการเนิร์นสต์ (Nernst) (Ronto and Tarjan, 1999)

$$E_i = \frac{-RT}{z_i F} \ln \frac{C_i}{C_o} \quad (2)$$

เมื่อ E_i = ศักย์สมดุล

R = ค่าคงตัวของแก๊ส = $8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

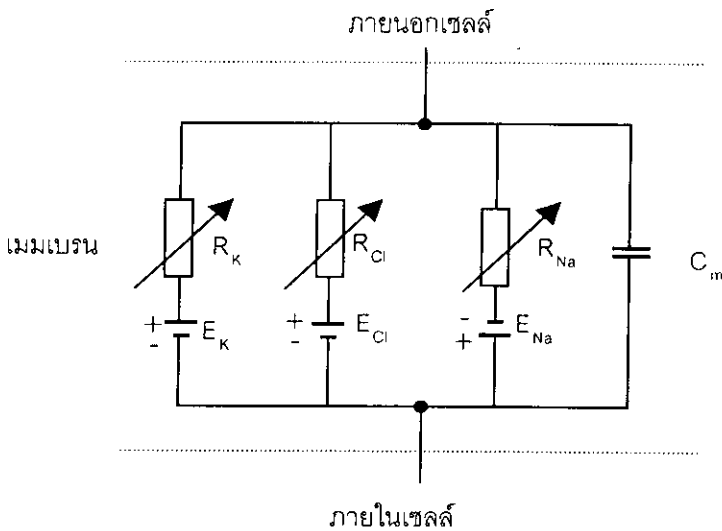
T = อุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)

F = ค่าคงตัวฟาราเดย์ = $96,487 \text{ C mol}^{-1}$

z_i = จำนวนประจุของไอออน (จำนวนเท่าของประจุมูลฐาน)

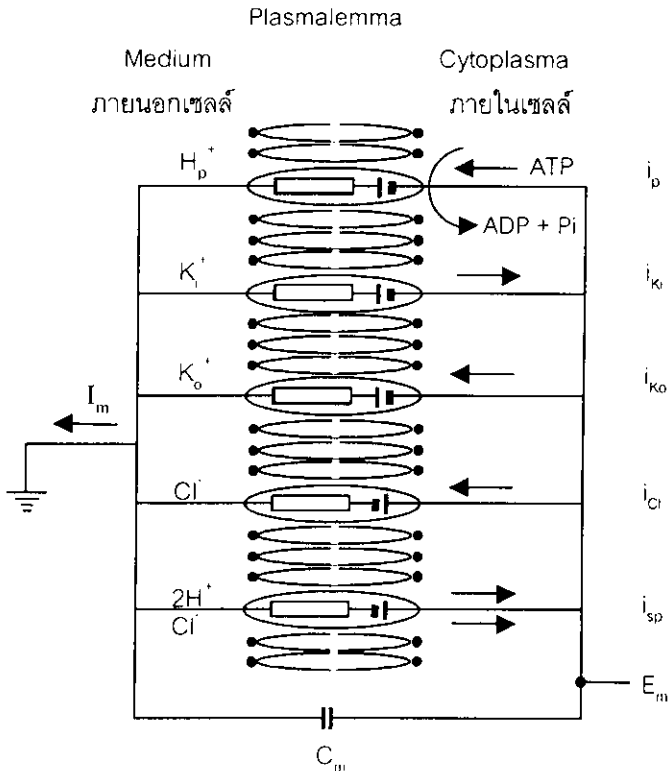
C_i = ความเข้มข้นของไอออนภายในเซลล์

C_o = ความเข้มข้นของไอออนภายนอกเซลล์



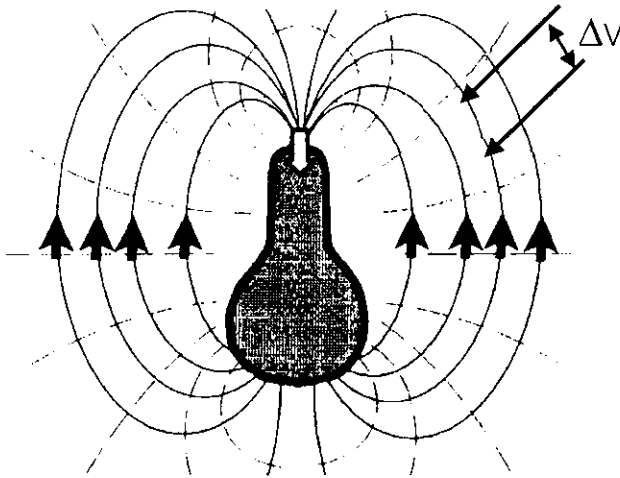
ภาพประกอบ 7 วงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนของเซลล์ประสาท
(ปรับปรุงจาก Ronto and Tarjan, 1999)

สำหรับวงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนของเซลล์พืชอาจจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่วงจรที่เชื่อว่าเป็นวงจรที่ใช้แทนเมมเบรนของพืชแสดงในภาพประกอบ 8 (Buschmann *et al.*, 1996; Gradmann and Hoffstadt, 1998; Gradmann, 2001) โดยในหนึ่งหน่วยวงจรไฟฟ้าประกอบด้วยแขนแนลที่ให้ไอออนชนิดต่างๆ ผ่านได้ คือ โปรตอนปั๊ม (H^+ pump, proton pump) โฟแทลเทียมไอออนแซนแนลขาเข้า (K^+ -inward rectifier) และแซนแนลขาออก (K^+ -outward rectifier) แชลแนลขาออกของคลอไรด์ไอออน ส่วนแชลแนลสุดท้ายคือแชลแนลขาเข้าของโปรตอน-คลอไรด์ ซิมพอร์เตอร์ ($2H^+/Cl^-$ symporter) แชนแนลนี้จะยอมให้คลอไรด์ไอออนและไฮโดรเจนไอออนผ่านได้เมื่อมีไอออนทั้งสองชนิด กล่าวคือต้องมี $2H^+$ และ Cl^- จึงจะมีการนำไอออนทั้งสองชนิดเข้าสู่เซลล์ ลูกศรในภาพประกอบ 8 แสดงทิศการไหลของไอออน และเนื่องจากกระแสไฟฟ้าพิจารณาจากทิศการไหลของประจุบวก ดังนั้นจากวงจрдังกล่าวจะได้ว่ากระแสไฟฟ้า i_p จากโปรตอนปั๊มเนื่องจากการไหลของ H^+ จะมีทิศออกจากเซลล์ กระแสไฟฟ้า i_k จะเข้าสู่เซลล์ และ i_{k_0} ออกจากเซลล์ ส่วนกระแสไฟฟ้า i_{Cl^-} จาก Cl^- จะมีทิศเข้าสู่เซลล์ และในซิมพอร์เตอร์กระแสไฟฟ้าสุทธิ i_{sp} จาก $2H^+/Cl^-$ จะมีทิศเข้าสู่เซลล์ โดยกระแสไฟฟ้าสุทธิ (I_m) คือผลรวมของกระแสไฟฟ้าไอออนทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น



ภาพประกอบ 8 วงจรไฟฟ้าที่สมมูลกับเมมเบรนของพืชน้ำ *Egeria densa*
(Bushmann *et al.*, 1996)

งานวิจัยนี้จะวัดกระแสไฟฟ้าสุทธิ (I_m) ที่ได้จากผลรวมของไอออนชนิดต่างๆ โดยวัดในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าในสารละลายภายนอกที่มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านโดยระบบไวเบรติงโพรบ ซึ่งวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าในระยะสั้นๆ โดยใช้โพรบที่สั้นด้วยความถี่ในช่วงเป็นร้อยเฮิร์ต ระยะของการสั้นอยู่ในช่วงไมโครเมตร โดยโพรบจะวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างจุดสองจุดที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านสารละลายรอบๆ เซลล์ที่มีค่าสภาพต้านทาน ρ (ภาพประกอบ 9) จากนั้นนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้คำนวณเป็นความหนาแน่นกระแส



ภาพประกอบ 9 การวัดความต่างศักย์ไฟฟ้ารอบเซลล์ที่มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านในสารละลายภายนอก (ปรับปรุงจาก Glaser, 2001)

โดยพิจารณาจากสมการ (Miller *et al.*, 1986)

$$\vec{J} = \frac{\vec{E}}{\rho} \quad (3)$$

โดย

\vec{J} = ความหนาแน่นกระแส (แอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร)

\vec{E} = สนามไฟฟ้า (โวลต์ต่อเมตร)

ρ = สภาพนำไฟฟ้า (โอห์มเมตร)

หากมีกระแสไฟฟ้าไอออน \vec{J} ไหลผ่านสารละลายจะมีความต่างศักย์ไฟฟ้า ΔV เกิดขึ้นระหว่างระยะทาง Δr และจะมีสนามไฟฟ้าตามความสัมพันธ์

$$\vec{E} = \frac{-\Delta V}{\Delta r} \vec{e}_E \quad (4)$$

ดังนั้น

$$\vec{J} = \frac{-\Delta V}{\rho \Delta r} \vec{e}_E \quad (5)$$

เมื่อ Δr คือ ระยะทางระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสอง และ \vec{e}_E เป็นเวกเตอร์หน่วยแสดงทิศทางของสนามไฟฟ้าที่มีทิศจากศักย์ไฟฟ้ามากไปน้อย

Central Library Prince of Songkla University

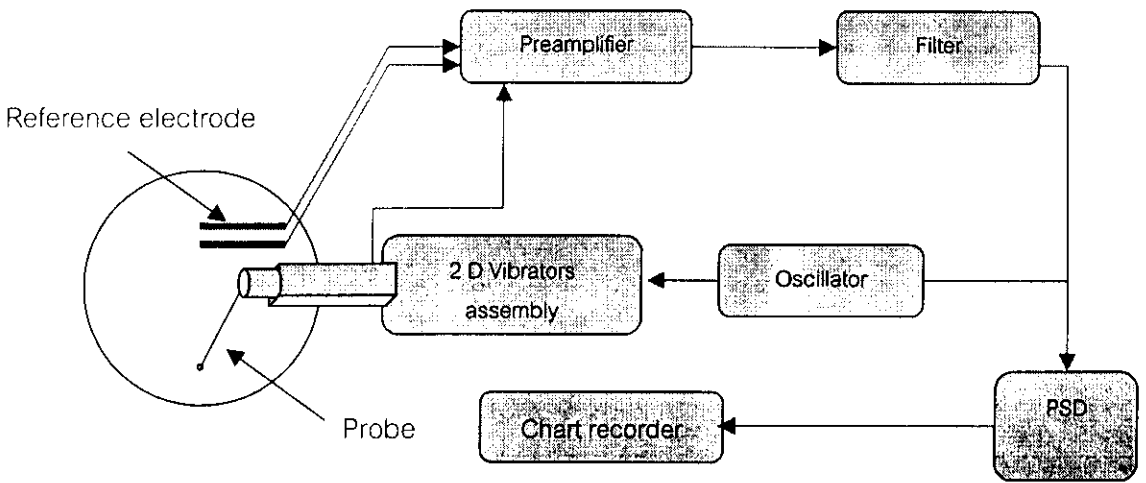
นั่นคือ เมื่อทราบค่าสภาพต้านทานของสารละลาย ρ สามารถคำนวณค่าความหนาแน่นกระแสจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า ΔV ที่วัดระหว่างจุดสองจุดที่ห่างกันเป็นระยะ Δr หากระยะ Δr ยิ่งสั้นมากเท่าใด ค่าความหนาแน่นกระแสที่คำนวณได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากเท่านั้น แต่ค่า ΔV ที่วัดได้จะมีค่าน้อยลงเช่นกัน ดังนั้นระบบที่จะวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะต้องสามารถวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าปริมาณน้อยที่ระยะสั้นๆ ได้ และระบบไวเบรติงโพรบได้ถูกพัฒนาขึ้นมาสำหรับวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าปริมาณน้อยนี้ ข้อจำกัดสำคัญของอิเล็กโทรดที่ใช้อยู่เดิม (Ag/AgCl) คือสัญญาณรบกวน (noise) ของตัวอิเล็กโทรดเองมีค่าสูงกว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าไอออนปริมาณน้อย สัญญาณรบกวนดังกล่าวจะถูกกำหนดด้วยความต้านทานของอิเล็กโทรด ถ้าสามารถลดความต้านทานของอิเล็กโทรดลงสัญญาณรบกวนจะลดลงด้วยระบบไวเบรติงโพรบแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการชุบปลายโพรบด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ ทำให้เกิดสารประกอบแพลทินัมแบลค (platinum black) ที่มีรูพรุน ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของโพรบทำให้ความต้านทานของโพรบลดลงสัญญาณรบกวนจึงลดลงด้วย (Jaffe and Nuccitelli, 1974) ระบบไวเบรติงโพรบนี้สามารถวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าได้ถึงระดับนาโนโวลต์ ซึ่งมีความแตกต่างจากอิเล็กโทรดที่ทำจากเงิน/เงินคลอไรด์ที่มีขีดจำกัดของความต่างศักย์ที่วัดได้อยู่ในระดับไมโครโวลต์ (Nuccitelli, 1983)

