บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สถานที่ศึกษา

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย

1. ตู้เพาะเลี้ยงสาหร่าย ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส
2. เครื่องปั๊มอากาศขนาดเล็ก
3. Spectrophotometer : รุ่น Spectronic 21 ของ Milton Roy Company
4. Atomic Absorption Spectrophotometer: รุ่น Spectr AA –300 ของ Varian Techtron Pty. Ltd.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) : รุ่น SA520 ของ Orion
6. เครื่องปั่นแยก : รุ่น 3K18 ของ SIGMA
7. ตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน : รุ่น F115 ของ Binder
8. เครื่องชั่งละเอียด : รุ่น A20S ของ Sartorius
9. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
10. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) : AR grade ของ Merck

3.3 จุลินทรีย์

สาหร่ายเกลียวทองที่ใช้เป็นสายพันธุ์ Spirulina platensis ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก culture collection ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารอาหารที่เลือกใช้สำหรับเตรียมสารละลายอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลนา ใช้ตามสูตรของ Zarrouk ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 6 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Zarrouk (Pissopa, 1990)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	
$NaHCO_3$	16.80	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.50	"
$NaNO_3$	2.50	"
NaCl	1.00	"
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	"
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	"
$CaCl_2.2H_2O$	0.04	"
EDTA	0.08	"
A5 solution(1)	1.00	มิลลิลิตรต่อลิตร
B6 solution(2)	1.00	"

หมายเหตุ

(1) A5 solution (กรัมต่อลิตร)

H_3BO_3	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.80
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22
MoO_3	0.01
$CuSO_4.5H_2O$	0.08

(2) B6 solution (มิลลิกรัมต่อลิตร)

NH_4VO_3	22.9
$NiSO_4.7H_2O$	47.8
Na_2WO_4	17.9
$Ti_2(SO_4)_3$	40.0
$CO(NO_3)_2.6H_2O$	4.4

เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยาของ $FeSO_4.7H_2O$ ซึ่งจะทำให้สารละลายอาหารตกตะกอน จึงแยกเตรียม $NaHCO_3$ และ K_2HPO_4 จากสารประกอบตัวอื่นๆ หลังจากผสมส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตราฐานคือ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จึงผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22211573

3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.5.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

การเตรียมการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่ายเกลียวทอง (S. platensis) เพื่อใช้เป็นสาหร่ายเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดลอง โดยเตรียมสารละลายอาหารตามสูตรของ Zarrouk แล้วเติมเชื้อสาหร่ายเกลียวทองลงในสารละลายอาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดน้ำเกลือขนาด 1 ลิตร ปรับค่า $O.D._{560}$ ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้นให้มีค่า 0.1 ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส) พ่นให้อากาศโดยใช้ปั๊มขนาดเล็กตลอดการทดลอง ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 10,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง สาหร่ายที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมีอายุ 5 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากสาหร่ายอยู่ในช่วง Exponential phase

3.5.2 การวัดความเจริญของสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายเกลียวทองโดยวิธีไร้เชื้อโดยใช้หลอดและเข็มฉีดยาที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ใช้หลอดฉีดยาดูดตัวอย่างขึ้นมาประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจวัดค่าต่างๆดังต่อไปนี้

3.5.2.1 หาความหนาแน่นของสาหร่ายที่เปลี่ยนแปลงไปในรูป Optical density ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer มีวิธีการดังนี้

เปิดเครื่อง ปรับความยาวคลื่นให้เท่ากับ 560 นาโนเมตรและปรับปุ่มการทำงานของหลอดวัดแสง (phototube) ให้หน้าปัดอ่านค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 เปิดเครื่องไว้นาน 15 นาที จากนั้นใส่เซลล์ที่มีน้ำกลั่นเป็นสารละลายอ้างอิงลงในช่องใส่เซลล์ ปรับปุ่มปรับปริมาณแสงจนเข็มบนหน้าปัดอ่านค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสาหร่ายที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าสาหร่ายมีความหนาแน่นมากจะเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2-3 เท่า แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้มาคำนวณกลับเพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริง

การคำนวณอัตราการเติบโต (Growth rate) ของสาหร่าย

จากข้อมูลการเจริญนำมาเขียนกราฟการเจริญ (Growth curve) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural logarithms กับเวลาเป็นวัน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญจากความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยเลือกช่วงของการเจริญที่อยู่ในระยะ exponential phase เนื่องจากเป็นระยะที่สภาพแวดล้อมอื่นๆในการเลี้ยงไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเจริญเติบโตในระยะนี้จึงเป็นผลมาจากปัจจัยที่กำหนดให้เท่านั้น (Fogg, 1987)

