ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์

1. **การคำนวณหาปริมาณมวลเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง**

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาดเล็กที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 105 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่งชนิดละเอียด
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการวิเคราะห์

1. นำเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญเต็มที่ มาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2. นำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ตามลำดับ (ทำ 3 ซ้ำ)

3. นำเซลล์ที่เจือจางแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 12 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

4. ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน และทำซ้ำจนมีน้ำหนักคงที่ นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งกับค่าการดูดกลืนแสง (ภาพภาคผนวกที่ ค1)

2. **การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ**

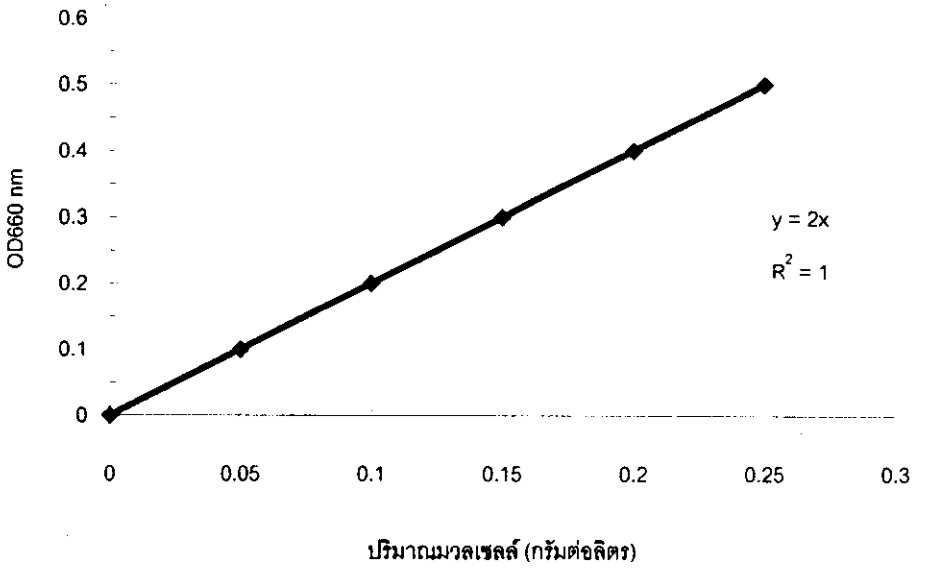
สูตรคำนวณ $$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

กำหนดให้ μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

$\ln x$ คือ ปริมาณมวลเซลล์ที่เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)

$\ln x_0$ คือ ปริมาณมวลเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)



ภาพภาคผนวกที่ ค1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปริมาณมวลเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3. **การสร้างสารยับยั้งการเจริญโดยวิธี** disc diffusion (**ดัดแปลงจาก** Burgess *et al.*, 1991)

1. นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เลี้ยงในอาหารเหลว GM ที่เวลาต่างๆ มาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ละลายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเซลล์โดยนำมาใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3. ดูดส่วนใสที่ได้ในข้อ 1 และ 2 มา 50 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร) วางบนจานเพาะเชื้อที่มีการเกลี่ยเชื้อ *V. harveyi* (มีความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.5 McFarland) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มนาน 18-24 ชั่วโมง

4. **การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์** (AOAC, 1990)

สารเคมี

1.น้ำปราศจากไนไตรท์ (NO^-_2 free water)

2. *N*-(1- naphththyl)ethylenediamide

3. sulfanilamide reagent

เติม sulfanilamide 5 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ที่มี hydrochloric acid 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

4. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์

ละลายสาร sodium nitrite ($NaNO_2$) 0.13 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (ใน 1 มิลลิลิตร มีไนไตรท์ประมาณ 50 ไมโครลิตร) ปิดฝาขวดให้แน่น เพราะสารนี้ไม่คงตัว เจือจางให้มีความเข้มข้นของไนไตรท์ในช่วง 0-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ มาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. นำส่วนใสที่ได้มา 5 มิลลิลิตร เติม sulfanilamide reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาไม่เกิน 7 นาที

3. เติมสาร *N*-(1- naphththyl) ethylenediamide 0.1 มิลลิลิตร เขย่าทันทีและวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ภายในเวลา 10 นาที นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-125 ไมโครกรัมต่อลิตร

*หมายเหตุ ควรวิเคราะห์ตัวอย่างทันทีหรือเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส และก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ ต้องปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนทุกครั้ง

5. การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท (AOAC, 1990)

สารเคมี

1.สารละลายมาตรฐานไนเตรทที่มีความเข้มข้นของไนเตรทอยู่ในช่วง 0-0.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