2.2.1 หลักการทำงานของระบบไวเบรติงโพรบ

ระบบไวเบรติงโพรบเป็นระบบที่ใช้ศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนที่เกิดขึ้นในระดับของเซลล์และออร์แกนนิซึม โดยที่ระบบนี้สามารถวัดกระแสไฟฟ้าไอออนปริมาณน้อยในระดับไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรได้โดยไม่มีการทำลายเซลล์ที่ต้องการศึกษา เนื่องจากระบบดังกล่าวจะวัดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้ารอบๆ เซลล์ในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้า ระบบไวเบรติงโพรบประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังแสดงในภาพประกอบ 10

ในงานวิจัยนี้ศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากทานตะวันโดยใช้ระบบไวเบรติงโพรบ 2 มิติ นั่นคือระบบนี้สามารถวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่เกิดขึ้นในแนวแกน x และ แนวแกน y ได้พร้อมกัน โดยในแต่ละแนวแกนจะวัดในรูปของความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างจุดสองจุดในสารละลายโดยใช้โพรบอันเดียวซึ่งสั้นกลับไปกลับมาระหว่างจุดสองจุดนี้ การสั้นดังกล่าวเกิดจากการจ่ายสัญญาณรูปไซน์จากออสซิลเลเตอร์ให้เกิดการสั่นของไวเบรเตอร์แอสเซมบลี (vibrator assembly) ความถี่และระยะทางของการสั่นของโพรบสามารถกำหนดได้จากการปรับความถี่ (frequency) และแอมพลิจูด (amplitude) ของออสซิลเลเตอร์

ในการวัดกระแสไฟฟ้าจะให้โพรบสั้นกลับไปกลับมาในระยะทางประมาณ 20-30 ไมโครเมตร โดยมีความถี่ของการสั่นทั้งสองแนวแกนอยู่ในช่วง 250 – 500 เฮิรตซ์ สัญญาณที่วัดได้จากโพรบจะมีลักษณะเป็นสัญญาณรูปซายน์ที่มีความถี่เดียวกับความถี่การสั่นของโพรบ สัญญาณนี้จะถูกขยายและกรองสัญญาณก่อนผ่านมายัง PSD (phase sensitive detectors) พร้อมกับสัญญาณอ้างอิงจากออสซิลเลเตอร์ PSD จะแสดงสัญญาณที่วัดได้จากโพรบ ค่าที่วัดได้จะมากหรือน้อยขึ้นกับการปรับเฟส (phase) ของสัญญาณ ระหว่างสัญญาณซายน์ที่วัดได้กับสัญญาณซายน์จากออสซิลเลเตอร์ เมื่อปรับสัญญาณที่วัดได้และสัญญาณอ้างอิงให้มีเฟสเดียวกัน (inphase) จะได้สัญญาณที่มีค่าสูงสุด นอกจากนี้ PSD ยังสามารถแสดงสัญญาณที่มีเฟสต่างจากสัญญาณที่วัดได้ 90 องศา เรียกสัญญาณนี้ว่า สัญญาณควอดเรเจอร์ (quadrature) สัญญาณนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าสัญญาณที่วัดได้เป็นสัญญาณที่ได้จากการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนหรือไม่ โดยอาศัยหลักการที่ว่าหากปรับเฟสของสัญญาณอินเฟสได้ถูกต้องแล้วสัญญาณควอดเรเจอร์จะมีค่าเป็นศูนย์ตลอดเวลา หากสัญญาณนี้มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 10% ของสัญญาณอินเฟส แสดงว่าสัญญาณที่วัดได้ไม่ได้เกิดจากกระแสไฟฟ้าไอออนแต่เกิดจากสาเหตุอื่น เช่น การชนของโพรบกับผิวของเซลล์ หรือชนสารแขวนลอยในสารละลาย เป็นต้น สัญญาณที่ผ่าน PSD ออกมาถูกเปลี่ยนจากสัญญาณซายน์เป็นสัญญาณกระแสตรงโดยจะถูกเฉลี่ยด้วยค่าคงตัว 3 วินาที สัญญาณที่ออกมาจะถูกบันทึกด้วยเครื่องบันทึกสัญญาณ (chart recorder)



ภาพประกอบ 10 ระบบไวเบรติงโพรบ

2.3 การเตรียมสารละลาย Artificial pond water (APW)

2.3.1 การเตรียมสารละลาย APW pH 6.0

สารละลาย APW ที่ใช้ในการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากและรอบๆ โขนของขนราก ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1.0 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ และ MES (2-Morpholinoethansulfonic acid Monohydrate) 1.0 มิลลิโมลาร์ การปรับ pH ของสารละลายใช้ Tris (Tris - hydroxymethyl aminomrthane) ความเข้มข้น 10⁻⁵ และ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ หยดลงในสารละลายจนกระทั่งสารละลาย APW มี pH 6.00 ± 0.05 (Meyer และ Weisenseel, 1997) โดยสารละลายดังกล่าวมีค่าสภาพนำไฟฟ้า 182 ± 10 (ไมโครโอห์ม-เซนติเมตร)¹ มีสภาพต้านทาน (5.5 ± 0.3) × 10³ โอห์ม-เซนติเมตร สารละลายนี้ใช้ในการเพาะเมล็ด เลี้ยงต้นกล้าและขนราก ตลอดจนศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากและโขนของขนรากในสภาวะปกติ

2.3.2 การเตรียมสารละลาย APW pH 4.00 และ pH 8.00

การศึกษาค่าผลของค่า pH ของสารละลายต่อการเกิดกระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากและกลุ่มของขนรากใช้ APW pH 4.00 ± 0.05 และ 8.00 ± 0.05 ศึกษาเปรียบเทียบกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นใน APW pH 6.00 สารละลายที่มี pH ต่างกันนี้ยังคงมีส่วนประกอบของ โซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นของสารเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 แต่การปรับ pH ของสารละลาย APW pH 4.00 ใช้ MES 1.0 มิลลิโมลาร์ และใช้ Tris 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายดังกล่าวมีค่าสภาพนำไฟฟ้าสารละลาย 177 ± 6 (ไมโครโอห์ม-เซนติเมตร)¹ และสภาพต้านทาน $(5.6 \pm 0.2) \times 10^3$ โอห์ม-เซนติเมตร ในกรณีของ 8.00 ± 0.05 ใช้ MES 10.0 มิลลิโมลาร์ Tris 5 และ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อปรับความสมดุลของกรด เบสให้อยู่ในสภาวะสมดุลไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลาย APW ค่าสภาพนำไฟฟ้าของสารละลาย 167 ± 9 (ไมโครโอห์ม-เซนติเมตร)¹ และสภาพต้านทาน $(6.0 \pm 0.3) \times 10^3$ โอห์ม-เซนติเมตร

2.3.3 การเตรียมสารละลายเพื่อศึกษาค่าผลของไอออน

สารละลาย APW ประกอบด้วยไอออนชนิดเดียวกัน คือ แคลเซียม (Ca^{2+}) โซเดียม (Na^+) โพแทสเซียม (K^+) และคลอไรด์ (Cl^-) ไอออนเหล่านี้เป็นส่วนสำคัญในการเกิดกระแสไฟฟ้าไอออนในพืช ในงานวิจัยนี้ไอออนที่สนใจได้แก่ Ca^{2+} K^+ และ Cl^- เนื่องจากไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่มีผลต่อกระแสไฟฟ้าในขนราก เช่น ในข้าวบาร์เลย์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เพิ่มขึ้นกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่ปลายของขนรากมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่วนความเข้มข้นของ K^+ และ Cl^- ไม่มีผลต่อกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในขนราก (Weisenseel *et al.*, 1979) แต่ในขนรากข้าวสาลี *Triticum aestivum* L. (Gassmann and Schroeder, 1994) พบว่ากระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่ปลายของขนรากปริมาณสูงเนื่องจากการเคลื่อนที่เข้าของ K^+ สูขนราก

ในการศึกษาค่าผลของไอออนต่อการเกิดกระแสไฟฟ้าในขนรากใช้วิธีที่ต่างกันสองวิธี คือ ในกรณีที่ศึกษาค่าผลของ Ca^{2+} และ K^+ ใช้สารละลายที่มีไอออนบวกคือ Ca^{2+} หรือ K^+ เพียงอย่างเดียวโดยรักษาความเข้มข้นของไอออนในสารละลายและค่า pH ให้คงเดิม (ตารางที่ 1) ในกรณีนี้เพื่อศึกษาว่าหากความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ K^+ เพิ่มขึ้นจะมีผลอย่างไร ส่วนในกรณีของ Cl^- ใช้วิธีการแทนที่ไอออน (ion substitution) (Miller, 1989; Troxell, 1989) โดยใช้โซเดียมซัลเฟตแทนโซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมซัลเฟตแทนโพแทสเซียมคลอไรด์และแคลเซียมซัลเฟตแทนแคลเซียมคลอไรด์ (Miller, 1989) (ตารางที่ 1) โดยให้ไอออนหลักมีความเข้มข้นและจำนวนประจุ

เท่ากับสารละลาย APW pH 6.0 กรณีนี้คิดว่าเมื่อไม่มีคลอไรด์จะมีผลอย่างไรต่อกระแสไฟฟ้าในขบวนการ

2.3.4 การเตรียมสารละลาย APW ที่มีอะลูมิเนียม 0.1 มิลลิโมลาร์

pH 4.00 ± 0.05

อะลูมิเนียมเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีมากในธรรมชาติ โดยอะลูมิเนียมจะแตกตัวเป็นไอออนได้ดีที่ pH ต่ำๆ และเป็นพิษต่อพืชหลายชนิดเมื่ออยู่ในดินที่มีสภาพเป็นกรด ซึ่งอะลูมิเนียมในรูปของ Al^{3+} จะมีผลต่อเนื้อเยื่อเจริญของพืช โดยเฉพาะเซลล์บริเวณปลายราก และรากแขนง โดยจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์บริเวณนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการลำเลียงธาตุที่จำเป็นบางชนิด ทำให้เกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่ของไอออน โดยเฉพาะการลำเลียง Ca^{2+} และ Mg^{+} เข้าสู่เซลล์ (Rout *et al.*, 2001) ในขณะที่ Al^{3+} มีผลต่อแขนงการแลกเปลี่ยน K^{+} ในขบวนการข้าวสาลี โดยยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าของ K^{+} (Gassmann and Schroeder, 1994) นอกจากนี้แล้วอะลูมิเนียมจะทำให้เกิดการไหลออกของไอออนลบมากขึ้นในรากข้าวสาลี (Ryan *et al.*, 1997)

