ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ Ankistrodesmus sp. จากสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย ในห้องปฏิบัติการ สูตร NSIII ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เตรียมได้ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 29 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ Ankistrodesmus sp. ตามสูตร NS III (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

สารเคมี	น้ำหนักสาร (g): น้ำกลั่น 1 ลิตร	นำมาใช้ (ml): 1 ลิตร
KNO_3	101.1	10
KH_2PO_4	120.0	2
$K_2HPO_4.3H_2O$	142.0	-
$MgSO_4.H_2O$	62.0	2
$CaCl_2.2H_2O$	7.4	2
NaCl	116.8	0.1
Micro A		2
Micro B (Manganese)		2
Micro C (Iron-EDTA)		2

สำหรับการเตรียมสารละลาย Microelement A, B, และ C เตรียมได้ดังตารางที่ 21

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 30 การเตรียมสารละลาย Microelement A, B และC

สารเคมี	น้ำหนักสาร (mg)		ปริมาณที่ใช้ (ml)
Micro <u>A</u> = 200 ml A.1 Solution + 2 ml A.2 Solution + 798 ml Water			
KBr	595.0		
KI	415.0	น้ำกลั่น 1,000 ml +	
LiCl	21.2	3 ml HCl conc.	200
H_3BO_3	77.0	**(A.1)**	
$ZnSO_4.7H_2O$	144.0		
$NiSO_4.6H_2O$	658.0		
$CoSO_4.5H_2O$	70.0	น้ำกลั่น 100 ml +	
$CuSO_4.5H_2O$	125.0	0.3 ml HCl conc.	2
$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	167.0	**(A.2)**	
$(NH_4)_6MoO_{24}.4H_2O$	44.0		
NH_4VO_3	29.0		
Micro <u>B</u>			
$MnCl_2.4H_2O$	50.0	ผสมในน้ำกลั่น 1,000 ml + 3 ml HCl conc.	
Micro <u>C</u>			
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	810.0	ผสมในน้ำกลั่น 100 ml (เก็บไว้ในที่มืด)	
EDTA	750.0		

เมื่อทำการผสมสารต่าง ๆ ตามที่กล่าวแล้ว นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเก็บในขวดทึบแสงต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมสารเคมี

ทำการเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับทดสอบโลหะหนัก โดยเตรียม Stock Solution ของโลหะหนักไว้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 ppm ทำการคำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

โดยที่ C_1: ความเข้มข้นสารเริ่มต้น (1,000 ppm)

C_2: ความเข้มข้นสารที่ต้องการ (40 ppm)

V_1: ปริมาตรสารที่ใช้

V_2: ปริมาตรสารที่ต้องการ

<u>ตัวอย่าง</u> ต้องการเตรียม Stock Solution ของโลหะหนักแต่ละชนิดให้เป็น 40 ppm จาก Stock solution โลหะหนักที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1,000 ppm คำนวณดังนี้

$$(1{,}000 \text{ ppm})(V_1 \text{ ml}) = (40 \text{ ppm})(1{,}000 \text{ ml})$$

$$V_1 = 40 \text{ ml}$$

ดังนั้นต้องดูด Stock solution โลหะหนักที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 40 ml ผสมกับน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 ml สุดท้ายจะได้ Stock Solution ที่มีความเข้มข้น 40 ppm และสำหรับการเตรียม Media Toxicant ทำโดยการ dilute โลหะหนักแต่ละชนิดจาก Stock Solution 40 ppm ที่เตรียมไว้ โดยใช้ Media ที่ปราศจาก EDTA เป็นตัว dilute ตามระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

วิธีการวัดค่าการเจริญของสาหร่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

