



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการในการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำมันอย่าง
รวดเร็ว สำหรับการผลิต ไบโอดีเซล

ดร. พันธุ์วงศ์ คุณชนะวัฒน์

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

31 มกราคม พ.ศ.2558

สัญญาเลขที่ MRG5580248

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการในการคัดแยกสายพันธุ์สำหรับน้ำมันอย่าง
รวดเร็ว สำหรับการผลิต ไบโอดีเซล

ดร. พันธุ์วงศ์ คุณชนะวัฒน์

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
ต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5580248

**Project Title : Development of a Simple Method for Rapid Screening of Lipids
Containing Microalgae for Biodiesel Production**

The potential of algae as crops for food and bioenergy has prompted for a better understanding of basic algal cell biology/physiology and rapid measurement of valuable compounds, such as lipids in the organism. However, the conventional techniques can be ineffective, time consuming, require a large sample size, are quite laborious, and costly. Here, we present a novel biochip for single algal cell study and simple techniques to measure algal lipids. This microwell-based biochip can electrostatically trap single algal cells of multiple species without cellular interference. The simplicity and versatility of the device allows for different types of single cell experiments in different modes of cultures, rapid cell isolation, and strain testing to be performed with ease. The algal lipid was successfully quantified, using microgram sample size or less, based on alteration of carbon-electrode's conductivity and evaporation of the microdroplet of the lipid solution. The biochip and these miniaturized techniques have a potential to be of use in fundamental algal research as well as in industrial studies with minimal technical and skill requirements.

Keywords: biochip, microfluidic device, algae, phytoplankton, single cell trapping, algal lipid, carbon electrode, conductivity, evaporation

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580248

ชื่อโครงการ : การพัฒนาวิธีการในการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำมันอย่างรวดเร็ว
สำหรับการผลิต ไบโอดีเซล

ศักยภาพของมวลชีวภาพสาหร่ายขนาดเล็กเพื่ออุตสาหกรรมอาหารและพลังงานชีวภาพ ส่งผลให้เกิดความจำเป็นที่จะต้องเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานเช่น ชีววิทยาระดับเซลล์ สรีรวิทยา ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวอย่างลึกซึ้ง รวมถึงต้องการการตรวจวัดปริมาณสารมูลค่าสูงเช่น น้ำมันในสาหร่าย ที่มีประสิทธิภาพ และรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม เทคนิควิธีการในการศึกษาและตรวจวัดที่มีอยู่ในปัจจุบันมักมีข้อจำกัดข้อใดข้อหนึ่งเสมอ เช่น มีประสิทธิภาพต่ำ ใช้เวลานานในการทดสอบ ต้องใช้ตัวอย่างในการทดสอบปริมาณมาก ค่อนข้างสิ้นเปลืองแรงงานและมีราคาแพง งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้นำเสนองานวิจัยสองส่วนเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ส่วนแรกคือไบโอชิปเชิงหลุมที่สามารถดักจับเซลล์สาหร่ายหลายหลายชนิดให้ติดอยู่ในกับดักแยกเป็นเซลล์หรือโคโลนีเดี่ยวด้วยสนามไฟฟ้าสถิตย์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ ความไม่ยุ่งยากซับซ้อนในการสร้างและใช้งาน และความสามารถในการประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย ทำอุปกรณ์ดังกล่าวสามารถใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เชิงเดี่ยวของสาหร่ายได้ในหลายโหมดของการเพาะเลี้ยง สามารถคัดแยกเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และทดสอบสายพันธุ์สาหร่ายได้อย่างง่ายดาย

ในส่วนที่สอง ผู้วิจัยได้นำเสนอวิธีการใหม่ในการวัดปริมาณน้ำมันในสาหร่ายปริมาณน้อย (ระดับไมโครกรัม หรือน้อยกว่า) โดยใช้ความสามารถของน้ำมันในการเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าคาร์บอน และการเปลี่ยนแปลงอัตราการระเหยของตัวทำละลาย ไบโอชิปและเทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยที่พัฒนาขึ้นอาศัยความชำนาญการและองค์ประกอบทางเทคนิคที่ไม่มากจนเกินไป ในการดำเนินการ และมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางสาหร่ายพื้นฐานและในภาคอุตสาหกรรม

คำสำคัญ: ไบโอชิป, อุปกรณ์ของไหลระดับจุลภาค, สาหร่าย, แพลงตอนพืช, การดักเซลล์เดี่ยว, น้ำมันจากสาหร่าย, ขั้วไฟฟ้าคาร์บอน, การนำไฟฟ้า, การระเหย

Executive summary

The potential of algae as crops for food and bioenergy has prompted for a better understanding of basic algal cell biology/physiology and rapid measurement of valuable compounds. Here, we present a novel biochip for single algal cell study and simple techniques to measure algal lipids.

Biochip for single cell trapping

We successfully fabricated a simple and versatile biochip for single phytoplanktonic cell study. The microscope-slide sized device is capable of capturing multiple species of phytoplankton. Up to 60 replications can be done in a single setting. In addition, different mode of culture can be performed and variation of chemical concentration can be done during the experiment. Trapped cells can be easily transferred to another location. Cell screening and strain testing are also feasible using this biochip. Minimal technical skills are required to construct and operate the biochip.

Micro-analytical methods for algal lipid measurement

We demonstrate the possibility of using physical properties of lipids: changing electrical conductivity of a screen printed carbon electrode and reducing evaporation rate of volatile compound they dissolved in, as principles to measure algal lipids. The measurements require very low amount of lipid sample (i.e. in the order of μl or below). Techniques to handle and extract small amount of sample are developed. Further experiments on real algal sample are being conducted. The developed techniques have a potential as a possible alternative methods in quantifying algal lipid from small sample size in algal lipid research and industry.

Investigator : ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

ดร. พันธุ์วงศ์ คุณณะวัฒน์

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

นส. จิรภัทร์ เรือนอินทร์

หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ดร.รุ่งเรือง พัฒนากุล

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

นายพงศกร กันหอม

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รศ.ดร. วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

นส. สมปอง สุขประสงค์

สาขาวิศวกรรมไฟฟ้า สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ดร.นิมิต ชมनावัง

สาขาวิศวกรรมไฟฟ้า สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รศ. บุญยา บุญนาค

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address :

panwong.kun@gmail.com

Project Period :

2 ปี 6 เดือน

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ของไหลระดับจุลภาค เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงและศึกษาเซลล์แพลงก์ตอน
เชิงเดี่ยว (single cell/colony studies)
- 2) เพื่อพัฒนาวิธีการใหม่ในการวัดปริมาณน้ำมันจากตัวอย่างสาหร่ายปริมาณน้อย เพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย และเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของวิธีการดังกล่าวในการนำไปใช้จริง

วิธีการทดลอง

การพัฒนาไบโอชิปสำหรับการศึกษาแพลงตอนเชิงเซลล์/โคโลนีเดี่ยว

1) การออกแบบ การสร้าง และการทดสอบลักษณะจำเพาะ (characterization)

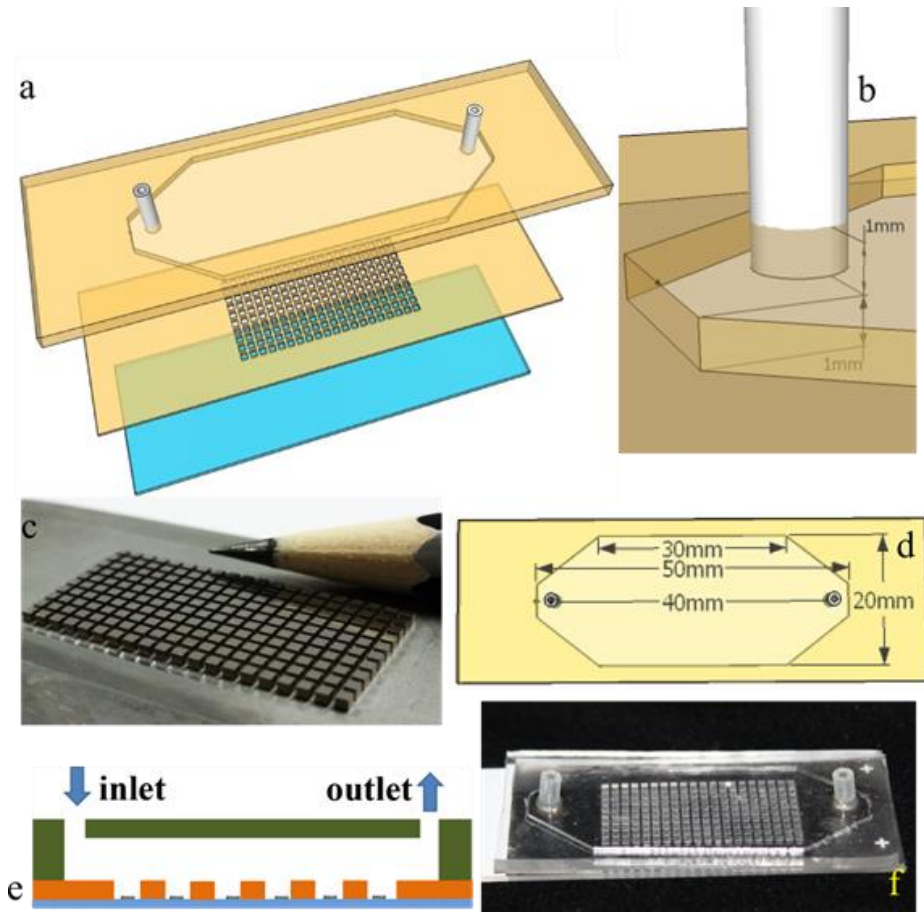
ไบโอชิปที่สร้างขึ้นมีลักษณะเป็นห้องเลี้ยงเซลล์ขนาดกว้างยาวเท่ากระจกสไลด์ (75 x 25 mm) โดยที่พื้นของห้องเลี้ยงจะมีหลุมทรงสี่เหลี่ยมมุมฉาก (ขนาด กว้างxยาวxลึก เท่ากับ 1,000 x 1,000 x 500 μm) ทำหน้าที่เป็นหลุมดักเซลล์ การเรียงตัวของหลุมเหล่านี้เป็นแถว 10 แถว แต่ละแถวมีหลุม 20 หลุม โดยมีระยะห่างระหว่างหลุมเท่ากับ 500 μm (ภาพ 1a) ภาพตัดขวางของชิ้นงาน และภาพผลงานที่สำเร็จแสดงดังภาพ 1e และ ภาพ 1f ตามลำดับ

โครงสร้างของชิ้นงานสร้างขึ้นโดยการสร้างนำแผ่น polydimethylsiloxane (PDMS) ซึ่งหนา 500 μm และมีลวดลายของหลุมดังกล่าวที่มีก้นเจาะทะลุ ไปผ่านกระบวนการ plasma bonding แล้วนำมาประกบกับกระจกสไลด์ที่มีประจุบวก (SuperFrost® Plus J1800AMNZ, MENZEL-GLÄSER, USA) หลังจากนั้นจึงนำเอาชั้นฟลูอิด (fluidic layer) (ภาพ 1d) ซึ่งมีทางไหลของอาหารรูปกระสวย ทำหน้าที่นำอาหารเข้าสู่และออกจากชิ้นงาน ประกอบติดด้านบน ด้านบนของชิ้นงานจะมีการต่อท่อซิลิโคน สำหรับนำอาหารจากแหล่งจ่าย เข้าและออก (ภาพ 1b)

ชิ้นงานชั้น PDMS ที่มีลวดลายของหลุมระดับจุลภาค สร้างขึ้นโดยการหล่อ PDMS ด้วยแม่พิมพ์โลหะ (soft lithography) ที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค X-ray LIGA ซึ่งอาศัยแสงซิงโครตรอนในการสร้าง ภาพ 1c ในการหล่อ ส่วนผสม PDMS เหลวจะถูกเทลงบริเวณพื้นที่เรียบด้านของของแม่พิมพ์ ก่อนที่จะปล่อยให้ PDMS เหลวไหลไปตามร่องของลวดลาย ความหนาของชิ้นงานกำหนดโดยปริมาตรของ PDMS ที่เททั้งหมด และเมื่อนำไปอบด้วยความร้อนประมาณ 60 องศาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง PDMS จะเปลี่ยนสภาพเป็นของแข็งที่ยืดหยุ่น สามารถดึงลอกออกจากแม่พิมพ์ได้

ชั้นของ fluidic layer สร้างขึ้นด้วยกระบวนการคล้ายกัน แต่อาศัยแม่พิมพ์ที่เป็นหลุมรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า และมีเกาะรูปกระสวยตรงกลาง สร้างขึ้นจากพลาสติกอะคริลิก ความหนา และรูปร่างของกระสวยเป็นตัวกำหนดขนาดของทางไหลของอาหาร

การวัดขนาดปากหลุม ทำโดยการวัดความหนาของแผ่น PDMS ด้วยไมโครมิเตอร์ และถ่ายภาพหลุมจากกล้องจุลทรรศน์แล้ววัดด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางภาพถ่าย (ImageJ)



ภาพ 1. โครงสร้างของชิ้นงาน ประกอบขึ้นจากชั้นของชิ้นงานสามชั้น คือ กระดาษสไลด์ประจุบวก ชั้น PDMS ที่มีลวดลายของหลุมระดับจุลภาค และชั้นฝาปิดที่มีทางไหลของอาหาร (a); โครงสร้างรอยต่อของระบบท่อนำอาหาร เข้าสู่ชิ้นงาน และออกจากชิ้นงาน (b); ชั้น PDMS ที่มีลวดลายของหลุมสร้างขึ้นด้วยเทคนิคsoft lithographyโดยอาศัยแม่พิมพ์โลหะที่สร้างขึ้นจากเทคนิค X-ray LIGA (c); โครงสร้างของชิ้นงาน มุมมองจากด้านบน (d); และมุมมองภาพตัดขวาง (e) ภาพชิ้นงานสำเร็จ (f).

2) สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina platensis* strain CMU 2 *Pediastrum* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สาหร่ายทุกสายพันธุ์ถูกเลี้ยงในอาหาร BG-11 medium ยกเว้น *S. platensis* ที่เลี้ยงด้วย Zarrouk's medium. สาหร่ายถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ at 30 °C

ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความสว่าง 4k lux และการแกว่งเหวี่ยงที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที

3) การนำเซลล์เข้าสู่ชิ้นงาน การเพาะเลี้ยงและการติดตามการเจริญ

ก่อนการนำเซลล์เข้าสู่ชิ้นงาน ภายในของอุปกรณ์จะถูกชะด้วย 70% เอทานอล ตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และอาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อตามลำดับ หลังจากนั้นสารละลายเหล่านี้จะถูกขับทิ้ง ก่อนที่อาหารปลอดเชื้อรอบใหม่จะถูกนำเข้าสู่ชิ้นงานจนเต็ม เซลล์ในอาหารถูกนำเข้าแทนที่อาหารที่บรรจุอยู่ในชิ้นงาน โดยการขับดันด้วยปั๊มประบอกฉีดยา (syringe pump) ด้วยอัตราการไหลคงที่ 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ ปริมาณและความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเป็นปัจจัยที่สนใจศึกษาอิทธิพลต่อความสำเร็จในการดักจับเซลล์เดี่ยวในที่นี้ หลังจากนำเซลล์เข้าสู่ชิ้นงานแล้ว อาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อจะนำเข้าสู่ชิ้นงานเป็นรอบสุดท้าย เพื่อชะเซลล์แขวนลอยคงค้างในชิ้นงาน เหลือเฉพาะแต่เพียงเซลล์ที่ติดติดอยู่ในหลุมไฟฟ้าสถิต

หลังจากนั้นเซลล์ที่อยู่ในชิ้นงานจะถูกนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ และความเข้มแสงดังกล่าวมาข้างต้น

การเจริญของเซลล์ในหลุมดักเซลล์ทำโดยการถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์และนับจำนวน โดยอาจใช้เครื่องมือใน ImageJ ร่วม

4) การทดสอบการแพร่กระจายตัวของสารเคมีในห้องเลี้ยงเซลล์

การทดลองนี้เป็นการทดสอบว่าหากมีการนำสารอาหารหรือสารเคมีใหม่ เข้าสู่ชิ้นงาน และในทางกลับกัน หากมีการชะสารอาหารเก่าหรือสารเคมีคงค้างในระบบ การแพร่กระจายของสารเคมีจากชั้นทางไหลของอาหารเข้าไปยังหลุมเลี้ยงเซลล์จะเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่ การทดลองทำโดยการเติมสารอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้เข้าไปในห้องเพาะเลี้ยงก่อน คือ Zarrouk's medium (blank) หรือ 1 mM Azorubine in Zarrouk's medium (dye solution). หลังจากนั้น จึงขับดันสารในห้องเลี้ยงนั้นด้วยสารอีกชนิดกัน (เช่น หากในห้องเลี้ยงบรรจุอยู่ด้วย blank จึงชะสารดังกล่าวด้วย dye solution) ด้วยอัตราการไหล 200 หรือ 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ ภาพของหลุมจะถูกถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก ๆ 50 วินาที สีของของเหลวในหลุม ณ เวลาใด ๆ จะถูกวิเคราะห์ด้วย ImageJ ซึ่งสามารถคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของสารในหลุม ณ เวลาใด ๆ โดยอาศัย calibration curve ที่สร้างไว้ก่อนหน้านี้

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการวัดปริมาณน้ำมันในสาหร่ายจากตัวอย่างปริมาณน้อย

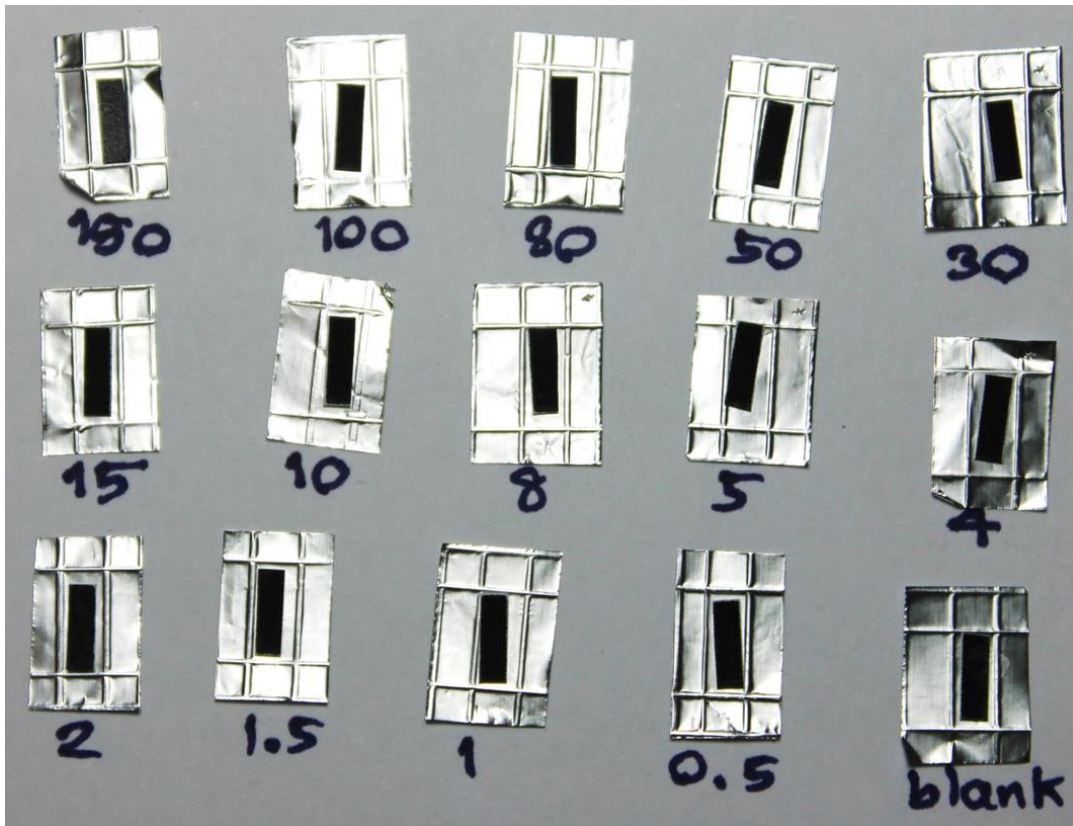
1) เทคนิคการวัดด้วยขั้วไฟฟ้าคาร์บอน

การวัดปริมาณลิปิดด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ ได้พัฒนามาจากแนวคิดที่ว่าลิปิดมีคุณสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดี ยกตัวอย่างเช่น ไมอีลินชีท ที่ห่อหุ้มเส้นใยประสาท สามารถช่วยป้องกันการรั่วไหลของกระแสประสาท(กระแสไฟฟ้า) ผ่านเส้นใยประสาท ด้วยเหตุนี้ หากนำสารละลายลิปิดหยดลงบนตัวนำไฟฟ้าบางชนิดเช่นผงกราไฟท์ คาร์บอน หรือ ขั้วไฟฟ้าโลหะแบบพิมพ์สกรีน ซึ่งเนื้อของตัวนำไม่ได้หลอมเป็นหนึ่งเดียว กล่าวคือการนำไฟฟ้าเกิดจากการแตะต้องกันของอนุภาคตัวนำ และช่องว่างระหว่างการแตะสัมผัส นั้นมีพอที่จะให้ลิปิดจะแทรกตัวระหว่างรอยต่อได้ อาจทำให้การนำไฟฟ้าของตัวนำลดลง (ความต้านทานไฟฟ้าสูงขึ้น) เพราะพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวนำลดลง การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนไปในตัวนำ เป็นไปได้ลำบากขึ้น อย่างเป็นสัดส่วนตามกัน

