บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย</u>

เครื่องปั่นผสม รุ่น K-550-GE บริษัท Scientific Industries Inc., USA.

ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co.,LTD.

ตู้เลี้ยงสาหร่าย

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น รุ่น J2-21 บริษัท Beckman, USA.

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb,USA.

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Japan.

ตู้อบแห้ง บริษัท Hearson, England.

โถดูดความชื้น

เครื่องชั่งละเอียด Sartorius รุ่น A200S บริษัท Scientific Promotion.

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น KM-15200 บริษัท Kubota, Japan.

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง รุ่น W-385 บริษัท Heat System-ultrasonics, Inc.

UV-visible recording spectrophotometer รุ่น UV-160 A บริษัท Shimadzu

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น SP-5A บริษัท Suntex, Taiwan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกและจำแนกสาหร่าย Chlorella sp.B.K.1

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำจืดเพื่อแยกหาสาหร่าย Chlorella sp. B.K.1 จากแหล่งน้ำจืดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจืดจากแหล่งน้ำจืดต่างๆ ในกรุงเทพ ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยใช้ขวดขนาด 5 มล. ตักน้ำจากแหล่งน้ำ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีในข้อ 1.2

ตารางที่ 8. แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างในกรุงเทพมหานคร

	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	สระน้ำข้างเรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2	สระน้ำด้านหน้า ศาลาพระเกี้ยว จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3	สระน้ำบริเวณ พุทธมณฑล
4	สระน้ำบริเวณ สวนลุมพินี
5	สระน้ำบริเวณ สวนจตุจักร

1.2 การแยกสาหร่าย Chlorella sp. B.K.1 ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำตัวอย่างน้ำที่เก็บได้มาทำให้เจือจางลง 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล.เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck (Nichols, 1973) (ภาคผนวก ก) ด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวอาหาร เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อผึ่งให้แห้งใน Laminar flow นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเขี่ยโคโลนีของสาหร่ายที่มีสีเขียวที่เจริญบนอาหารแข็ง แยกซ้ำหลาย ๆ ครั้งบนอาหารแข็งให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา หลังจากได้เชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีลักษณะคล้าย Chlorella แล้ว เก็บตัวอย่างที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเพื่อนำไปจำแนกสกุลและชนิดของสาหร่ายต่อไป

1.3 การจำแนกสกุลและชนิดของสาหร่าย Chlorella sp.B.K.1

1.3.1 การจำแนกสกุลตาม key ที่รายงานใน Bold และ Wynne (Bold และ Wynne, 1985) เขี่ยโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ได้จากข้อ 1.2 นำไปตรวจสอบลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา เพื่อจำแนกตาม key ที่รายงานใน Bold และ Wynne (ภาคผนวก ง)

1.3.2 ทำการจำแนกชนิดของสาหร่ายตาม key ของ Pascher (Nakamura, 1981a) (ภาคผนวก ง)

1.3.2.1 การเตรียมเซลล์เพื่อถ่ายรูป จากกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา เขี่ยเซลล์จากโคโลนีเดี่ยวๆ 1 โคโลนีที่ได้จากข้อ 1.2 เจือจางในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปหยดลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass

1.3.3 ทำการยืนยันผลการจำแนกโดยส่งสาหร่ายที่แยกได้ไปในจานเลี้ยงเชื้อไปจำแนกยังห้องปฏิบัติการของ Japan Dairy Technical Association ที่ประเทศญี่ปุ่น

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1

ในการทดลองนี้ จะทำการทดลองเพียงการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมเท่านั้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น การเตรียมเพิ่มปริมาณเซลล์ของ Chlorella sp.B.K.1 เพื่อใช้เป็นสาหร่ายเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดลอง โดยเตรียมสารละลายอาหารตามสูตร Beijerinck ที่ได้ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.5 ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขี่ยสาหร่าย Chlorella sp. B.K.1 ที่แยกให้บริสุทธิ์จากข้อ 1.2 ลงไป 1 ลูป เขย่าให้สาหร่ายกระจายทั่วในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้ที่มีแสงไฟจากหลอดนีออน 40 วัตต์ 4 หลอด ที่มีความเข้มแสง3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.2 การเลี้ยง Chlorella sp. ดูดเชื้อตั้งต้นจากข้อ 2.1 ด้วย autopipette ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck 250 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวย 500 มล. ให้มีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 1-2x10^8 เซลล์ต่อ มล. บ่มในตู้ที่มีแสงไฟจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 4 หลอด ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ทำการศึกษาอัตราการให้อากาศที่ทำให้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17123574

