บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สาหร่าย

- ตู้เพาะเลี้ยงสาหร่าย ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์, อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2°C (รูปที่ 3)
- เครื่องปั๊มอากาศขนาดเล็ก
- ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุปกรณ์การเติมก๊าซ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Orion, model SA520)
- Spectrophotometer (รุ่น Spectronic 21 ของ Milton Roy Company)
- ชุดเครื่องกรองชนิดมีปั๊มช่วยดูดอากาศ
- ตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน (Binder, F115)
- กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (high power microscope)

2.1.2 อุปกรณ์ในการทำแห้งและวิเคราะห์คุณภาพสาหร่าย

- ตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน (Binder, F115)
- เครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray drier, SD-04) (รูปที่ 6)
- Freeze dryer (model FD-1) (รูปที่ 7)
- เครื่องบดแบบ pin mill (Shangtung Chimo Agricultural Machinery Work, FFG-23)
- ชุดย่อย-กลั่นโปรตีน (Kjeldaltherm และ Vapodest 1, Gerhardt, KT 85)

- ชุดสกัดไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic, S-116)
- เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, A200S)
- เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius, B3100S)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

2.2.1 สาหร่ายเกลียวทองที่นำมาใช้ในการศึกษามี 3 สายพันธุ์ คือ

สายพันธุ์แรก เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

สายพันธุ์ที่สอง เป็นสายพันธุ์ที่แยกจากน้ำในบ่อเต่าในวัดเบญจมบพิตร

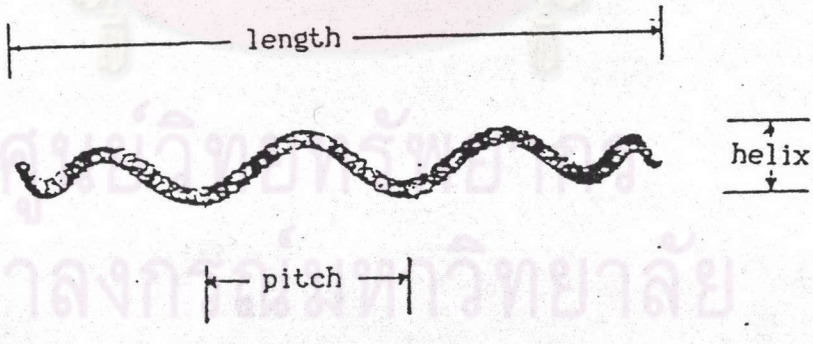
สายพันธุ์ที่สาม เป็นสายพันธุ์ที่แยกจากน้ำในบึงมักกะสัน

ทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญต่อวัน, ผลผลิตน้ำหนักแห้ง, ปริมาณโปรตีน และปริมาณไขมันของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสูตร Zarrouk (Zarrouk, 1966) การเลี้ยงสาหร่ายทำในขวดลูกชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 9 $\pm$ 0.10 โดยมีค่า OD_{560} ของเชื้อเริ่มต้นที่ 0.200 $\pm$ 0.010 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง สลับที่ทุก 2 วัน (พรทิพา, 2533) เพื่อให้ทุกขวดได้รับแสงสม่ำเสมอ และมีการให้อากาศตลอดเวลา (รูปที่ 6) ทำการทดลองเป็นชุด (batch culture) โดยแต่ละชุดของการทดลองมี 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เก็บข้อมูลทุกวันที่เวลาเดียวกัน

รูปที่ 6 ตู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง (Spirulina sp.)

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทำโดยวิธีการไร้เชื้อ โดยใช้หลอดและเข็มฉีดยาซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที โดยหลอดฉีดยามีขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างขึ้นมาประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจวัดค่าต่างๆดังต่อไปนี้

- การหาความหนาแน่นของสาหร่ายที่เปลี่ยนแปลงไป ในรูป Optical Density ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Spectronic 21 ของ Milton Roy Company (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข)
- วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหาร ที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายโดยใช้เครื่อง pH meter ของ Orion, model SA520)
- ชั่งหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเป็นกรัมต่อลิตร (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข)
- ขนาดและรูปร่างสาหร่าย สุ่มวัดขนาดของสาหร่าย 10 trichome โดยวัดความยาว (length) ระยะห่างระหว่างเกลียว (pitch) และเส้นผ่าศูนย์กลางเกลียว (helix) (รูปที่ 5) โดยใช้ occular และ stage micrometer



รูปที่ 5 รูปร่างสาหร่ายเกลียวทองแสดงลักษณะที่จะทำการวัด

ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยใช้วิธีการกรองผ่านผ้ากรองไนล่อน ซึ่งมีขนาดรู 45 ไมครอน แล้วล้างด้วยน้ำจืด 2 ครั้ง ในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตร / ปริมาตร) นำสาหร่ายเกลียวทองทั้งสามสายพันธุ์มาทำแห้งโดยวิธีตากแห้งภายใต้แสงอาทิตย์ (Sun drying) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และปริมาณไขมันในสาหร่ายเกลียวทองแห้งด้วยวิธี AOAC, 1984