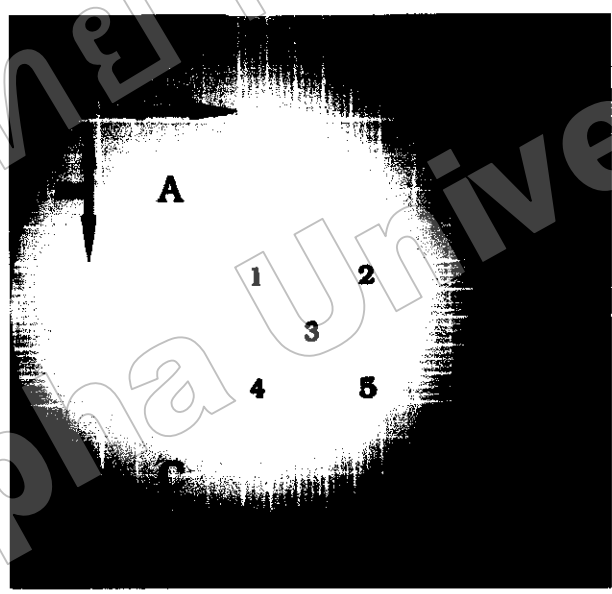
วิธีการวัดค่าการเจริญของสาหร่าย

การนับจำนวนเซลล์สาหร่าย (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี, 2548)

การนับจำนวนสาหร่ายด้วย Hemacytometer ใช้หน่วยเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรน้ำ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้หน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำโดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร หยดตัวอย่างให้ไหลเข้า Cover Glass ที่อยู่บน Hemacytometer จนเต็มพื้นที่ตารางจะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก จากนั้นนับจำนวนเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ตามช่องที่กำหนดคือ A B C D หรือ 1 2 3 4 5 และนำมาคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตรดังนี้

ค่าเฉลี่ยของเซลล์ในช่อง A B C D $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ

ค่าเฉลี่ยของเซลล์ในช่อง (1 2 3 4 5) $\times \frac{1}{4} \times 10^6$ เซลล์/ มิลลิลิตร



ภาพที่ 47 ตำแหน่งการนับจำนวนเซลล์บน Haemacytometer

การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าโอดีกับน้ำหนักแห้ง (ศศิพินท์ นรเสรษฐพันธ์, 2541)

การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าโอดีกับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (มิลลิกรัม/ ลิตร) เพื่อสร้างเป็นสมการพยากรณ์ ทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองไปอบในตู้อบ (Oven) จนแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำ

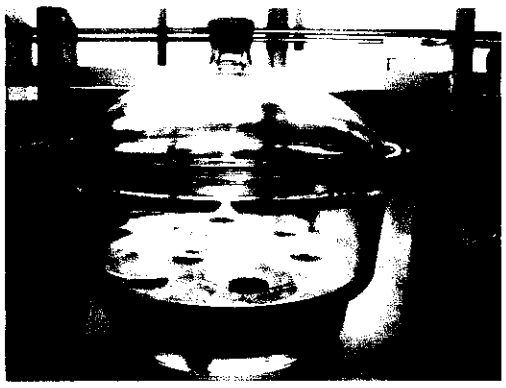
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. นำ pure culture ของสาหร่ายแต่ละชนิดมาปรับให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้อาหารเลี้ยง แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายเป็น Blank

3. นำ pure culture ของสาหร่ายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งวัดค่า OD แล้ว จำนวน 10 มิลลิลิตร ไปกรองบนกระดาษกรองจากข้อ 1.

ภาพที่ 48 กระดาษกรอง GF/ C หลังจากกรองเซลล์สาหร่ายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้