2.สารละลาย sodium asenite ($NaAsO_2$)

ละลาย sodium asenite 5 กรัม ในน้ำกกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.สารละลาย brucine-sulfalinic acid

ละลาย brucine-sulfate 1 กรัม และกรด sulfalinic 0.1 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 70 มิลลิลิตร แล้วเติม hydrochloric acid 3 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สารละลายนี้คงตัวได้หลายเดือน

4.สารละลาย sulfuric acid

ค่อย ๆ เท sulfuric acid เข้มข้นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปิดจุกให้แน่นเพื่อกันความชื้นจากอากาศภายนอก

5.สารละลาย sodium chloride

ละลาย sodium chloride 300 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ มาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. นำส่วนใสที่ได้มา 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย sodium chloride 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลาย sulfuric acid ให้เข้ากัน 10 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง ถ้ามีความขุ่นหรือสีเกิดขึ้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้เป็นค่าแบลงค์ของตัวอย่างและของสารละลาย

4.นำไปวางในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง เติมสารละลาย brucine-sulfalinic acid 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5.นำไปไว้ที่เครื่องอังไอน้ำที่มีอุณหภูมิคงที่ไม่น้อยกว่า 95 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

6.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของไนเตรทอยู่ในช่วง 0-0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ดัดแปลงจาก Soderhall *et al.*, 1988)

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
2. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
3. เครื่องอุลตร้าโซนิค ฮอโมจิไนซ์เซอร์ (ultrasonics homoginizer)

สารเคมี

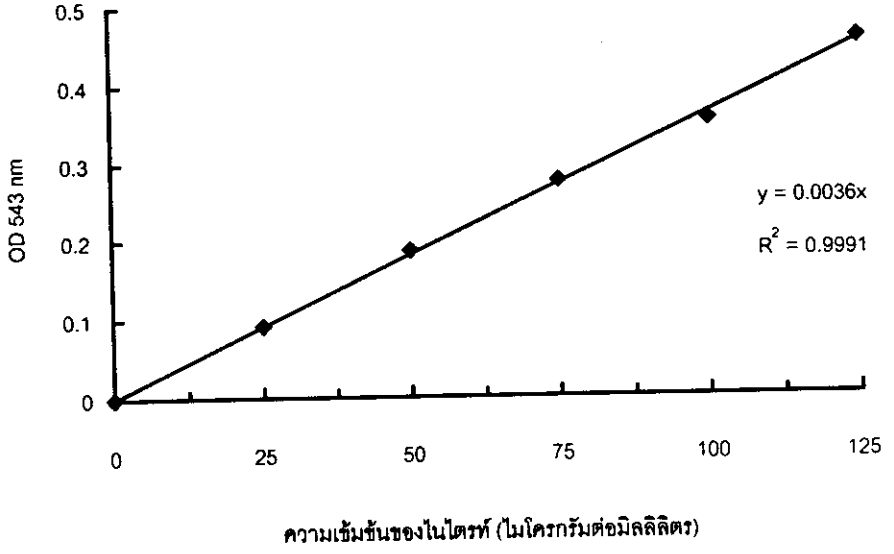
1.สารละลาย K-199 100 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992) ประกอบด้วย

M-199	50	มิลลิลิตร
HEPES	0.238	กรัม
magnesium chloride hexa-hydrous	0.33	กรัม
magnesium sulphate hepta-hydrous	0.30	กรัม
sodium hydrogen phosphate	0.005	กรัม
sodium chloride	1.1	กรัม
calsium chloride dihydrous	0.09	กรัม
L-glutamine	1	มิลลิลิตร

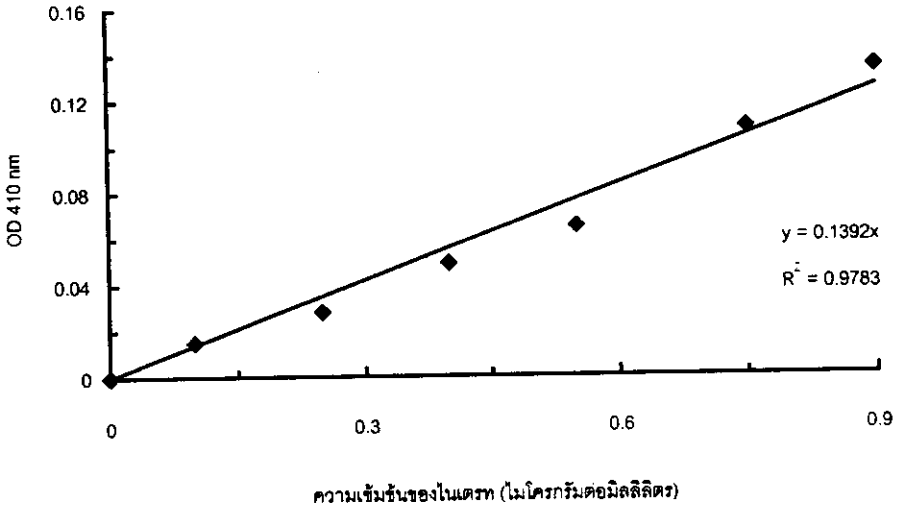
เติมน้ำปราศจากอิออน (deionized water) จนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.6 ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.สารละลาย cysteine 3 เปอร์เซ็นต์