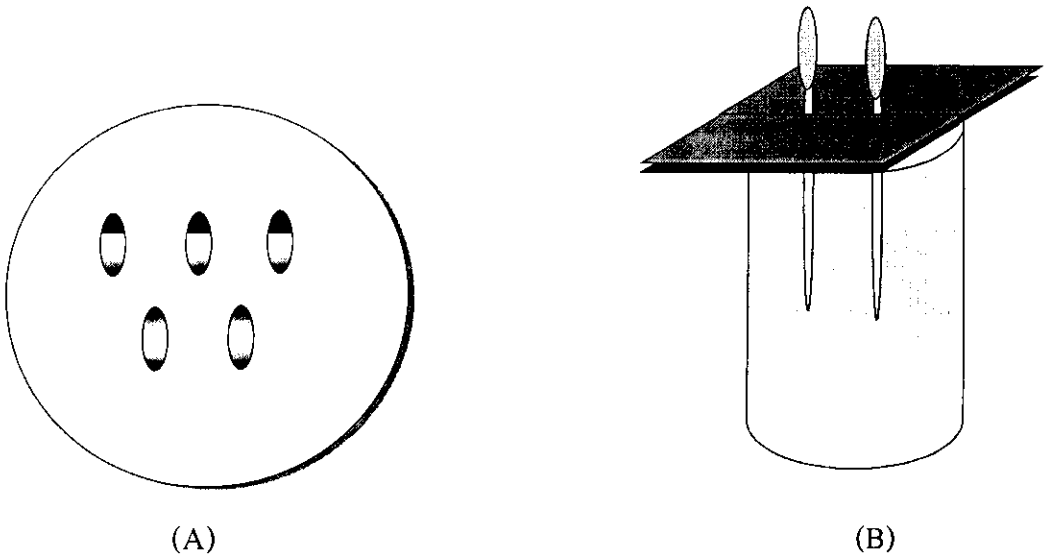
สำหรับการเตรียมสารละลายที่มีอะลูมิเนียมเป็นองค์ประกอบ โดยการเตรียมในสารละลาย APW pH 4.00 ± 0.05 เนื่องจากอะลูมิเนียมสามารถละลายได้ดีในสภาพที่เป็นกรด (Kinraide, 1991) การเตรียม APW pH 4.00 ± 0.05 เตรียมเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.3.2 และเติมอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเตรียมสารละลายเพื่อศึกษาผลของไอออน

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลาย (มิลลิโมลาร์)				
	APW ปกติ	สารละลาย $CaCl_2$	สารละลาย KCl	สารละลายที่ไม่มี Cl^{-}	APW pH 4.00 เติม $AlCl_3$
โซเดียมคลอไรด์	1.0	-	-	-	1.0
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.1	-	1.3	-	0.1
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	0.65	-	-	0.1
MES	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
โซเดียมซัลเฟต	-	-	-	0.5	-
โพแทสเซียมซัลเฟต	-	-	-	0.05	-
แคลเซียมซัลเฟต	-	-	-	0.1	-
อะลูมิเนียมคลอไรด์	-	-	-	-	0.1
ปรับ pH 6.00 ± 0.05 ด้วย Tris 10.5 และ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ					

2.4 การเพาะเมล็ดทานตะวัน

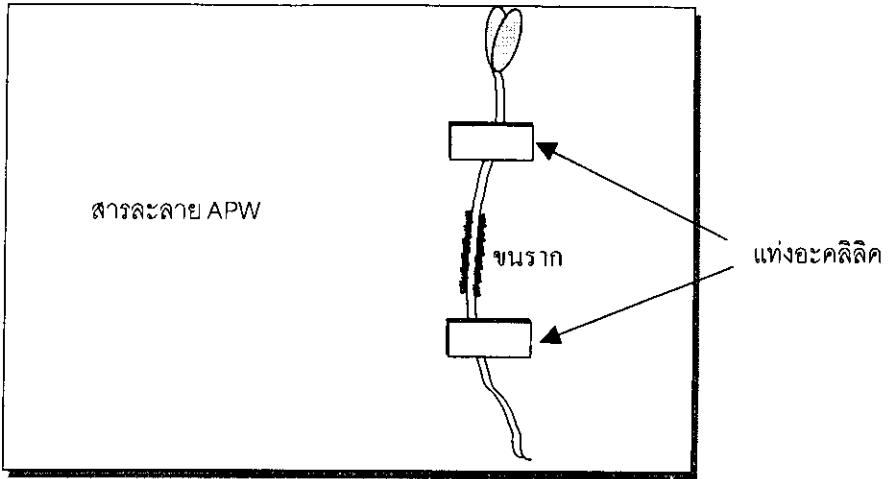
นำเมล็ดทานตะวัน (แปซิฟิก - 33) จำนวน 10 เมล็ดต่อการเพาะเมล็ดต่อหนึ่งครั้ง มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยไฮเตอร์ซึ่งมีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) 6 % (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) โดยแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 2 - 3 ครั้งและแช่ทิ้งไว้ในน้ำเป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำมาเพาะในจานเพาะเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.00 ± 0.05 เซนติเมตร สูง 1.00 ± 0.05 เซนติเมตร ภายในจะบรรจุด้วยกระดาษทิชชูที่ชุ่มไปด้วยสารละลาย APW pH 6.0 เรียงเมล็ดดังแสดงในภาพประกอบ 11A ปิดทับด้วยกระดาษทิชชูที่ชุ่มด้วย APW อีกหนึ่งชั้นเพื่อให้ความชื้นแก่เมล็ดและยัดเมล็ดไม่ให้เกิดการเคลื่อนที่ นำไปวางในตู้มืดที่มีอุณหภูมิภายในตู้ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยวางในแนวตั้งเพื่อให้รากเมล็ดทานตะวันงอกในทิศทางเดียวกับทิศทางแรงโน้มถ่วงของโลก ทิ้งไว้ 2 วัน จะได้ต้นกล้าที่มีรากยาวประมาณ 2.00 - 3.00 เซนติเมตร จากนั้นนำต้นกล้าที่ได้มาทำความสะอาดส่วนที่เป็นรากโดยเช็ดเบา ๆ ด้วยทิชชูที่ชุ่มด้วยน้ำเพื่อเอาทิชชูที่ติดกับส่วนรากออกก่อนนำมาเลี้ยงขนราก โดยนำต้นกล้าที่มีความยาวรากดังกล่าว มาตรึงในแนวตั้งโดยใช้แผ่นอะคริลิก ขนาด $2.50 \times 4.00 \times 0.20$ เซนติเมตร (กว้าง \times ยาว \times สูง) สองอันประกบกัน (ภาพประกอบ 11B) โดยให้รากแช่อยู่ในสารละลาย APW pH 6.0 หลังจากนั้นนำไปวางในตู้มืดเป็นเวลา 15-17 ชั่วโมง รากจะยาวเพิ่มขึ้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โขนของขนรากจะอยู่ถัดจากส่วนที่เป็นลำต้นประมาณ 1.5 เซนติเมตร ขนรากที่มีความยาวอยู่ในช่วง 500 - 800 ไมโครเมตร



ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (A) การวางเมล็ดในงานเพาะเชื้อ
(B) การเพาะเลี้ยงต้นกล้าในสารละลาย APW pH 6.00 ± 0.05

2.5 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

นำต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงได้ในหัวข้อ 2.4 มาวางในภาชนะสี่เหลี่ยมขนาด $6.9 \times 9.3 \times 1.0$ ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง \times ยาว \times สูง) ตรึงตัวอย่างให้อยู่กับที่ด้วยอะคลิลิกที่ยึดติดกับภาชนะด้วยซิลิโคนกรีซ โดยยึดส่วนที่เป็นลำต้นลำต้นของต้นกล้าที่อยู่เหนือบริเวณขนรากและส่วนที่เป็นรากที่อยู่ใต้ขนราก (ภาพประกอบ 12) จากนั้นล้างต้นกล้าด้วยสารละลายที่ใช้เป็นสารละลายภายนอกเซลล์ที่ต้องการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออน 2 ครั้งโดยเติมสารละลายที่ต้องการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนด้วยปริมาตร 45 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลายออก เพื่อล้างเอาสารละลายและสิ่งอื่นๆ ที่อาจจะติดมากับต้นกล้าในขณะเพาะเลี้ยงออก แล้วจึงเติมสารละลายที่ต้องการศึกษาปริมาตร 45 มิลลิลิตร จนท่วมต้นกล้า จากนั้นจึงเริ่มกระบวนการวัดกระแสไฟฟ้า



ภาพประกอบ 12 ต้นกล้าทานตะวันที่ถูกตรึงไว้ในภาชนะสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

2.6 การเตรียมโพรบสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

โพรบปลายแหลมที่ใช้ทำด้วยเสตนเลสและมีฉนวนไฟฟ้าหุ้มตลอดความยาวของโพรบ (8 เซนติเมตร) ยกเว้นส่วนที่เป็นปลายแหลมซึ่งมีความยาว 5 ไมโครเมตร ตัดโพรบให้เหลือความยาวเพียง 1.5 – 1.7 เซนติเมตร และนำไปต่อเข้ากับไวเบรเตอร์แอสซ็อมบลี (ภาพประกอบ 13A) ในการชุบโพรบประกอบด้วยการชุบด้วยทองและชุบด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ (platinum chloride) โดยเริ่มจากการล้างโพรบด้วยอะซิโตนเพื่อกำจัดไขมันและสิ่งสกปรก (ภาพประกอบ 13B) จากนั้นชุบด้วยสารละลายทองไซยาไนด์ 0.2% (น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยผ่านกระแสไฟฟ้า -0.10 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 5 นาที (ภาพประกอบ 13B) ต่อจากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้า -0.20 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 3 นาที (ภาพประกอบ 13C) เมื่อสองดูปลายโพรบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท จะเห็นทรงกลมทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำมาชุบด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเลดอะซิเตต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแพลทินัมคลอไรด์ 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยผ่านกระแสไฟฟ้า -0.40 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 5 นาที และผ่านกระแสไฟฟ้า -0.60 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 นาที (ภาพประกอบ 13D) ขั้นสุดท้ายผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 1.0 มิลลิแอมแปร์ เป็นช่วงสั้นๆ ครั้งละ 0.5 วินาที ประมาณ 10 ครั้ง (ภาพประกอบ 13E) หลังจากนั้นทำการทดสอบค่าความจุของโพรบโดยใช้ระบบตรวจสอบในชุดอุปกรณ์ไวเบรติงโพรบ ค่าความจุจะต้องไม่น้อยกว่า 2 นาโนฟารัด ถ้าค่าความจุมากขึ้นที่ผิวจะมากด้วย ซึ่งหมายความว่าอิมพีแดนซ์ (impedance) ของโพรบจะน้อย สัญญาณรบกวนจากโพรบซึ่งแปรผันตรงกับอิมพีแดนซ์ก็จะน้อยตามไปด้วยโพรบจึงสามารถใช้ได้