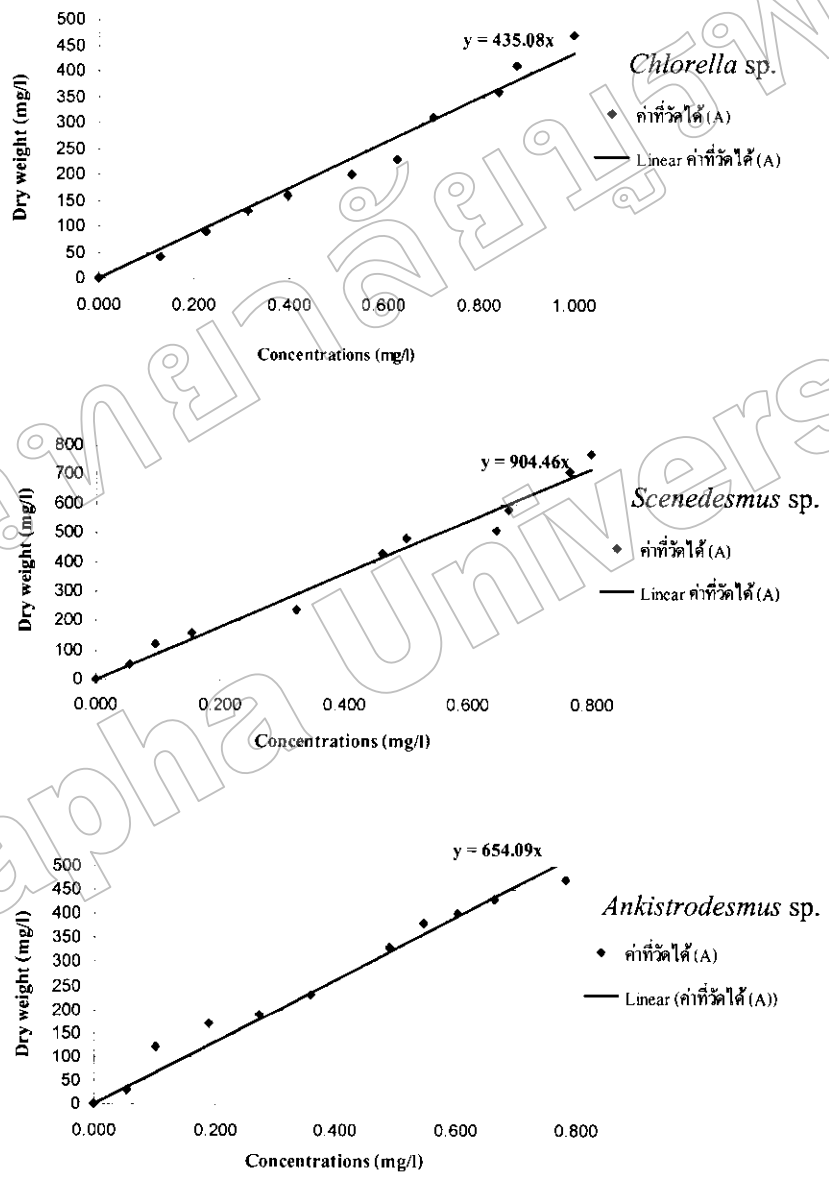
4. นำกระดาษกรองที่กรองสาหร่ายในข้อ 3. ไปอบจนแห้งสนิทอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ดังภาพที่ 57 จนอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง หักน้ำหนักของกระดาษกรองออก น้ำหนักที่เหลือเป็นน้ำหนักแห้งของสาหร่าย คิดเป็นหน่วย mg/ l



ภาพที่ 49 ทำให้อุณหภูมิเย็นลงด้วยโถดูดความชื้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. นำค่า OD ในข้อ 2. และค่าของน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (mg/ l) ในข้อ 4. มาสร้างสมการพยากรณ์เพื่อใช้ประเมินค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (mg/ l) จากค่า OD ที่วัดได้จากการทดลอง ได้กราฟมาตรฐานดังนี้

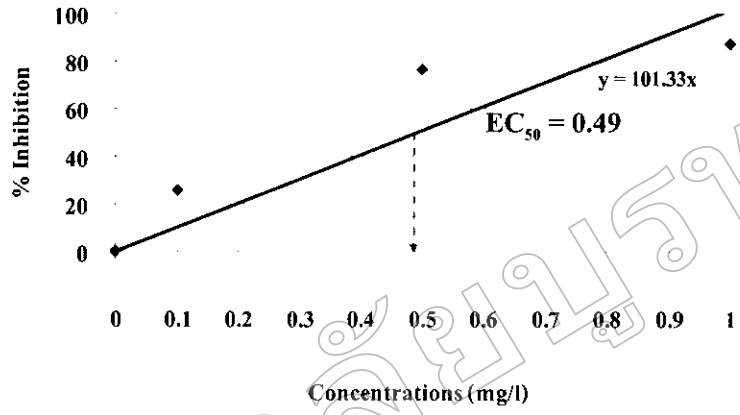


ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., และ *Ankistrodesmus* sp.

