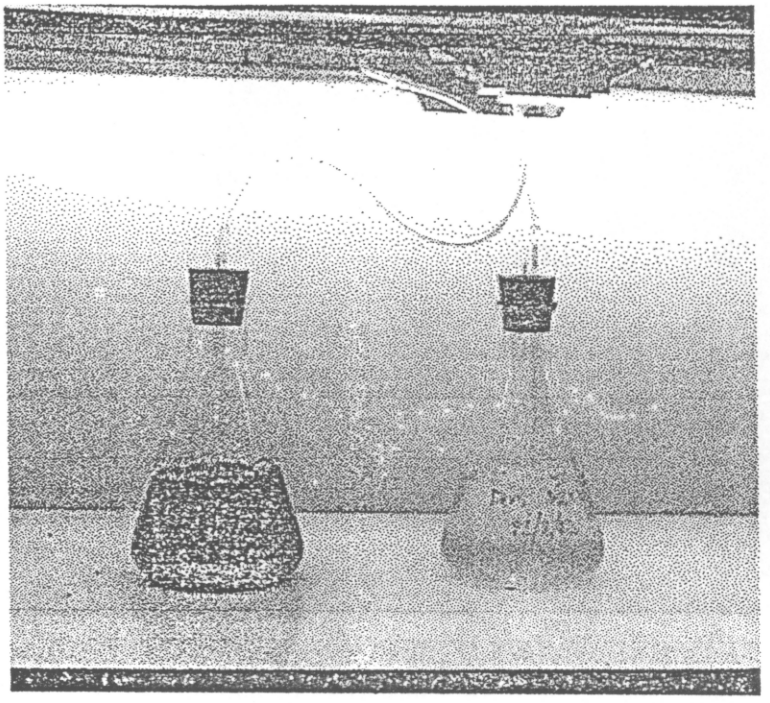
2. วิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเพื่อหาช่วงการเจริญเติบโต

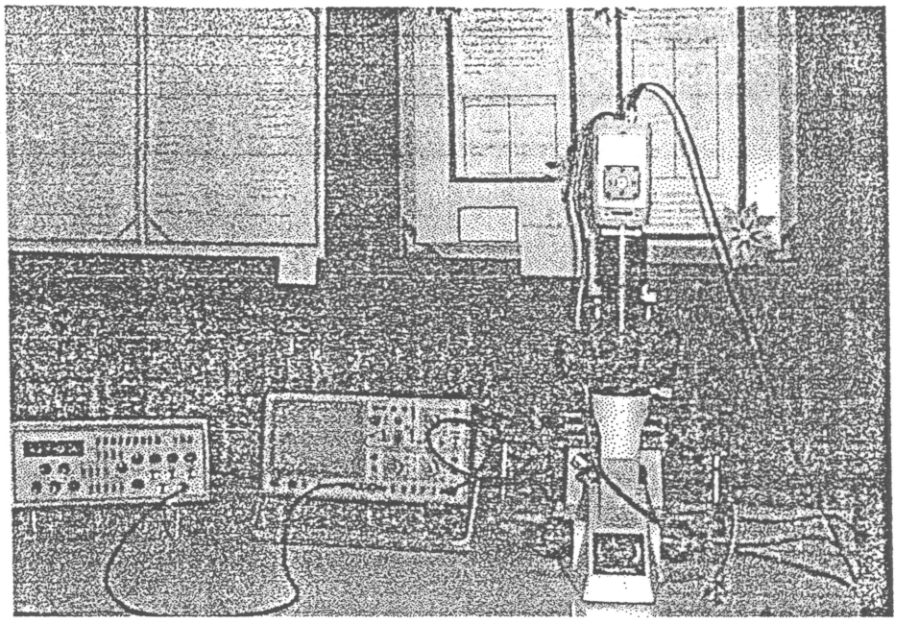
แพลงก์ตอนพืชชนิด Chlorella sp.ที่ใช้ทดลองได้รับจากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยปรับความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง (4-5) x 10^5 cell/ml ในน้ำเลี้ยงสูตร sato &serrikawa และ น้ำเลี้ยงสูตร provasoli (ดูรายละเอียดสูตรน้ำเลี้ยงทั้งสองจากภาคผนวก ก.) อัตราส่วนของหัวเชื้อต่อน้ำเลี้ยงเป็น 1 : 10 สภาพความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้ในน้ำเลี้ยง 20 ppt (ตามศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสุราษฎร์ธานี) ควบคุมแสงที่ 3000 Lux อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงดังภาพประกอบ 3 นับเซลล์ทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound ชนิด canon YS2-H กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกค่าที่ได้ คำนวณความหนาแน่นเซลล์ เขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ (log phase) .