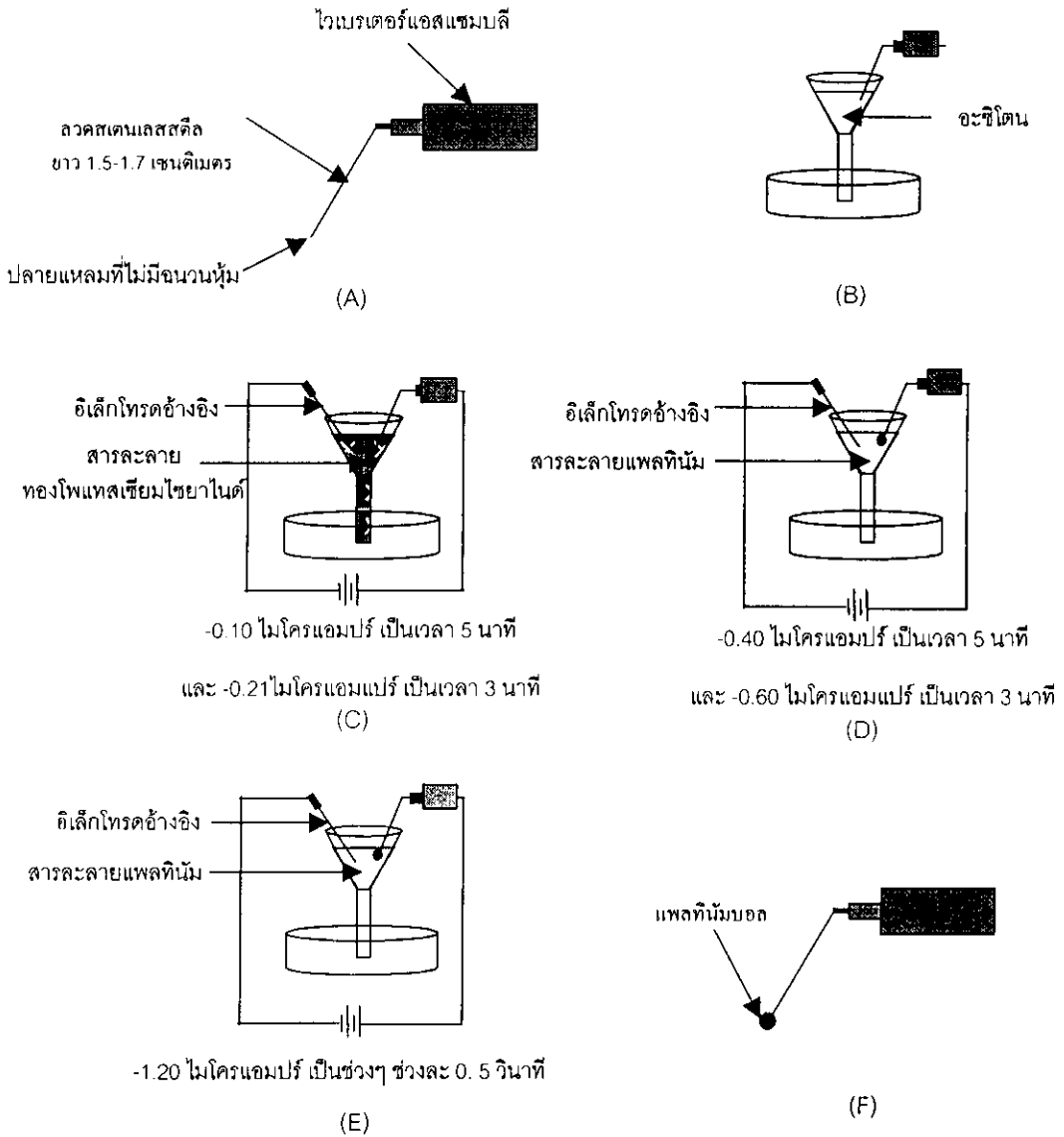
เมื่อครบขั้นตอนดังกล่าวจะได้ปลายโพรบมีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 13F)

2.7 การเตรียมไมโครอิเล็กโทรดปรับเทียบ

ในการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนด้วยโวลเทอโรแกรมก่อนที่จะทำการทดลองวัดกระแสไฟฟ้าไอออนทุกครั้งจะต้องปรับเทียบโพรบเพื่อใช้ในการพิจารณาทิศทางของกระแสไฟฟ้าและคำนวณขนาดของกระแสไฟฟ้าจากความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากกราฟ การปรับเทียบทำโดยจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ทราบค่าผ่านไมโครอิเล็กโทรดปรับเทียบแล้ววัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดจากกระแสไฟฟ้านั้น ซึ่งไมโครอิเล็กโทรดที่ใช้จ่ายกระแสไฟฟ้าที่รู้ค่านี้ทำจากเงิน/เงินคลอไรด์ อยู่ในหลอดแก้วคาปิลารีปลายแหลมที่มีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ (ภาพประกอบ 14) โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

2.7.1 การเตรียมลวดเงิน

ใช้ลวดเงินที่มีเทพลอนหุ้มเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.30 ± 0.05 มิลลิเมตร ยาว 10.00 \pm 0.05 เซนติเมตร ลอกเทพลอนออกจากปลายด้านหนึ่งยาว 3.00 ± 0.05 เซนติเมตร ลวดที่ลอกเทพลอนออกจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ± 0.05 มิลลิเมตร ขัดส่วนที่ลอกเทพลอนออกด้วยกระดาษทรายและทำความสะอาดด้วยอะซิโตนเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกและไขมันออกก่อนที่จะนำไปชุบชั้นของเงินคลอไรด์บนผิวของลวดเงิน ชุบลวดเงิน 5 เส้นพร้อมๆ กันในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ในชุดอุปกรณ์ดังแสดงในภาพประกอบ 15 โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 1.0 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้การเกาะจับของชั้นเงินคลอไรด์เข้าสู่ภาวะสมดุล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำลวดเงิน/เงินคลอไรด์ที่ได้มาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพสมดุลของชั้นเงินคลอไรด์ที่เคลือบบนผิวของลวดเงิน

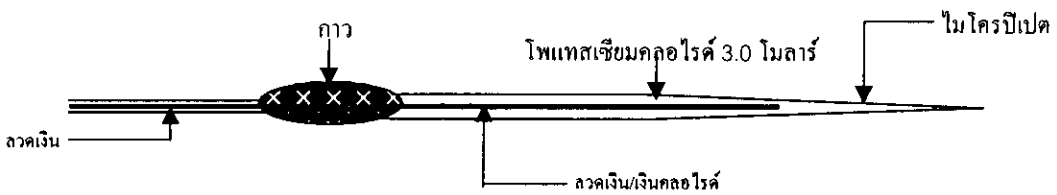


ภาพประกอบ 13 ขั้นตอนการชุบโพรบที่วัดกระแสไฟฟ้าไอออน (จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)

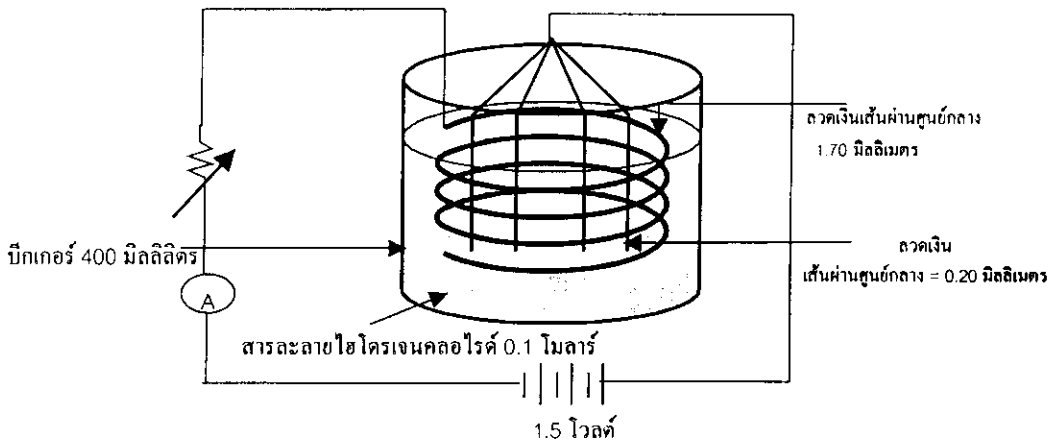
- (A) ลักษณะของโพรบก่อนผ่านขั้นตอนชุบเมื่อมองทางด้านข้าง
- (B) ความสะอาดโพรบด้วยอะซิโตน
- (C) ขั้นตอนการชุบโพรบด้วยสารละลายทองโพแทสเซียมไดโครเมต
- (D) และ (E) ชุบด้วยสารละลายเพอร์มันังเกตคลอไรด์
- (F) ลักษณะของโพรบที่ผ่านการชุบ

2.7.2 การเตรียมอิเล็กโทรดปลายแหลม

นำคาปิลารีแก้วปลายแหลมยาว 5.00 ± 0.05 เซนติเมตรมาต้มในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 3.0 โมลาร์ (ภาพประกอบ 16) เพื่อให้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้าไปแทนที่อากาศในหลอดคาปิลารีปลายแหลม ทั้งหลอดคาปิลารีปลายแหลมที่มีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บรรจุอยู่ไว้ให้เย็น นำคาปิลารีที่ได้มาเตรียมไมโครอิเล็กโทรดเปรียบเทียบ โดยนำลวดเงิน/เงินคลอไรด์ใส่ในคาปิลารีที่เตรียมได้ จากนั้นปิดด้วยกาวเพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายภายในไหลออกมายังภายนอก

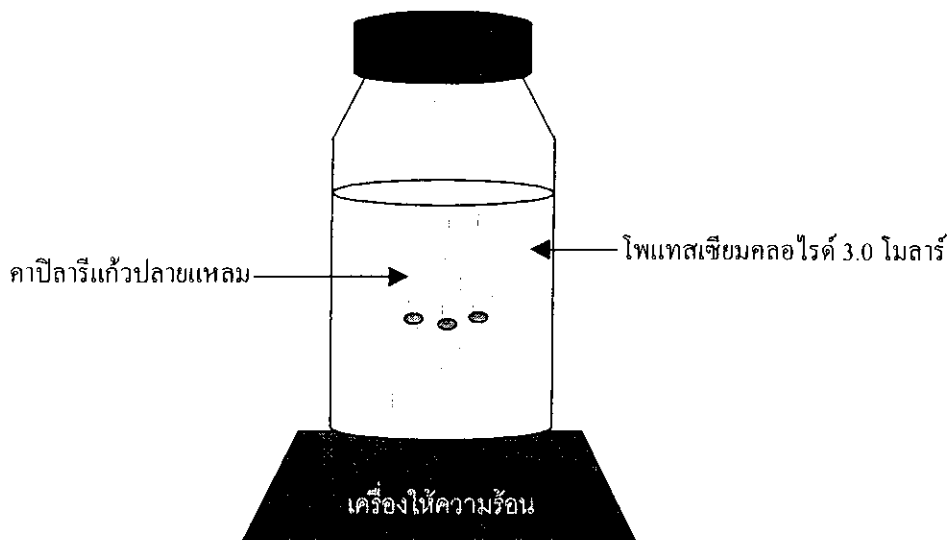


ภาพประกอบ 14 ไมโครอิเล็กโทรดสำหรับเปรียบเทียบ (จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)



ภาพประกอบ 15 การจัดชุดอุปกรณ์สำหรับชุบไมโครอิเล็กโทรด

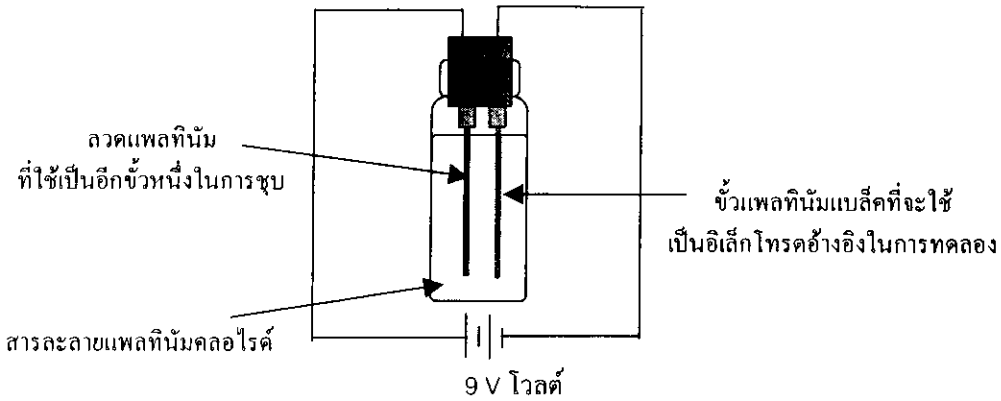
(จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)



ภาพประกอบ 16 การเตรียมไมโครอิเล็กโทรดปลายแหลมโดยต้มในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (จุฬารัตน์, 2544)