การทดลองเบื้องต้นเริ่มจากการเตรียมสารละลายลิปิด (น้ำมันถั่วเหลือง) ใน คลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลงบนอิเล็กโทรด คาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยเริ่มจากอิเล็กโทรดอย่างง่ายที่สุดคือกระดาษถ่ายเอกสาร ฝน ด้วยดินสอกดบรรจุด้วยไส้ดินสอ 2B (Pentel) จากการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่า ปริมาณน้ำมันที่หยดลงบนขั้วไฟฟ้ามีผลต่อความต้านทานไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปจริง

หลังจากนั้นจึงหันมาใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนบนแผ่นพลาสติกทน คลอโรฟอร์ม และขั้วไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนบนกระดาษตามลำดับ (ภาพ 2) ปริมาณสารละลายน้ำมันที่หยดลงบนอิเล็กโทรด มีการปรับเพื่อความเหมาะสมตามชนิดของอิเล็กโทรด โดยอยู่ในช่วงประมาณ 1-15 ไมโครลิตร การวัดความต้านทานไฟฟ้าของอิเล็กโทรด จะทำด้วยกันสองครั้ง คือก่อนหยดสารละลายลิปิด และหลังจากหยดสารละลายลิปิดและทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด โดยใช้มัลติมิเตอร์

หลังจากที่ได้ปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทดลองแล้ว ผู้วิจัยได้เริ่มทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนแหล่งของลิปิดเป็น ไตรโอสีนความบริสุทธิ์ 97% (Sigma) และ สารสกัดหยาบลิปิดจากสาหร่ายสองชนิด คือ *Spirulina* sp., *Chlorella* sp. และ *Ankistrodesmus densus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากห้องปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี



ภาพ 2 คาร์บอนนาโนทิวที่ใช้ในการทดลอง นำมาวางบนแผ่นอะลูมิเนียมฟลอย เพื่อรองรับหดย สารละลายน้ำมันที่นำมาใช้ในการทดลอง

2) เทคนิคการวัดอัตราการระเหยของสารละลายน้ำมันตัวอย่าง

วิธีการวัดปริมาณลิปิดนี้มีแนวคิดมาจากความรู้พื้นฐานทางเคมีฟิสิกส์ คือเมื่อตัวทำละลายบางชนิดมีตัวถูกละลายที่เหมาะสมเจือปนอยู่ จะเกิดสัดส่วนของแรงระหว่างโมเลกุลในระบบเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ตัวทำละลายระเหยได้ช้าลง หากสามารถวัดอัตราการระเหย ณ เวลาใด ๆ ของสารละลายลิปิดในคลอโรฟอร์ม ภายใต้ข้อกำหนดว่าลิปิดมีอัตราการระเหยต่ำมากจนถือว่าไม่มีการระเหยเลย ลักษณะของกราฟอัตราการระเหยต่อเวลาอาจสามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายลิปิดเริ่มต้นได้

การทดสอบแนวคิดเบื้องต้น ทำโดยการเตรียมสารละลายน้ำมันถั่วเหลืองในคลอโรฟอร์ม ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 500 ไมโครลิตร ต่อมิลลิลิตร ก่อนจะปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงบนฝาของหลอดเหวี่ยงสารละลายขนาด 500 ไมโครลิตร (Eppendorf) ที่วางอยู่บนเครื่องชั่งสารดิจิตอลสี่ตำแหน่ง เมื่อหยดสารละลายลงในภาชนะแล้ว จะเริ่มจับเวลาทันที และบันทึกน้ำหนักของสารละลายที่เปลี่ยนไป ที่เวลาใด ๆ เวลาที่ใช้ในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารละลายอยู่ในช่วงประมาณไม่เกิน 700 วินาที

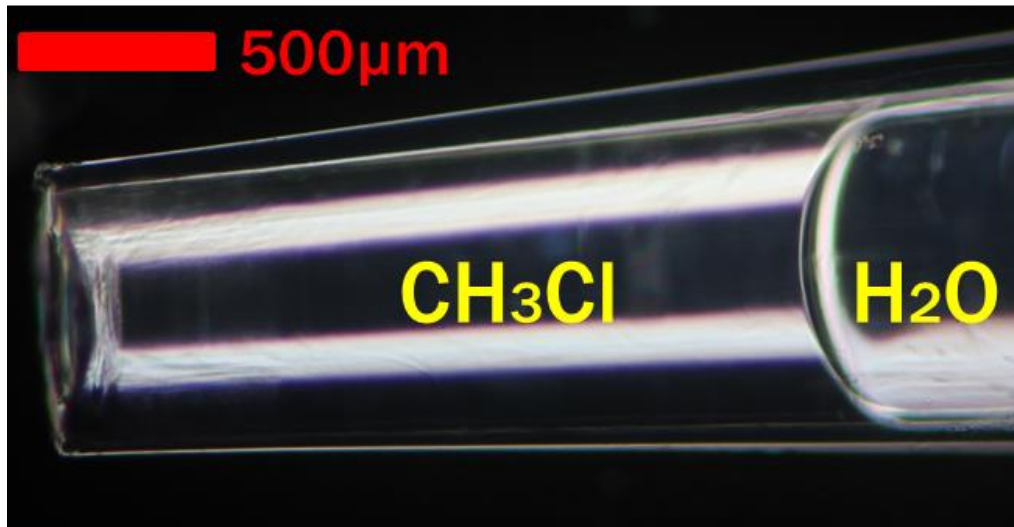
อย่างไรก็ตามพบว่า การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารละลายอาจเกิดความผิดปกติ อันเนื่องมาจากพื้นผิวสัมผัสอากาศของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปมากในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งปริมาณสารหลงเหลืออยู่น้อย ผู้วิจัยจึงพิจารณาข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์ในช่วงไม่เกิน 300 วินาทีแรก

การทดลองทำในสภาพความดันบรรยากาศปกติ อุณหภูมิห้อง และอากาศไม่มีการพัดพา บริเวณที่ซึ่งสารมีการป้องกันการพัดของอากาศผ่านหน้าระบบสารละลายด้วยกรอบพลาสติกใส ที่ปิดรอบด้าน ยกเว้นด้านบน เพื่อให้ยอมให้ไอระเหยของตัวทำละลายไม่เกิดการสะสม จนส่งผลกระทบต่ออัตราการระเหยของตัวทำละลายในระบบสารละลาย การทดลองสันนิษฐานการระเหยของตัวทำละลายในระบบเปิดที่ไม่มีการสะสมของไอระเหย และมีลมสงบ

ในลำดับต่อมาผู้วิจัยได้พยายามลดปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ และเปลี่ยนวิธีการติดตามปริมาตรของสารละลายน้ำมันในระบบ จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงมวล มาเป็นการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของหยดน้ำมันแทน โดยการปิเปตสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตรประมาณ 0.5 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตที่ปที่มีน้ำบรรจุอยู่ก่อนแล้ว แล้วนำไปตั้งบนขาตั้งปิเปตที่ปที่ทำจากดินญี่ปุ่น (ภาพ 3) แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ การระเหยของสารละลายคลอโรฟอร์มจะเกิดขึ้นเฉพาะทางปากของปิเปตที่ป เพราะอีกด้านหนึ่งถูกกั้นด้วยเฟสของน้ำ ซึ่งทำหน้าที่เป็น stop cock ที่ดันเลื่อนหยดของคลอโรฟอร์มให้ติดอยู่กับปลายปิเปตที่ปเสมอด้วยแรงตึงผิว (ภาพ 4) การหดตัวของหยดน้ำมันจะบันทึกที่ทุก ๆ 15 วินาที โดยใช้การถ่ายภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์



ภาพ 3 ปิเปตที่ปที่วางอยู่บนขาตั้งที่ทำขึ้นจากดินญี่ปุ่น (ภาพมองมุมสูง)



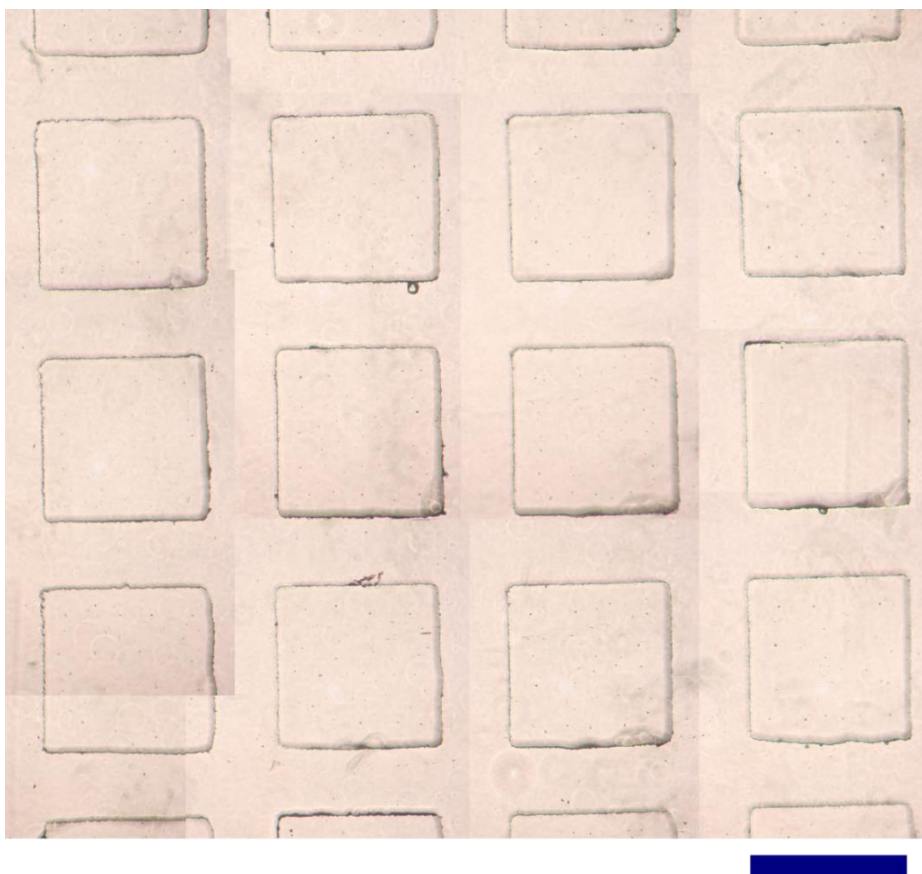
ภาพ 4 ภาพถ่ายของหยดสารละลายคลอโรฟอร์มในปิเปตทิปและเฟสของน้ำ

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การพัฒนาไบโอชิปสำหรับการศึกษาเพลงตอนเชิงเซลล์/โคโลนีเดียว

1. ลักษณะเฉพาะของหลุมระดับจุลภาคที่สร้างขึ้น

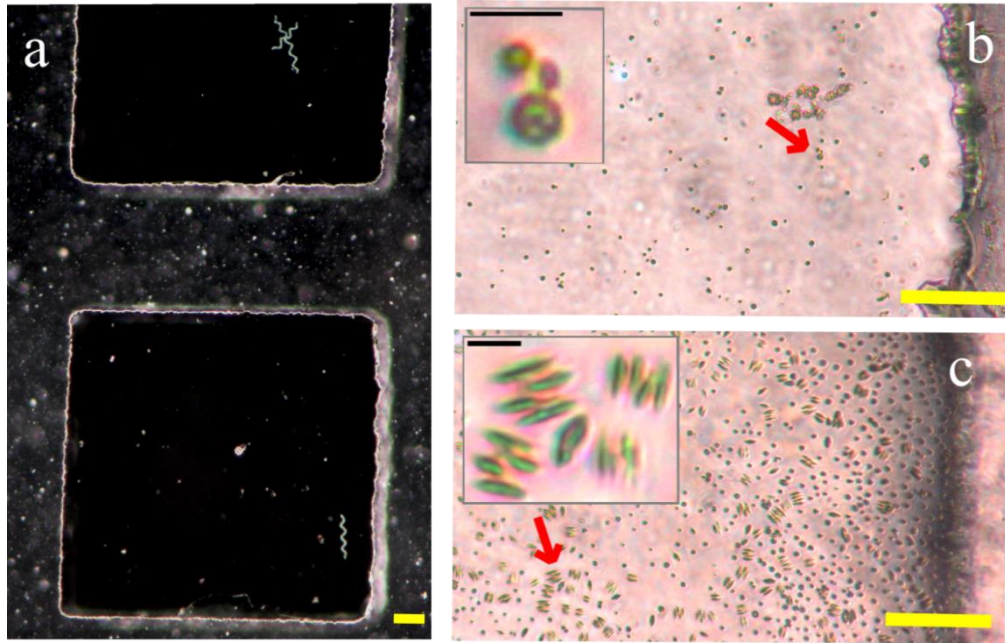
หลุมระดับจุลภาคที่สร้างขึ้นมีความลึกและความกว้าง $523.7 \pm 27.9 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, $n=3$) and $1,067 \pm 24 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, $n=28$) ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดของหลุมที่อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับที่ต้องการสร้าง นอกจากนี้ยังพบว่าหลุมเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสและมีขอบเรียบ ภาพ 5 ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า เทคนิคในการสร้างหลุมระดับจุลภาคที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยแม่พิมพ์ดั่งที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ให้ผลลัพธ์ที่ยอมรับได้ในการผลิตชิ้นงาน นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากที่จะใช้แม่พิมพ์โลหะในการสร้างหลุมระดับจุลภาค ผู้วิจัยยังสามารถพัฒนาแม่พิมพ์ที่ทำจากเรซินซึ่งมีราคาถูกกว่ามาก และให้ผลลัพธ์เป็นที่ยอมรับได้ ความไม่ซับซ้อนในการทำ soft lithography ความสามารถในการทำซ้ำได้สูง และราคาของการผลิตที่ไม่แพงจนเกินไป ทำให้กระบวนการดังกล่าวสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาทั่วไป โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือหรือทักษะพิเศษทางเทคนิค



ภาพ 5 ภาพปะต่อของภาพถ่ายหลุมระดับจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเกลแสดงความยาวประมาณ 1 mm

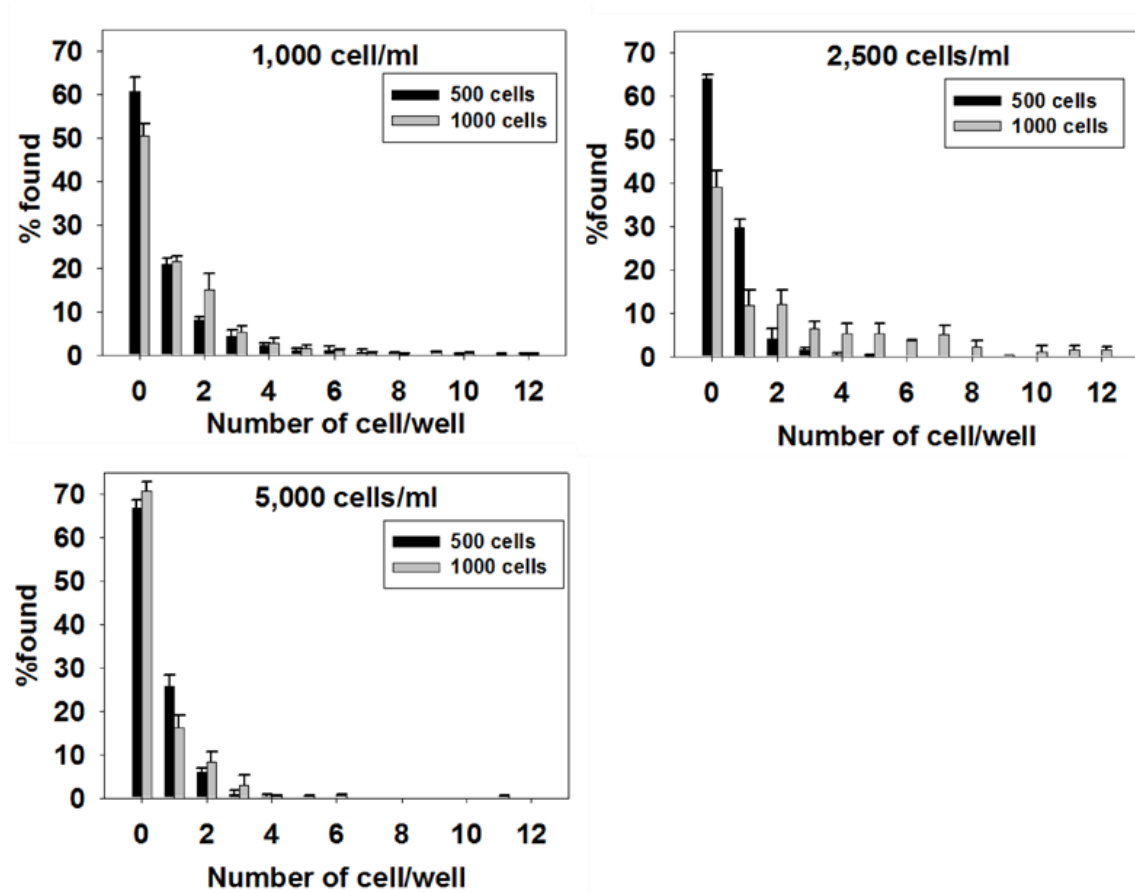
2. การดักจับเซลล์

จากการทดลองพบว่า เซลล์สาหร่ายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองอันได้แก่ *Pediastrum* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, and *Scenedesmus* sp. สามารถดักได้ด้วยไบโอชิปที่พัฒนาขึ้น (ภาพ 6a – c) และแม้ว่าจะเพิ่มอัตราการไหลของการเติมอาหารเข้าสู่ห้องเลี้ยงเซลล์ถึง 900 $\mu\text{l}/\text{min}$ ก็ไม่ทำให้เซลล์หลุดออกจากหลุมดักได้ แสดงให้เห็นถึงสนามไฟฟ้าที่มีแรงดึงดูดเพียงพอที่จะทำให้เซลล์ติดอยู่กับที่ตลอดการทดลอง ในทางกลับกัน หากเปลี่ยนกระจุบกระจุบด้วย ประจุสไลด์ธรรมดา เซลล์ไม่สามารถติดอยู่ในหลุมได้ แสดงให้เห็นว่าการดักจับเซลล์นั้น เกิดขึ้นได้เพราะแรงจากสนามไฟฟ้าสถิตระหว่างกระจุบที่มีประจุบวก และผิวเซลล์ที่มีประจุลบ อย่างไรก็ตาม จากภาพ 6b และ c จะเห็นว่าเซลล์ของสาหร่ายที่มีขนาดเล็กกว่า มีแนวโน้มที่จะถูกดักติดอยู่ในหลุมได้อย่างหนาแน่นมากกว่า จึงจำเป็นต้องศึกษาการปรับปัจจัยในการนำเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ เช่น ปริมาณ และความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่น อาจมีการปรับขนาดหลุมดักเซลล์ให้มีขนาดเหมาะสมกับชนิดของสาหร่าย เพื่อความสะดวกในการทำทดลอง อย่างไรก็ตาม จากการทดลองเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า กลไกการดักจับเซลล์ได้ด้วยหลุมดักเซลล์และแรงจากสนามไฟฟ้าสถิตที่น่าเสนอในงานนี้ สามารถใช้การได้ตามที่คาดหวังไว้กับสาหร่ายหลากหลายชนิด