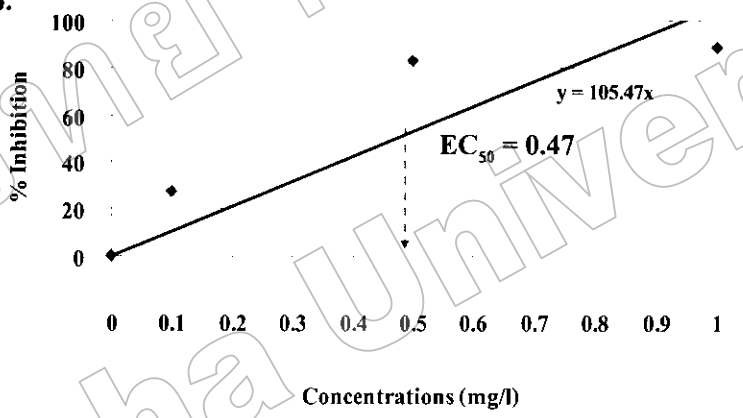
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กราฟหาค่าระดับความเข้มข้นที่มีผลให้การเจริญของสาหร่ายลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

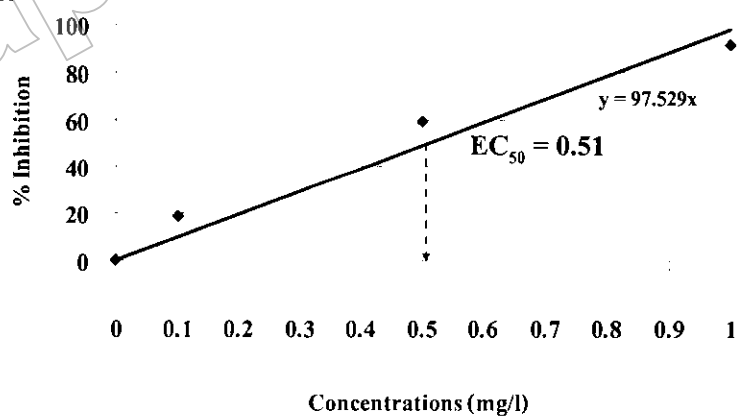
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