เชื้อเจริญดีที่สุด เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการทดลองต่อไป โดยเลี้ยงสาหร่าย Chlorella sp.B.K.1 ตามวิธีในข้อ 2.2 ภายใต้ภาวะการให้อากาศจากเครื่องปั๊มอากาศ ที่อัตราต่างๆกัน ดังนี้คือ 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำแต่ละการทดลอง ทำการเลี้ยงสาหร่ายจนเข้าสู่ภาวะคงที่แล้วนำมาเปรียบเทียบการเจริญ

3. การวัดการเจริญและผลผลิตของ Chlorella sp. B.K.1

ทำการเก็บข้อมูลทุกวันโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างสาหร่ายขวดละ 3.5 มล. ด้วยวิธีปลอดเชื้อทำการวัดการเจริญของสาหร่าย 2 วิธี คือ

3.1 การวัดมวลของเซลล์

3.1.1 การวัดความขุ่นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Layne, 1957) โดยใช้อาหารสูตร Beijerinck เป็น blank

3.1.2 การหาน้ำหนักแห้ง ทำการเก็บข้อมูลเฉพาะวันสุดท้ายที่เลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาหร่ายเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก 100 มล. นำไปหาปริมาณโปรตีนซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป อีกส่วนจะมีเหลือประมาณ 100-120 มล. นำไปปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ตกตะกอนมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 100 มล. เขย่าให้เซลล์เข้ากับบัฟเฟอร์ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งด้วย ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำเซลล์ที่ปั่นได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 วัน จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้น 1 วัน จนน้ำหนักคงที่แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง คำนวณเป็นน้ำหนักแห้งต่อ มล.

3.1.3 การหาปริมาณโปรตีน นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. จากข้อ 3.1.2 ไปปั่นเก็บเซลล์และล้างเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 นำมา 0.2 มล. ใส่ในไมโครทิวป์ แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง กำลัง 285 วัตต์ นาน 10 นาที (ใช้ปลายขนาดเล็ก) ตรวจสอบการแตกของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา จากนั้นใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 0.9 มล. นำไปปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยในการทดลองนี้เลือกใช้วิธี Bradford และ วิธีวัดค่าดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต ในการหาปริมาณโปรตีน

3.1.3.1 วิธีของ Bradford (Spector, 1978) ใช้ BSA

เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยมีวิธีการดังนี้ เติมส่วนน้ำใสที่เก็บจากข้อ 3.1.3 ปริมาตร 0.1 มล. ลงใน Dye reagent 5 มล. (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ใน cuvette แก้วขนาด 3 มล. หาปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จาก BSA ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนเทียบกับน้ำหนักแห้ง

3.1.3.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Layne, 1957) นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.1.3 ที่เหลือจากข้อ 3.1.3.1 มา 0.1 มล. เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 0.9 มล. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV 160 A) ด้วย cuvette ที่เป็น pyrex ขนาด 1 มล.โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เป็น Blank จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนดังสมการ

$$\text{โปรตีน (มก.ต่อ มล.)} = 1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$$

(A_{280} หรือ A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร)
จากนั้นนำไปหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน โดยเทียบกับน้ำหนักแห้ง

3.2 การวัดจำนวนเซลล์ ใช้ autopipette ดูด ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากข้อ 3 มา 0.02 มล. หยดลงบน Haemacytometer slide ปิดด้วย cover glass จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลผลิตของ Chlorella sp. จะแสดงด้วยน้ำหนักแห้งและปริมาณโปรตีน ส่วนการเจริญของ Chlorella sp. แสดงด้วยการวัดความขุ่นและการนับจำนวนเซลล์

4. การเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยง Chlorella sp. ในสภาวะ Autotrophic, Heterotrophic และ Mixotrophic