ละลาย cysteine 30 กรัมในสารละลาย K-199 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร



ภาพภาคผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานไนไตรท์ ความเข้มข้นในช่วง 0-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์



ภาพภาคผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้นในช่วง 0-0.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์

3.สารละลาย cacodylate buffer (CAC buffer)

ละลาย sodium- carcodylate 1.07 กรัมต่อลิตรในน้ำ deionized ปลอดเชื้อ 500 มิลลิลิตร เติม calcium chloride 0.37 กรัม ปั่นให้ละลายแล้วจึงเติม magnesium chloride 5.08 กรัม ปรับพีเอชเป็น 7.0 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4.สารละลาย Trypsin

ละลาย trypsin 0.001 กรัม ใน cacodylate buffer 1 มิลลิลิตร

5.สารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-DOPA 0.003 กรัมใน cacodylate buffer 1 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

6.1 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร ดูดสารละลาย cysteine 0.2 มิลลิลิตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใน microtube นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เซลล์เม็ดเลือดที่ได้เติมสารละลาย CAC buffer 1มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

1. นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้จากข้อ 6.1 มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิกส์ ฮอโมจิไนซ์เซอร์ ที่แอมพลิจูด (amplitude) ระดับ 30 เป็นเวลา 20 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนใสที่ได้ต้องวิเคราะห์ทันที

2. เติมสารละลาย trypsin 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13x125 mm จากนั้นเติมส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.1 200 ไมโครลิตร โดยหลอดที่เป็นแบลงค์ (blank) ใช้สารละลาย CAC buffer 200 ไมโครลิตรแทน จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาที จึงเติมสารละลาย CAC buffer 1800 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกริยา 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงทุก 2 นาที

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคำนวนได้จากสูตร

ยูนิต (unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 1 นาที (ยูนิต/นาที)

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส} = \frac{\text{ยูนิต/นาที}}{\text{โปรตีนในเซลล์เม็ดเลือด}}$$

= unit/min/mg protein

7.การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือด (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. Folin reagent 1:10

   เจือจางสารละลาย Folin ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน Folin 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 9 ส่วน

2. Alkaline copper solution ประกอบด้วย

   สารละลาย $CuSO_4 . 5H_2O$ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

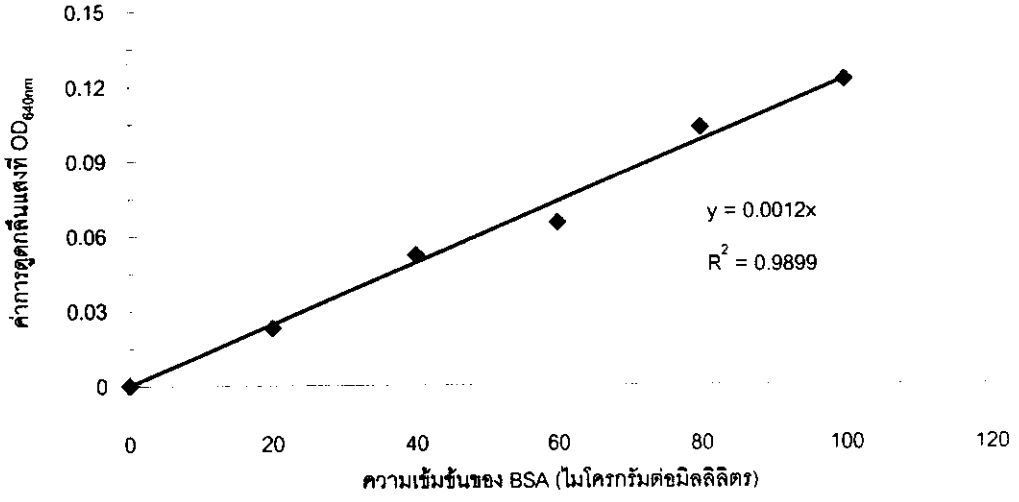
   สารละลาย Na K tatrate เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

   สารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย NaOH 0.5 นอร์มัล 50 ส่วน

3. สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

วิธีการวิเคราะห์

1. เจือจางสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความเข้มข้นในช่วง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 360 ไมโครลิตร ใช้น้ำกลั่น 400 ไมโครลิตรเป็นแบลงค์ (blank)
3. เติม Alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกริยา 10 นาที
4. เติมสารละลาย Folin reagent 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกริยา 10 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร
6. คำนวณปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA



ภาพภาคผนวกที่ ค4 กราฟมาตรฐาน BSA ที่มีค่าความเข้มข้นในช่วง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count)

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์

1.ชั่ง trypan blue 0.15 กรัม ละลายในสารละลายเกลือแกงเข้ม 2.6 เปอร์เซ็นต์ ปั่นให้ละลายโดยใช้ magnetic stir ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง

2.นำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ที่ความเร็ว 10,000 ต่อนาที ส่วนใสที่ได้นำมากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3.ดูดใส่ microtube หลอดละ 450 ไมโครลิตร เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

8.1 วิธีการนับปริมาณเม็ดเลือด

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 26 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้เลือดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ดูดมา 50 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายไตรแพนบลู นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้คำนวณเป็น เซลล์/มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

8.2 วิธีการคำนวณ

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้างxยาวxสูง

=1mmx1mmx0.1mm

$=0.1(mm)^3$

ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด $= \frac{(\text{ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}/2)\times 5\times 10(\text{dilution})}{0.1\ (mm)^3}$

= ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร

9. การทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. harveyi*

ถ่ายแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากอาหารแข็ง NA ใส่ในสารละลายเกลือแกง 0.9 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตรให้เท่ากับ 1.2 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้ฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายของกุ้ง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกอัตราการตาย

10. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โรทินอยด์และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (ดัดแปลงจาก Hirayama *et al.*, 1974)

สารเคมี

1. สารละลายเกลือแกง 0.9 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายเมทานอลในอะซีโตน (methanol:acetone) อัตราส่วน 2:3 (ปริมาตรต่อปริมาตร, v/v)

วิธีการวิเคราะห์

1.นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในช่วง late log phase ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร บันทึกค่าที่อ่านได้ และเปลี่ยนเป็นค่าน้ำหนักแห้งโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร กับปริมาณมวลเซลล์ (ภาพภาคผนวกที่ ค1) จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือแกง 0.9 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง

2.ละลายเซลล์ ด้วยสารละลายเมทานอลในอะซีโตน (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แบ่งใช้ครั้งละ 10 มิลลิลิตร) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใสในที่มืด และทำซ้ำจนกว่าส่วนใสที่ได้ไม่มีสี

3.วัดปริมาตรของส่วนใสที่ได้ และปรับให้ได้ 50 มิลลิลิตรโดยใช้สารละลายเมทานอลในอะซีโตน

4.นำส่วนใสที่ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (OD) 480 และ 770 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเมทานอลในอะซีโตนเป็นแบลงค์ (blank)

วิธีการคำนวน

คาร์โรทินอยด์ (OD_{480nm}ต่อปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม) $= \dfrac{OD_{480nm} \times B}{A}$

A= ปริมาณมวลเซลล์ (กรัมต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

B=ปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม

แบคเทอริโอคลอโฟิลล์ (OD_{770nm}ต่อปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม) = $\frac{OD_{480nm} \times B}{A}$

A= ปริมาณมวลเซลล์ (กรัมต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

B=ปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม

11. **ชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์** (Pfennig, 1969)

สารเคมี

สารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่อยู่ในระยะเจริญเต็มที่ใส่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส (ปริมาณมากพอที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้) ผสมให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ
2. นำเซลล์ในข้อ 1. มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวิธี scanning ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 300-900 นาโนเมตร ใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสเป็นแบลงค์ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (ภาพภาคผนวกที่ ง1-ง3)

12. **น้ำตาลทั้งหมด** (Total sugar) (**ดัดแปลงจาก** Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