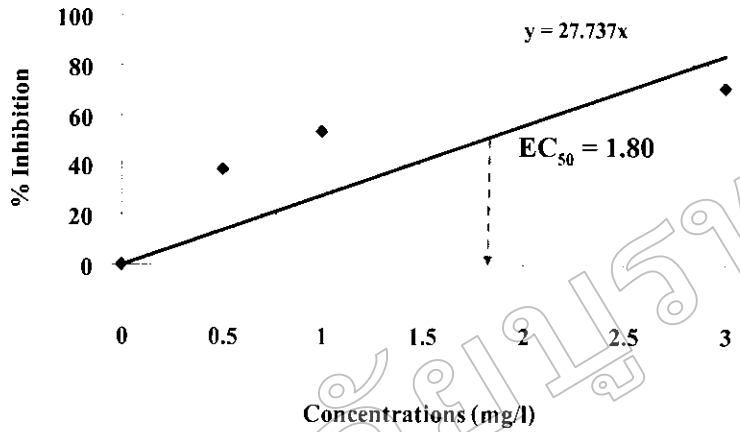
***Ankistrodesmus* sp.**



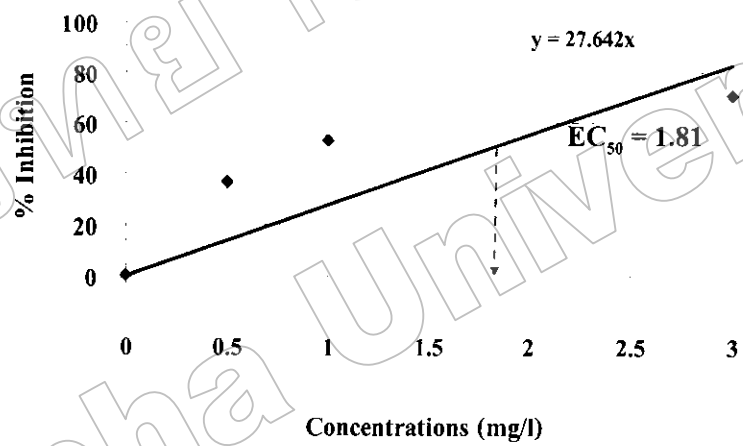
ภาพที่ 51 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของจำนวนเซลล์ (% Inhibition) เมื่อเทียบกับ Control ของสาหร่าย *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Ankistrodesmus* เพื่อหาค่า EC_{50} หลังจากได้รับสารปรอทเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

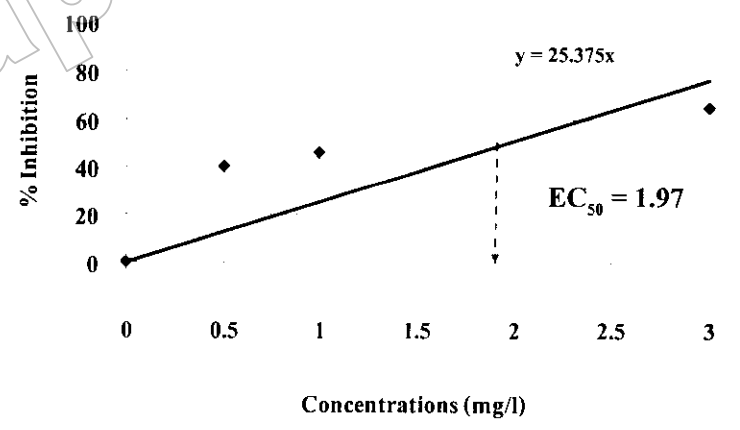
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