เลี้ยง Chlorella sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ตามวิธีในข้อ 2 โดยเติมแหล่งคาร์บอนคือ กรดแอซีติก หรือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำไปวัดการเจริญและผลผลิตตามวิธีในข้อ 3 เพื่อหาชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยง Chlorella sp. โดยแปรสภาวะการเลี้ยงและค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนดังนี้

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ในการเพาะ

เลี้ยง Chlorella sp. ในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic เลี้ยง Chlorella ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนดังนี้

4.1.1 การเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ทำการเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ตามข้อ 2.1-2.2 โดยใช้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการให้อากาศดังนี้คือ 0, 5, 10, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที ทำการทดลองอย่างละ 1 ซ้ำ เพื่อสุ่มหาช่วงของการให้อากาศที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูง เลือกมา 4 ค่า คือ 0, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที นำมาทำการทดลองซ้ำอีกอัตราละ 10 ซ้ำ เพื่อนำค่าอัตราการเจริญจำเพาะ,น้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีน มาคำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี ANOVA และ LSD (กรมวิชาการเกษตร, 2532) จากนั้นเลือกอัตราการให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 60 มล.ต่อนาที เพื่อนำมาทดลองเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ รวมทั้งเพื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์

4.1.2 การเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ทำการเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ตามข้อ 2.1-2.2 แต่ความเข้มแสงที่ใช้ในการเลี้ยงจะเปลี่ยนจาก 3500 ลักซ์ เป็น 1750 ลักซ์ โดยจะเลือกอัตราการให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เพื่อนำค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, น้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี ANOVA เพื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์

4.1.3 การเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1ในสภาวะHeterotrophic ในที่มืด ทำการทดลองโดยใช้สภาวะมาตรฐานตามข้อ 2.1-2.2 โดยให้อากาศที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มข้นของกรดแอซีติกดังนี้ 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ แต่เลี้ยงในที่มืดโดยใช้กระดาษตะกั่วห่อรอบขวด ทำการทดลองความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ เพื่อสุ่มหาช่วงความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูง เลือกมา 4 ค่า คือ 0, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณโปรตีนมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี

ANOVA และ LSD เพื่อหาค่าความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ให้ค่าการเจริญและผลผลิตดีที่สุด

4.2 ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ และ กรดแอซีติกในการเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic เลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสภาวะมาตรฐานในข้อ 2.1-2.2 โดยให้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคืออากาศผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที และกรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ความเข้มแสง 2 ค่าคือ 1750 และ 3500 ลักซ์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้กับการเลี้ยงด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะ Autotrophic กับการเลี้ยงด้วยกรดแอซีติกในสภาวะ Heterotrophic เพื่อตรวจสอบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงเป็น Mixotroph หรือไม่ และเพื่อหาสภาวะการเลี้ยงที่ให้การเจริญและผลผลิตของ Chlorella sp.B.K.1 ดีที่สุด

5. การเปรียบเทียบการเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ด้วย แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย

ในการทดลองนี้เลือกใช้การเลี้ยงแบบ Heterotrophic เพื่อตัดปัญหาที่อาจเกิดการสังเคราะห์แสง อันอาจเกิดจาก ไบคาร์บอเนตอิออน ที่เป็นผลพลอยได้จากการใช้ยูเรีย (Thompson and Muenster, 1971)

เลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด ที่ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ โดยเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน 2 แหล่ง คือ แอมโมเนียมไนเตรต หรือ ยูเรีย โดยจะเลือกใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้นเท่ากับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck คือ 1.87 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับยูเรีย ส่วนความเข้มข้นของสารละลายยูเรียจะทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ 0, 0.0187, 0.187, 0.93, 1.87, 3.74 และ 18.7 มิลลิโมลาร์ อย่างละ 1 ซ้ำ เพื่อสุ่มหาช่วงความเข้มข้นของสารละลายยูเรียที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูง เลือกมา 4 ค่า คือ 0, 0.93, 1.87, และ 3.74 มิลลิโมลาร์ มาทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรต

วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญจำเพาะน้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี T-test ในการวิเคราะห์ทางสถิติในข้อนี้ใช้วิธี T-test เพราะเป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง ประชากร 2 กลุ่มเท่านั้น คัดเลือกชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ให้การเจริญและผลผลิตในการเพาะเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ดีที่สุด