2.8 การเตรียมอิเล็กโทรดอ้างอิง

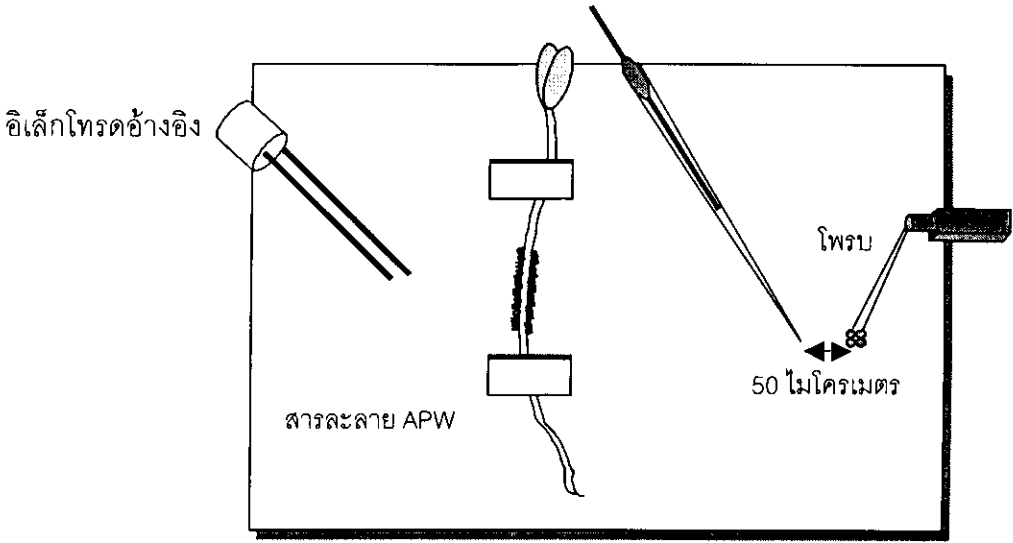
ใช้ลวดแพลทินัมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 ± 0.05 มิลลิเมตร 3 เส้นยาวเส้นละ 4.00 ± 0.05 เซนติเมตร ทำความสะอาดด้วยอะซิโตน และชุบในสารละลายแพลทินัมคลอไรด์โดยใช้ลวดแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าหนึ่งเส้น อีกสองเส้นชุบด้วยสารละลายแพลทินัมคลอไรด์โดยทำการชุบครั้งละเส้น โดยให้ความต่างศักย์ ไฟฟ้า 9 โวลต์ เป็นเวลา 10 วินาที โดยเส้นที่ชุบเป็นขั้วลบ (ภาพประกอบ 17) จะได้ลวดแพลทินัมแบล็คจำนวนสองเส้นสำหรับใช้เป็นอิเล็กโทรดอ้างอิง



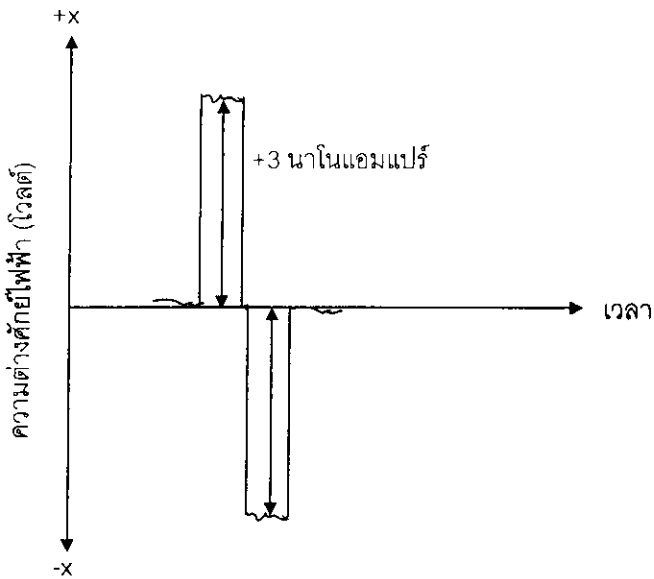
ภาพประกอบ 17 การเตรียมอิเล็กโทรดอ้างอิง (จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)

2.9 การปรับเทียบโพรม

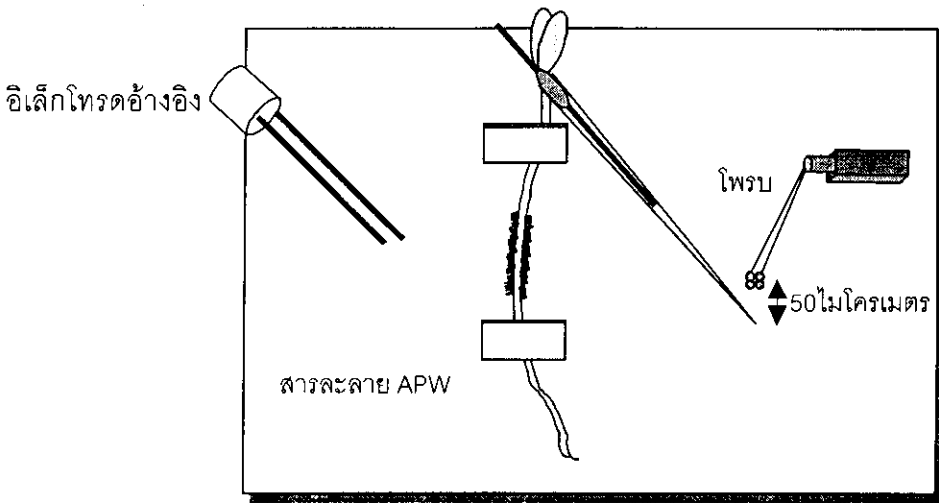
ก่อนจะทำการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในชนรากและในรากทานตะวัน จะต้องทำการปรับเทียบก่อนโดยการวัดสัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าจากกระแสไฟฟ้าที่ทราบค่า ในการวัดกระแสไฟฟ้าใช้ระบบไวเบรติงโพรมที่สั้นได้ในสองแนวแกนพร้อมกัน คือ แนวแกน x และแนวแกน y โดยทำการปรับเทียบทีละแนวแกน การปรับเทียบจะปรับเทียบแนวแกนใดก่อนก็ได้ การปรับเทียบโพรมทำสองครั้งคือ ก่อนจะการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่ปลายของชนรากและก่อนที่จะวัดกระแสไฟฟ้าที่โคนของชนราก สำหรับการปรับเทียบก่อนที่จะวัดกระแสไฟฟ้าที่ปลายของชนราก เริ่มจากการปรับเทียบในแนวแกน x โดยเลื่อนโพรมและไมโครอิเล็กโทรดปรับเทียบลงในสารละลายให้อยู่ในระนาบเดียวกัน และมีระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับโพรม 50 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 18) จากนั้นจ่ายกระแสไฟฟ้า +3 นาโนแอมแปร์เป็นเวลา 1 นาที และผ่านกระแสไฟฟ้า -3 นาโนแอมแปร์เป็นเวลา 1 นาที โพรมจะวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพประกอบ 19) ในกรณีปรับเทียบโพรมในแนวแกน y (ภาพประกอบ 20) ขั้นตอนการปรับเทียบเช่นเดียวกับการปรับเทียบในแนวแกน x การจ่ายกระแสไฟฟ้าทั้งบวกและลบเพื่อเปรียบเทียบทิศทางของกระแสไฟฟ้ากับค่าศักย์ที่วัดได้โดยโพรม (ภาพประกอบ 21 และ 22) ส่วนการปรับเทียบครั้งที่สองจะทำการปรับเทียบก่อนวัดกระแสไฟฟ้ารอบโคนของชนราก ขั้นตอนการปรับเทียบทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วแต่ระยะห่างระหว่างโพรมกับไมโครอิเล็กโทรดเพิ่มเป็น 150 ไมโครเมตร และผ่านกระแสไฟฟ้า ± 30 นาโนแอมแปร์



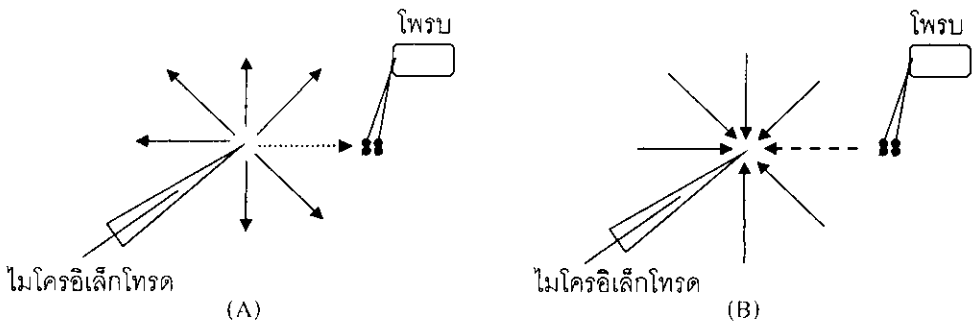
ภาพประกอบ 18 การปรับเทียบโพรบในแนวแกน x โดยโพรบจะสั้นทั้งในแนวแกน x และ y



ภาพประกอบ 19 ลักษณะสัญญาณความต่างศักย์ที่ได้จากการปรับเทียบในแนวแกน x

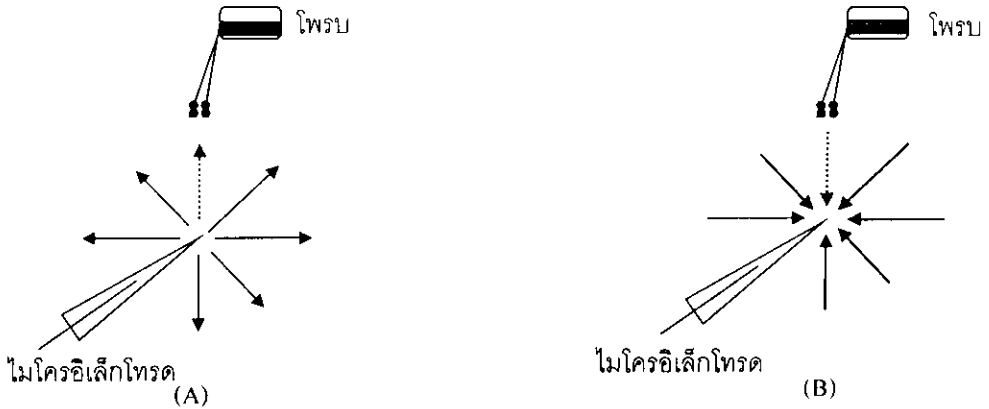


ภาพประกอบ 20 การเปรียบเทียบไฟรบในแนวแกน y โดยไฟรบจะสั้นทั้งในแนวแกน x และ y



หมายเหตุ ทิศทางของกระแสไฟฟ้าตามทิศทางของลูกศร $-x \longleftrightarrow +x$

ภาพประกอบ 21 ทิศทางของกระแสไฟฟ้าเมื่อปรับเทียบในแนวแกน x (A) ไมโครอเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าในทิศ $+x$ (ออกจากไมโครอเล็กโทรด) กระแสไฟฟ้าผ่านจากซ้ายไปขวาของไฟรบ (B) ไมโครอเล็กโทรดให้กระแสไฟฟ้าในทิศ $-x$ (เข้าสู่ไมโครอเล็กโทรด) กระแสไฟฟ้าผ่านจากขวาไปซ้ายของไฟรบ ทิศทางกระแสไฟฟ้าพิจารณาจากทิศของลูกศร (จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)