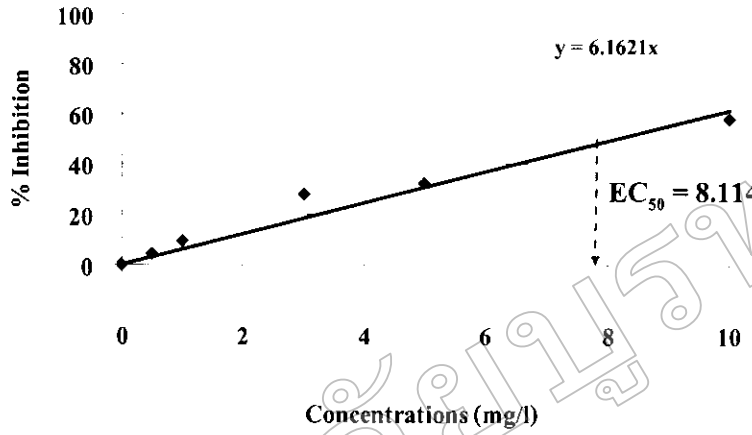
***Ankistrodesmus* sp.**



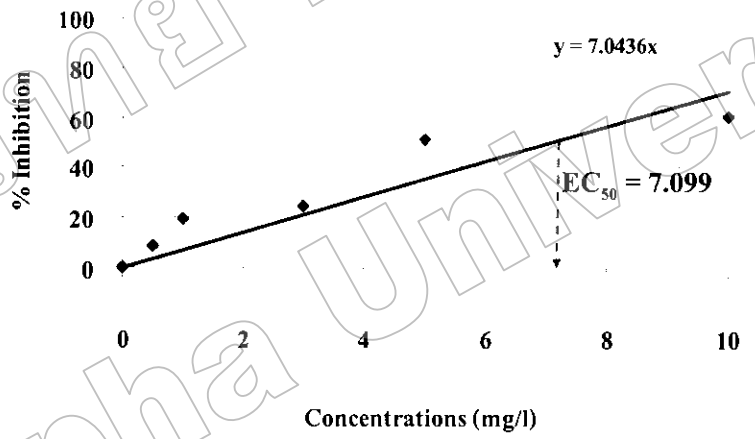
ภาพที่ 52 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของจำนวนเซลล์ (% Inhibition) เมื่อเทียบกับ Control ของ *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Ankistrodesmus* เพื่อหาค่า EC_{50} หลังจากได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

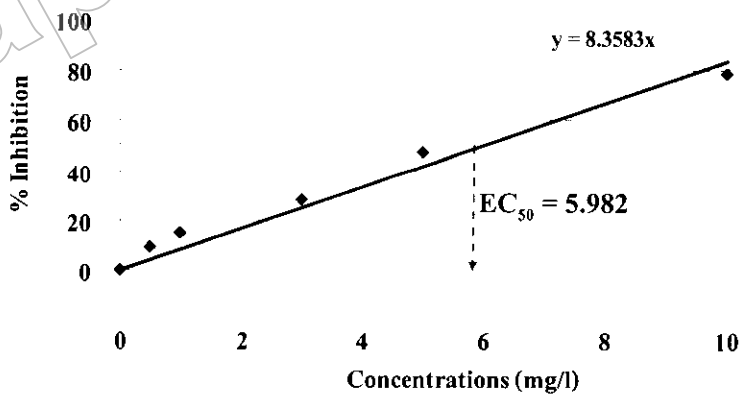
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



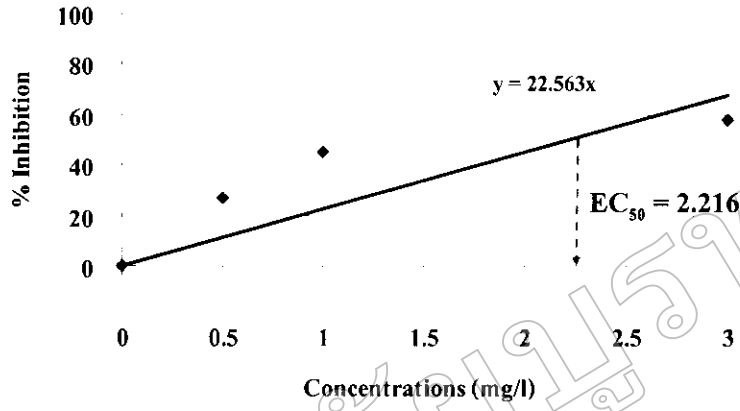
***Ankistrodesmus* sp.**



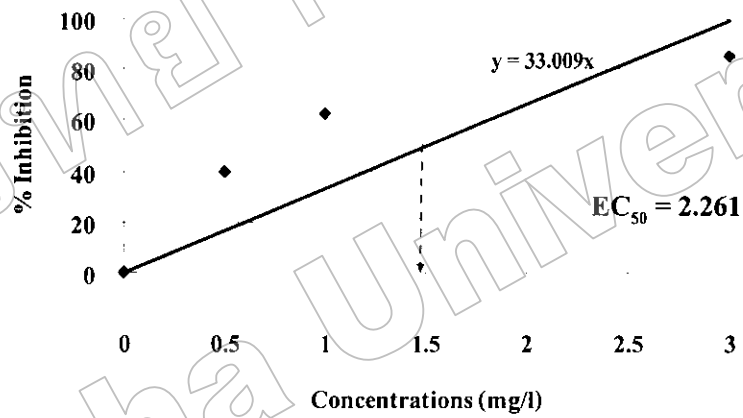
ภาพที่ 53 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของจำนวนเซลล์ (% Inhibition) เมื่อเทียบกับ Control ของ *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Ankistrodesmus* เพื่อหาค่า EC_{50} หลังจากได้รับสารตะกั่วเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