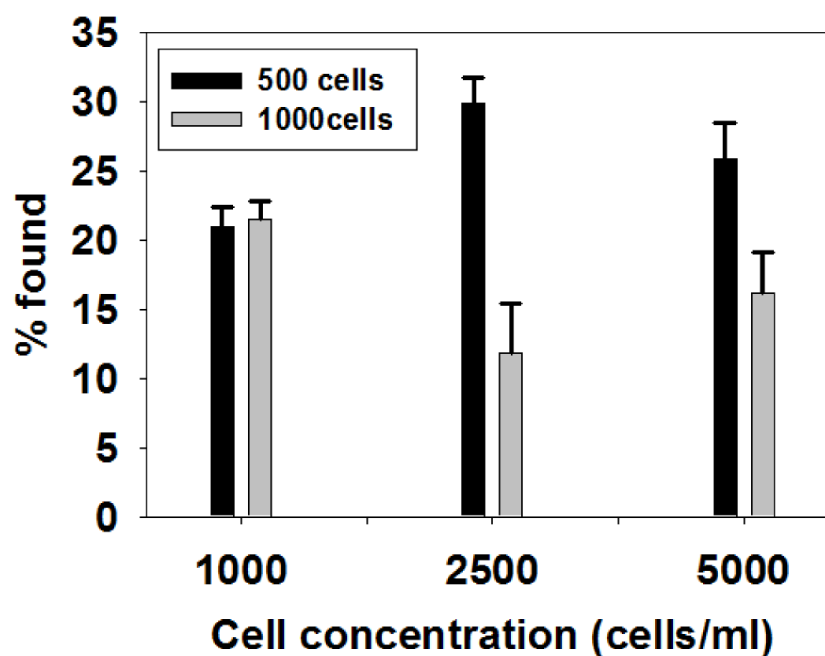
ภาพ 6 สาหร่ายจากหลากหลายกลุ่มทางอนุกรมวิธาน สามารถดักจับได้ด้วยไบโอชิปที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างสาหร่ายที่สามารถดักจับได้ด้วยอุปกรณ์ได้แก่ *Spirulina platensis* (a), *Chlorella vulgaris* (b) and *Scenedesmus* sp. (c) สเกลแสดงความยาว 100 and 10 μm ในภาพ a และ b-c ตามลำดับ

การทดลองศึกษาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการดักจับเซลล์สาหร่ายแบบเซลล์เดี่ยวในห้องเลี้ยงเซลล์ ได้ใช้สาหร่าย *S. platensis* เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ ปัจจัยที่ให้ความสนใจในนี้มีสองประการ คือจำนวนเซลล์สุทธิ (500 หรือ 1000 เซลล์/เส้นสาย) ที่นำเข้าสู่ห้องเลี้ยงเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (1,000, 2,500 และ 5,000 เซลล์/มิลลิลิตร) การนำเซลล์เข้าสู่อุปกรณ์ด้วยอัตราไหลคงที่ 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ พบว่าทั้งสองปัจจัยมีผลต่อรูปแบบของการดักจับของเซลล์ในห้องเลี้ยงเซลล์ ในภาพ 7 ซึ่งแสดงสัดส่วนของหลุมดักเซลล์ที่ดักเซลล์ได้ปริมาณต่าง ๆ ซึ่ให้เห็นว่า หลุมส่วนใหญ่ไม่สามารถดักจับเซลล์ไว้ได้ และสัดส่วนหลุมที่ดักเซลล์ได้ปริมาณมาก มีสัดส่วนที่น้อยกว่า หลุมที่ดักเซลล์ได้ปริมาณต่ำ



ภาพ 7 การกระจายตัวของร้อยละของหลุมที่ดักเซลล์ที่ดักเซลล์ได้ปริมาณต่างๆ กัน ในแต่ละเงื่อนไขของการนำเซลล์เข้าสู่ห้องเลี้ยง เมื่อใช้อัตราการไหลคงที่ แต่ละแท่งข้อมูลและแถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อน เป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ชุด (mean $\pm$ SD, n=3)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงหลุมที่ดักเซลล์ได้เพียงเซลล์เดียว พบว่าร้อยละของหลุมที่ดักเซลล์ได้ในลักษณะดังกล่าว มีสัดส่วน ~10-30% สัดส่วนสูงที่สุดที่ทำได้ 30.3 ± 1.5 (mean $\pm$ SD) เกิดขึ้นเมื่อการนำเซลล์เข้าสู่ห้องเลี้ยง ทำโดยใช้จำนวนเซลล์สุทธิ 500 เส้นสาย ในอาหารเลี้ยงที่มีเซลล์หนาแน่น 2,500 เส้นสายต่อมิลลิลิตร (ภาพ 8)



ภาพ 8 สัดส่วนของหลุมที่ติดเซลล์ได้เพียงเซลล์เดียว เมื่อนำเซลล์เข้าสู่ห้องเลี้ยงด้วยเงื่อนไขที่ต่างกัน แต่ละแท่ง ข้อมูลและแถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อน เป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ชุด (mean $\pm$ SD, n=3) จากการทดลองพบว่าสัดส่วนนี้สูงสุดเท่ากับ 30.3 ± 1.5 เมื่อใช้เงื่อนไข จำนวนเซลล์สุทธิ 500 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงที่มีเซลล์หนาแน่น 2,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของเซลล์ที่ถูกดักอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของห้องเลี้ยงเซลล์ ภาพ 9 พบว่าโดยส่วนใหญ่ เซลล์มีการกระจายตัวค่อนข้างเท่าเทียมกันไปในแต่ละส่วนของห้องเลี้ยง การกระจุกตัวของเซลล์บริเวณทางเข้าห้องเลี้ยงพบในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (1,000 cell/ml)

ที่ต้องการ มีน้อยเกินไป ดังนั้นห้วงเวลาที่หลุมดักเซลล์มีเซลล์ไหลลอยผ่านไปมา จึงมีน้อย
ความสำเร็จที่จะดักจับเซลล์ได้ จึงลดต่ำลง

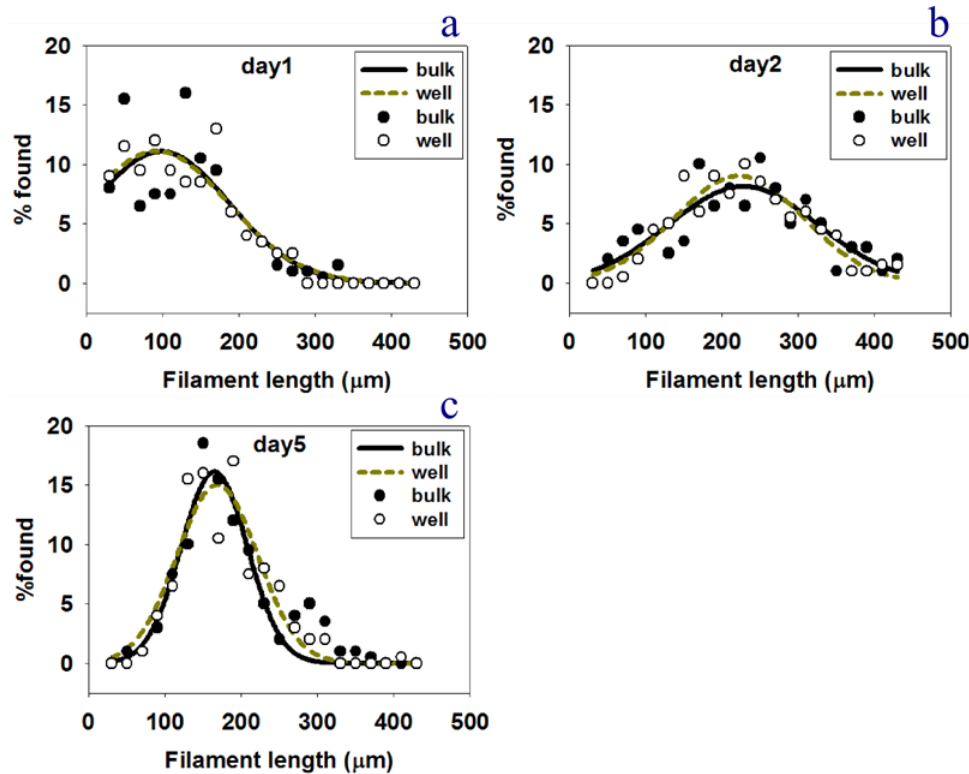
จากข้อสันนิษฐานทั้งสองส่วนนี้ ทำให้สรุปได้ว่า หัวใจของความสำเร็จของการดักจับเซลล์ได้
อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในแง่ของจำนวนหลุมที่ดักเซลล์ได้เพียงหนึ่งเซลล์ และการกระจาย
ตัวอย่างทั่วถึงในห้องเลี้ยงเซลล์ คือความสมดุลระหว่างความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่
นำเข้าสู่ห้องเลี้ยง และความยาวนานของห้วงเวลาที่เหนือหลุมดักเซลล์จะมีเซลล์ลอยไหล
ผ่าน และนั่นจึงอธิบายว่าเหตุใด อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ในระดับกลาง
2,500 cells/ml จึงให้ผลสำเร็จในการดักเซลล์สูงที่สุด

ปัจจัยอีกประการหนึ่งต่อการดักเซลล์ คือจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ไหลผ่านห้องเลี้ยงเซลล์ และ
เป็นไปตามที่คาดเอาไว้ คือเมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ไหลผ่านห้องเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่ดักได้ก็เพิ่ม
จำนวนขึ้นทั่วทั้งห้องเลี้ยงเซลล์ อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ที่ไหลผ่านห้องเลี้ยง ไม่ส่งผลต่อการ
กระจุกตัวของเซลล์ในบริเวณใดบริเวณหนึ่งของห้องเลี้ยงเซลล์เนกเซนในกรณีของปัจจัย ห้วง
เวลาที่เซลล์ไหลผ่านห้องเลี้ยง และความหนาแน่นของเซลล์

ในชุดการทดลองนี้ พบว่าการดักจับเซลล์ด้วยอุปกรณ์และเงื่อนไขที่พัฒนาขึ้นนี้ มีประสิทธิภาพ
ในการดักเซลล์เดี่ยวได้อยู่ในระดับเทียบเคียงได้กับกลไกการดักเซลล์เดี่ยวอื่น ๆ ที่มีมาในอดีต
จำนวนเซลล์ประมาณ 60 เซลล์เดี่ยวที่ดักได้ในหนึ่งไบโอชิป ต่อการทดลองหนึ่งครั้ง เพียงพอ
สำหรับการศึกษาทางชีววิทยาระดับเซลล์ที่หลากหลาย เช่น การศึกษาจุลศาสตร์การเจริญของ
เซลล์เดี่ยว และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และปัจจัยสิ่งแวดล้อม และในการคัดเลือกเซลล์ตั้งต้นใน
การสร้างสายพันธุ์

3. ความเอนเอียงในการดักจับเซลล์โดยขึ้นกับขนาด

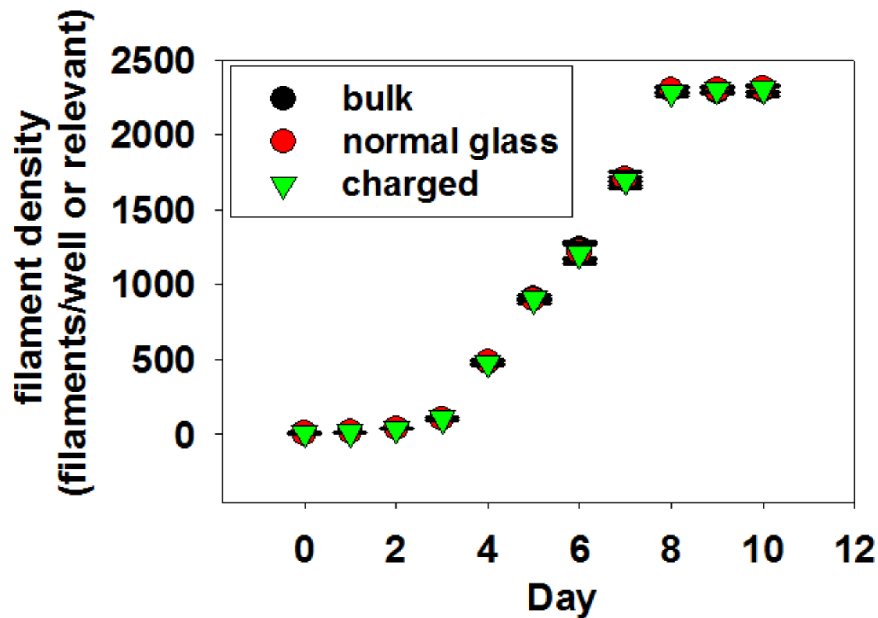
เซลล์ที่ดักได้ในห้องเลี้ยงเซลล์ จำเป็นต้องเป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มประชากรที่ตัวอย่างถูกสุ่มมา
ขนาดของเซลล์มีความสัมพันธ์กับอายุและสภาพทางสรีรวิทยาของสาหร่าย ผู้วิจัยจึงเกิดข้อ
สงสัยว่าความน่าจะเป็นที่เซลล์จะถูกดักจับในหลุมนั้น ขึ้นกับขนาดของเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการ
สุ่มตัวอย่างที่มีความเอนเอียงไปยังกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งของเซลล์เป็นพิเศษหรือไม่ ผู้วิจัยได้วัด
ความยาวของเซลล์สาหร่าย *S. platensis* ที่ดักจับได้ในชิ้นงาน เทียบกับความยาวของเซลล์ใน
อาหารเลี้ยงที่กลุ่มประชากรถูกสุ่มมา (อย่างละ 200 เส้นสาย) พบว่าการกระจายตัวของเส้นสาย
ขนาดต่าง ๆ ในกลุ่มเซลล์ทั้งสองแหล่ง ไม่มีความแตกต่างกัน แม้การเปลี่ยนแหล่งของเซลล์
โดยใช้เซลล์ที่กำลังเจริญอยู่ในวันที่แตกต่างของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแบบแผนการกระจายตัวของ
เซลล์ขนาดต่าง ๆ เปลี่ยนไป แต่กลับพบว่าแบบแผนการกระจายตัวของเซลล์ในที่ดักได้และ
เซลล์ในอาหารเลี้ยง ไม่ได้มีความแตกต่างกัน (ภาพ 10)



ภาพ 10 การกระจายตัวของเส้นสาย *S. platensis* ขนาดต่าง ๆ ที่ดักได้ในห้องเลี้ยงเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ตัวอย่างเซลล์ถูกสุ่มมา ในวันที่ 1, 3 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง การทดลองพบว่า การกระจายตัวมีลักษณะเปลี่ยนไปในแต่ละวันของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างการกระจายตัวของเซลล์ที่ดักได้กับเซลล์ในอาหารเลี้ยง

4. ผลกระทบของสนามไฟฟ้าสถิตต่อจลศาสตร์การเจริญ

การทดลองในงานที่มีมาก่อนหน้าพบว่า การดักจับเซลล์โดยใช้สนามไฟฟ้าส่งผลกระทบต่อเซลล์ ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาผลกระทบของสนามไฟฟ้าสถิตซึ่งเกิดจากกระจกประจุบวกที่ใช้ในการดักจับเซลล์ การติดตามการเจริญของเซลล์สายสำหรับ *S. platensis* ที่เจริญอยู่ในหลอดดักเซลล์ที่มีก้นหลุมเป็นกระจกที่มีประจุบวก หลุมดักเซลล์ที่มีก้นหลุมเป็นกระจกสไลด์ปกติ และเซลล์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติก (500 ml flask) (10 กลุ่มในแต่ละชุด, mean±SD ของจำนวนเส้นสายสายสำหรับเริ่มต้น = 9.8 ± 1.4 เส้นสาย) พบว่าเซลล์ที่เจริญในสามสภาวะมีแบบแผนการเจริญเช่นเดียวกัน และมีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate (μ)) ในช่วงการเจริญสูงสุด (ในช่วง exponential phase of growth) เท่ากับ 0.966 ± 0.001 , 0.967 ± 0.001 และ 0.967 ± 0.001 ตามลำดับ (ภาพ 11)

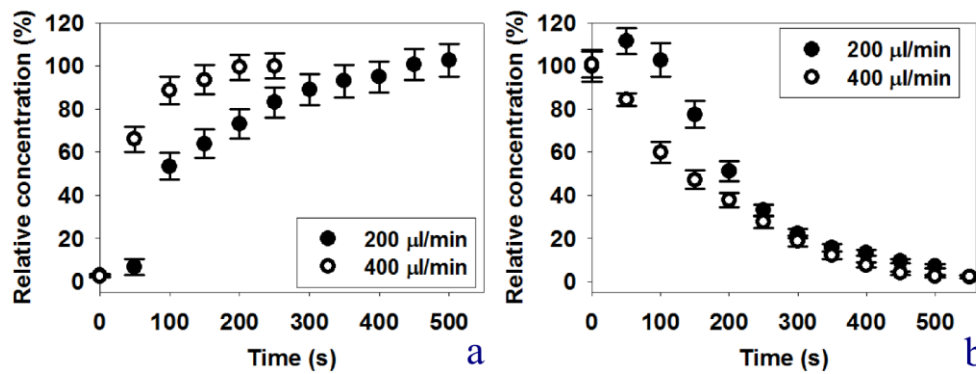


ภาพ 11 กราฟการเจริญของ *S. platensis* ในสภาพการเพาะเลี้ยงสามสภาวะ คือในอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ในหลุมดักเซลล์ที่กั้นหลุมเป็นกระຈกสไลด์ธรรมดา และหลุมดักเซลล์ที่มีกั้นหลุมเป็นกระຈกที่มีประจุบวก จุดข้อมูลและแถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล 10 ชุด (n=10) ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของสาหร่ายในสามสภาวะคือ 0.967 ± 0.001 , 0.967 ± 0.001 , 0.966 ± 0.001 ตามลำดับ

5. การแพร่กระจายตัวของสารเคมีในห้องเลี้ยงเซลล์และหลุมดักเซลล์

ไบโอชิปที่พัฒนาขึ้นนี้ ออกแบบขึ้นมาเพื่อให้สามารถปรับเปลี่ยนสภาพทางเคมีของหลุมเพาะเลี้ยง เพื่อรองรับการทดลองที่หลากหลาย และการเพาะเลี้ยงเซลล์ในโหมดที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นการแพร่กระจายของของสารเคมีที่นำเข้ามาใหม่ในห้องเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องกระจายตัวอย่างสมบูรณ์สู่หลุมดักเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ และในทางกลับกัน เมื่อมีการชะล้าง สารเคมีในหลุมดักเซลล์ต้องสามารถถูกชะออกได้อย่างสมบูรณ์

จากการทดลองสองส่วน คือการเติม dye และการ ชะล้าง dye พบว่าการกระจายตัวแทนที่ของสารเคมีเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในทั้งสองกรณี ดังจะดูได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีในหลุมดักเซลล์ (ซึ่งแปลงเป็นค่าความเข้มข้นของสารเคมีด้วย calibration curve ที่ทำไว้ก่อนหน้านี้) ที่กราฟเข้าสู่สมดุลในระยะเวลาน้อยกว่า 500 วินาที อย่างไรก็ตามการเข้าสู่จุดอิ่มตัวนี้ใช้เวลาแตกต่างกัน คือใช้เวลา ~300 และ ~550 วินาที ในการชะล้างหลุม 80% และ 100% (ภาพ 12b) และใช้เวลา ~100-250 และ ~250-500 วินาที ในการแทนที่ของสารเคมีใหม่ลงในหลุมได้ 80% และ 100% (ภาพ 12a) ระยะเวลาที่ใช้ถือว่ายอมรับได้ เมื่อเทียบกับระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนจากหนึ่งเป็นสองของเส้นสายสาหร่าย



ภาพ 12 การแทนที่ของสารเคมีในหลุมดักเซลล์ ที่อัตราการไหลที่แตกต่างกัน ข้อมูลเก็บจากหลุมดักเซลล์ 4 หลุม ($n=4$) จุดข้อมูลและแถบความคลาดเคลื่อน คือค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (a) คือการทดลอง “เติมสารเคมี” (b) คือการทดลอง “ชะล้างสารเคมี”

จากกราฟจะเห็นว่า ในช่วง 2-3 นาทีแรกของการทดลองที่ความเข้มข้นของสารเคมีภายในหลุมพุ่งขึ้น 120% นั้นเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากของเหลวเปลี่ยนสภาพจากการหยุดอยู่นิ่งไปสู่สภาพเคลื่อนที่ การ”ผลัก” ของเหลวในช่วงเวลาดังกล่าวอาจทำให้เกิดการบีบอัดชั่วคราวอันเนื่องมาจากความเฉื่อย ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดัชนีการหักเหของของเหลวชั่วคราวและดูราวกับสารเคมีมีสีเข้มข้นในช่วงเวลานั้น

ปรากฏการณ์การไหลในห้องเลี้ยงเซลล์ที่เกิดขึ้นที่น่าสนใจประการหนึ่ง คือเมื่อมีการนำสารละลายชนิดที่สองเข้าแทนที่ จะเกิดขอบเขตแบ่งแยกชัดเจนระหว่างสารละลายสองชนิด และเป็นขอบเขตที่เป็นเส้นตรงตลอดการทดลอง ซึ่งเคลื่อนจากทางเข้าจนถึงทางออก นั้นแสดงให้เห็นว่าการไหลในห้องเลี้ยงเซลล์และการแทนที่ของของเหลวในหลุมเป็นแบบลามินาร์

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการวัดปริมาณน้ำมันในสารถ่ายจากตัวอย่างปริมาณน้อย