หมายเหตุ ทิศทางของกระแสไฟฟ้าตามทิศทางของลูกศร

+y
-y

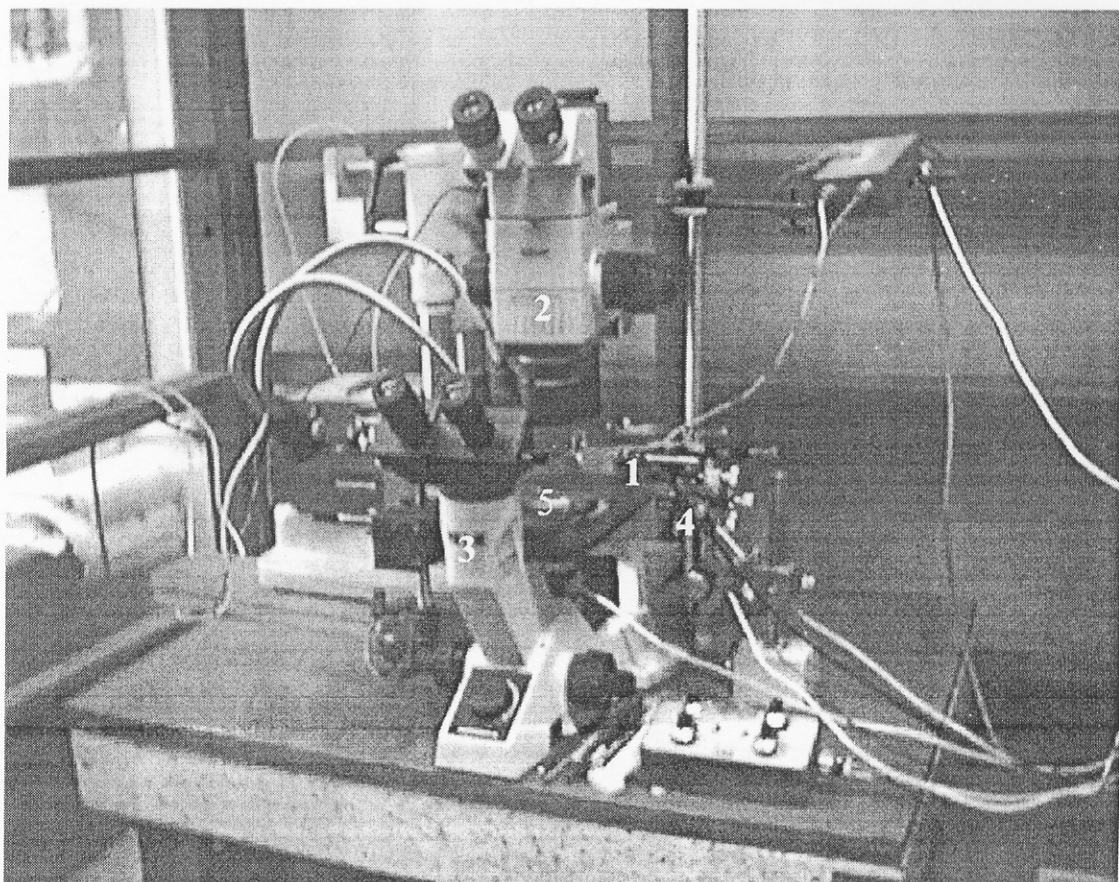
ภาพประกอบ 22 ทิศทางของกระแสไฟฟ้าเมื่อปรับเทียบในแนวแกน y (A) ไมโครอิเล็กทรอนิกส์ให้กระแสไฟฟ้าในทิศ $+y$ (ออกจากไมโครอิเล็กทรอนิกส์) กระแสไฟผ่านจากด้านล่างด้านบนของโพรบ (B) ไมโครอิเล็กทรอนิกส์ให้กระแสไฟฟ้าในทิศ $-y$ (เข้าสู่ไมโครอิเล็กทรอนิกส์) กระแสไฟผ่านจากด้านบนลงด้านล่างของโพรบทิศทางกระแสไฟฟ้าพิจารณาจากทิศของลูกศร (จุฬารัตน์ ม่วงดิษฐ์, 2544)

2.10 การวัดกระแสไฟฟ้าไอออน

นำภาชนะที่มีต้นกล้าทานตะวันที่เตรียมไว้แล้ว (ข้อ 2.5) มาวางบนฐานกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (ภาพประกอบ 23-3) จากนั้นปรับโฟกัสโดยให้เห็นขนรากที่ต้องการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนแล้วเลื่อนอิเล็กทรอนิกส์อ้างอิงลงในสารละลายห่างจากต้นกล้า 2 เซนติเมตร เริ่มทำการปรับเทียบโพรบโดยเลื่อนโพรบและไมโครอิเล็กทรอนิกส์ปรับเทียบให้อยู่ในระนาบเดียวกับขนรากแล้วทำการปรับเทียบดังที่ได้กล่าวมาในหัวข้อ 2.9 หลังจากนั้นนำไมโครอิเล็กทรอนิกส์ปรับเทียบออก เหลือเพียงอิเล็กทรอนิกส์อ้างอิงกับโพรบเท่านั้น เริ่มวัดกระแสไฟฟ้าไอออนที่ปลายของขนราก โดยเลื่อนโพรบไว้ที่ตำแหน่งอ้างอิงห่างจากปลายของขนราก 2000 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 24) เป็นเวลา

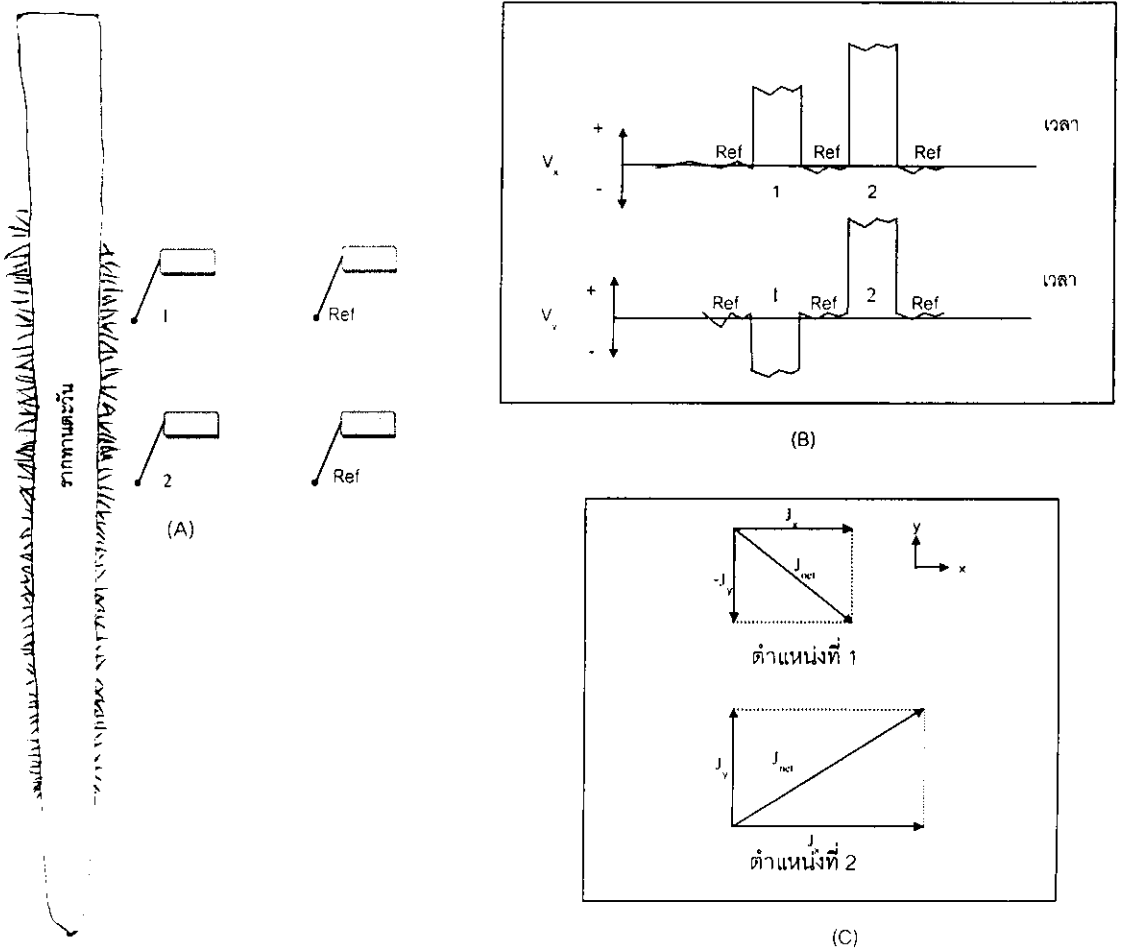
30 วินาที ตำแหน่งนี้จะไม่มีกระแสไฟฟ้า ต่อมาเลื่อนโพรบเข้าใกล้ปลายของชนรากโดยให้โพรบอยู่ห่างจากปลายของชนรากเป็นระยะ 50 ไมโครเมตรเป็นเวลา 30 วินาที วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จากนั้นเลื่อนโพรบกลับมาที่ตำแหน่งอ้างอิง

ในขณะวัดกระแสไฟฟ้าในชนรากต้องมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (ภาพประกอบ 23 - 2) เพื่อกำหนดตำแหน่งของโพรบเนื่องจากสามารถมองเห็นระยะห่างระหว่างปลายของชนรากกับโพรบได้ชัดเจนแต่จะเห็นภาพเป็นบริเวณไม่มากนัก ดังนั้นการเลื่อนโพรบเข้า-ออกระหว่างตำแหน่งวัดและอ้างอิงจะมองผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่อยู่เนื่องจากสามารถมองภาพได้ในขอบเขตที่กว้างกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท ส่วนในกรณีที่วัดกระแสไฟฟ้ารอบโคนของชนรากจะวัดที่ระยะห่างจากแนวของปลายของชนราก 150 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 24) เพื่อเปรียบเทียบทิศทางของกระแสไฟฟ้าที่ปลายชนรากกับรอบโคนของชนรากว่ามีรูปแบบของกระแสไฟฟ้าเหมือนหรือต่างกันอย่างไร และเปรียบเทียบกระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากปลายชนรากและที่วัดห่างออกไปกระแสไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร นำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น



ภาพประกอบ 23 แสดงอุปกรณ์ของระบบไวยเบรติงไฟรบ

1. ไฟรบ
2. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
3. กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท
4. Manipulator
5. ตัวอย่างที่วัด



ภาพประกอบ 24 แสดงการวัดกระแสไฟฟ้าไอออน (A) ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 โดยโพรบอยู่ที่ตำแหน่งอ้างอิงที่ระยะ 2000 ไมโครเมตร ก่อนเลื่อนมาวัดที่ตำแหน่งปลายขนาน (50 ไมโครเมตร) (B) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 (C) ตัวอย่างเขียนแผนภาพการรวมกันแบบเวกเตอร์ของกระแสไฟฟ้าไอออนในแนวแกน x และ y

2.11 การคำนวณผล

จากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้สามารถนำมาคำนวณหาค่ากระแสไฟฟ้า (ความหนาแน่นกระแส) โดยเทียบจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากสัญญาณเปรียบเทียบ (ข้อ 2.9) ในกรณีที่วัดกระแสไฟฟ้าที่ปลายของขนากรจะเปรียบเทียบโพรบทั้งสองแนวแกนคือ แนวแกน x และแนวแกน y ที่ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดเปรียบเทียบกับโพรบ 50 ไมโครเมตร (r) และผ่านกระแส (I) ± 3.0 นาโนแอมแปร์ และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการเปรียบเทียบคือ V_{xx} และ V_{yy} ตามดังนั้นความหนาแน่นกระแสสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$J = \frac{I}{4\pi r^2} \quad (6)$$

ดังนั้น

$$J = \frac{\pm 3nA}{4\pi(50 \times 10^{-4})^2 \text{ cm}^2} \\ = 9.54 \mu\text{A/cm}^2$$


ให้ความต่างศักย์ที่วัดได้จากปลายของขนากรคือ V_x และ V_y และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการเปรียบเทียบคือ V_{xx} และ V_{yy} ตามลำดับ ดังนั้นความหนาแน่นกระแสทั้งสองแนวแกนสามารถคำนวณได้จาก

$$J_x = \frac{V_x}{V_{xx}} \times 9.54 \mu\text{A/cm}^2$$

และ

$$J_y = \frac{V_y}{V_{yy}} \times 9.54 \mu\text{A/cm}^2$$

เมื่อ J_x และ J_y คือความหนาแน่นกระแสในแนวแกน x และ y ตามลำดับ

เนื่องจากสันของโพรบในแนวแกน x ไม่ได้อยู่แนวซ้าย - ขวา แต่จะทำมุมเอียงบน - ล่างเมื่อเทียบกับแนวแกน x () ดังนั้นในขณะที่เปรียบเทียบในแนวแกน y ของสัญญาณ x ซึ่งควรจะมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็นศูนย์จะวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า V_x ได้ด้วย นั่นคือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากกรากในแนวแกน x (V_x) จะมีส่วนที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าในแนวแกน y รวมอยู่ส่วนหนึ่ง ดังนั้นก่อนจะคำนวณความหนาแน่นกระแสในแนวแกน x จะต้องหักเอาส่วนเกินดังกล่าวออกก่อน โดยส่วนเกินดังกล่าวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงสัญญาณเปรียบเทียบและสัญญาณที่วัดได้จากแนวแกน y นั่นคือส่วนเกินนี้หาได้จาก

$$\left(\frac{V_x}{V_{yy}}\right)V_y \quad (7)$$

ดังนั้นความต่างศักย์ไฟฟ้าสุทธิในแนวแกน x (V_{x1})

$$V_{x1} = V_x - \left(\frac{V_x}{V_{yy}}\right)V_y \quad (8)$$

ส่วนทิศของกระแสไฟฟ้าหาได้จากการพิจารณาค่าบวกหรือค่าลบของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้เทียบกับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ได้จากการปรับเทียบ ในงานวิจัยนี้พบว่า