ภาพประกอบ 3 แสดงการเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงควบคุมแสงที่ 3000 Lux อุณหภูมิ 25 C^{0}

2.2 การเตรียมเซลล์เพื่อการเหนี่ยวนำ

นำเซลล์ที่มีช่วงอายุในช่วง log phase มาล้างโดยการ เซนตริฟิวจ์ 2 ครั้ง ใช้เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน Hettich รุ่น EBA III ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีแขวนลอยในสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ปรับค่าสภาพนำไฟฟ้าด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์(KCl)ด้วยเครื่องวัดค่าสภาพนำไฟฟ้า Mettler toledo รุ่น MC 126 – 2M ปรับความหนาแน่นเซลล์เป็น (1-2) x 10^{5} cell/ml หยดสารละลายเซลล์ปริมาตร 50 μl ลงระหว่างขั้วอิเล็กโทรด ที่ปรับระยะห่างระหว่างขั้วไว้ 120 μm (จุติพร สุดศิริ, 2541) ให้สัญญาณไฟฟ้าด้วยเครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า BK precision 4040 ดังภาพประกอบ 4 หาช่วงความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิกกำหนดให้เป็นค่า $f_1 - f_2$ โดยให้ค่า f_1 เป็นค่าความถี่ต่ำและf_2 เป็นค่าความถี่สูง



ภาพประกอบ 4 แสดงเครื่องมือการเหนี่ยวนำเซลล์ประกอบด้วย เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้า เครื่องออสซิลโลสโคป และกล้องจุลทรรศน์ซึ่งมีอิเล็กโทรดวางติดกับฐานกล้อง

2.3 การเตรียมเซลล์เพื่อแขวนลอยในสารละลาย ($Na_2HAsO_4.7H_2O$)

นำเซลล์ที่มีอายุเหมือนในข้อ 2.2 เซนตริฟิวจ์ 2 ครั้งปรับความหนาแน่นเซลล์เหมือนข้อ 2.2 แขวนลอยเซลล์ในสารละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ในการนี้ทำการทดลอง 2 ขั้นตอนดังนี้

2.3.1 หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก กับความเข้มข้นของสารละลาย

โดยการแขวนลอยเซลล์ในสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารละลาย 5,10,50,100 และ 200 ppm เหนี่ยวนำเซลล์ หาค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก f_1 กับความเข้มข้นของสารละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$

2.3.2 หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิกกับเวลาที่แขวนลอยเซลล์

โดยให้เซลล์แขวนลอยในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ppm ที่เวลา 30 นาที 1 , 2 , 3 ชั่วโมง เหนี่ยวนำเซลล์ หาค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก กับเวลาที่แขวนลอยเซลล์ ทำซ้ำที่ความเข้มข้นค่าอื่นตามข้อ 2.3.1 ทุกค่า

2.3.3 หาค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิกเริ่มเปลี่ยน

ในขั้นนี้ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1 ppm และเพิ่มเป็น 2 , 3 และ 4 ppm แขวนลอยในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที เหนี่ยวนำเซลล์ หาค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์

2.3.4 หาเวลาในการแขวนลอยเซลล์ที่ความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิกเริ่มเปลี่ยน

ในขั้นนี้ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.3.2 แต่เปลี่ยนเวลาในการแขวนลอยเซลล์เป็น 5นาทีและเพิ่มเป็น 10 , 15 , 20 , 25 นาที แขวนลอยในสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 ppm เหนี่ยวนำเซลล์ หาค่าความถี่ไดอิเล็กโทรฟอเรทิก ทำซ้ำกับค่าวคามเข้มข้นทุกค่าตามข้อ 2.3.3

2.4 การเตรียมเซลล์เพื่อแขวนลอยในสารละลาย $Pb(NO_3)_2$

ทำตามขั้นตอนการทดลองตามข้อ 2.3.1 – 2.3.4 แต่เปลี่ยนสารละลายที่แขวนลอยเซลล์เป็นสารละลาย $Pb(NO_3)_2$

2.5 การเตรียมเซลล์เพื่อการตรวจสอบการดูดซับโลหะหนักของเซลล์

ในตอนนี้ทำการทดลอง เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์มีการดูดซับโลหะหนักจริง ทำการทดลองโดย

2.5.1 ใช้เซลล์ที่มีอายุ ตามข้อ 2.2 แขวนลอยในสารละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 10 นาที เซนตริฟิวจ์เอาเซลล์ออก นำสารละลายที่แขวนลอยเซลล์ไปตรวจหา ปริมาณ Arsenic และ lead ที่เหลือเทียบกับขวดควบคุม ที่ไม่มีเซลล์แขวนลอย โดยการส่งตัวอย่างไปตรวจหาปริมาณดังกล่าวด้วยเครื่อง AA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.5.2 ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.5.1 แต่เปลี่ยนสารละลายที่แขวนลอยเซลล์เป็นสารละลาย $Pb(NO_3)_2$

2.5.3 เปรียบเทียบปริมาณโลหะหนักในข้อ 2.5.1 และข้อ 2.5.2 กับขวดควบคุมที่ไม่มีเซลล์แขวนลอย บันทึกผลปริมาณโลหะหนักที่เปลี่ยนแปลงไป

3.ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็นตอนๆดังนี้

ตอนที่1 การทดลองเพื่อหาช่วงการเจริญเติบโตของ Chlorella sp.

การทดลองในตอนนี้เพื่อหาช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการวิจัย ทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (4-5) x 10^5 cell/ml ค่า PH เฉลี่ยของการเลี้ยง 7.85 – 8.68 ครั้งแรกเลี้ยงด้วยน้ำเลี้ยง sato&serrikawa ได้ผลการทดลองดังกราฟในภาพประกอบ 5