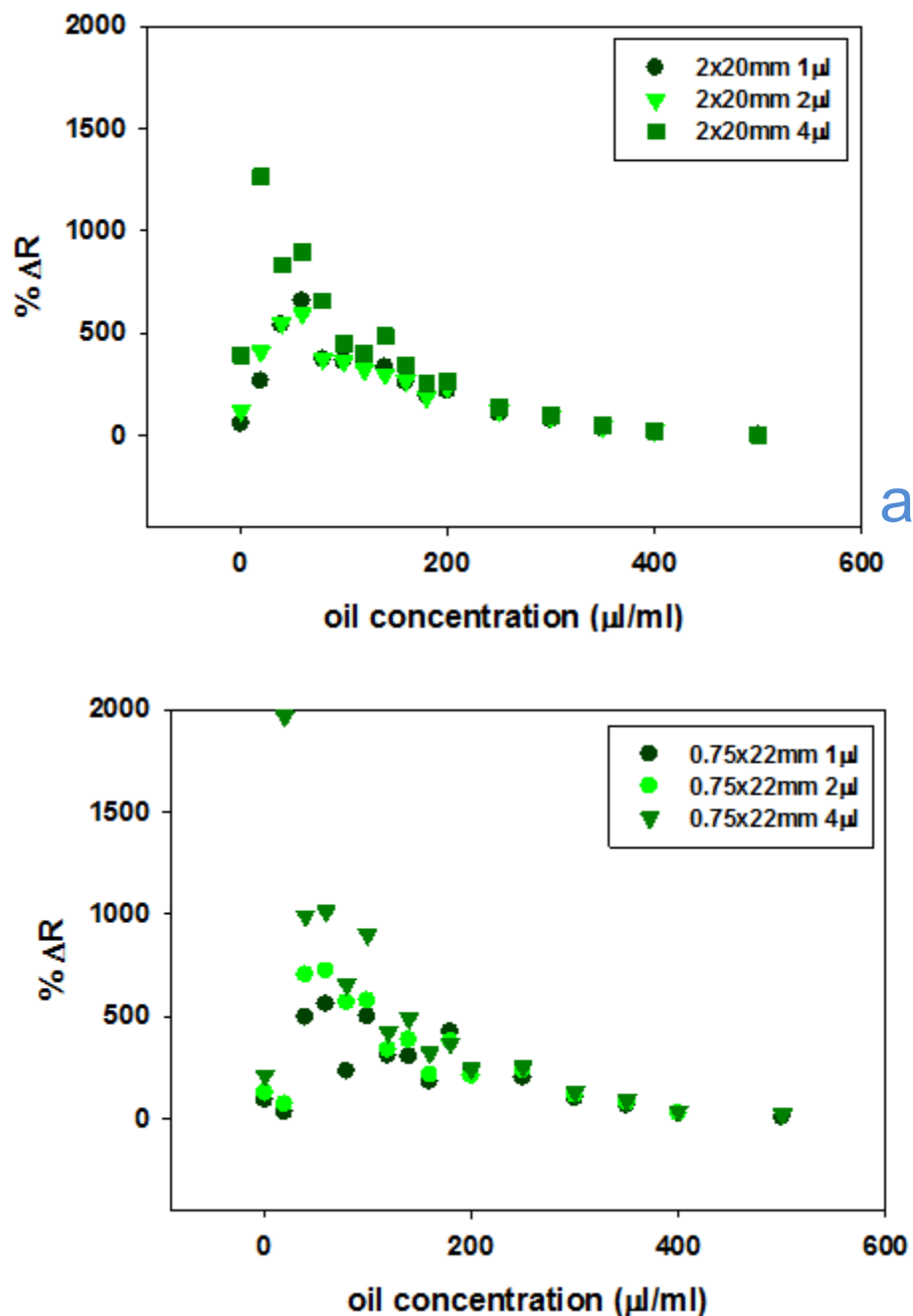
1) เทคนิคการวัดด้วยหัวไฟฟ้าคาร์บอน

จากการทดลองเบื้องต้นในการหยดสารละลายลิปิด (น้ำมันพืช) ในคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร บนคาร์บอนอิเล็กโทรดสองชนิดคืออิเล็กโทรดจากกระดาษถ่ายเอกสารที่ฝนด้วยดินสอ 2B โดยใช้สารละลายลิปิดปริมาตร 9 หรือ 15 ($9+6$) ไมโครลิตร และ บนหัวไฟฟ้าคาร์บอนแบบพิมพ์สกรีนบนสับเซรทพลาสติกทนคลอโรฟอร์ม พบว่า ค่าความต้านทานไฟฟ้าของอิเล็กโทรดดังกล่าว เปลี่ยนไปหลังจากการหยดสารละลายและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยออกไป อย่างมีความสัมพันธ์แบบไม่เชิงเส้นตรง (non-linear relationship) กับความเข้มข้นของสารละลายลิปิด ในลักษณะของสมการรูปตัวเอส (s-shape)

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองละเอียดขึ้น คือเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายลิปิดที่นำมาหยด ให้ถี่มากขึ้น กลับพบว่าความสัมพันธ์ของตัวแปรและตัวแปรตามไม่ได้เป็นดังที่คาดไว้ ว่าเป็นรูปตัวเอส แต่กลับมีลักษณะเป็นเอกซ์โปเนนเชียลที่ความชันเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดหนึ่ง กราฟจึงตกลงเข้าสู่ช่วงความสัมพันธ์แบบลบ ลักษณะกราฟในช่วงท้ายลดลงคล้ายสมการ

เอกซ์โพเนนเชียลที่ความชันลดลงเรื่อย ๆ จนสู่จุดสมดุล ภาพ 13 แสดงผลการทดลองที่หยุดสารละลายลิปิดปริมาตรต่างกัน บนขั้วไฟฟ้าที่มีขนาดต่างกันสองขนาดคือ 2x20 มิลลิเมตร (ภาพ 13a) และ 0.75x22 มิลลิเมตร (ภาพ 13b)

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สมมติฐานเรื่องการเพิ่มขึ้นของความต้านทานของตัวนำไฟฟ้าอันเนื่องจากการแทรกตัวของลิปิดระหว่างรอยต่อของอนุภาคตัวนำไฟฟ้า อาจไม่ถูกต้อง และเมื่อทำการทดลองซ้ำกับขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีนบนกระดาษที่ใช้ตัวนำไฟฟ้าเป็นโลหะเงิน กลับพบว่า การหยุดสารละลายลิปิดไม่ได้เปลี่ยนแปลงความต้านทานของขั้วไฟฟ้าแต่อย่างใด จึงอาจทำให้สรุปได้ว่า สมมติฐานดังกล่าว ไม่น่าจะถูกต้อง จากการอภิปรายร่วมกับเพื่อนนักวิจัยคาดว่า การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเฉพาะกับขั้วไฟฟ้าที่มีตัวนำเป็นคาร์บอนเท่านั้น เป็นเพราะตัวนำไฟฟ้าคาร์บอนประพติดตัวคล้ายกับสารกึ่งตัวนำในวงจรทรานซิสเตอร์ ปริมาณของลิปิดและสารที่ละลายรวมอยู่อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับหรือตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งทำให้การยอมให้การไหลของอิเล็กตรอนในวงจรวัดความต้านทานในปริมาณที่ต่างกันขึ้นกับปริมาณของสารเหล่านั้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองซ้ำพบว่าแบบแผนของกราฟเช่นนี้เกิดขึ้นเสมอ จึงอาจสามารถพัฒนาต่อไปเป็นวิธีการใหม่ในการพยากรณ์ปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายได้



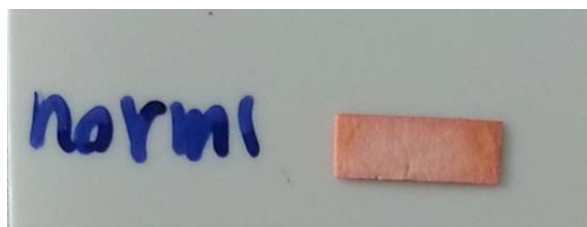
ภาพ 13 เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงความต้านทานของอิเล็กโทรดคาร์บอนแบบพิมพ์ปริ้นท์บนแผ่นพลาสติกทนคลอโรฟอร์ม เมื่อหยดสารละลายน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เทียบกับความต้านทานเริ่มต้นของอิเล็กโทรด ความสัมพันธ์เป็นแบบไม่เชิงเส้นตรง เมื่อความเข้มข้นมาก เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงความต้านทานจะสูงขึ้นตาม จนถึงจุดผกผัน ความสัมพันธ์จะเปลี่ยนเป็นตรงกันข้าม คือยิ่งความเข้มข้นมาก เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงความต้านทานจะลดลง ข้อมูลสามชุดเก็บจากอิเล็กโทรดชนิดเดียวกันแต่มีขนาดต่างกันคือ 2x20 มิลลิเมตร (ก) และ ขนาด 0.7 x22 มิลลิเมตร (ข) และหยดด้วยสารละลายปริมาตรต่างกันคือ วงกลมสีเขียวเข้ม: 1 ไมโครลิตร, วงกลมสีเขียวอ่อน: 2 ไมโครลิตร, และสามเหลี่ยมหัวกลับ: 4 ไมโครลิตร

จากภาพ 13 จะเห็นได้ว่า กราฟมีทั้งช่วงฟังก์ชันเพิ่มและลดอยู่ในกราฟเดียวกัน และจุดเปลี่ยนระหว่างฟังก์ชันเพิ่มและลด เป็นช่วงสั้นมาก หากกราฟเช่นนี้ถูกนำไปใช้เป็นสมการ

มาตรฐาน จำเป็นที่จะต้องทำการทดลองสามจุด คือใช้สารละลายลิปิดที่ไม่ทราบค่า 3 ความเข้มข้น (ที่ทราบว่าเข้มข้นเป็นกี่เท่าของกันและกัน เช่น x , $2x$ และ $3x$) เพื่อระบุให้ได้ว่าช่วงย่านความเข้มข้น ที่สารตัวอย่างตกอยู่ในช่วงใดของความสัมพันธ์ อย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติการจริง นักวิจัยมักจะทราบโดยคร่าวว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ตกอยู่ในย่านความเข้มข้นช่วงใด และเลือกช่วงการตีความผลการวิเคราะห์ได้ การวัดสามจุด อาจไม่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ซ้ำเสมอไป

ทั้งนี้ทั้งนั้น กราฟความสัมพันธ์ที่สร้างได้ ยังคงมีข้อน่าสังเกตอยู่บางประการ ประการแรกคือจุดหักเหที่กราฟเปลี่ยนจากฟังก์ชันเพิ่มเป็นฟังก์ชันลดที่ชันมาก ประการที่สอง ช่วงฟังก์ชันเพิ่ม ซึ่งเป็นช่วงที่มี sensitivity (ค่าสัมบูรณ์ของความชันของกราฟ) สูงกว่า และมีแนวโน้มจะเป็นด้านที่ถูกเลือกใช้เป็น calibration curve มีช่วง (range) สั้น และประการที่สาม คือ การเพิ่มปริมาณลิปิดที่หยดลงบนอิเล็กโทรด (จาก 1 เป็น 2 และ 4 ไมโครลิตร) มีผลทำให้ค่าความต้านทานเพิ่มขึ้นทั้งในด้านที่เป็นฟังก์ชันเพิ่มและฟังก์ชันลด ซึ่งไม่ควรจะเป็นเช่นนั้น เมื่อตัวทำละลายในสารละลายลิปิดที่หยดลงบนอิเล็กโทรด ระเหยไปหมด สิ่งที่เหลืออยู่คือลิปิดปริมาณสารละลายลิปิดที่เพิ่มขึ้น จึงมีค่าเท่ากับการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายลิปิดที่หยด ดังนั้น การเพิ่มปริมาณลิปิดที่หยดลงบนอิเล็กโทรด ที่ตกอยู่ในช่วงย่านความเข้มข้นที่เป็นฟังก์ชันลด ควรจะส่งผลให้ค่าความต้านทานของขั้วไฟฟ้ายิ่งลดลง

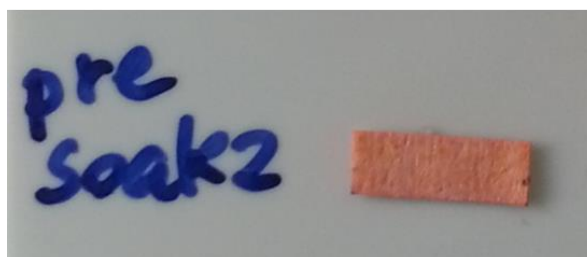
ผู้วิจัยมีความเห็นว่าการกระจายตัวที่ไม่ทั่วของลิปิดบนอิเล็กโทรดอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้กราฟความสัมพันธ์ที่อธิบายได้ลำบากดังกล่าว และยังเป็นผลให้ความสามารถในการทดลองซ้ำได้ (repeatability) ต่ำลงอีกด้วย ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปลี่ยนสับเสอร์ทที่ใช้รองรับตัวนำไฟฟ้าของอิเล็กโทรด จากเดิมที่เป็นพลาสติกทนตัวทำละลายเป็นกระดาษถ้ายเอกสารซึ่งอาจทำให้การกระจายตัวของสารละลายน้ำมันได้ดีขึ้นก่อนตัวทำละลายจะระเหยไปหมด การแพร่ของสารละลายบนชั้นบาง ๆ ของผงคาร์บอน ในระบบอิเล็กโทรดที่ใช้พลาสติกเป็นตัวรองรับ อาจยังไม่ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่า การหยดคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารละลายลิปิดในการทดลอง ลงบนกระดาษก่อนหนึ่งครั้ง ปล่อยให้แห้ง แล้วจึงหยดสารละลายลงบนกระดาษ จะทำให้การกระจายตัวของลิปิดคงค้างไปบนขั้วไฟฟ้าที่เป็นกระดาษเกิดขึ้นอย่างเท่าทั่วถึงกันได้ดีขึ้น ดังแสดงให้เห็นจากการทดลองโดยใช้สารละลายสีย้อมชูตานในคลอโรฟอร์มดังแสดงในภาพ 14 จากภาพจะเห็นว่า การกระจายตัวของตัวถูกละลายบนตัวกลางกระดาษที่ไม่ได้หยดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนหน้า จะมีการกระจายตัวหนาแน่นไปยังบริเวณขอบของกระดาษ ในขณะที่การกระจายตัวของตัวถูกละลายบนกระดาษที่หยดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนหนึ่งครั้ง จะมีความทั่วกันทั้งกระดาษมากกว่า



ก



ข



ค

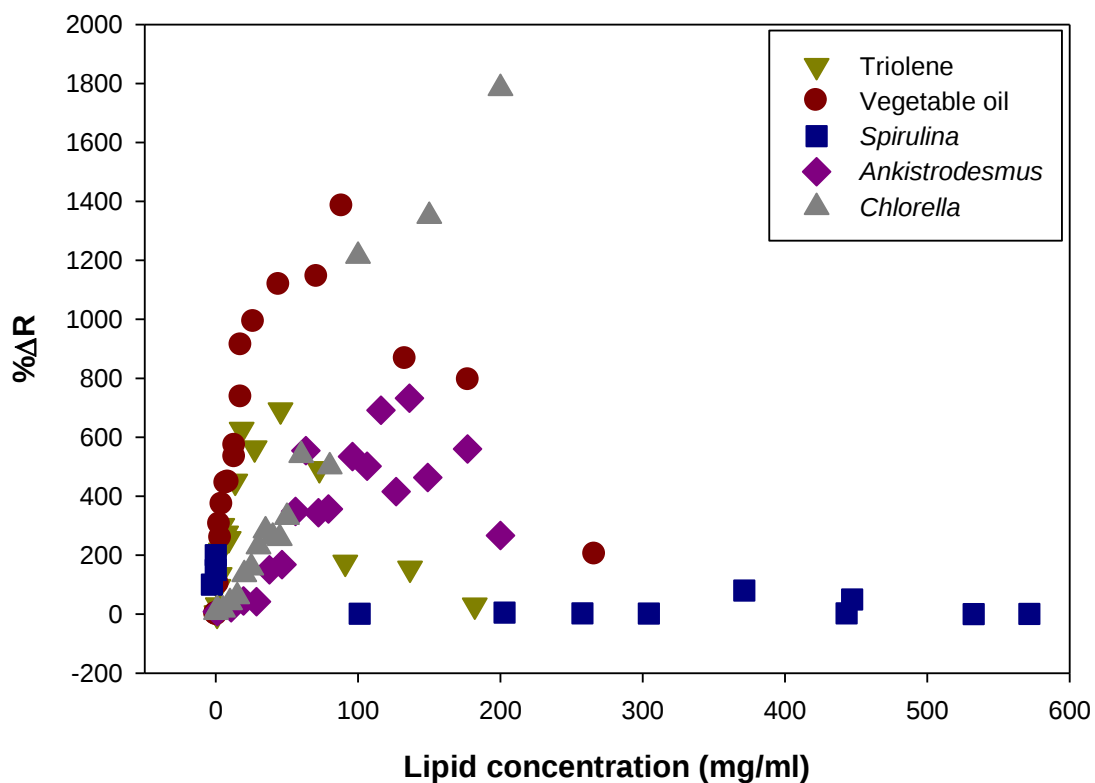
ภาพ 14 อิเล็กโทรดกระดาษที่หยดด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วปล่อยให้แห้ง ก่อนนำมาหยดด้วยสารละลายลิปิด จะทำให้การกระจายตัวของลิปิดหลังการระเหยแห้งของตัวทำละลาย เกิดการกระจายตัวไปยังส่วนต่าง ๆ ของกระดาษได้อย่างทั่วถึงเท่ากันมากกว่า ปรากฏการณ์ดังกล่าวสาธิตให้เห็นได้ โดยใช้สารละลายชูดานในคลอโรฟอร์ม เมื่อหยดลงบนกระดาษปกติ (ก) สีมินวโน้มจะกระจายตัวไปยังขอบของกระดาษ และ เมื่อหยดซ้ำลงอีกหนึ่งหยด(ข) การกระจุกตัวของสีที่ขอบชัดเจนยิ่งขึ้น แต่เมื่อหยดคลอโรฟอร์มก่อน ทิ้งให้แห้งแล้วจึงหยดสารละลาย สีมมีการกระจายตัวที่ทั่วเท่ากันทั้งแผ่นมากขึ้น (ค) กระดาษที่ใช้ทดลองคือกระดาษถ่ายเอกสารขนาดประมาณ 1.5x5 มิลลิเมตร

เมื่อนำระบบอิเล็กโทรดและวิธีการหยดสารละลายลิปิดดังกล่าวไปใช้ในการทดลองกับน้ำมันพืช (อิเล็กโทรดกระดาษขนาด ประมาณ 1.5x5 มิลลิเมตร รองด้วยอลูมิเนียมฟลอย ปริมาตรสารละลายลิปิดที่ใช้ 4 ไมโครลิตร) พบว่ากราฟความสัมพันธ์ที่ได้ มีช่วงฟังก์ชันเพิ่มที่ยาวขึ้น และมีช่วงผกผันของความสัมพันธ์จากฟังก์ชันเพิ่มไปฟังก์ชันลด ที่มีการชะลอตัวให้เห็นชัดมากขึ้นดัง ภาพ 15

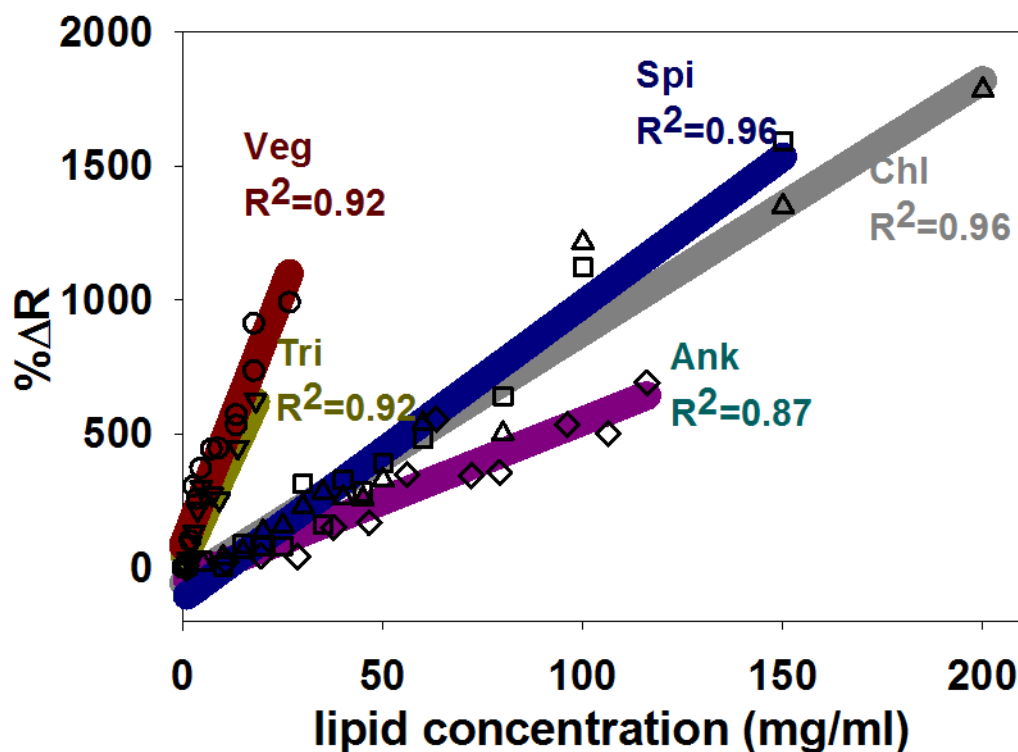
เมื่อทำการทดลองกับไตรกรีเซอไรด์มาตรฐาน (ไตรโอเลอิน 97%) ลิปิดสกัดหยาบจากมวลสารหยาบ *S. platensis*, *Ankistrodesmus* sp. และ *Chlorella* sp. พบว่าแนวโน้มของกราฟยังคงเป็นเช่นเดิม (ภาพ 15) แต่ลักษณะของกราฟมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน คือช่วงฟังก์ชันเพิ่มของกราฟมีความชันน้อยกว่า และกินช่วงยาวกว่ามาก ภาพ 16 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของน้ำมันและการเปลี่ยนแปลงความต้านทานไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้า เฉพาะในส่วนที่ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ค่า R-square ของความสัมพันธ์ในทุกชนิดของน้ำมัน อยู่ในช่วง 0.87-0.96

ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความต้านทานของอิเล็กโทรดสูงสุดที่จุดผกผันมีค่ามากที่สุด ในบรรดา lipid สามชนิด จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า lipid จากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีลักษณะของกราฟความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน แต่จะมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันออกไป และหากวิธีนี้จะถูกนำไปใช้จริง จะต้องมีการสร้าง standard curve สำหรับน้ำมันจากสาหร่ายแต่ละชนิดเสียก่อน อย่างไรก็ตาม

วิธีการนี้ยังมีข้อดีกว่าวิธีทาง spectrometry โดยใช้ Nile red เพราะ แม้วิธีการดังกล่าวจะทำลายเซลล์ แต่สาหร่ายที่ใช้มีปริมาณน้อย ไม่อาศัยการติดฉลาก (label-free) และยังใช้อุปกรณ์ที่สามารถหาได้ทั่วไป ในราคาที่ไม่แพง



ภาพ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ lipid จากแหล่งต่าง ๆ คือ ไทรโอไลน์ น้ำมันพืช น้ำมันสกัดหยาบ จาก *S. platensis*, *Ankistrodesmus* sp. และ *Chlorella* sp. กับความต้านทานไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปของขั้วไฟฟ้า



ภาพ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลิพิดจากแหล่งต่าง ๆ คือ ไทรโอลิน น้ำมันพืช น้ำมันสกัด
หยาบจาก *S. platensis*, *Ankistrodesmus* sp. และ *Chlorella* sp. กับความต้านทานไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปของ
ชีวไฟฟ้า ในช่วงที่ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ค่า R-square ของความสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.87-0.92

การทดลองในส่วนนี้อยู่ในระยะสุดท้าย คือการทดสอบนำกระบวนการดังกล่าวไปใช้ในการวัด
ปริมาณน้ำมันจากตัวอย่างสาหร่ายแห้ง เทียบเคียงกับวิธีการมาตรฐานปัจจุบัน (การสกัดด้วยตัว
ทำละลาย และนำน้ำมันที่สกัดได้ไปชั่งหาน้ำหนัก)

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการวัดปริมาณน้ำมันในสาหร่ายจากตัวอย่างปริมาณน้อย

2) เทคนิคการวัดอัตราการระเหยของสารละลายน้ำมันตัวอย่าง

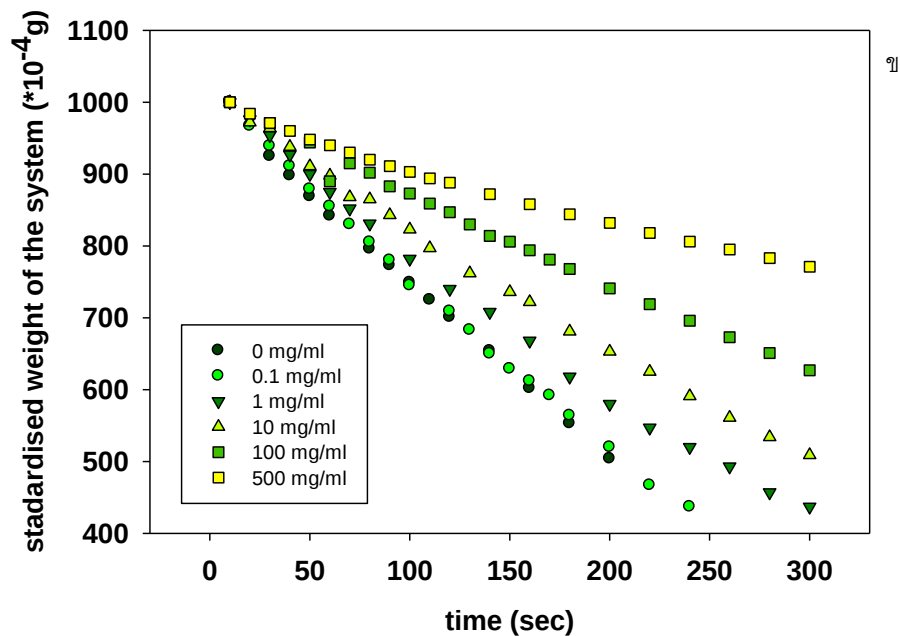
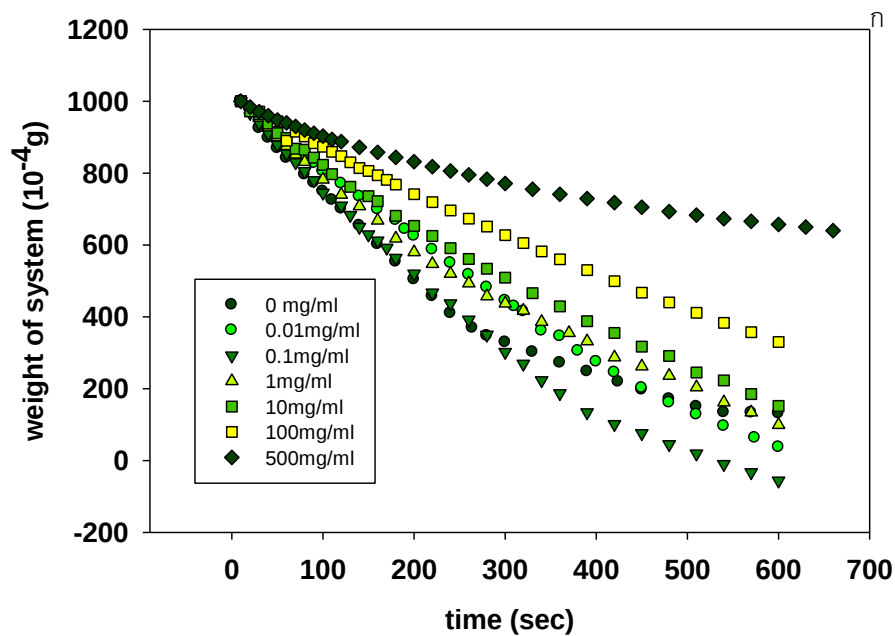
จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า สารละลายน้ำมันถั่วเหลืองในคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น
ต่างกัน จะมีอัตราเร็วในการระเหยที่แตกต่างกัน **Error! Reference source not found.** แสดง
ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของระบบ (ภาชนะและสารละลายน้ำมันถั่วเหลือง) ณ เวลาใด ๆ
ภาพ 17a คือข้อมูลดิบ และ ภาพ 17b คือข้อมูลชุดเดิมที่กราฟถูกปรับตำแหน่งตามแกน y (offset)
เพื่อให้จุดเริ่มต้นของกราฟเริ่มที่ค่า y เดียวกัน คือ 1000

จากภาพจะเห็นว่ากราฟน้ำหนักของระบบ ณ เวลาใด ๆ ของสารละลายน้ำมันถั่วเหลืองที่มี
ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มีความแตกต่างกันสองประการหลักคือ ความชันของกราฟ ที่มีค่าติดลบ
ทำมุมกับแกนนอนประมาณ -45° ในกรณีของคลอโรฟอร์มที่ไม่มีน้ำมันละลายอยู่เลย (0
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีองศาที่ติดลบลดลงเรื่อย ๆ ในกรณีที่ความเข้มข้นของน้ำมันเพิ่มขึ้น

ที่ระดับ (เลขชี้กำลังฐานสิบที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ) และจากชุดของกราฟสามารถพยากรณ์ได้ว่า องศาของกราฟจะลดลงน้อยลงเรื่อย ๆ และเข้าสู่กราฟที่เป็นเส้นนอนราบไปกับแกน x เมื่อ สารละลายน้ำมันไม่มีตัวทำละลายอยู่เลย (ไม่มีการระเหยของมวลจากระบบ) กล่าวได้อีกนัยหนึ่ง คือ ยิ่งความเข้มข้นของสารละลายมาก การระเหยก็จะช้าลง เป็นไปตามสมมติฐานที่มีไว้ใน ตอนต้น เมื่อพิจารณาชุดข้อมูลรวมกันจะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความชันของกราฟชันเจนมากขึ้นเรื่อย ๆ ในกราฟ 10-500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน่าจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วมากในช่วง หลังจาก 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้นไป

ความแตกต่างประการที่สองคือรูปแบบของกราฟ จะเห็นได้ว่า กราฟของคลอโรฟอร์ม เป็นเส้นตรง แต่เมื่อมีน้ำมันละลายอยู่ กราฟจะเริ่มเปลี่ยนเป็นเส้นโค้ง คล้ายกราฟของสมการเอกโปเนนเชียล ซึ่งจะเห็นได้ชัดในกราฟความเข้มข้นสูง การเข้าสู่จุดสมดุลในสมการเอกโปเนนเชียล อาจแสดงให้เห็นถึงจุดที่ตัวทำละลายระเหยออกไปจนเกือบหมด ดังนั้นหากในสารละลาย มีตัวทำละลายอยู่น้อย จุดที่กราฟจะเข้าสู่สมดุลจะเร็วขึ้นเรื่อย ๆ เข้าใกล้ $t=0$ ซึ่งคือเส้นตรงราบนอนไปกับแกน x ในที่สุด

ในเบื้องต้นพบว่า แบบแผนการระเหยของสารละลายสามารถ fit เข้าได้กับสมการแบบเอกโปเนนเชียล การสร้างแบบจำลองการระเหย อาจทำให้สามารถแก้สมการหาค่าคงที่ที่สำคัญ ซึ่งกำหนดลักษณะเด่นของกราฟ เช่น ความชัน ค่า x ที่กราฟเข้าสู่จุดสมดุล และความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายลิปิด



ภาพ 17 การเปลี่ยนแปลงมวลของระบบสารละลายน้ำมันถั่วเหลืองในคลอโรฟอร์มที่เวลาต่าง ๆ อันเนื่องมาจากการระเหยของตัวทำละลาย (ก) ข้อมูลดิบ (ข) ข้อมูลดิบที่ถูกปรับค่าแกนตั้ง เพื่อให้มีค่า y เริ่มต้นที่จุดเดียวกัน จากภาพ ความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายมีผลต่อรูปแบบของกราฟความสัมพันธ์ สองประการคือ ความชัน (เข้มข้นมาก ความชันติดลบน้อยลง) และความเป็นเส้นตรงของกราฟความสัมพันธ์

ในระบบที่ทำการทดลองจะเห็นว่า ปริมาตรของสารละลายที่ใช้คือ 80 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างมาก ทั้งนี้เพราะการทดลองดังกล่าวเป็นการทดลองเบื้องต้น เพื่อมองหาความเป็นไปได้ ในขั้นต่อไป ผู้วิจัยสนใจที่จะวัดอัตราการระเหยของสารละลายในระบบที่เล็กลง ในระดับไมโครลิตร หรือน้อยกว่า

ในระบบที่เล็กลง การติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของระบบเป็นไปได้ลำบากด้วยเครื่องมือในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบระบบการติดตามการระเหยบนปลายของปิเปตทิปที่ผู้วิจัยตั้งชื่อว่า lab on a tip ดังที่ได้อธิบายไปในวิธีการทดลอง ระบบดังกล่าวทำให้สามารถติดตามการระเหยของสารละลายน้ำมันในคลอโรฟอร์มได้ โดยวิธีทางภาพถ่าย และการคำนวณปริมาตรของของเหลวที่คงอยู่ในปิเปตทิป ณ เวลาใด ๆ

ในเบื้องต้นผู้วิจัยพบว่า สามารถใช้ระบบดังกล่าวในการติดตามการหดตัวของหยดสารละลายน้ำมันได้ ดังภาพ 18 และจากภาพจะเห็นได้เห็นว่าแม้สารละลายคลอโรฟอร์มจะลดปริมาตรลง แต่หยดสารละลายจะอยู่ที่ปลายของปิเปตทิปเสมอ ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสอากาศคงที่ และหากสามารถสันนิษฐานได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันในแต่ละบริเวณของหยด เข้าใกล้ความเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน (homogeneity) ย่อมสามารถสร้างกราฟการระเหยของสารละลายน้ำมัน ได้เช่นเดียวกับการทดลองในระบบขนาด 80 ไมโครลิตร ในอนาคตระบบดังกล่าว อาจสามารถใช้ร่วมกับการถ่ายภาพและกระบวนการวิธีทางภาพถ่าย (image processing) เพื่อติดตามการระเหยและสร้างกราฟการระเหยของสารละลายทั้งแบบอัตโนมัติและกึ่งอัตโนมัติ

ในอันดับต่อไป ผู้วิจัยต้องการศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการระเหย เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และจลนศาสตร์การระเหยของสารละลายน้ำมันจากสารละลายต่างชนิด รวมไปถึงถึงการทดลองนำวิธีการดังกล่าวไปใช้จริง เทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยวิธีมาตรฐาน



ภาพ 18 ภาพถ่ายต่อเนื่องของการลดปริมาตรลงอันเนื่องมาจากการระเหย ของคลอโรฟอร์มในระบบ lab on a tip ที่พัฒนาขึ้น ในภาพ หยดสารละลายใสที่อยู่ปลายปิเปตทิปคือคลอโรฟอร์ม ของเหลวที่อยู่ถัดมาคือน้ำ ซึ่งทำหน้าที่เป็น stop cock ที่ควบคุมให้การระเหยเกิดขึ้นที่ปลายปิเปตทิปเพียงด้านเดียว แต่ละภาพถ่ายห่างกัน 15 วินาที

การพัฒนาไบโอชิปสำหรับการศึกษาเพลงตอนเชิงเซลล์/โคโลนีเดียว

- การพัฒนาเทคนิคเพื่อการวัดปริมาณน้ำฝนในสหายรายจากตัวอย่างปริมาณน้อย

- การหดยดสารละลายลิปิดในคลอโรฟอร์ม ลงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนทำให้ค่าความต้านทานไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าเปลี่ยนไป โดยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมัน (เมื่อปริมาตรของหยดน้ำมันที่ใช้คงที่) กับเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่าความต้านทานเป็นไปตามสมการไม่เชิงเส้น ในช่วงแรกความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่าความต้านทานเป็นแบบแปรผันตรง แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มถึงจุดหนึ่งจะเป็นแบบผกผัน

- ลักษณะกราฟความสัมพันธ์ในลิปิตต่างชนิดเป็นไปในทางเดียวกัน แต่มีลักษณะในรายละเอียดเฉพาะตัว เช่น ความชันของกราฟ จุดสูงสุดของกราฟ เป็นต้น
- การหยดน้ำมันลงบนขั้วไฟฟ้าช้า ทำให้เกิดปรากฏการณ์ coffee ring effect และทำให้ค่าความต้านทานที่อ่านได้ สูงกว่าความเป็นจริง
- การใช้ขั้วไฟฟ้าที่มีวัสดุรองรับคาร์บอนเป็นกระดาศ ทำให้จุดหักของกราฟ จากฟังก์ชันเพิ่มเป็นฟังก์ชันลด แห่ลมน้อยลง และมีช่วงความยาวของความสัมพันธ์แบบเส้นตรงยาวขึ้น
- วิธีการดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการวัดปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายปริมาณน้อยได้ในอนาคต

2) เทคนิคการวัดอัตราการระเหยของสารละลายน้ำมันตัวอย่าง

- แบบแผนการระเหยและกราฟการระเหยของของสารละลายลิปิตในคลอโรฟอร์ม ขึ้นกับความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายลิปิตที่นำมาทดสอบ สารละลายลิปิตที่มีความเข้มข้นสูงจะระเหยช้า และลู่เข้าสู่จุดสมดุลที่ค่า y (ปริมาณสารละลายคงเหลือในระบบ) ที่สูงกว่า
- ลักษณะเฉพาะของกราฟที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายลิปิต อาจนำไปใช้ในการพยากรณ์ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมัน ที่ไม่ทราบค่าความเข้มข้นตั้งต้นได้
- ระบบ lab on a tip ที่พัฒนาขึ้นมา มีแนวโน้มที่จะใช้ในการลดปริมาตรของสารละลายน้ำมันตัวอย่าง ในการติดตามแบบแผนการระเหยได้ ปริมาตรน้อยที่สุดของสารละลายน้ำมันที่สามารถทดสอบได้ในระบบ lab on a tip ณ ปัจจุบันคือประมาณ 0.5 ไมโครลิตร
- วิธีการดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในการวัดปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะในอนาคต

การพัฒนาไบโอชิปสำหรับการศึกษาแพลงตอนเชิงเซลล์/โคโลนีเดี่ยว

- อาจศึกษาถึงลักษณะทางเรขาคณิตของหลุมระดับจุลภาคต่อประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เดี่ยว
- อาจมีการปรับเงื่อนไขการนำเซลล์เข้าสู่ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์เดี่ยวของสาหร่ายหลายชนิดที่มีขนาดแตกต่างกัน

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการวัดปริมาณน้ำมันในสาหร่ายจากตัวอย่างปริมาณน้อย

- อาจมีการทดสอบใช้กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย หรือราที่ผลิตน้ำมันได้ และอาจทดสอบโดยการนำไปใช้ในการวัดปริมาณสารสำคัญชนิดอื่น ที่สกัดได้จากกระบวนการสกัดหยาบ เช่น รงควัตถุ เป็นต้น

Keywords : จำนวน 3-5 คำ

(คำหลัก)

สำหรับ ไมโครฟลูอิดิกส์ การศึกษาระดับเซลล์เดี่ยว ไบโอดีเซล การวัดปริมาณน้ำมันใน
สำหรับ

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 1. Kuntanawat P, Ruenin J, Phatthanakun R, Kunhorm P, Surareungchai W, Sukprasong S, Chomnawang N, An Electrostatic Microwell – based Biochip for Phytoplanktonic Cell Trapping. *Biomicrofluidics* 2014; 8: 034108. (IF = 3.772)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ เริ่มมีการผลิต free sample ของไบโอชิป หรือโครงสร้างบางส่วน ของไบโอชิปให้กับกลุ่มนักวิจัยอื่น เพื่อใช้ในงานที่หลากหลาย เช่น ใน การศึกษาสรีรวิทยาการเจริญของสาหร่าย *Volvox*, *Pediastru*, นอกจากนี้ ยังมี กลุ่มผู้ใช้ที่แสดงความต้องการที่จะใช้อุปกรณ์ดังกล่าว หรือชิ้นงานที่ปรับปรุง แบบจากไบโอชิปที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยของตน และบางส่วนได้เริ่มนำ free sample ไปใช้ประโยชน์บ้างแล้ว งานวิจัยที่เริ่มมีการนำไปใช้ประโยชน์และมี ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าวนั้นครอบคลุมในสาขาที่หลากหลายเช่น วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ชีววิทยาของมะเร็ง การศึกษาทาง HIV และโรคพืช และด้วยอุปสงค์ที่เพิ่มขึ้นของชิ้นงานนี้ ทางกลุ่มวิจัยจึงได้เริ่มพัฒนา lab scale production line ของชิ้นงานดังกล่าว และจะเริ่มผลิตจำหน่ายเชิงการค้าผ่าน ทางบริษัทเอกชนภายในปี พ.ศ.2558 นี้ นอกจากนี้ ชิ้นงานจากโครงการวิจัย ดังกล่าวยังเป็นส่วนสำคัญและจุดเริ่มต้นของโครงการวิจัยที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งได้รับความร่วมมือจากภาคเอกชน คือ ฟาร์มเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา บุญสมฟาร์ม อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่
 - เชิงสาธารณะ เกิดการสร้างความร่วมมือทางด้านการพัฒนา biomicrofluidic devices สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ และการใช้ประโยชน์ ซึ่งเป็นเครือข่ายวิจัย ของนักวิจัยที่มีความชำนาญหลากหลาย เช่น วิศวกรรมไฟฟ้า วิศวกรรมระบบ ควบคุม นักชีววิทยา นักโรคพืช วิศวกรเซลล์ และนักเทคโนโลยีชีวภาพ จาก มหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัยหลากหลายแห่ง อันได้แก่ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ห้องปฏิบัติการสาหร่าย ประยุกต์ และห้องปฏิบัติการพัฒนาต่อต้านและรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ภาควิชาพันธุศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (สำนักวิชาเกษตรศาสตร์ สาขาการผลิตพืช) และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน

- เชิงวิชาการ อุปกรณ์ดังกล่าวถูกนำไปเป็นส่วนหนึ่งในการเรียนการสอน การทำโครงการวิทยาศาสตร์ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ของนักเรียนห้องเรียนวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
- ได้นำเสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการระดับชาติ 6th National Conference on Algae and Plankton วันที่ 28-30 มีนาคม 2556 ณ โรงแรมดิ เอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ จำนวนสองเรื่องคือ 1) การพัฒนากระบวนการวัดปริมาณลิปิดในสาหร่ายด้วยวิธีทางอิเล็กทรอนิกส์ และ 2) ระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อการติดตามพฤติกรรมเชิงปริมาณระดับเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก
 - ได้นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ภายใต้หัวข้อ A Biochip for Single Algal Cell Trapping and Miniaturized Techniques for Qualitative Analysis of Algal Lipid ในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ระหว่างวันที่ 23-25 ตุลาคม พ.ศ. 2557
 - ได้รับรางวัลผู้ใช้แสงซึ่งโครตรอนดีเด่น ประเภท ผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ และสังคม โดยสถาบันวิจัยแสงซึ่งโครตรอน (องค์การมหาชน) เมื่อวันที่ 19 มกราคม พ.ศ. 2558

ภาคผนวก



An electrostatic microwell-based biochip for phytoplanktonic cell trapping

Panwong Kuntanawat, Jirapat Ruenin, Rungrueang Phatthanakun, Phongsakorn Kunhorm, Werasak Surareungchai, Sompong Sukprasong, and Nimit Chomnawang

Citation: *Biomicrofluidics* **8**, 034108 (2014); doi: 10.1063/1.4882196

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4882196>

View Table of Contents: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/bmf/8/3?ver=pdfcov>

Published by the [AIP Publishing](#)

Articles you may be interested in

[Vertical microbubble column—A photonic lab-on-chip for cultivation and online analysis of yeast cell cultures](#)
Biomicrofluidics **6**, 034106 (2012); 10.1063/1.4738587

[Covalently immobilized biomolecule gradient on hydrogel surface using a gradient generating microfluidic device for a quantitative mesenchymal stem cell study](#)
Biomicrofluidics **6**, 024111 (2012); 10.1063/1.4704522

[Geometrical effects in microfluidic-based microarrays for rapid, efficient single-cell capture of mammalian stem cells and plant cells](#)
Biomicrofluidics **6**, 024112 (2012); 10.1063/1.4704521

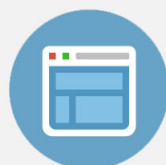
[Cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochip applications: Ultraviolet surface grafting using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine](#)
Biomicrofluidics **6**, 012822 (2012); 10.1063/1.3682098

[Preface to Special Topic: Microsystems for manipulation and analysis of living cells](#)
Biomicrofluidics **5**, 031901 (2011); 10.1063/1.3641860

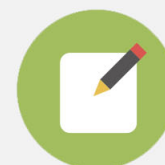


Re-register for Table of Content Alerts

Create a profile.