ในแนวแกน x กระแสไฟฟ้า $+J_x$ (\rightarrow) มีทิศ $+x$ จะให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า $+V_x$

$-J_x$ (\leftarrow) มีทิศ $-x$ จะให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า $-V_x$

ในแนวแกน y กระแสไฟฟ้า $+J_y$ (\uparrow) มีทิศ $+y$ จะให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า $+V_y$

$-J_y$ (\downarrow) มีทิศ $-y$ จะให้ความต่างศักย์ไฟฟ้า $-V_y$

ตัวอย่างการพิจารณา

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากการปรับเทียบในแนวแกน x

$$V_{xx} = 2.5 \text{ โวลต์}$$

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากการปรับเทียบในแนวแกน y

$$V_{yy} = 3.3 \text{ โวลต์}$$

$$V_x = -0.50 \text{ โวลต์}$$

ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จากปลายของขั้วในสารละลาย APW pH 6.0

$$V_x = -0.090 \text{ โวลต์}$$

$$V_y = 0.050 \text{ โวลต์}$$

ดังนั้นความหนาแน่นกระแสในแนวแกน y

$$J_y = \frac{V_y}{V_{yy}} \times 9.54 \mu A/cm^2 = \frac{0.050}{3.3} \times 9.54 = 0.14 \mu A/cm^2$$

และเนื่องจาก V_y เป็นบวก J_y มีทิศ $+y$

ความหนาแน่นกระแสในแนวแกน x

ขณะปรับเทียบในแนวแกน y ของสัญญาณ x วัดความต่างศักย์ไฟฟ้าในแนวแกน x (V_x) ได้ -0.50 โวลต์ ดังนั้นความต่างศักย์ไฟฟ้าในแนวแกน x ที่ได้จากการปรับเทียบในแนวแกน y คือ

$$V_y \left(\frac{V_x}{V_{yy}} \right) = (0.050) \left(\frac{-0.50}{3.3} \right) = -0.010 \text{ โวลต์}$$

นั่นคือความต่างศักย์ไฟฟ้าสุทธิในแนวแกน x (V_{x1})

$$\begin{aligned} V_{x1} &= V_x - V_y \left(\frac{V_x}{V_{yy}} \right) = -0.090 - (-0.010) = -0.080 \text{ โวลต์} \\ &= -0.080 \text{ โวลต์} \end{aligned}$$

ดังนั้นความหนาแน่นกระแสในแนวแกน x

$$\begin{aligned} J_x &= \frac{V_{x1}}{V_{xx}} \times 9.54 \\ &= \frac{-0.08}{2.5} \times 9.54 \\ &= -0.31 \mu\text{A/cm}^2 \end{aligned}$$

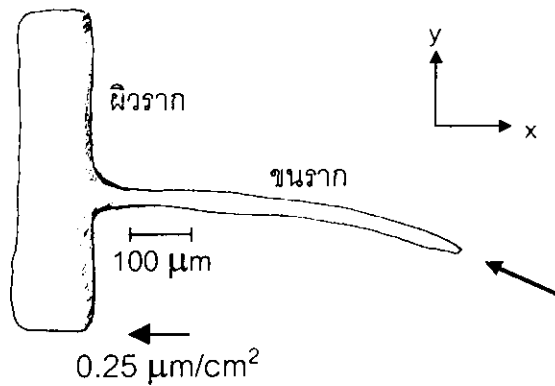
และเนื่องจากทิศของความหนาแน่นกระแสพิจารณาจากทิศของความต่างศักย์ V_x ซึ่งมีค่าลบ นั่นคือ J_x มีทิศ $-x$

ดังนั้น ความหนาแน่นกระแส J_x เท่ากับ $0.31 \mu\text{A/cm}^2$ มีทิศทางในทิศ $-x$ และความหนาแน่นกระแส J_y เท่ากับ $0.14 \mu\text{A/cm}^2$ มีทิศทางในทิศ $+y$

สำหรับความหนาแน่นกระแสที่ปลายของขนรากเป็นผลรวมของความหนาแน่นกระแสในสองแนวแกน โดยรวมกันแบบเวกเตอร์ ดังนี้

$$\begin{aligned} J_{total} &= \sqrt{J_x^2 + J_y^2} \\ &= \sqrt{(0.31)^2 + (0.14)^2} \\ &= 0.35 \text{ } \mu\text{A/cm}^2 \end{aligned}$$

ส่วนทิศของกระแสไฟฟ้าพิจารณาตามทิศกระแสไฟฟ้าในแนวแกน x โดยเปรียบเทียบกับทิศการเลื่อนโพรมบเข้า - ออก ระหว่างตำแหน่งวัดกับตำแหน่งอ้างอิงในแนวแกน x ดังนั้นความหนาแน่นกระแสที่ปลายของขนราก คือ $0.35 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ มีทิศเข้า - x โดยสามารถเขียนแผนภาพการรวมกันแบบเวกเตอร์ (ภาพประกอบ 24(C)) เมื่อเปรียบเทียบกับกรวางตัวอย่างในขณะทำการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนจะมีทิศเข้าสู่ปลายของขนราก (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 ตัวอย่างทิศกระแสไฟฟ้าที่ปลายขนราก

นอกจากวัดกระแสไฟฟ้าที่ปลายของขนรากแล้วยังได้วัดกระแสไฟฟ้ารอบโคนขนรากที่ระยะห่าง 150 ไมโครเมตรจากแนวปลายขนรากเพื่อเปรียบเทียบทิศของกระแสไฟฟ้ารอบโคนขนรากกับปลายขนราก โดยวัดบริเวณรอบโคนที่ตำแหน่งห่างจากปลายของขนรากออกไปและตลอดทั้งโคนของขนรากและวิธีการคำนวณคำนวณหาความหนาแน่นกระแสและการพิจารณาทิศทางของ

กระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับในตัวอย่างการคำนวณข้างต้น แต่ความหนาแน่นกระแสที่ได้จากการปรับเทียบเท่ากับ 10.60 ไมโครแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร

2.12 การศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนราก และรอบ โชนขนรากทานตะวัน ในสภาวะปกติ

ในกรณีสภาวะปกติทำการวัดกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 6.00 ± 0.05 เพื่อศึกษาว่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีขนาดและทิศทางอย่างไร โดยนำต้นกล้าที่มีขนรากทานตะวันที่เลี้ยงในสารละลายที่สภาวะปกติมาตั้งในภาชนะรูปสี่เหลี่ยมดังหัวข้อ 2.5 เดิมสารละลาย APW จนท่วมต้นกล้า ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาทีเพื่อปรับสภาพของต้นกล้าในสภาวะสิ่งแวดล้อมใหม่ ก่อนเริ่มทำการทดลองต้องทำการปรับเทียบโพรบตามหัวข้อที่ 2.9 หลังจากนั้นนำค่าศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้ในแต่ละขนราก และที่ตำแหน่งต่างรอบโชนขนรากเพื่อเปรียบเทียบกับกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากขนราก นำค่าความต่างศักย์ที่วัดได้มาหาค่ากระแสไฟฟ้าไอออนตามหัวข้อ 2.11

2.13 การศึกษากระแสไฟฟ้าในขนราก และรอบโชนขนรากทานตะวันเมื่อเปลี่ยน pH

ศึกษากระแสไฟฟ้าในขนราก และรอบโชนขนรากทานตะวันเมื่อ pH ของสารละลาย APW เปลี่ยนไปว่ามีผลต่อกระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากและรอบโชนกลุ่มของขนรากอย่างไร จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของสารละลายภายนอกมีผลต่อกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในรากพืชกล่าวคือเมื่อค่า pH ลดลงปริมาณกระแสไฟฟ้ามักมีทิศเข้าสู่รากเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ pH เพิ่มขึ้นกระแสไฟฟ้ามักลดลง (Miller, 1989; Weisenseel *et al.*, 1979) นอกจากนี้ Weisenseel และคณะ (1979) พบอีกว่า H^+ เป็นองค์ประกอบของกระแสไฟฟ้าไอออน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของค่า pH น่าจะมีผลต่อขนรากด้วยจึงได้ศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากเมื่อค่า pH ของสารละลาย APW เท่า 4.00 ± 0.05 และ 8.00 ± 0.05 ตามลำดับ

2.13.1 ศึกษากระแสไฟฟ้าในขรอก และรอบโชนขรอกที่มี APW

pH 4.00 ± 0.05

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.12 แต่เปลี่ยนสารละลายละลาย APW pH 6.00 ± 0.05 เป็น สารละลาย APW pH 4.00 ± 0.05 โดยทำการล้างต้นกล้าด้วยสารละลาย APW pH 4.00 2 ครั้งก่อนเติมสารละลายเพื่อวัดกระแสไฟฟ้าต่อไป

2.13.2 ศึกษากระแสไฟฟ้าในขรอก และรอบโชนขรอกที่มี APW

pH 8.00 ± 0.05

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.12 แต่เปลี่ยนสารละลายละลาย APW pH 6.00 ± 0.05 เป็น สารละลาย APW pH 8.00 ± 0.05

2.14 ศึกษาผลของไอออนต่อกระแสไฟฟ้าในขรอก และรอบโชนขรอกทานตะวัน

การเกิดกระแสไฟฟ้าไอออนเกิดจากการเคลื่อนที่ของไอออนชนิดต่าง ๆ ดังนั้นเมื่อสารละลายภายนอกมีการเปลี่ยนชนิดของไอออนและการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในขรอกและรอบโชนขรอกมาเปรียบเทียบกับกระแสไฟฟ้าไอออนในสภาวะปกติ

2.14.1 ผลของแคลเซียมคลอไรด์

การทดลองเริ่มจากนำต้นกล้ามาเตรียมเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.12 ก่อนที่จะทำการทดลองจะต้องล้างด้วยสารละลายที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว 2 ครั้ง ก่อนทำการเติมสารละลายที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที ทำการปรับเทียบก่อนเริ่มทำการทดลอง นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่ากระแสไฟฟ้า (2.10)

2.14.2 ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.14.1 แต่เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลายที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว

2.14.3 ผลของสารละลายที่ไม่มีคลอไรด์ไอออน

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.14.1 แต่เปลี่ยนสารละลายเป็น APW ที่ไม่มีคลอไรด์

2.15 ผลของอลูมิเนียมต่อกระแสไฟฟ้าไอออน

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.13.1 แต่เปลี่ยนสารละลายเป็น APW pH 4.00 \pm 0.05 ที่มีอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในสารละลาย

2.16 การหาอัตราเร็วของขนรากทานตะวัน

จากการดูขนรากทานตะวันผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท เลือกขนรากที่อยู่ห่างจากขนรากอื่นอย่างเห็นได้ชัดที่จะวัดกระแสไฟฟ้า ในขณะเดียวกันจะทำการอัตราเร็วของขนราก เริ่มจากวัดความยาวของขนรากโดยให้โคนของขนรากเป็นจุดอ้างอิงพร้อมบันทึกเวลาเริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไป วัดความยาวของขนรากอีกครั้ง บันทึกเวลาสุดท้าย คำนวณหาอัตราเร็วของขนรากโดย

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{\text{ความยาวของขนรากสุดท้าย} - \text{ความยาวของขนรากเริ่มต้น} (\mu\text{m})}{\text{เวลาสุดท้าย} - \text{เวลาเริ่มต้น} (\text{min})}$$