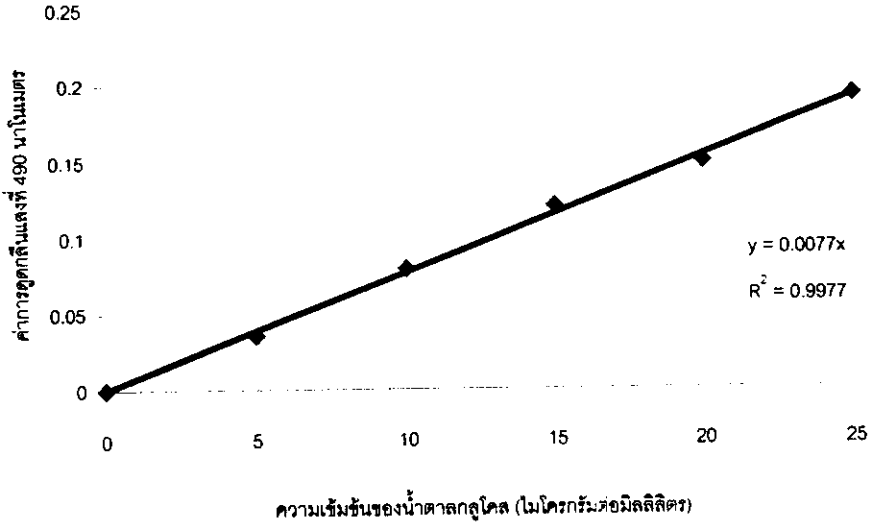
1.กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (phenol reagent)

3.น้ำตาลกลูโคสเกรดสำหรับวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1. ละลายเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง 0.001 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร
2. เจือจางน้ำตาลกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ ค5 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. แช่หลอดทดลองขนาด 16x125 mm ในน้ำแข็ง เติมสารในข้อ 1 และ 2 ลงไป 2 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ (blank)
4. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกริยา 2-3 นาที
5. เติมกรดซัลฟิวริก 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร
7. เตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

13. **การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน** (AOAC, 1990)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกลม (สำหรับใส่ตัวทำละลาย), ซอคเลต (soxhlet), อุปกรณ์ควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน
2. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดกลมสำหรับหาไขมัน ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัมบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้ว แล้วนำไปใส่ในซอคเลต
3. เติมตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดกลมที่ได้จากข้อ 1 แล้ววางไว้บนเตาสำหรับกลั่น
4. ประกอบชุดสกัดไขมัน และทำการกลั่นนาน 14 ชั่วโมง โดยต้องมีการหล่อเย็นตลอดเวลา
5. เมื่อครบเวลา นำขวดกลมในข้อ 3 บ่มในตู้อบ นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
6. คำนวณหาไขมันจากสูตร

ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก = $\frac{X \times 100}{Y}$

กำหนดให้ X คือ น้ำหนักไขมันหลังอบ

Y คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

14. โปรตีนในรูปไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeidhal **(ดัดแปลงจาก** AOAC., 1990)

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยตัวอย่างขนาด 2.5x31 เซนติเมตร
2. หลอดกลั่นตัวอย่างขนาด 4.0x30 เซนติเมตร
3. เครื่อง Kjeltech ซึ่งประกอบด้วย เครื่องย่อย เครื่องกลั่น และเครื่องจับไอกรด

สารเคมี

1. sodium sulfate (Na_2SO_4)
2. สารละลาย mercury sulfate ($HgSO_4$)

ละลายผง mercury oxide จำนวน 10 กรัม ใน boric acid เข้มข้นจำนวน 12 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรด sulfuric เข้มข้น
4. สารละลาย sodium hydroxide 60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (w/w)

ละลาย sodium hydroxide 60 กรัม และ sodium thiosulfate (Na_2SO_3) 5กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรด boric 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (w/w)
6. สารละลายกรด hydrochloric 0.02 นอร์มัล
7. อินดิเคเตอร์

ละลาย methyl red 0.2 กรัม และ methyl blue 0.1 กรัม ใน สารละลาย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัม ใส่ในขวดย่อยโปรตีน ใช้น้ำกลั่นเป็น blank
2. เติม sodium sulfate 2 กรัม และ mercury sulfate 5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายกรด sulfuric เข้มข้น 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเครื่องย่อย จนกว่าจะได้สารละลายใส ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. นำสารที่ได้จากข้อ 3 ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น และนำขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายกรด boric 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2 หยด ไปรองรับ สารที่กลั่นได้จนกว่าจะมีปริมาตรรวม เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5. นำสารที่ได้จากข้อ 4 มาไตเตรทกับสาละลายกรด hydrochloric 0.02 นอร์มัล จุดยุติจะมีสีม่วง

การคำนวณ

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) $= \frac{(A-B) \times N \times 14 \times 1000}{w}$

A คือ ปริมาตรของสารละลายกรด hydrochloric ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของสารละลายกรด hydrochloric ที่ใช้ไตเตรทกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรด hydrochloric (นอร์มัล)