Sign up today!



An electrostatic microwell–based biochip for phytoplanktonic cell trapping

Panwong Kuntanawat,^{1,2,a)} Jirapat Ruenin,² Rungrueang Phatthanakun,³ Phongsakorn Kunhorm,¹ Werasak Surareungchai,¹ Sompong Sukprasong,⁴ and Nimit Chomnawang⁴

¹*School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkhuntien), 49 Soi Thian Thale 25, Bangkhunthian-Chaithale, Bangkok 10150, Thailand*

²*Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 126 Pracha Uthit Rd., Bang Mod, Thung Khru, Bangkok 10140, Thailand*

³*Beamline 6a: Deep X-ray lithography (DXL), The Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

⁴*School of Electrical Engineering, Institute of Engineering, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

(Received 16 February 2014; accepted 28 May 2014; published online 9 June 2014)

A simple microwell-based microfluidic chip for microalgal cells trapping was fabricated. An electrostatic cell trapping mechanism, enabled by a positively charged glass surface, was used. The chip was capable of capturing multiple algal cell types. In the case of filamentous *Spirulina platensis*, we observed single filament occupancy of up to ~30% available wells, as high as some previously proposed methods. Captured filaments were not of any preferential size, suggesting well randomized cell trapping. It was found that the electrostatic attraction did not affect the cell growth. Total replacement of liquid inside the wells could be achieved by pumping new solutions via the inlet, making single cell experiments in controlled chemical conditions possible. After the top layer of the chip was removed, cells in the wells could be simply transferred using a micropipette, turning the chip into a platform for strain selection. © 2014 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4882196>]

I. INTRODUCTION

Microalgae are a highly diverse group of primitive photosynthetic microorganisms. They are rich sources of a wide spectrum of valuable products such as proteins,^{1,2} pigments,^{2–5} antioxidants,^{2,6} fatty acids,^{2,7} and pharmaceutical compounds.^{2,6} Recently, algae have gained even more attention from scientists around the world as food and alternative energy crops. Their ability to thrive in various harsh culturing conditions and high growth rates⁸ make algae attractive candidates for foods and alternative energy production.

The key to a successful algae-based industry is fundamental knowledge of algal cell behaviors, growth and their interaction with the environmental factors. Most understanding of algal biology has been based on descriptive observations or conventional quantitative measurements on samples collected from bulk scale culture (optical density, sample cell count). One example is the work by Cifferi⁹ in which a descriptive *Spirulina platensis* life cycle was redrawn and is still in use of today. Scientists started to realize these methods are not sufficient to truly understand the algal cells, as the measurements assume individuals in the population of the culture behave exactly same.^{10–12} Observation of diversity of characters and capabilities of the true population is hindered by the data acquisition. Unlike adherent cell types such as mammalian cells, living phytoplanktonic cells, especially over a long period of time, has been poorly

^{a)}Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: panwong.kun@mail.kmutt.ac.th

studied. The major barrier is the fact that the cells are not only microscopic but also planktonic—being free floating in the culture medium. Investigation of the algal cell under a controlled environment has been technically problematic.

In the past few years, there have been several proposed new techniques from many groups to overcome the problems of trapping different species of cells, including algae, on microfluidic chips. These techniques not only allow several single cells/colonies/filaments to be tracked for quantifying individual growth over a long period of time but also enable quantitative observation of the algal cell behavior continuously in a culture. However, some technical limits still remain.

One of the most famous techniques is the microdroplet-based cell encapsulation in oil phase^{10,11,13} separating cells into private compartments. It facilitates the rapid tracking of single cells in parallel but only in a static culture mode. An addition or removal of chemicals cannot be simply made. Trapping of cells with an electric field, using electrodes,^{14–16} may allow cells to be captured in place under regular medium replacement. The technique, however, is not very practical for repeated biological routines and is not very cost-effective. The electrical field may also affect cell proliferation.^{17,18} Cell trapping based on suction,^{15,19} channel constriction²⁰ or microcage²¹ may be considered a less costly alternative. Their great difficulty is that there is not a single universal trap design of this kind that can handle multiple types of algal species. The algal cells come in a great variety of shapes and sizes. A tailor-made mechanism is needed for work with each specific cell types. Long-term cultivation can be even more problematic as the trap has to be capable of keeping the whole population of daughter cells in place. A design based on channels with a closed end has been successfully used in studying cell wall growth²² and tracking lineage²³ of rod-like bacteria. However, the algal cell morphology is diverse. The channel-based design is not applicable to algae. So far, there has not been a simple versatile single trapping mechanism capable of use with a board range of algal cell types and allowing truly flexible user-defined chemical control during the experiment. Experiments under continuous culture or adding gradients of growth factors or inhibitors have not been possible.

Microwell-based trapping mechanisms have been acceptably used in capturing a wide range of cells such as mammalian cells^{24–26} and yeasts.^{27,28} The intuitive nature of the well structure is that it allows any particles that are smaller than its size to fall within non-specifically. The wells' depth also acts as a barrier to prevent particles fallen into the well from being easily lifted away when there is a liquid flow above the well. Furthermore, a well structure is also relatively easy to construct repetitively with conventional microfabrication technology. However, it has not yet been designed for use with algae. This is probably because many microalgae are non-adherent, and after settling, may freely float away from the wells, dependent upon the cell status and light.^{29,30}

In this paper, we propose a biochip design that uses the advantages of a microwell as an economical and simple cell capturing mechanism for studying the growth and behavior of single planktonic microalgal cells in a controllable medium flow in which gradients of chemicals (i.e., nutrients, growth factors, and growth inhibitors) can be created or removed at any users desire. To overcome the problem of the cells floating away, an array of microwells was constructed using a commercial positively charged glass slide as the base, facilitating an electrostatic field to trap the planktonic cells inside the well for long run single cell observation under a continuous flow. An economically important algae, *Spirulina platensis*, was chosen as the major organism model in the study because it exhibits a highly diverse multicellular filament's length (from a few microns to several hundred microns). Optimization of the cell seeding condition, to reach high single cell trapping, was conducted. Validity of the device was demonstrated through different studies such as chemical perfusion within the wells, size distribution of cells captured in the device and growth kinetics of cells in the device.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Design, fabrication, and characterization of the biochip

The chip is a microscope slide-size (75 × 25 mm) cell chamber containing an array of 200 microwells (width × length × depth = 1000 × 1000 × 500 μm) in the base. This size fits the

large algal cells used, which were in the range of a few hundred microns in diameter. The array contains 10 rows of 20 wells with $500\ \mu\text{m}$ spacing. The wells were formed by plasma bonding a $500\ \mu\text{m}$ thick polydimethylsiloxane (PDMS) layer with a pattern of the bottomless microwells to a commercially available positively charged microscope slide (SuperFrost® Plus J1800AMNZ, MENZEL-GLÄSER, USA). This was then covered by a diamond shape fluidic layer. See Fig. 1(a). Fig. 1(b) displays a magnified image of the connection between the inlet/outlet to the chamber. The tip of the silicone tube was embedded to the ceiling so its opening end was exposed to the fluidic space.

The microwell layer was created by standard PDMS soft lithography using the nickel mold which was fabricated using X-ray LIGA technique³¹ (Fig. 1(c)). The technique was suitable for fabrication of a “tall” micropattern with a microscopically smooth surface. The metal was used because it is a good material choice of permanent prototype mold for repeat casting of PDMS. Alternatively, a heat resistant resin could be used.

The pre-polymerized PDMS was poured on the flat area of the mold and then spread to the micropatterned area. Like this the thickness of the microwell can be adjusted by changing the volume of the poured PDMS. A thickness of $\sim 100\ \mu\text{m}$ was achieved.

On top of the microwell layer is a fluidic layer. It has a flat top with a diamond shaped flow channel on the reverse side. The depth of the channel determines the height of the cell chamber, which is about 1 mm. The specified dimension of the fluidic layer is shown in Fig. 1(d). The inlet and outlet are connected to the ends of the channel allowing the flow of liquid media. This layer was made by pouring pre-polymerized PDMS on a laser cut acrylic mold

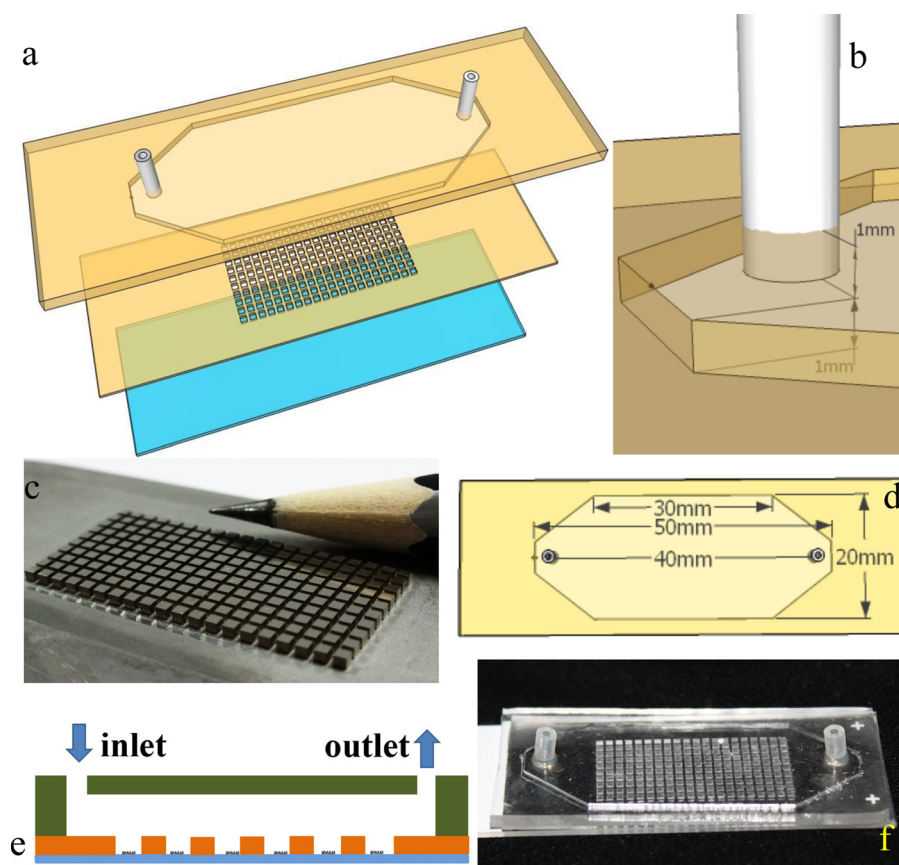


FIG. 1. The fabricated device. The device is composed of 3 layers: the positively charged glass slide, microwell layer, and fluidic layer (a); detail of the structure of the connection between the tubing and inlet/outlet is displayed. Tube is embedded into the volume of PDMS so the tube end is connected to the fluidic space (b); the microwell layer was fabricated using a nickel mold produced with X-ray LIGA technique (c); dimension of the fluidic layer as seen from the top view is specified (d); cross-section (e) and picture of the finished device (f) are displayed.

that had a rectangular frame and diamond shaped island at the center. The diamond shape was thinner than the frame so it gave the embossed patterned of the channel to the finished layer. Tubing and contacts between layers of the device were sealed using pre-polymerized PDMS followed by heating. Figs. 1(e) and 1(f) display the cross-section of the device and the finished device, respectively.

To ensure the expected outcome of the micro-patterned structure, the depth of the micro-wells (the thickness of the patterned layer), was measured from 9 different area of 3 fabricated arrays, using a digital micrometer (Mitutoyo, Japan). The structure of the wells was investigated using an inverted microscope (Nikon TS100F). Digital micrographs of the wells were captured under the inverted microscope with a digital single-lens reflex (DSLR) camera (Canon D110) through its microscope adaptor. The width of the well was measured from digital micrographs of 28 different wells randomly selected from 4 arrays using the freeware, ImageJ.³²

B. Algal strains and culture

Algal strains used were *Spirulina platensis* strain CMU 2, *Pediastrum* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp. obtained from Applied Algal Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand. All the stains were maintained in BG-11 medium³³ except *S. platensis*, which was cultured in Zarrouk's medium.³⁴ Preparation of these standard algal culture media are described elsewhere.^{33,34} *S. platensis* were cultured at 30 °C under 4k lux fluorescent illumination and rotary shaking at 120 rpm (SHO-2D, Wids Laboratory Instruments, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Korea).

C. Cell loading and cultivation in the chip

Prior to the cell loading, the fluidic channel was subsequently rinsed with 70% ethanol, sterile distilled water and sterile algal cell medium. After rinsing, the chip was fully filled with sterile medium before cells infusion. To load the cell to the biochip, the algal cell suspension in the appropriate medium was filled in a plastic sterile syringe. The cells suspension was then injected using a syringe pump (NE-1000, New Era Pump Systems Inc., USA) at a constant flow rate of 200 μ l/min. This particular flow rate performed effectively in our preliminary experiment with *S. platensis*, and thus, the experiments and optimization in this study were done based on this rate. At the end, another round of sterile medium was injected into the device to purge the remaining uncaptured cells.

In our further cell loading optimization with *S. platensis*, different combinations of filament concentration in the suspension (1000, 2500 or 5000 filaments/ml) and volumes of the algal suspension, making up a total filament number of either 500 or 1000 filaments, were loaded into the device at a constant flow rate of 200 μ l/min. For instance, in the case of 1000 filament/ml suspension, 500 μ l and 1000 μ l of this suspension was prepared and infused so that the total number of 500 and 1000 filaments was loaded into the device. The algae cultured in the biochip were kept in the same lighting and temperature setting previously described in the cultivation section.

D. Imaging of cells and analysis

In the study of the cells' growth kinetics in the biochip, the algal cells were observed and counted to monitor their growth under an inverted microscope (Nikon TS100F). Digital micrographs of the cells were captured under the inverted microscope with a DSLR camera (Canon D110) through its microscope adaptor. Measurement of cells length in the micrograph was done manually using the measuring tool of the freeware, ImageJ.³²

E. Chemical perfusion inside the biochip and analysis

The biochip was first filled with either Zarrouk's medium (blank) or 1 mM Azorubine in Zarrouk's medium (dye solution). Then, the other solution, i.e., the dye (adding mode) or blank medium (washing mode), was injected into the device to replace the first solution at a constant

flow rate of either 200 or 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. The picture of the wells (around the center of the array, $n = 4$) was captured every 50 s or more frequently under the inverted microscope with attached DSLR camera in manual mode. The intensity in the red channel of the well area could be measured using ImageJ. The intensity values were converted into a local concentration using a calibration curve constructed from a set of images taken from wells filled with dye solutions of known concentration. The relative local intensity (100x local intensity/the local intensity when the device filled with the blank) was plotted against time.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Biochip characterization

The obtained microwell layer of the biochip was investigated using the micrometer and optical microscope. The depth and width of the well measured were $523.7 \pm 27.9 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, $n = 3$) and $1067 \pm 24 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, $n = 28$), respectively, similar to expected dimension. The square shape and a fairly straight edge of the wells were observed, see Fig. 2. This indicated that the array of microwell can be obtained using the novel protocol. The soft lithographic procedure using the resin mold, an economical substitution of the metal mold, produced a similar result. The simplicity of the protocol and reproducibility of mold at low cost heightens the potential of the biochip to be constructed and used in any biological laboratory with minimal technical prerequisites.

B. Cell capturing

All the algal cells including *Pediastrum* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, and *Scenedesmus* sp. (Fig. 3) could be successfully captured in the biochip. By increasing the speed of medium injection to the device up to 900 $\mu\text{l}/\text{min}$, no cell detachment was observed. This suggests a sufficiently strong capturing ability of the well under a continuous stream of culture medium.

In contrast, cells were not captured in the wells when the positively charged microscope slide was replaced with an uncharged one. Cells were flushed away after the final medium

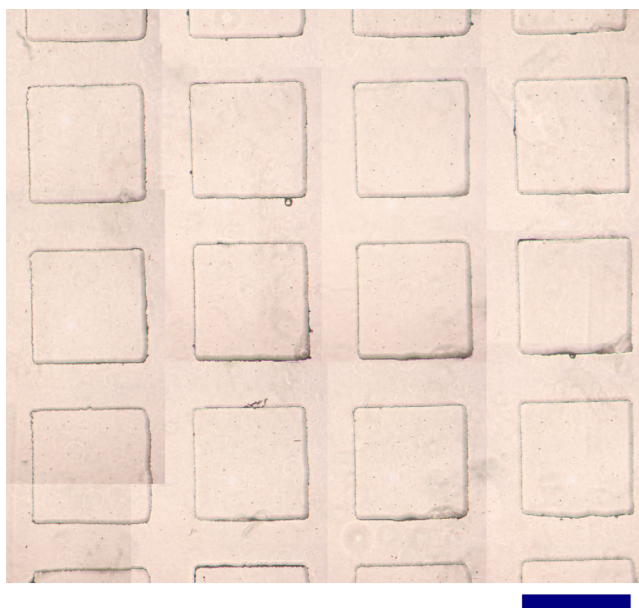


FIG. 2. Displays the stitched micrograph of the micro-patterned layer. The image suggests that the desired rectangular well structures were successfully formed by the developed fabrication process. The scale bar represents ~ 1 mm.

