

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae (Bergandy)

Saccharomyces cerevisiae (Champ)

Saccharomyces cerevisiae ATCC 5094

อาหารเลี้ยงเชื้อ

YM medium

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Piperzine-1, 4-bis (z-ethanosulphonic acid) (PIPES) ของ Fluka
2. $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ของ Fluka
3. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ของ Fluka
4. K_2CrO_4 ของ Carlo erba
5. HgO ของ Fluka
6. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ของ Fluka
7. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ของ Carlo erba
8. Standard solution ของโลหะหนักแต่ละตัวของ Merck

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

Philips PU 9100

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Perkin Elmer AA 3300

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. การเจริญของเชื้อยีสต์

- 1.1 เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ยีสต์ทั้ง 3 Strain ใน YM extract Broth 100 ml. แต่ละสายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 30°C ประมาณ 15 ชั่วโมง ได้ Absorbance ที่ 540 nm ประมาณ 1
- 1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 400 ml. ใน flask 1,000 ml. ของแต่ละเชื้อ ปรับ pH 6.8 ใส่หัวเชื้อ 1% เชื้อด้วยความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 6, 8, 15, 18, 21, 24, 38, 42 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.3 ตัวอย่างที่เก็บแบ่งเป็น

1.3.1 นำน้ำหนักของชีวมวล (Biomass) นำ 4 ml. ของตัวอย่างมา Centrifuge ของเฉพาะเซลล์ยีสต์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ml. เทลงในกระดาษ foil ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนอบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 90°C นาน 4 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นใน dessicator แล้วชั่งน้ำหนักน้ำหนักที่เพิ่มมาเป็นน้ำหนักแห้งของชีวมวล

1.3.2 วัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1.4 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า น้ำหนักแห้งกับเวลา และค่า Absorbance 540 nm. กับเวลา

1.5 พิจารณากราฟ ดูเวลาที่ใช้เลี้ยงที่ทำให้ชีวมวลมีน้ำหนักแห้งประมาณ 0.75-1.25 mg/ml. แล้วใช้เป็นเวลาในการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อการทดลองครั้งต่อไป

2. ผลของสังกะสี (Zn) ต่อการเจริญของยีสต์

เพื่อศึกษาว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีโลหะหนัก คือ สังกะสี (Zn) ปนเปื้อนอยู่ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ppm. (mg/l) จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ แต่ละสายพันธุ์หรือไม่อย่างไร

2.1 เตรียมหัวเชื้อ 100 ml. ของแต่ละเชื้อ เหมือนข้อ 1.1

2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของ Zn 5, 10 และ 20 ppm. จาก standard solution Zn 500 ppm. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ml. ลงใน flask 250 ml. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 ทำ control ที่มีแต่เชื้อยีสต์กับอาหารไม่มีโลหะใด ๆ inoculum 1% เช่นเดียวกัน

2.4 เก็บตัวอย่างวัดค่า Absorbance 540 nm ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ทั้ง control และตัวอย่าง โดยใช้ aseptic technique

2.5 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Absorbance 540 nm. กับเวลาของแต่ละสายพันธุ์

2.6 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ในอาหารที่มีโลหะหนัก (Zn) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ control

3. การดูดซับสังกะสีของยีสต์

ทดสอบความสามารถของเซลล์ที่ตายแล้วกับเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการดูดซับสังกะสีและในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันหรือไม่

3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย ที่มีเซลล์สำหรับใช้ดูดซับโลหะหนัก

1. เตรียม inoculum ของแต่ละสายพันธุ์ เหมือนข้อ 1.1

2. เตรียมอาหาร 400 ml. ใน flask 1,000 ml. ต่อเชื้อ 1 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 flasks

3. ใส่หัวเชื้อ (inoculum) 1% ในอาหารทั้ง 2 flask เลี้ยงเซลล์เขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 30°C เวลา 18 ชั่วโมงให้ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 0.75-1.25 mg/ml.

ก. flask ที่ 1 เตรียมเซลล์ยีสต์ที่เป็น killed cells บั่นเหวี่ยง cell suspension ด้วยความเร็ว 15,000 rpm 5 นาที นำเซลล์ยีสต์มาล้างด้วย 5×10^{-3} M HClO_4 50 ml. 10 นาที เพื่อให้ผิวเซลล์บริสุทธิ์ จากนั้น Centrifuge เอาแต่เซลล์ยีสต์มาทำให้ตายด้วยสารละลาย ethanol 70% v/v 50 ml. 20 นาที แล้ว centrifuge เก็บเซลล์ยีสต์มา resuspen ด้วย buffer 5 mM-piperazine-1, 4 -bis (2-ethanesulphonic acid) 400 ml. (PIPES: Good et. al., 1966)

ข. flask 2 เตรียมเซลล์ยีสต์ที่เป็น living cells บั่นเหวี่ยง cell suspension เพื่อ นำเซลล์ยีสต์มาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ว resuspension ด้วย bufer PIPES 400 ml.

3.2 เตรียม yeast suspension ใส่ flask ต่อ 1 สายพันธุ์ โดยเป็น killed cells 2 flask และ living cells 2 flask แล้วเติมสารละลาย Zn 50 ppm. ที่ทำการเจือจางแล้วจาก standard solution ลงไป 2 ml. ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ Zinc เป็น 1 ppm. ทุก flask

3.3 เตรียม control ที่มีแต่ buffer PIPES +2 ml. ของ Zn 50 ml. ดังนั้น control จะมีความเข้มข้น 1 ppm.

3.4 เก็บตัวอย่าง นำ supernatant ไปวัดค่าความเข้มข้นของ Zinc ด้วยเครื่อง AAS ค่าที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของ Zn ที่เหลืออยู่ ที่เวลา 10, 20, 40, 60, 120 และ 240 นาที รวมทั้ง Control ด้วย

3.5 คำนวณค่าความเข้มข้นลบออกจากความเข้มข้นของ control จะได้ความเข้มข้นที่เซลล์ยีสต์ดูดซับเอาไว้ คิดเป็น $\mu\text{mol/g}$ Cells dry wt แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณที่ดูดซับไว้ได้กับเวลา

3.6 เลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการดูดซับ Zn ได้มากที่สุด เพื่อนำไปทำการทดสอบหาความสามารถในการดูดซับโลหะอื่นต่อไป

4. ผลของโลหะหนัก Hg, Mn, Co, Cd และ Cr ต่อการเจริญของยีสต์ สายพันธุ์ที่เลือกจากข้อ 3

สำหรับโลหะหนัก Hg, Mn, Co, Cd, และ Cr จะทำทดสอบผลของโลหะหนักต่อการเจริญเช่นเดียวกับข้อ 2 ทุกประการ standard solution จะเริ่มจาก 1,000 ppm. (mg/l) เพื่อศึกษาผลกระทบของอาหารที่มีโลหะหนักปนเปื้อนว่า จะมีผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ที่เลือกมาหรือไม่อย่างไร

5. การดูดซับโลหะหนัก Hg, Mn, Co, Cd และ Cr โดยยีสต์สายพันธุ์ที่เลือกจากข้อ 3

เพื่อดูความสามารถของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่เลือกมาว่านอกจากจะมีความสามารถดูดซับ zinc แล้วจะสามารถดูดซับโลหะหนักอื่น ๆ หรือไม่อย่างไร โดยทำการทดลองเพื่อทดสอบการดูดซับโลหะหนักเช่นเดียวกับข้อ 3