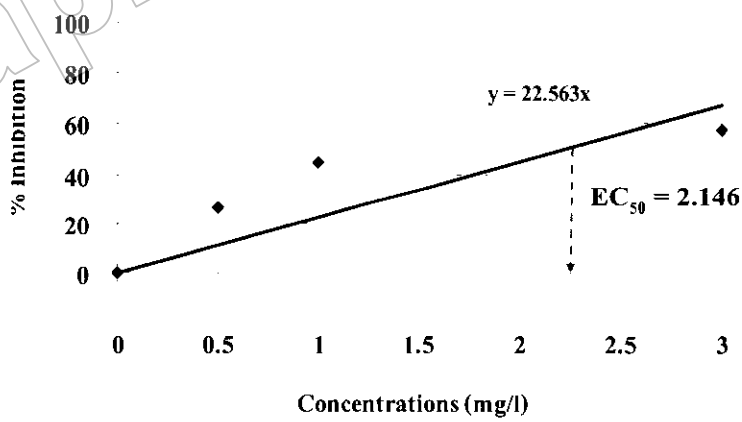
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



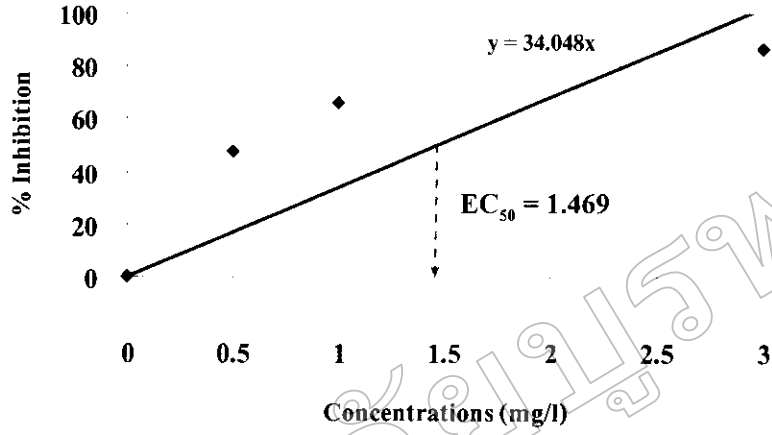
***Ankistrodesmus* sp.**



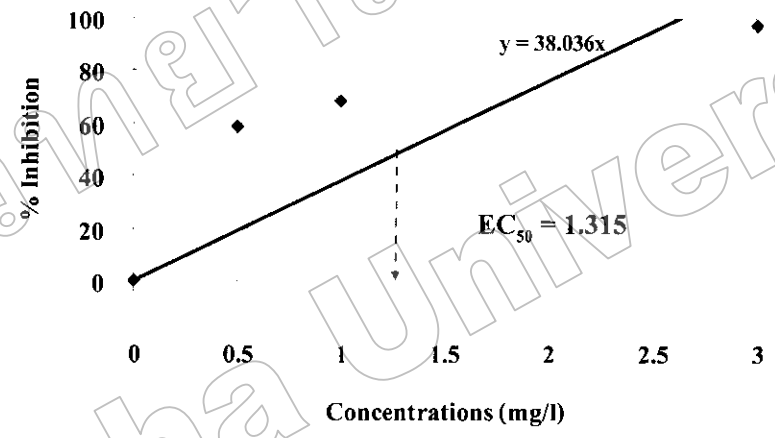
ภาพที่ 54 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของจำนวนเซลล์ (% Inhibition) เมื่อเทียบกับ Control ของ *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Ankistrodesmus* เพื่อหาค่า EC_{50} หลังจากได้รับสารหนู เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