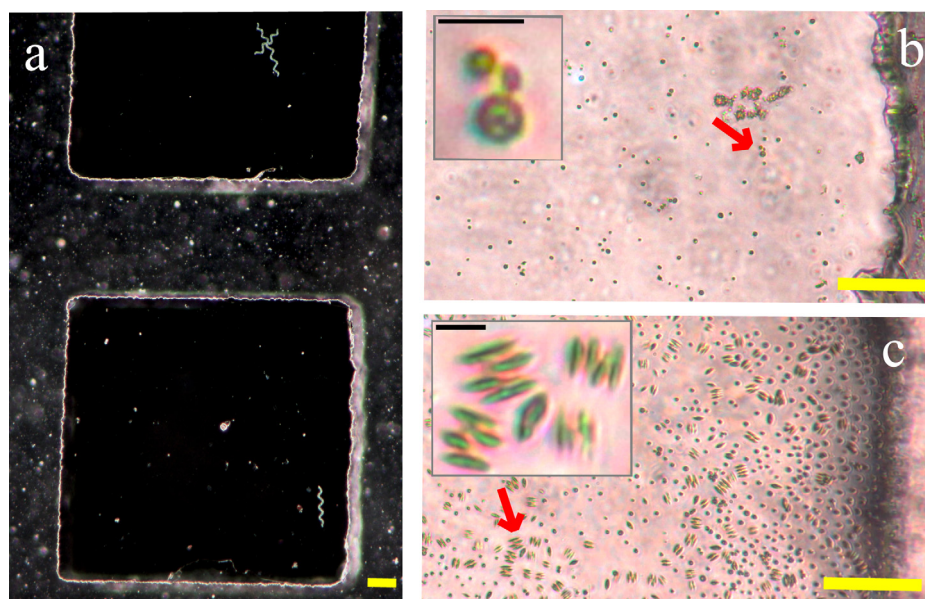


FIG. 3. Algae from different taxonomic groups could be captured by the device. Example of trapped algae displayed here are *Spirulina platensis* (a), *Chlorella vulgaris* (b), and *Scenedesmus* sp. (c). Pictures of magnified groups of trapped cells are presented in (b) and (c). The yellows and black scale bars represent 100 and 10 μm , respectively.

injection. This indicated that the capturing in the biochip occurred via electrostatic interaction between the positively charged glass slide and the negatively charged cells surface as expected.

It was found that the species of smaller cell size such as *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. tended to be trapped more densely in single wells, even when the same cell concentration was used (Figs. 3(b) and 3(c)). Further optimization of cell loading conditions may be required for each species. In addition, the size of the wells may be adjusted to fit smaller cell types. However, these experiments suggested that this electrostatic microwell can be used in capturing planktonic algal cells of a diverse shape, size, and taxonomic group.

In our further cell loading optimization with *S. platensis*, a total number of either 500 or 1000 filaments, were loaded to the device at a constant flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 3$ each). The cell number used for loading affected the number of cells trapped in the well. The percentage of wells found trapping different numbers of *S. platensis* filaments are displayed (Fig. 4). It can be obviously seen in the graphs that the majority of wells did not trap cells. The percentage of wells containing cells decreased with the number of cells the well trapped. This percentage decaying trend was found in all optimization experiment.

However, the major concern is the percentage of wells containing a single cell. The larger this percentage, the more repeat experiments with single cells that can be performed in a single set up. In general, the percentage of single cell occupancy varied within the range of $\sim 10\%$ – 30% . The highest percentage of 30.3 ± 1.5 (mean $\pm$ SD) was achieved when 500 filaments were loaded using a 2500 filament/ml cell suspension (Fig. 5).

Fig. 6 depicts distribution of cells captured in different location of the biochip when different number of cells loaded using cell suspension of various concentrations. In most cases, captured cells were found to be equally distributed within the array. The clear patterns of preferential cell accumulation towards the inlet were found when the suspension with the lowest cell concentration (1000 cell/ml) was used. In addition, a large proportion of wells under this condition, especially those near the inlet, also captured more than 1 filament.

At lower cell concentrations, greater volume of cell suspension for the targeted number of cells infused was required to flow through the device, and therefore, the more time the wells were exposed to the cell suspension. In addition, for a given time period, most of the cells were captured by the wells located at the front (near inlet) and even less remained for the subsequent wells. This

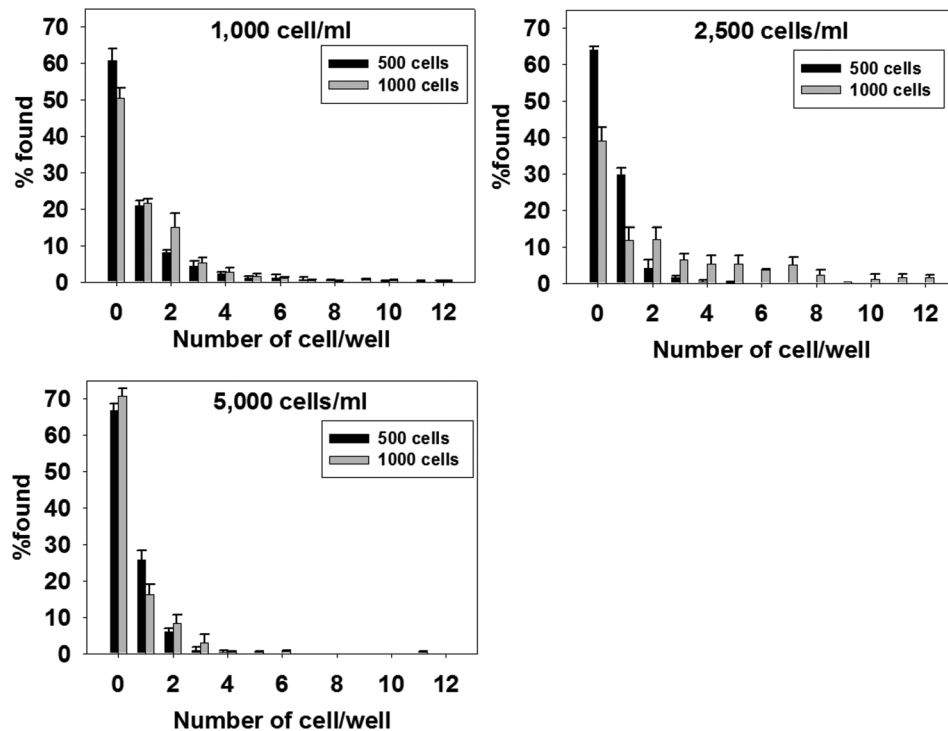


FIG. 4. Percentage of wells containing trapped cells of different numbers when different total cell numbers and cell concentrations were loaded to the device at the constant speed. The percentage was calculated based on how the cells occupied in the well in the biochip. The bars represent the average of the percentage with the error bar displaying the SD; the values based on triplicate results. The trends of the percentage in all the experiments follow the same decaying trend with the highest frequency of the empty wells. The total cell occupancy in one single well could be as high as 12 cells per well.

could explain the disproportionate accumulation of cells towards the inlet when lower cell concentration was used.

Infusion with highly concentrated cells suspension reduced severity of the bias captured cell distribution. It is also intuitive that the success rate of capturing should depend on cell

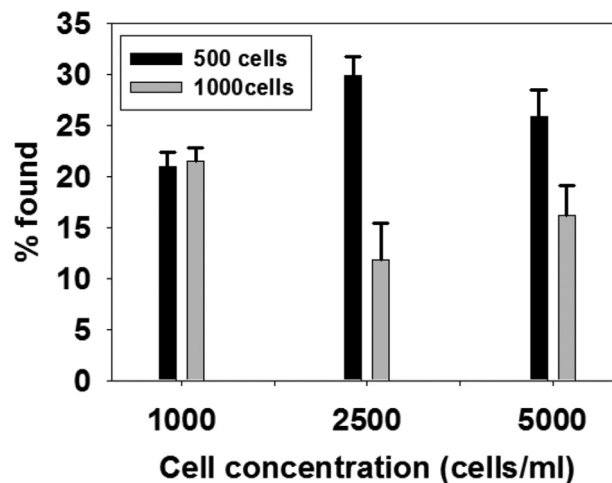


FIG. 5. Percentage of wells containing single cells trapped when total filament numbers of 500 or 1000 filament were loaded using different suspension of different cell concentration (1000–5000 cells (or filaments)/ml). The bars with the error bar represent the means with their SD based on 3 different repeat experiments (n=3). The highest percentage of single cells trapped in a single well reached 30.3 ± 1.5 when 500 cells were loaded using the cell suspension with a cell concentration of 2500 cells/ml with the constant flow rate.

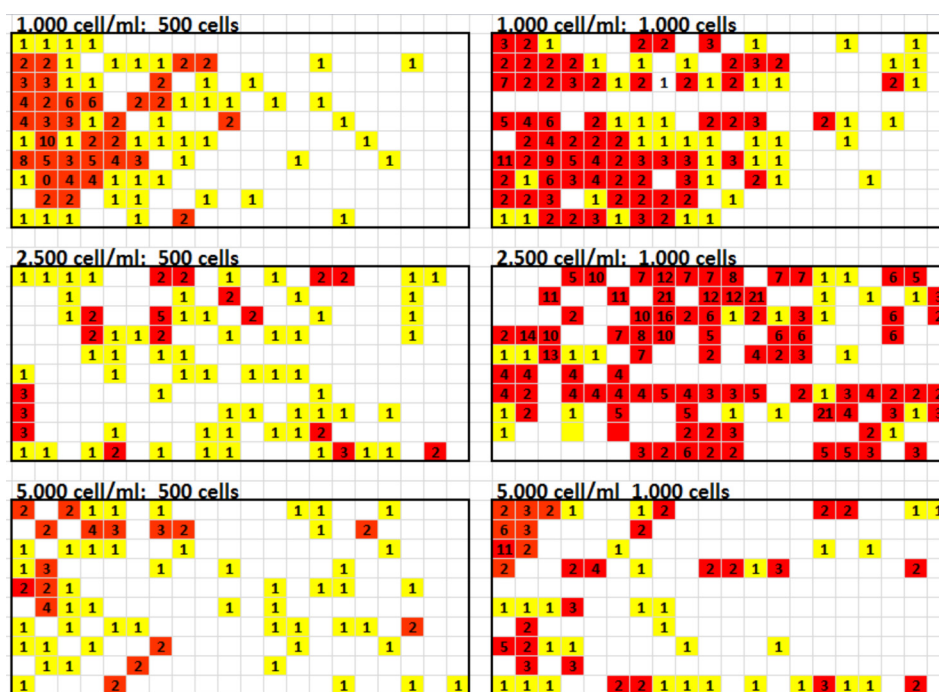


FIG. 6. Distribution map of trapped cells in the biochip when different total cell numbers (500 or 1000 cells) were added to the chip using different concentrations of cell suspension (1000–5000 cell/ml). 6 tables contain 10×20 cells represent the microwells presented in the chip. Well columns on the most left is the closest to the inlet whereas the most right is the nearest to the outlet. The cell colored in yellow and red represent occupied well with number of cell = 1 and >1 cell, respectively. Numbers of cells captured are also specified. White cells are empty wells.

concentration; the denser the cells, the more likely that at least one cell get captured. However, according to our experiment, it resulted in slight to moderate drop in cell capturing efficiency. This could be due to the fact that less suspension volume was required to be flowed through the chip to reach a certain loaded cell, in comparison to the case of lower cell concentrations. As attraction of suspended cells to the trap is a probabilistic (random) event, beside the density, the chances of cells being capture may also be a function of time. In other words, the longer the well exposed to the flow of suspension, the more likely the cell capture (at least one cell) will be successful.

Therefore, the capturing efficiency in this biochip was a balance between cell concentrations and time the wells exposed to the cell suspension. Either of these two extremes resulted in reduction of the capturing efficiency. This implies why the capturing efficiency, in terms of single cell capturing, number of wells occupied and non-bias cell accumulation, reached the highest when 2500 cells/ml cell suspension was used, among others in this experiment.

Another factor involved in capturing efficiency was the total number of cells loaded. It was also another factor determining how long the wells are exposed to the stream of suspended cells. Expectedly, it was found that doubling the number of total cell loaded resulted in larger number of cells trapped, globally. Unlike the pair of “time” and “cell concentration,” in the investigation of cell concentration, the total cell number did not change the preference of cell accumulation but the frequency of cell found. As seen in Fig. 6, patterns of cell accumulation in the experiments with same cell concentration were similar but intensified when cell number increased.

The highest efficiency of single algal cell trapping was equivalent to those in some previous mechanisms used in other works.^{10,11} This means that about single 60 *S. platensis* filaments will be provided in a single chip, which is sufficient for a broad range of experiments such as tracking growth kinetics of the filaments, cell-environmental interaction and cell screening.

C. Preference of cell size trapped

It is necessary to ensure that the trapped filaments represent the actual population present in the bulk culture (i.e., cell cultured in an Erlenmeyer flask). *S. platensis* exhibit a wide range of filaments length distributions in a given culture (a few tens of μm to a few hundreds of μm). As size is closely related to cell maturation and physiology, we wondered if filaments of particular sizes (i.e., smaller) may be more likely to be trapped, causing a selective sampling. To answer this question, we took microscopic images and measured the length of 200 trapped filaments in the biochip using imageJ. The same experiments were conducted using algae from 3 different days of culture: day1, day2, and day5. These algal cells were cultured in $\sim 150\text{ml}$ culture volume in Erlenmeyer flask. The length distribution of the filaments from each day was constructed based on the frequency found. This was then compared to that of the algal population directly sampled from the bulk culture of the same day.

It was found that all the length distributions fit a similar peak-like pattern (Figs. 7(a)–7(c)). Diversion of the peak characteristics such as the maxima, the x-axis value at which the maxima occurred, were observed upon day of algal collection. Although the distribution changed with day of culture, a similar pattern of distribution was found between the trapped cells and the cells in bulk culture on the same day. This means that cells of a given single species trapped by the biochip are a well randomized sample representing their population in their bulk culture.

D. Effect of the electrostatic charged to cell growth kinetics

The employment of a positively charged surface to capture the cells may be considered controversial. Similarly to trapping cells with an electric field using a micropatterned electrode, electrical charge may affect the cells.^{17,18} It may also be of a concern that preventing cells to

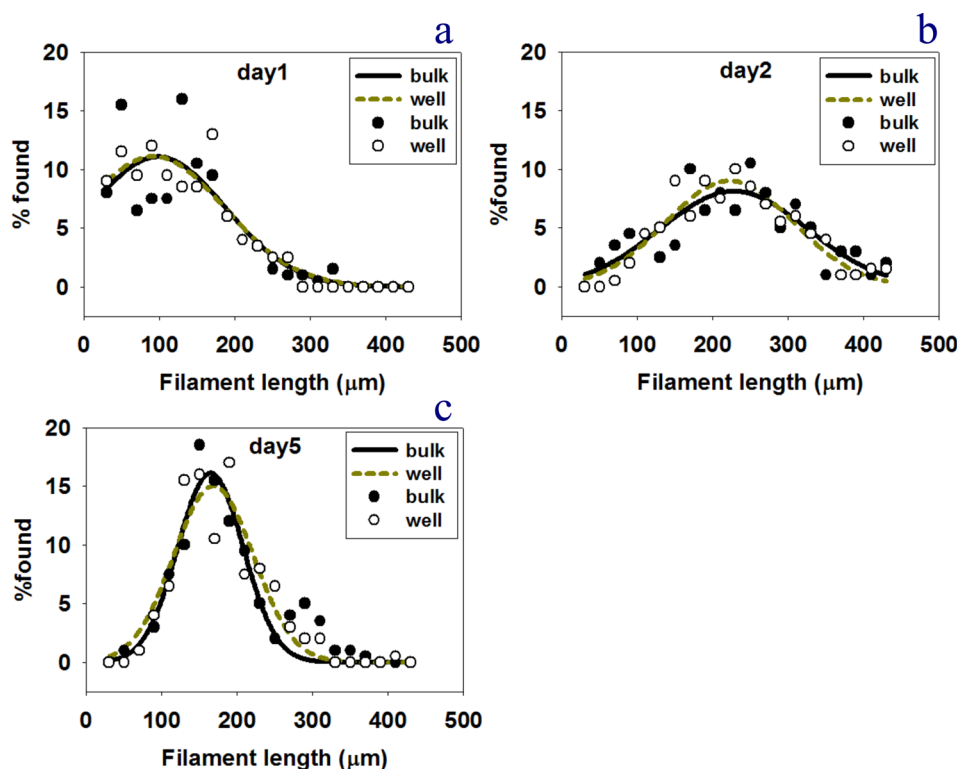


FIG. 7. Length distribution of the *S. platensis* filaments found captured in the device in comparison with that in the bulk culture. The experiment conducted using algal samples from 3 different days of cultivation, the distribution of the captured cells and cells in the bulk are similar in all the experiments. Each distribution was based on 200 filaments counted. The trend lines display the data sets fitted to Gaussian distribution ($y = a \times \exp(-0.5 \times ((x-b)/c)^2)$; when a , b , and c are regression coefficients).

be naturally free-floating eventually results in changed growth kinetics. To study the effect of the charged surface on growth kinetics, we monitored groups of *S. platensis* filaments grown under 3 different conditions (10 groups each, mean $\pm$ SD of initial filament number = 9.8 ± 1.4): (1) in wells with the positively charged based, (2) in wells with normal glass surface base, and (3) in static bulk culture (500 ml flask).

As earlier mentioned, cells could not be trapped in the biochip without assistance of the positively charged microscope slide. Therefore, the conditions (1) and (2) were conducted in a similar biochip but with a larger area of circular wells (5 mm in diameter and 1 mm in depth). The PDMS fluidic layer was removed. 20 μ l initial cell suspension was directly added to the wells with a micropipette. Another piece of microscope slide was put over the well layer with the help of a 2 mm thick spacer. This caused a 1 mm gap between the wells and the ceiling that minimized the evaporation of the medium and also avoided a direct contact which could disturb the liquid in the well. The whole biochip was kept in a moist chamber to prevent medium drying. The cells number in the wells was directly counted from the well slide. To count cells in the bulk culture (condition 3)), a 20 μ l cell suspension was pipetted from the flask and dropped on a microscope slide before counting under a microscope.

It was found that cells under the 3 conditions grew in a similar pattern (Fig. 8). They entered the logarithmic and stationary phase of growth on the same day and had a very similar specific growth rate (μ) during the logarithmic phase. Calculation of μ was done using the following equation:¹⁰

$$\mu = \frac{d(\ln N)}{dt},$$

where N is number of filaments and t is time. Results were in agreement with the previous finding indicating that growing algae in a relatively small scale volume does not alter the cells' growth kinetics.¹⁰ Based on the same previous study, it should be noted that this is only true for the case of a small population of multiple cells. Kinetics of single cell growth varies enormously which is thought to be due to individual physiological differences and the stage of cell cycle each individual is at.¹⁰ This was the reason our experiment started with an initial filament number of about 10.

Another interesting aspect of our result is that the deviation of the average filament number during different days of experiments was very low. This was probably because a larger number of repeat experiments were conducted ($n = 10$) in comparison to previous studies.¹⁰ In addition, unlike the previous study¹⁰ in which single cells of *C. vulgaris* were the model organism, the multicellular *S. platensis* were studied. Ten filaments of *S. platensis* may contain hundreds of

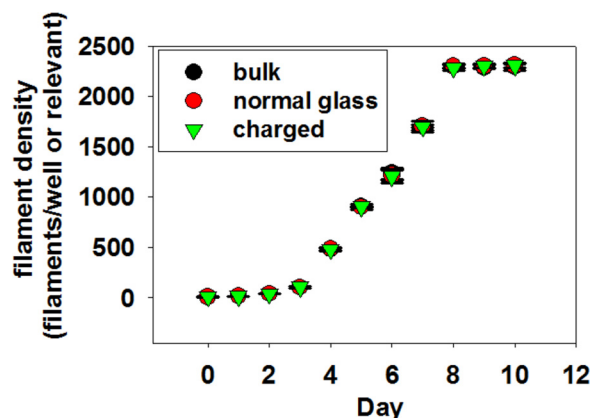


FIG. 8. The growth curves of *S. platensis* in 3 culturing conditions: in bulk culture, in a well with a normal glass bottom, in a well with the positively charged glass bottom. The scatters represent mean of filament density from 10 observed groups ($n = 10$). The error bars are SD of the means. Cells in all conditions entered different phases of growth on the same day and own a similar maximum specific growth rate of 0.967 ± 0.001 , 0.967 ± 0.001 , and 0.966 ± 0.001 , respectively.

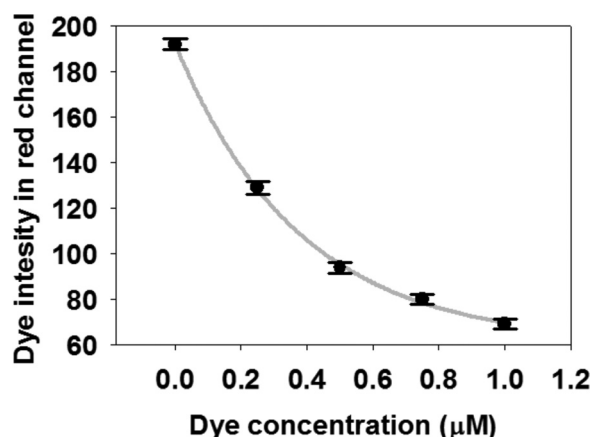


FIG. 9. Exponential relationship between the dye concentration and dye intensity in the red channel measured from the digital photographs ($n=4$), error bars = ± 1 standard deviation. The relationship fit the equation $y = 60.4 + 131.7 \times \exp(-2.6x)$ with R^2 of 0.99.

cells, which sufficiently evens out the physiological divergence among the micropopulation in any single experiment.

E. Chemical perfusion in the microenvironment

This chip is designed to allow chemical environment to be tunable by the user. It is thus essential to ensure that the added chemicals completely perfuse the culturing microenvironment.

Prior to the experiment, the light intensity-dye concentration relationship was constructed as shown in Fig. 9. The relationship fitted well an exponential equation $y = 60.4 + 131.7 \times \exp(-2.6x)$ with R^2 of 0.99. For any local dye intensity measured from the digital photograph of the well taken from the control light setting, the local concentration can be calculated.

From the washing and adding dye experiment, we found that total perfusion in the “adding” and “washing” mode occurred within a time frame of not longer than 500 s but that saturation was reached at different times, depending on the flow rate (Fig. 10). The higher flow rate meant the quicker replacement. In general, it took ~ 300 s and ~ 550 s to get the wells 80% and 100% “washed,” and ~ 100 –250 s and ~ 250 –500 s to get the wells 80% and 100% “added,” respectively. The magnitude of the time taken for the initial chemical to be fully replaced (hundreds of second) is acceptable when considering to the alga’s doubling time, which is about one day.

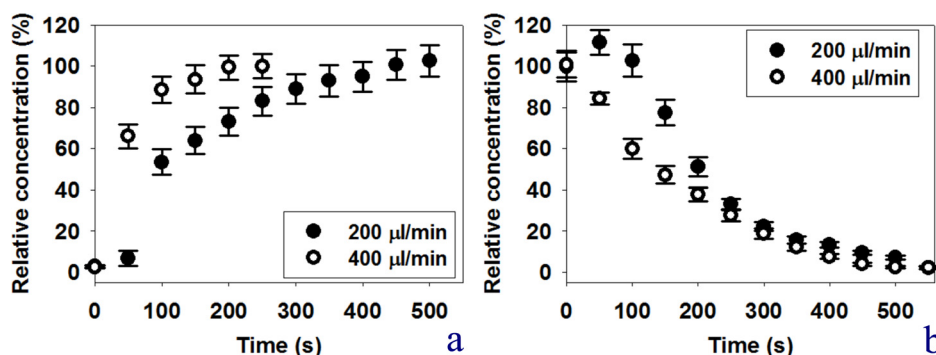


FIG. 10. Replacement of solution in the device at different speeds of flow. The data points represent mean relative local concentration of dye in four different wells ($n=4$), error bars = ± 1 standard deviation. (a) displays the replacement of the blank medium with dye solution whereas (b) represents the replacement of the dye solution with the blank.

Although the initial relative concentration started at 100%, in one of the experiment (i.e., washing at 200 $\mu\text{l}/\text{min}$) the dye concentration reached nearly 120% within the first minute of the washing. It is possible that this could happen as a result of a transition of the liquid: from being static to being moved. The dye solution was filled and remained static until the constant flow of the blank was introduced. The “push” generated by introduction of the blank caused a temporary compression at the beginning as a result of inertia. This compressed dye solution could temporarily undergo refraction index change and appeared as a spike in optical density, and thus, concentration.

An interesting flow phenomena observed, when “the second solution” was being introduced to the chip, was that the observable and almost linear boundary between the first and the second solution was formed. This boundary moved towards the outlet and took about 5 min to reach the other side of the chip. This indicated the infusion took place primarily through laminar mode of flow of the second solution. Second, as the wells are identical and arranged in symmetrical rectangular array, they should experience the flow in similar fashion. However, with the flow rate used, it took about 2–3 min for the linear boundary of dye to travel from the first column of wells to the last. This caused the “lag phase,” the phase before the leaping rise or fall of the relative concentration in the perfusion kinetics in Fig. 10. The leaping phase started coincidentally with an arrival of the linear boundary. This suggests that, although the perfusion phenomena in all wells should be of a similar fashion, the variation in lag phase can be expected in wells located at different distances from the inlet.

As noted that the perfusion experiments were done based on wells selected from the middle of the array (approximately column 9–11 from the inlet and a row 4–6 from either long edge of the chip). The perfusion phenomena may not absolutely represent the exact perfusion kinetics of wells all across the chip. It describes a generalized idea about what can be expected from the infusion using the middle area of the chip as an average. With known distance of the wells’ locations to the inlet, the delayed perfusion can be adequately estimated. However, the delay should be within 2–3 min which is negligible when considering cell doubling time. In addition, from the knowledge above, it can ensure that there is no “dead zone” in the biochip and the biochip can be thoroughly perfused within the relevant time frame.

IV. CONCLUSION

We successfully fabricated a biochip with electrostatically attracting microwells for planktonic cell trapping. It was demonstrated that this kind of trapping mechanism is capable of trapping multiple planktonic algal cells of different species. The trapping is strong enough to hold the cells in the well under a flow rate of up to 900 $\mu\text{l}/\text{min}$. By adjusting the number of total algal filaments and concentration, the highest occupancy of single *S. platensis* filament reached in the biochip was about 30%. The algal filaments found trapped by the devices are a well-randomized sample of the population they represent in the bulk culture. Further study may focus on the effects of the flow rate and geometry of the well in determining capturing efficiency of algal cells of diverse morphology. Cells grown in the electrostatic microwells exhibited the same growth pattern as those grown in non-electrostatic wells and in the bulk culture. This implies that the electrostatic mechanism can be used to immobilizing cells without altering the cell growth pattern. Chemicals in the culturing environment can be fully replaced within a physiologically acceptable time frame. Faster replacement is possible by increasing the flow speed up to at least 900 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Beside its efficiency, the apparent advantages of this design are its simplicity and versatility. The chip could be fabricated and operated with minimal technical knowledge. Unlike some of the previous designs in which trapped cells could, to some extent, freely float or move in 3D space, electrostatic field immobilized cells to the bottom. This is ideal for qualitative and quantitative imaging. Wells organized symmetrically in a rectangular array made well numbering straightforward both automatically and manually. Another separate piece of microscope slide (75 $\times$ 25 mm) was fabricated with a pattern of numbers corresponding to the location of wells. This made a manual search of particular wells under microscope easier, especially for a long

term monitoring of cells in multiple wells. Addition or removal of gradients of chemicals can be added to the chip via the inlet both automatically and manually at any time of experiment. The design fits a wide variety of experimental set up such as observation on temperature-controlled microscope stage, in an incubator, or even in a water bath. The possibility of using heat resistant resin, an economical alternative to the metal mold, increases the practicality for any biological laboratory.

Unlike other algal cell trapping chips, another feature of this device is that it allows users to simply transfer the cell from any particular well to another location. We found the top layer of the device can be simply lifted off exposing the microwell layer. The algal cells remained attached afterwards. By using micropipette, we successfully picked up the cell samples directly from wells of interest. This makes this biochip usable as a platform for the testing and screening of phytoplanktonic strains.

Conventionally, testing and screening of phytoplankton was done by cell isolation using microbiological methods, such as streak plate or cell picking using a capillary tube, before upscaling the initial cells into a mass culture. Clearly, these procedures are time- and resource-consuming and laborious. In contrast, with this device up to 60 single cells at a time can be simply isolated in the wells. After observing the characteristics of each of the isolates under the user-defined culturing conditions, desirable cells can be manually transferred for mass culturing. This makes the biochip not only a simple versatile platform for fundamental experiments but also for testing and screening algal strains for biotechnological purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful for all the algal strains given as a precious gift from Applied Algal Research Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand. The funding for this research was provided by KMUTT Research Fund, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand; Thailand Research Fund (Contract No. MRG5580248); National Research University, Office of the Higher Education Commission, Thailand; and internal funding by Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand. We also appreciate the help from Dr. Mithran Somasundrum and Dr. Tule Sirikitputtisak through discussions about the content of this article and proofreading of the manuscript.

- ¹K. H. Ogbonda, R. E. Aminigo, and G. O. Abu, *Bioresour. Technol.* **98**, 2207 (2007).
- ²L. M. Colla, C. O. Reinehr, C. Reichert, and J. A. V. Costa, *Bioresour. Technol.* **98**, 1489 (2007).
- ³M. A. C. L. de Oliveira, M. P. C. Monteiro, P. G. Robbs, and S. G. F. Leite, *Aquacult. Int.* **7**, 261 (1999).
- ⁴S. T. Silveira, J. F. M. Burkert, J. A. V. Costa, C. A. V. Burkert, and S. J. Kalil, *Bioresour. Technol.* **98**, 1629 (2007).
- ⁵C. D. O. Rangel-Yagui, E. D. G. Danesi, J. C. M. de Carvalho, and S. Sato, *Bioresour. Technol.* **92**, 133 (2004).
- ⁶H. Berberoglu, P. S. Gomez, and L. Pilon, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **110**, 1879 (2009).
- ⁷A. Hongsthong, M. Sirijuntarut, P. Prommeenate, S. Thammathorn, B. Bunnag, S. Cheevadhanarak, and M. Tanticharoen, *Mol. Biotechnol.* **36**, 123 (2007).
- ⁸Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, and A. Darzins, *Plant J.* **54**, 621 (2008).
- ⁹O. Ciferri, *Microbiol. Rev.* **47**, 551 (1983).
- ¹⁰A. Dewan, J. Kim, R. H. McLean, S. A. Vanapalli, and M. N. Karim, *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2987 (2012).
- ¹¹J. Pan, A. L. Stephenson, E. Kazamia, W. T. S. Huck, J. S. Dennis, G. Smith, and C. Abell, *Integr. Biol.* **3**, 1043 (2011).
- ¹²D. B. Weibel, W. R. Diluzio, and G. M. Whitesides, *Nature* **5**, 209 (2007).
- ¹³J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.-C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Köster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, *Chem. Biol.* **15**, 427 (2008).
- ¹⁴C. Sussillon, O. D. Velez, and V. I. Slaveykova, *Biomicrofluidics* **7**, 024109 (2013).
- ¹⁵Z. Zhu, O. Frey, D. S. Ottos, F. Rudolf, and A. Hierlemann, *Lab Chip* **12**, 906 (2012).
- ¹⁶J. Voldman, M. L. Gray, M. Toner, and M. A. Schmidt, *Anal. Chem.* **74**, 3984 (2002).
- ¹⁷A. Menachery and R. Pethig, *IEEE Proc. Nanobiotechnol.* **152**, 145 (2005).
- ¹⁸R. Pethig, M. S. Talar, and R. S. Lee, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **22**, 43 (2003).
- ¹⁹S. Cui, Y. Liu, W. Wang, Y. Sun, and Y. Fan, *Biomicrofluidics* **5**, 32003 (2011).
- ²⁰A. C. Rowat, J. C. Bird, J. J. Agresti, O. J. Rando, and D. A. Weitz, *PNAS* **106**, 18149 (2009).
- ²¹C. Wu, P. Wang, P. B. Lillehoj, L. Sabet, and C.-M. Ho, in *Proceedings of the 5th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* (2010), p. 975.
- ²²A. Amir, F. Babaeipour, D. B. McIntosh, D. R. Nelson, and S. Jun, *PNAS* **111**, 5778 (2014).
- ²³P. Wang, L. Robert, J. Pelletier, W. L. Dang, F. Taddei, A. Wright, and S. Jun, *Curr. Biol.* **20**, 1099 (2010).
- ²⁴N. Zurgil, E. Afrimzon, A. Deutsch, Y. Namer, Y. Shafran, M. Sobolev, Y. Tauber, O. Ravid-Hermesh, and M. Deutsch, *Biomaterials* **31**, 5022 (2010).
- ²⁵J. R. Rettig and A. Folch, *Anal. Chem.* **77**, 5628 (2005).

- ²⁶D. K. Wood, D. M. Weingeist, S. N. Bhatia, and B. P. Engelward, *PNAS* **107**, 10008 (2010).
- ²⁷M. C. Park, J. Y. Hur, K. W. Kwon, S. H. Park, and K. Y. Suh, *Lab Chip* **6**, 988 (2006).
- ²⁸M. C. Park, J. Y. Hur, H. S. Cho, S. H. Park, and K. Y. Suh, *Lab Chip* **11**, 79 (2011).
- ²⁹A. Walsby and M. Booker, *Br. Phycol. J.* **15**, 311 (1980).
- ³⁰C. J. Kim, Y. H. Jung, and H. M. Oh, *J. Microbiol.* **45**, 122 (2007).
- ³¹R. Phatthanakun, C. Yunphuttha, C. Pantong, C. Sriphung, N. Chomnawang, and P. Viravathana, in *Proceedings of the 10th International Conference on Electrical Engineering/Electronics Computer, Telecommunications and Information Technology* (IEEE, 2013), p. 1.
- ³²M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, *Biophotonics Int.* **11**, 36 (2004).
- ³³X. Zhang, Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Puruhito, and Y. Chen, *Bioresour. Technol.* **101**, 5297 (2010).
- ³⁴C. Zarrouk, “Contribution a l’ Etude d’ une cyanophycee: Influence de diverse facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler,” Ph.D. Thesis (University of Paris, 1966).

ระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อการติดตามพฤติกรรมเชิงปริมาณระดับเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

จิรภัทร์ เรือนอินทร์^{1*} รุ่งเรือง พัฒนากุล² พันธุ์วงศ์ คุณชนะวัฒน์¹

¹หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

²ห้องปฏิบัติการแสงสยาม ระบบลำเลียงแสง 6a สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

*Email: bldejazaa@gmail.com

ความเข้าใจในพฤติกรรมระดับเซลล์เป็นรากฐานสำคัญของการเพาะเลี้ยงและใช้ประโยชน์จากสาหร่ายขนาดเล็ก ปัจจุบันมีการพัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกเพื่อใช้ติดตามพฤติกรรมระดับเซลล์ของสาหร่ายในอาหารเหลว แต่อุปกรณ์ยังคงมีข้อจำกัดเช่น ไม่สามารถใช้ได้กับสาหร่ายหลากหลายชนิดหรือไม่อำนวยให้ควบคุมพลวัตทางเคมีของอาหารได้ ผู้เขียนได้พัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกที่ใช้งานได้อย่างง่ายดายและเอาชนะข้อจำกัดดังกล่าว โดยสร้างชิ้นงานให้มีลักษณะเป็นห้องเลี้ยงเซลล์แบบปิดขนาดเท่ากับกระจกสไลด์มาตรฐาน สามารถควบคุมการไหลเข้าออกของอาหารได้ และมีหลุมระดับจุลภาค (กว้าง x ยาว x ลึก = 1,000x1,000x500 ไมโครเมตร) จำนวน 200 หลุมที่บริเวณพื้นห้องเลี้ยงซึ่งทำหน้าที่ดักจับสาหร่ายโดยอาศัยแรงทางประจุไฟฟ้า โครงสร้างระดับจุลภาคของชิ้นงานเป็นสำเนาที่ได้จากแม่พิมพ์ที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิคลิโธกราฟีด้วยแสงเอ็กซ์เรย์ ในการทดสอบประสิทธิภาพพบว่า ชิ้นงานสามารถดักจับเส้นสายของ *Spirulina platensis* ให้ตกลงในหลุมแบบ 1 เส้นสายต่อ 1 หลุม ได้ถึงประมาณ 30% ของหลุมดักทั้งหมด เมื่อฉีดอาหารเลี้ยงที่มีสาหร่าย 2,500 เส้นสายต่อมิลลิเมตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตรด้วยอัตราเร็ว 200 ไมโครลิตรต่อนาที เข้าสู่ห้องเลี้ยง จากการทดลองด้วยสารละลายสีผสมอาหารพบว่าสภาพแวดล้อมทางเคมีของอาหารในหลุมดักสาหร่ายสามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการพัดพาของเหลวใหม่เข้าสู่ชิ้นงาน ชิ้นงานอยู่ในขั้นตอนการนำไปใช้จริงในการศึกษาทางสรีรวิทยาในระดับเส้นสายของสาหร่าย *Spirulina platensis*

คำค้น: สาหร่ายขนาดเล็ก, สไปรูลินา, พฤติกรรมระดับเซลล์, อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิก

Fabrications of microfluidic device for quantitative monitoring of algal cells

Jirapat Ruenin^{1*} Rungreang Phatthanakun² Panwong Kuntanawat¹

¹Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand 10140

²The beamline 6a: Deep X-ray lithography (DXL), The Synchrotron Light Research Institute (Public Organization) Nakorn Ratchasima, Thailand 30000

*Email: bldejazaa@gmail.com

Understanding in cellular behavior is a key to the effective cultivation and maximum exploitation of algae. There have been several microfluidic devices constructed for algal cell tracking. The devices however own some disadvantages: limited compatibility with cells'/colonies' shapes and incapability of controlling chemical dynamics of the culturing environment. Here we are presenting a new simple microfluidic device designed to overcome the problems. The device is a sealed transparent cell chamber of a microscope slide-size equipped with tubing system to allow a continuous flow of culture medium. At the floor, the device contains an array of 200 microwells (width x height x depth = 1,000 x 1,000 x 500 μm) working as electrostatic cell traps. The microstructure is patterned using a mold fabricated with deep x-ray lithographic technique (DXL). Testing with *Spirulina platensis*, we found that the device's capturing efficiency reaches 30% (30% of its microwells capture the single filament) if 200 microliter of 2,500 filament/ml algal suspension is injected to the device at the flow speed of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. In addition, as visualized by a food dye solution, the chemical microenvironment in the microwells can be adjusted with the continuously fed media. The device is being used in a filamentous physiological experiment of *Spirulina platensis* to demonstrate its feasibility.

Keywords: microalgae, *Spirulina platensis*, cellular behavior, microfluidic device

การพัฒนากระบวนการวัดปริมาณลิปิดในสาหร่ายด้วยวิธีทางอิเล็กทรอนิกส์

พันว์วงศ์ คุณธนวัฒน์^{1,2} * วิภาวรรณ เสียงดัง³ บุษยา บุนนาค³ วีระศักดิ์ สุระเรืองชัย^{1,2}

¹หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

²ห้องปฏิบัติการเซนเซอร์เทคโนโลยี สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

³กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

*Email: panwong.kun@gmail.com

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายเป็นกระบวนการสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์และการติดตามการผลิตไขมันของสาหร่ายในระบบเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตไบโอดีเซล เทคโนโลยีในการวิเคราะห์ปัจจุบันยังคงมีข้อจำกัดอยู่ เช่น ใช้มวลสาหร่ายปริมาณมากในการวิเคราะห์ ให้ค่าที่ไม่แน่นอน อาศัยทักษะความชำนาญการ หรือมีราคาในการวิเคราะห์สูง ในที่นี้ผู้เขียนนำเสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณลิปิดวิธีใหม่เพื่อลดปัญหาดังกล่าว วิธีดังกล่าวได้แรงบันดาลใจมาจากคุณสมบัติของลิปิดในการเป็นฉนวนทางไฟฟ้า จากการทดลองเบื้องต้นในการหดยดสารละลายน้ำมันพืชในคลอโรฟอร์มความเข้มข้นตั้งแต่ 1-500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนขนาด 2x20 มิลลิเมตร พบว่าเมื่อตัวทำละลายระเหยแห้ง ค่าความต้านทานตามความยาวของขั้วไฟฟ้าเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของน้ำมันอย่างมีความสัมพันธ์แบบไม่เชิงเส้น โดยค่าความต้านทานไฟฟ้าจะแปรตรงกับค่าความเข้มข้นในช่วงประมาณ 1-50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และแปรผกผันในช่วงความเข้มข้น 50-500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร แบบแผนความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถพบได้เช่นกันในการทดลองกับขั้วไฟฟ้าขนาดอื่น วิธีการดังกล่าวอาจทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันจากมวลสาหร่ายในช่วงไมโครกรัมได้ ซึ่งจะช่วยลดทรัพยากร เวลา และแรงงาน

คำค้น: สาหร่ายน้ำมัน, ไบโอดีเซล, การวัดปริมาณน้ำมัน, ขั้วไฟฟ้าคาร์บอน

Development of a new electronic-based technique for quantification of lipid in algae

Panwong Kuntanawat^{1,2*} Wipawan Siangdung³ Boosya Bunnag³ Werasak Surareungchai^{1,2}

¹Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi

²Sensor Technology Laboratory, PDTI, King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkhuntien)

³Algal Biotechnology Laboratory, PDTI, King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkhuntien)

*Email: panwong.kun@gmail.com

Quantification of lipid is a crucial part in screening of lipid producing algae and monitoring of lipid production in cultures. Quantifying amount of lipid with the existing technology could be problematic. The protocols may require large sample size, be not reliable or be unaffordable. Here we are presenting a new electronic-based method for the measurement that would overcome the problems. The method was inspired by the electrical insulating nature of lipid. In our preliminary study on dropping 1 μ l of 1-500 μ l/ml vegetable oil solution in chloroform on commercial carbon paste electrodes (2x20 mm), we discovered a non-linear relationship between concentration of oil and change in electrical resistance of the electrode after drying (measured along the length). The resistance increased with increasing concentration until ~500 μ l/ml when the graph gradually dropped. The pattern was also found in the experiments with the electrodes of other sizes. The method might enable quantification of algal lipid using sub-mg size samples which would help reducing cost, labors and time.

Keywords: lipid producing algae, biodiesel, lipid quantification, carbon paste electrode