2.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษากระแสไฟฟ้าไอออนในขนรากและรอบๆ กลุ่มขนรากทานตะวันที่มีภาวะต่างๆ พบว่าในสภาวะการทดลองเดียวกันผลการทดลองจากรากที่ต่างกันก็อาจจะให้ผลต่างกัันดังนั้นจึงต้องทำการทดลองซ้ำหลายๆรากเพื่อดูแนวโน้มของผลการทดลอง และในการสรุปผลใช้วิธีทางสถิติ

2.17.1 ทิศของกระแสไฟฟ้า

เพื่อเปรียบเทียบทิศทางของกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งเดียวกันในหลายๆ รากว่ามีทิศเข้าหรือออกจากรากอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ใช้ "การทดสอบสัดส่วนของประชากรกลุ่มเดียว" (testing proportion of one population) (อภิญา, 2533)

โดยให้ H_0 เป็นสมมติฐานนินเสธ และ H เป็นสมมติฐานอื่น โดยตั้งสมมติฐานดังนี้

H_0 : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าที่มีทิศเข้าสู่รากและออกจากรากไม่แตกต่างกัน นั่นคือสัดส่วนของประชากร $\pi = 0.5$

ในกรณีที่คาดว่าทิศของกระแสไฟฟ้าน่าจะเข้าสู่รากมากกว่าออกจากราก จะให้

H : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าที่มีทิศออกจากรากมากกว่ากระแสไฟฟ้าเข้าสู่ราก

นั่นคือ $\pi > 0.5$

ส่วนในกรณีที่คาดว่าทิศของกระแสไฟฟ้าน่าจะออกจากรากมากกว่าเข้าสู่ราก ให้

H : สัดส่วนของกระแสไฟฟ้าที่มีทิศเข้าสู่รากมากกว่ากระแสไฟฟ้าออกจากราก

นั่นคือ $\pi > 0.5$

ตัวทดสอบสถิติคือ

$$Z = \frac{\hat{p} - \pi}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}} \quad (9)$$

เมื่อ \hat{p} เป็นสัดส่วนของตัวอย่าง โดยที่ $\hat{p} = X/n$ n คือ จำนวนตัวอย่างที่วัดกระแสไฟฟ้า
ไอออน

โดย X คือจำนวนรากที่กระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากหรือออกจากราก ตามที่ตั้งไว้ใน
สมมติฐาน H

และ π เป็นสัดส่วนของประชากร = 0.5 ตาม H_0

หาก Z มากกว่าค่าวิกฤต (ตาราง 2) จะปฏิเสธ H_0

ตัวอย่างกรณีที่ 1: กระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากมากกว่ามีทิศเข้าสู่ราก

ให้ H_0 มีค่า $\pi = 0.5$ และ H มีค่า $\pi > 0.5$ จากการทดลองในสภาวะปกติ 8 รากที่ตำแหน่ง
13.50 มิลลิเมตรจากโคนราก พบกระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากจำนวน 7 ราก และกระแสไฟฟ้ามีทิศ
ออกจากรากจำนวน 1 ราก ดังนั้น $n=8$, $x=$ จำนวนรากที่มีทิศของกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ราก =

จะได้ $\hat{p} = 7/8 = 0.88$

และใช้ตัวทดสอบสถิติตามสมการ (3)

$$Z = \frac{0.88 - 0.5}{\sqrt{\frac{0.5(1-0.5)}{8}}} = 2.14$$

ค่า Z ที่คำนวณได้คือ 2.14 มากกว่าค่าวิกฤตแบบหางเดียวที่ระดับความมีนัยสำคัญ

$\alpha = 0.05$ ($Z=1.65$) จึงปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.05$

นั่นคือ กระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากมากกว่าเข้าสู่รากอย่างมีนัยสำคัญด้วยระดับความเชื่อมั่น

95 % ($P < 0.05$)

ตัวอย่างกรณีที่ 2 : กระแสไฟฟ้าเข้าสู่รากมากกว่าออกจากราก

ให้ H_0 มีค่า $\pi = 0.5$ และ H มีค่า $\pi > 0.5$ จากการทดลองในสารละลาย APW pH 4.00 จำนวน 12 รากที่ตำแหน่ง 11.75 มิลลิเมตรจากโคนราก พบกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากจำนวน 11 ราก และกระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากจำนวน 1 ราก ดังนั้น $n = 12$, $x =$ จำนวนรากที่มีทิศของกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ราก = 11

จะได้ $\hat{p} = 11/12 = 0.92$ และได้ค่า Z จากสมการ (9) = 2.89

ค่า Z ที่คำนวณได้คือ 2.89 มากกว่าค่าวิกฤติแบบหางเดียวที่ $\alpha = 0.05$ ($Z = 1.65$)

ดังนั้นเราจึงปฏิเสธ H_0 ที่ $\alpha = 0.05$

นั่นคือ กระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากมากกว่าออกจากรากอย่างมีนัยสำคัญด้วยระดับความเชื่อมั่น

95 % ($P < 0.05$)

ตัวอย่างกรณีที่ 3 : ไม่สามารถระบุได้ว่ากระแสไฟฟ้ามีทิศใดมากกว่ากัน

ให้ H_0 มีค่า $\pi = 0.5$ และ H มีค่า $\pi > 0.5$ จากการทดลองในสารละลาย APW pH 4.00 จำนวน 12 รากที่ตำแหน่ง 14.00 มิลลิเมตรจากโคนราก พบกระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากจำนวน 7 ราก และกระแสไฟฟ้ามีทิศออกจากรากจำนวน 5 ราก ดังนั้น $n = 12$, $x =$ จำนวนรากที่มีทิศของกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ราก เท่ากับ 7 ราก

จะได้ $\hat{p} = 7/12 = 0.58$ และได้ค่า Z จากสมการ (9) = 0.58 ซึ่งน้อยกว่า Z ที่

$\alpha = 0.05$ (1.65)

ดังนั้นเราจึงยอมรับ H_0 นั่นคือไม่สามารถกล่าวอย่างมีนัยสำคัญได้ว่ากระแสไฟฟ้ามีทิศเข้าสู่รากมากกว่าออกจากราก ($P > 0.05$)

ตาราง 2 ค่าวิกฤติเมื่อกำหนดค่าระดับความมีนัยสำคัญ (α) ต่างๆ กัน (อภิญา, 2533)

	α	ค่าวิกฤติ
การทดสอบแบบ สองหาง	0.05	$Z_{0.025} = \pm 1.96$
	0.01	$Z_{0.005} = \pm 2.58$
	0.001	$Z_{0.0005} = \pm 3.29$
การทดสอบแบบ หางเดียว	0.05	$Z_{0.05} = 1.65$
	0.01	$Z_{0.01} = 2.33$
	0.001	$Z_{0.001} = 3.09$

2.17.2 ผลของ pH ของสารละลายภายนอก

เนื่องจากค่ากระแสไฟฟ้าไอออนที่วัดในสภาวะปกติ (APW pH 6.00) และเมื่อ pH ของสารละลายภายนอกเปลี่ยนไป (pH 4.00 และ 8.00) หรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนบางชนิดในสารละลาย อาจจะทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากตำแหน่งเดียวกันแต่คนละรากมีการเปลี่ยนแปลงไป จึงทดสอบกระแสไฟฟ้าไอออนของตำแหน่งเดียวกันในทุกๆ รากว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่เมื่อสภาวะของสารละลายภายนอกเปลี่ยนไป โดยใช้วิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของประชากรสองกลุ่ม สถิติที่ใช้ทดสอบคือ

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{โดยที่} \quad df = n_1 + n_2 - 2 \quad (10)$$

และค่าที่ s หาได้จาก

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (11)$$

เมื่อ

\bar{X}_1, \bar{X}_2 = ค่าเฉลี่ยของขนาดกระแสไฟฟ้าที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกๆ รากในสภาวะการทดลองหนึ่งและสอง

s = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าในสองสภาวะข้างต้น (สมการ 11)

s_1, s_2 = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าในสภาวะที่หนึ่งและสอง

n_1, n_2 = จำนวนวัตต์ของกระแสไฟฟ้าในสภาวะที่หนึ่งและสอง

$$df = \text{degree of freedom} = n_1 + n_2 - 2$$

โดยมีขั้นตอนในการพิจารณาดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ตั้งสมมติฐาน ให้ H_0 เป็นสมมติฐานอิสระและ H เป็นสมมติฐานอื่น

ขั้นตอนที่ 2 ที่แต่ละตำแหน่งของราก หาค่าเฉลี่ยของขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออน

ในสารละลายสภาวะที่ 1

$$\bar{X}_1 = \frac{\sum_{j=1}^{n_1} X_{1j}}{n_1} \quad (12)$$

และเมื่อสารละลายภายนอกเปลี่ยนเป็นสภาวะที่ 2

$$\bar{X}_2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_2} X_{2j}}{n_2} \quad (13)$$

หลังจากนั้นหาค่าผลต่าง

$$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$$

ขั้นตอนที่ 3 หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกระแสไฟฟ้าในสภาวะทั้งสองจาก

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_1} (X_{1j} - \bar{X}_1)^2}{n_1 - 1}} \quad (14)$$

และ

$$s_2 = \sqrt{\frac{\sum_{j=2}^{n_2} (X_{2j} - \bar{X}_2)^2}{n_2 - 1}} \quad (15)$$

ขั้นตอนที่ 4 แทนค่าในสถิติทดสอบ (สมการ 10) และนำค่า t ที่คำนวณได้เปรียบ

เทียบกับค่าวิกฤติ (ตาราง 3) โดยพิจารณาการทดสอบแบบทางเดียวที่มี $df = n_2 + n_1 - 2$ นำค่า t ที่

คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่าวิกฤติที่ระดับนัยสำคัญ α จะปฏิเสธ H_0 จะยอมรับสมมติฐานอื่น

(H) ในทางตรงกันข้ามหากค่า t มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤติจะยอมรับสมมติฐานอิสระ

ตัวอย่างการคำนวณ ต้องการทดสอบขนาดของกระแสไฟฟ้าที่วัดจากตำแหน่ง 15.75 มิลลิเมตรจากโคนราก ในสารละลาย pH 4.00 จำนวน 12 ราก (n_1) และในสารละลายสภาวะปกติ pH 6.00 จำนวน 8 ราก (n_2) ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่โดยทำตามขั้นตอนการทดสอบที่กล่าวมา

ในการทดสอบให้

H_0 คือ ขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลายสภาวะปกติกับสารละลาย

APW pH 4.00 ไม่แตกต่างกัน

H คือ ขนาดของกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลายสารละลาย APW pH 4.00

มากกว่าสภาวะปกติ

จากการทดลองที่ตำแหน่ง 15.75 มิลลิเมตรห่างจากโคนราก มีค่าดังนี้

$$\bar{X}_1 = 0.57 \quad s_1 = 0.36$$

$$\bar{X}_2 = 0.34 \quad s_2 = 0.19$$

ดังนั้น $\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 0.57 - 0.34 = 0.23$

$$\begin{aligned} s &= \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \\ &= \sqrt{\frac{11(0.36)^2 + 7(0.19)^2}{18}} \\ &= 0.31 \end{aligned}$$

จาก

$$\begin{aligned} t &= \frac{X_1 - X_2}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \\ &= \frac{0.23}{0.31 \sqrt{\left(\frac{1}{12} + \frac{1}{8}\right)}} \quad df = n_1 + n_2 - 2 = 18 \\ &= 1.62 \end{aligned}$$

นำค่า t ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ (ตาราง 3) จากตัวอย่างค่า t คือ 1.62 มีค่าเป็นบวกและมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติแบบทางเดียวที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.1$ ($t_{\alpha} = 1.33$) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับสมมติฐานอื่น (H) ดังนั้นที่ตำแหน่งนี้ขนาดกระแสไฟฟ้าไอออนในสารละลาย APW pH 4.00 มีขนาดมากกว่าที่สภาวะปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.1$)

ตาราง 3 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