บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัตถุดิบ

- น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ที่ผ่านการบำบัดแล้วในบ่อตกตะกอน (ก่อนปล่อยออกสู่บึงประดิษฐ์) (ภาคผนวกที่ ข1)
- บริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์จำกัด (มหาชน) ที่ผ่านการบำบัดแล้วในบ่อตกตะกอน (ภาคผนวกที่ ข2)

1.2 สาหร่าย *Botryococcus braunii*

สาหร่าย *B. braunii* แยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.3 อาหารเลี้ยงสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

- Modified Chu 13 (เพิ่มปริมาณอาหาร 4 เท่า) (Largeau *et al*., 1980)
- Kratz and Myers media (Gelpi *et al*., 1970 อ้างโดย Vongprasert, 1986)

1.4 สารเคมีวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้ง (ภาคผนวก ข)

- วิเคราะห์ปริมาณซีโอดี
- วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน
- วิเคราะห์ปริมาณไนเทรต
- วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาชนิดและแยกสาหร่าย

- ถุงลากแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาดตา 45 ไมโครเมตร
- ขวดพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted Microscope) Model SZ-ST ของบริษัท Olympus

- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound Microscope) Model Olympus CH30 ของบริษัท Olympus
- จานเพาะเชื้อ
- หลอดแก้วทดลอง ขนาด 15x150 มิลลิเมตร
- คาปิลลารีปิเปต (Capillary pipette)
- ชั้นเลี้ยงสาหร่ายพร้อมหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ (หลอดละ 40 วัตต์ จำนวน 2 หลอด)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Model HT-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co.,Ltd.
- เครื่องหมุนเหวี่ยง Model H–103.N series ของบริษัท Kokusan Enshinki Ltd.
- หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

- หลอดแก้วทดลองขนาด 340x34 มิลลิเมตร
- ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- หลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์แบบ cool white (หลอดละ 40 วัตต์ จำนวน 16 หลอด)
- อ่างแก้ว ขนาด 50x91x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร
- หลอดแก้วกรองอากาศ
- จุกยางพร้อมท่อแก้ว
- ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
- เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ series RMA (Rate-master flow meter) ของบริษัท Dwyer Instruments, Inc.
- เครื่องวัดความดันแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (pressure regulator) type CR 25F ของบริษัท Ming Shen Ent. Co.,Ltd.
- เครื่องควบคุมเวลา Model TM-24H ของบริษัท Kawamura Electric Ind. Co.,Ltd.
- เครื่องปั๊มอากาศ (Air pump) LP-60 Guangdong Risheng Group Co.,Ltd.

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย

- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Model 7800 ของบริษัท Jasco
- เครื่องวัดค่ากรด-เบส Model SA520 ของบริษัท Orion

- เครื่องหมุนเหวี่ยง Model H–103.N series ของบริษัท Kokusan Enshinki Ltd.
- เครื่องกรองมิลลิพอร์
- ปั๊มดูดสุญญากาศ (Suction pump)

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพไฮโดรคาร์บอน

- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas Chromatography) Model HP 5890 Gas Chromatograph ของบริษัท Hewlette Packard
- เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) Model HP 5972 Mass Selective Detector ของบริษัท Hewlette Packard
- เครื่องฟรีซดรายเออร์ (Freeze dryer)
- เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator)
- เครื่องทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Thin Layer Chromatography)
- เครื่องระเหยสุญญากาศ

วิธีการ

1. การแยกสาหร่าย

เก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในเดือนพฤศจิกายน ปีพ.ศ. 2545 โดยใช้ถุงแพลงก์ตอน ขนาดตา 45 ไมโครมิเตอร์ นำตัวอย่างน้ำมาแยกเฉพาะโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus braunii* โดยใช้คาปิลารีปิเปต (Capillary pipette) ดึงโคโลนีของ *B. braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ล้างโคโลนีด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลายๆครั้งโดยใช้คาปิลลารีปิเปต (Stein, 1973) จากนั้นถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Modified Chu 13 ทำเช่นเดิมหลายๆครั้งจนได้จำนวนโคโลนีพอสมควร นำไปบ่ม (incubate) บนชั้นเลี้ยงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์

2. คัดเลือกและวิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

คัดเลือกแหล่งน้ำทิ้งที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่าย (พิจารณาจากน้ำทิ้งมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูง) โดยเลือกน้ำทิ้งของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจำกัด (มหาชน) และน้ำทิ้งของบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์จำกัด (มหาชน) มาทำการวัดค่ากรด-เบส, ซีโอดี, ของแข็งทั้งหมด, ไนเทรตโดยวิธี Cadmium reduction method, ฟอสเฟตโดยวิธี Ascorbic method, แอมโมเนียโดยวิธี Phenate method (APHA, AWWA and WPCF, 1995) และไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) โดยวิธี Kjeldahl method

(A.O.A.C.,1990) ซึ่งเฉพาะไนโตรเจนทั้งหมดได้ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

<u>เตรียมน้ำทิ้งเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่าย</u>

นำน้ำทิ้งมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อลดปริมาณสารแขวนลอยเก็บในแกลลอนพลาสติกขนาด 20 ลิตร นำไปเก็บรักษาในห้องแช่เยือกแข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาเลี้ยงสาหร่าย นำมาทำให้ละลายและกรองซ้ำด้วยผ้าขาวบางอีก 2-3 ครั้ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ก่อนนำมาใช้

<u>การเตรียมเชื้อเริ่มต้น</u>

ถ่ายสาหร่าย *B. braunii* ลงในฟลาสก์ (ภาพที่ 3a) ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารสูตร Modified Chu 13 ปริมาตร 100 มล. นำฟลาสก์ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ช่วงสว่างต่อมืด เท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายสาหร่ายจากแต่ละฟลาสก์ลงในขวดแก้วก้นแบน (Carboy) (ภาพที่ 3b) เจือจางด้วยอาหาร Modified Chu 13 เลี้ยงในสภาวะเดิมโดยเพิ่มอากาศผสม CO_2 1% อัตรา 5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

3a

3b

ภาพที่ 3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นในฟลาสก์ (3a) และในขวดแก้วก้นแบน (3b)

Figure 3 Preparation of precultures in conical flasks (3a) and carboys (3b)

3.1 ความเข้มแสง

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และ Kratz and Myers ค่ากรด-เบส 6.7 ความเข้มแสง 3,000, 5,000 และ 10,000 ลักซ์ โดยเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 400 มล. ปริมาตรเลี้ยง 200 มล. ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เลี้ยงในอ่างแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4) ให้อากาศผสม CO_2 1% อัตรา 1 ลิตรต่อนาที ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน ประมาณ 22 วัน โดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อวัดค่ากรด-เบส วัดการเติบโตโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร หาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (Vonshak and Borowitzka, 1991) คำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) (Pirt, 1975) จากสูตร

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \quad \text{หรือ} \quad \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\triangle t}$$

โดย X_1 = มวลของสาหร่ายเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

X_2 = มวลของสาหร่ายที่เวลา (t) (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (วัน)

คำนวณระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time)(t_d) จากสูตร

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

ทุกชุดการทดลองจะใช้ค่า μ และ t_d เป็นหลักในการพิจารณาผลที่ใช้ในการทดลองต่อเนื่อง

ภาพที่ 4 เลี้ยงสาหร่ายในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 และ Kratz and Myers ค่ากรด-เบส 6.7 ที่ความเข้มแสง 3000, 5000 และ 10,000 ลักซ์

Figure 4 Cultivation of algal cells in Modified Chu 13 pH 6.7 and Kratz and Myers pH 6.7 at light intensity 3,000, 5,000 and 10,000 lux

3.2 ค่ากรด-เบสเริ่มต้น

เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ปรับค่ากรด-เบส 6.7 และไม่ปรับค่ากรด-เบส เปรียบเทียบกับอาหาร Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 โดยใช้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดยเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 400 มล. ปริมาตรเลี้ยง 200 มล. ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เลี้ยงในอ่างแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศผสม CO_2 1% อัตรา 1 ลิตรต่อนาที ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน โดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.3 สารอาหาร

เลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ที่ปรับปริมาณสารอาหาร (ไนเทรต) ให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 โดยเลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหาร Modified Chu 13 ค่ากรด-เบส 6.7 ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เลี้ยงภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.2 สุ่มตัวอย่างและวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1 และสกัดไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายในระยะ early stationary phase (ตามวิธีข้อ 5.1) และหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคาโรทีนอยด์ (ตามวิธีภาคผนวก ค) วิเคราะห์คุณลักษณะน้ำทิ้งภายหลังการเลี้ยงสาหร่าย (ปริมาณไนเทรตและฟอสเฟต) และคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอน (Productivity) (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2541) จากสูตร

$$\text{Productivity} = \frac{dP}{dt}$$

โดย dP = ไฮโดรคาร์บอนที่สาหร่ายผลิตได้ต่อหน่วยเวลา (กรัมต่อลิตร)

dt = ช่วงเวลา (วัน)

(เมื่อเริ่มต้นทดลองที่ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 2.48%)

4. การเพิ่มปริมาณการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อสกัดไฮโดรคาร์บอน

4.1 ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น

เลี้ยงสาหร่ายในขวดแก้วก้นแบน ปริมาตรเลี้ยง 2 ลิตร ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจำกัด (มหาชน) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และปรับค่ากรด-เบส 6.7 ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 และ 0.4 ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศผสม CO_2 1% อัตรา 5 ลิตร/นาที ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยวิธีปลอดเชื้อ

เพื่อวัดค่ากรด-เบส วัดการเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย คำนวณอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอน และหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายในระยะ early stationary phase (ตามวิธีข้อ 5.1)

4.2 อัตราการให้อากาศ

เลี้ยงสาหร่ายในขวดแก้วก้นแบน ปริมาตรเลี้ยง 2 ลิตร ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่งจำกัด (มหาชน) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยปรับค่ากรด-เบส 6.7 และปรับปริมาณสารอาหารให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (ผลจากข้อ 4.1) ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศผสม CO_2 1% อัตราเพิ่มขึ้นจาก 5 ลิตร/นาที เป็น 7 ลิตร/นาที ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อวัดค่ากรด-เบส วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย คำนวณอัตราการผลิตไฮโดรคาร์บอน และหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายในระยะ early stationary phase (ตามวิธีข้อ 5.1 และ 5.2)

5. การสกัดไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่าย *B. braunii*

5.1 แบบทำแห้งสาหร่ายด้วยการอบแห้ง

นำสาหร่ายที่ได้มากรองแล้วทำให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมา สกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยสารละลายเฮกเซนเป็นเวลา 30 นาทีพร้อมการกวน (Frenz *et al*., 1989) จากนั้นกรองเซลล์สาหร่ายออก แล้วนำไประเหยเฮกเซนด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อบแห้งไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

5.2 แบบทำแห้งสาหร่ายด้วยการ freeze drying

นำสาหร่ายที่ได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จากนั้นนำมาสกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยสารละลายเฮกเซนเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง sonicator (Maxwell *et al*., 1968) โดยใช้ความถี่เสียง 70 Hz เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองเซลล์สาหร่ายออก แล้วนำไประเหยเฮกเซนด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อบแห้งไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

5.3 วิเคราะห์คุณลักษณะไฮโดรคาร์บอน

นำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้มาวิเคราะห์คุณลักษณะโดยใช้เครื่อง Thin Layer Chromatography (ส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และ Gas Chromatography (Metzger *et al*., 1985) (ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอาหารสังเคราะห์และความเข้มแสงด้วยวิธี Two-Way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 for Windows

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญเป็น 2 เท่า, ปริมาณคาโรทีนอยด์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอน ด้วยวิธี Tukey (HSD) comparision of means โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 for Windows