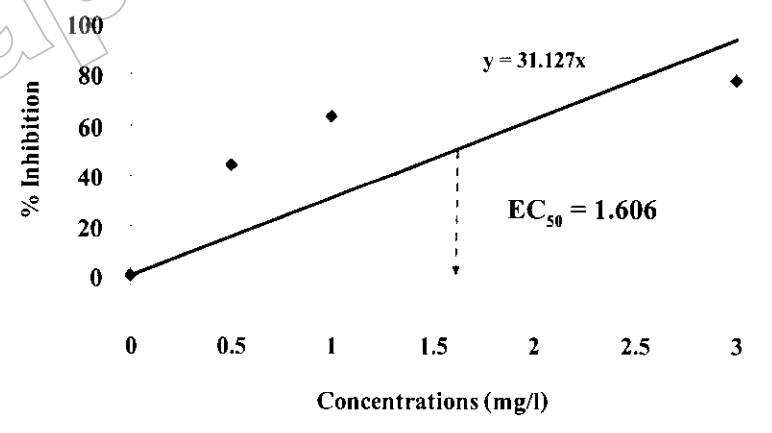
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



***Ankistrodesmus* sp.**



ภาพที่ 55 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของจำนวนเซลล์ (% Inhibition) เมื่อเทียบกับ Control ของ *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Ankistrodesmus* เพื่อหาค่า EC_{50} หลังจากได้รับทองแดงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

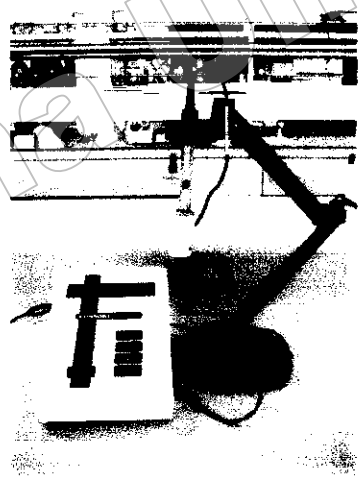
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 56 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง AND Model hr-200

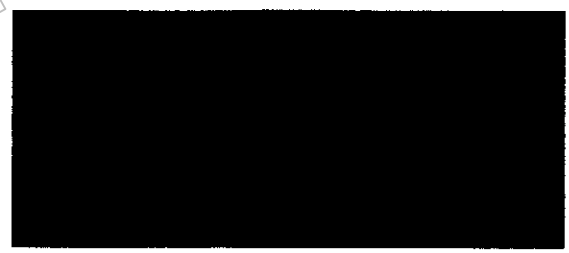


ภาพที่ 57 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Multi-Parameter Analyzer) CONSORT C380

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

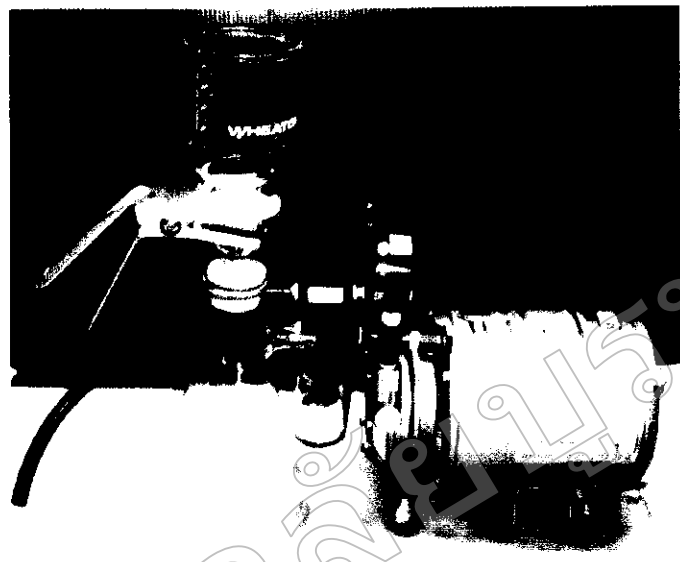
ภาพที่ 58 Spectrophotometer GENESYS 20

ภาพที่ 59 Centrifuge UNIVERSAL 32



ภาพที่ 60 สไลด์นับเซลล์สาหร่าย Hemacytometer

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 61 ชุดกรองสุญญากาศ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University