สมการที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$N_t = N_o e^{kt}$

$k = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t - t_0}$

k = อัตราการเจริญของสาหร่าย

N_t, N_0 = ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่อ่านได้จาก spectrophotometer ในวันแรก(t_0)และวันสุดท้าย(t)ของการเพาะเลี้ยงช่วง exponential phase

t = เวลา (วัน)

3.5.2.2 หาน้ำหนักแห้งของสาหร่าย มีวิธีการดังนี้

อบกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรอง จากนั้นนำกระดาษกรองมาวางบนเครื่องดูดสุญญากาศ เปิดเครื่องแล้วล้างแผ่นกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น เปิดเครื่องต่อเพื่อกำจัดน้ำจำนวนเล็กน้อยบนกระดาษ กวนสาหร่ายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่า ปิเปตสาหร่ายมา 20 มิลลิลิตร กรองสาหร่ายผ่านเครื่องดูดสูญญากาศ เมื่อดูดน้ำออกจากกระดาษกรองแล้วใช้คีมที่สะอาดพับกระดาษกรองให้เนื้อสาหร่ายอยู่ด้านใน วางกระดาษกรองบนจานแก้วที่สะอาด นำไปอบในตู้อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักรวมของสาหร่ายและกระดาษกรอง

การคำนวณหาน้ำหนักแห้งของสาหร่าย(g/l)

$$D.W. = \frac{(A-B) \times 1000}{V}$$

D.W. = น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

A = น้ำหนักรวมของสาหร่ายและกระดาษกรอง (กรัม)

B = น้ำหนักของกระดาษกรอง (กรัม)

V = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3.5.2.3 วัดค่าความเป็นกรด - ด่าง ของสารละลายอาหารที่สาหร่ายสไปรูไลนาเจริญอยู่โดยใช้พีเอชมิเตอร์ ตรวจวัดทุก 24 ชั่วโมง

3.5.3 การศึกษาผลปริมาณความเข้มข้นของแมงกานีสต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูไลนาและการสะสมแมงกานีสในเซลล์สาหร่าย

ทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ในสารละลายอาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า $O.D._{560}$ ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้นให้มีค่า 0.1 เติมสารละลายแมงกานีสคลอไรด์ในสารละลายอาหารให้มีความเข้มข้นแมงกานีสเริ่มต้นเป็น 0, 2, 4, 8, 16 และ 32 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นแมงกานีสเริ่มต้น 0 หมายถึงไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ลงในสารละลายอาหาร)เลี้ยงภายใต้สภาวะการให้อากาศและแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 10,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง สลับที่ทุก 2 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้กรองผ่านแผ่นกรอง Whatman เบอร์42 เก็บเซลล์เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแมงกานีสโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ต่อไป

การเตรียมเซลล์สาหร่ายเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแมงกานีสโดยใช้เครื่อง AAS

นำเซลล์ที่เก็บได้จากการกรองด้วยแผ่นกรอง Whatman เบอร์42 มาย่อยสลายด้วย กรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาณที่พอเหมาะ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดไขมัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองผ่านแผ่นกรอง Whatman เบอร์1 หลังจากนั้นเก็บส่วนที่เป็นสารละลายใส (filtrate) เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณแมงกานีสโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) เปรียบเทียบและคำนวณค่าที่ได้กับ standard curve

3.5.4 การศึกษาการสะสมแมงกานีสโดยสาหร่ายสไปรูไลนาในน้ำเสียสังเคราะห์

เก็บตัวอย่างสาหร่ายอายุ 5 วัน ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 140 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร แล้วนำมาเข้าเครื่องปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้วเทสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น เก็บเซลล์ซัสเพนชั่น (cell suspension) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายแมงกานีสคลอไรด์ ความเข้มข้น 2, 4, 8, 16 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการทดลองเปรียบเทียบโดยปรับสภาพความเป็นกรด - ด่างให้มีค่าเท่ากับ 8, 9, 10 และ 11 (ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้น ปรับโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์แมล) ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะการเขย่าและให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เก็บตัวอย่างสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้กรองผ่านแผ่นกรอง Whatman เบอร์42 หลังจากนั้นเก็บส่วนที่เป็นสารละลายใส (filtrate) เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแมงกานีสโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) เปรียบเทียบและคำนวณค่าที่ได้กับ standard curve

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย