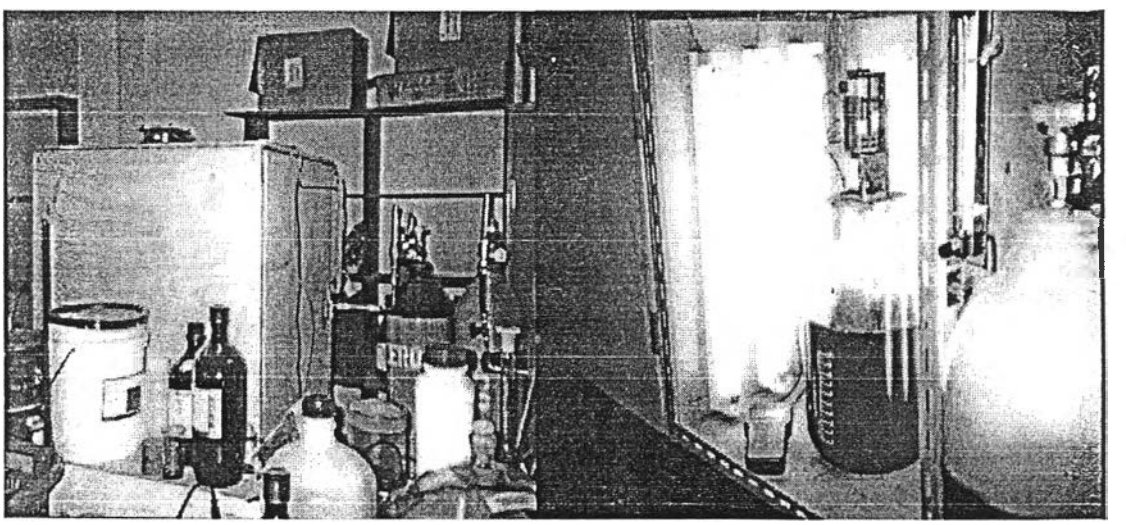
บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายคลอเรลลาที่ใช้ในการทดลองคือ *Chlorella* sp. เป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี

3.2 อุปกรณ์

1. กล่องไม้ขนาด 1.0 x 0.75 x 0.8 m^3
2. หลอดฟลูออเรสเซนต์ 20 W ขนาดเล็ก จำนวน 6 หลอด
3. ถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร (Nalgene Culture Vessels Cat. No. 2600-0012)
4. Rotameter flow 0 – 30 L/hr
5. 10-AU Fluorometer
6. เครื่องวัด TPS WP-81 (วัดอุณหภูมิ และ pH)
7. เตาอบ
8. แก๊สผสมที่มี CO_2 10 % และ 20 % (N_2 Balance)
9. ชุดกวน (motor 30 W และ ใบกวนแบบพาย)



รูปที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3 การออกแบบการทดลอง (Douglas C. Montgomery.1997. Chapter 9)

ตัวแปรที่ต้องการศึกษา

ตัวแปร		ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
A	= ความเข้มแสง (lux)	1000	3000
B	= อัตราการป้อน CO_2 (L/hr)	6	12
C	= ความเข้มข้น CO_2 (%)	10	20
D	= อัตราเร็วการกวน (rpm)	100	200

เนื่องจากตัวแปรที่ต้องการศึกษามีอยู่หลายตัวแปร และการทดลองแต่ละครั้งต้องใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองแบบ Full Factorial ได้

ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงออกแบบการทดลองเป็นแบบ Two-Level Fractional Factorial เพื่อศึกษาว่าตัวแปรใดมีผลกระทบที่สำคัญต่ออัตราการเติบโตและปริมาณการใช้ CO_2 ของสาหร่าย

การออกแบบ Full Factorial จะต้องทำการทดลองดังแสดงใน ตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 แบบการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ 2^k Factorial Design

RUN	A	B	C	D	ABCD
1	-	-	-	-	+
2	-	+	-	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	+	+	-	+
5	+	-	-	+	+
6	+	+	-	-	+
7	+	-	+	-	+
8	+	+	+	+	+
9	-	-	-	+	-
10	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-
12	-	+	+	+	-
13	+	-	-	-	-
14	+	+	-	+	-
15	+	-	+	+	-
16	+	+	+	-	-

เครื่องหมาย + เป็นค่าสูงสุดของตัวแปรที่ศึกษาและเครื่องหมาย - เป็นค่าต่ำสุดของตัวแปรที่ศึกษา

สำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Fractional Factorial จะทำการทดลองโดยเลือกค่า ABCD จากการออกแบบการทดลองแบบ 2^k Factorial Design ในตารางที่ 3.1 ซึ่งค่าเป็นบวกทั้งหมด หรือเป็นลบทั้งหมด ในงานวิจัยนี้เลือกค่า ABCD เป็นบวกทั้งหมด แผนการทดลองแบบ Two-Level Fractional Factorial เมื่อแทนค่าจริงของตัวแปรที่ต้องการศึกษาลงในตารางจะได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Two-Level Fractional Factorial

การทดลองที่	ความเข้มแสง (lux)	อัตราการป้อน CO_2 (L/hr)	ความเข้มข้น CO_2 (%)	ความเร็วรอบของการกวน (rpm)
1	1000	6	10	100
2	1000	12	10	200
3	1000	6	20	200
4	1000	12	20	100
5	3000	6	10	200
6	3000	12	10	100
7	3000	6	20	100
8	3000	12	20	200

3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

3.4.1 การทำความสะอาดถังปฏิกรณ์

1. การทำความสะอาดถังปฏิกรณ์ ล้างโดยใช้ สบู่เหลวสำหรับทำความสะอาดภาชนะ แช่ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาจนไม่มีฟองของสบู่เหลวสำหรับทำความสะอาดภาชนะ
2. ทำการแช่ด้วยกรด HCl 10 % เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่ปนเปื้อนในถังปฏิกรณ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำไปผึ่งโดยคว่ำถังลง จนถังปฏิกรณ์แห้งสนิท
4. นำไปเข้าเครื่องฉายแสงเหนือม่วงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อกำจัดเชื้อที่อาจจะเจือปนอยู่ในถังปฏิกรณ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. นำน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ประมาณ 14 ลิตร
2. ใส่สารอาหารสูตร NS III ตาม ภาคผนวก ก 250 ml.
3. ปรับปริมาตรเท่ากับ 15 ลิตร

3.4.3 การหาน้ำหนักแห้ง

1. สุ่มตัวอย่างสาหร่ายจำนวน 50 ml
2. กรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร
3. อบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำน้ำที่ได้จากการกรองนำไปวิเคราะห์หาค่า Free Carbon dioxide และ Total Alkalinity โดยการไตเตรตด้วยอินดิเคเตอร์ ดังภาคผนวก ข.

3.4.4 การหาความหนาแน่นเซลล์ โดย Haemacytometer

Haemacytometer เป็นสไลด์ที่มีขนาด กว้าง 0.1 cm ยาว 0.1 cm และลึก 0.01 cm

$\therefore$ ปริมาตร $= 0.1 \times 0.1 \times 0.01 = 1 \times 10^{-4}\ cm^3$

การวัดความหนาแน่นเซลล์ ใช้ autopipette ดูด ตัวอย่างสาหร่ายที่สุ่มมาจากถังปฏิกรณ์ หยดลงบน Haemacytometer ปิดด้วย cover glass จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

จำนวนเซลล์/มล. = จำนวนเซลล์ที่นับได้ $\times 10^4$

3.4.5 การเลี้ยงสาหร่ายในเครื่องปฏิกรณ์

1. นับจำนวนเซลล์คลอเรลลาในขวดเพาะเชื้อ (Stock) เพื่อหาความหนาแน่นด้วย Haemacytometer
2. หาปริมาตรของเหลวในขวดเพาะเชื้อที่จะเติมลงในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร เพื่อให้ได้เซลล์เริ่มต้นมีความหนาแน่นเท่ากับ 3000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
3. เลี้ยงคลอเรลลาในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร ที่ภาวะการทดลองตามที่ออกแบบการทดลองไว้ดังตารางที่ 3.2 เช่น ความเข้มแสง 1000 (20 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) ลักซ์ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราการป้อน 6 ลิตรต่อชั่วโมง อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และการให้แสงจะให้ช่วงมืดและช่วงสว่าง

เท่ากับ 12/12 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงจนกระทั่งสาหร่ายมีการเติบโตอยู่ในช่วงคงที่ (Stationary phase)

3.4.6 หาสัมประสิทธิ์การเติบโตของคลอเรลลา โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้เครื่อง Fluorometer ที่ได้ Calibrate กับการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer ไว้แล้ว โดยทำการสุ่มตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ทุกวันที่เวลาเดียวกัน โดยเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

3.4.7 หาอัตราการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง CHN Analyser เพื่อดูการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์บอนในเซลล์

3.4.8 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.4.5 โดยเปลี่ยนภาวะการทดลองตามตารางที่ 3.2 ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่าง