2.2.2 ทำการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายเกลียวทองจากข้อ 2.2.1 เพื่อทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.2.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองได้แก่

1. สูตร Zarrouk (Zarrouk, 1966) ความเค็ม 10 ส่วนต่อพันส่วน เป็นสูตรควบคุม
2. สูตร CFTRI (Becker and Venkataraman, 1982) ความเค็ม 10 ส่วนต่อพันส่วน
3. สูตรน้ำทะเลเทียม (Fox, 1973) ความเค็ม 15 ส่วนต่อพันส่วน
4. สูตรน้ำทะเลธรรมชาติ (Faucher, 1975) ความเค็ม 30 ส่วนต่อพันส่วน

โดยที่ส่วนประกอบของสูตรอาหารแต่ละสูตรแสดงในตารางที่ 3

<u>การเตรียมน้ำทะเลธรรมชาติ</u>

ใช้น้ำทะเลธรรมชาติจากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล และศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดศรีราชา ซึ่งผ่านการกรองด้วย sand filter และฆ่าเชื้อด้วย UV light นำน้ำทะเลมาเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 3 เดือน เมื่อจะนำน้ำทะเลมาใช้ในการทดลองจึงทำการกรองน้ำผ่านแผ่นกรอง GF/C น้ำทะเลที่ใช้จะเป็นน้ำทะเลที่เก็บมาในคราวเดียวกันตลอดการทดลอง

2.2.3 การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของสาหร่ายเกลียวทอง ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 แต่เปลี่ยนค่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นและเวลาที่เหมาะสมในการติดตามการเจริญของสาหร่ายในแต่ละสูตรอาหาร ซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 2.2.2 และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 1% เข้าสู่ระบบ (Joel, 1981) ที่อัตราการให้ก๊าซ 9 ต่อชั่วโมง (วัดโดย rotar meter) เพื่อให้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้สารเคมีที่แตกตัวให้ไบคาร์บอเนตอิออน ที่ต้องเติมในแต่ละสูตรอาหาร และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากผลการทดลองในข้อ 2.2.2

นำสาหร่ายเกลียวทองที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละสูตรอาหาร มาทำแห้งโดยวิธี Sun drying เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมัน ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.4 ศึกษาความเป็นไปได้ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองในบ่อสภาพกลางแจ้ง โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

เลือกวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่เหมาะสม จากผลการทดลองข้อ 2.2.3 ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง ในบ่อซีเมนต์กลางแจ้งขนาด 2.5 x 4 x 0.5 ลูกบาศ์กเมตร มีใบพัดขนาด 1.07 x 2.05 ตารางเมตร จำนวน 4 ใบ สำหรับกวนน้ำให้มีการเคลื่อนที่ประมาณ 18 เซนติเมตรต่อวินาที (รูปที่ 5) โดยระดับน้ำในบ่อสูงประมาณ 20 เซนติเมตร มีการเติมน้ำให้ได้ระดับเดิมเพื่อทดแทนส่วนของน้ำที่ระเหยไปในแต่ละวัน ค่า $OD_{560nm.}$ ของเชื้อเริ่มต้นที่ 0.4 $\pm$ 0.02 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มแสงเฉลี่ยตลอดการทดลอง

<u>การเตรียมเชื้อสาหร่ายเกลียวทอง</u>

ทำการเตรียมเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นในบ่อกลางแจ้ง โดยใช้ปริมาตรสารละลายอาหารสูตรน้ำทะเลเทียมเริ่มต้น 500 ลิตร เมื่อสาหร่ายเจริญจนมีความหนาแน่นสูงแล้วจึงเพิ่มปริมาตรสารละลายอาหารจนถึงระดับ 2000 ลิตร และเมื่อสาหร่ายเจริญจนมีค่า $O.D._{560nm}$ ประมาณ 1.4 จึงแบ่งย้ายลงไปในบ่อเลี้ยงกลางแจ้งทั้งสามบ่อแล้วจึงเติมปริมาตรสารละลายอาหารในแต่ละบ่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2000 ลิตร

รูปที่ 5 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองสภาพกลางแจ้ง

2.2.4.1 เปรียบเทียบวิธีการทำแห้งสาหร่าย

นำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้จากข้อ 2.2.4 มาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้ง 4 แบบคือ การทำแห้งด้วยการตากแห้งภายใต้แสงอาทิตย์ การอบแห้งด้วยตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน การอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย และการทำแห้งโดยวิธี Freeze drying โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. <u>การทำแห้งด้วยการตากแห้งภายใต้แสงอาทิตย์</u> (Sun drying)

เกลี่ยสาหร่ายลงบนแผ่นอลูมิเนียม ให้สาหร่ายมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แล้วนำไปตากตากแห้งภายใต้แสงอาทิตย์เป็นเวลา 3 วัน แผ่นสาหร่ายที่ได้นำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดแบบ Pin Mill โดยใช้ตะแกรงขนาด 0.08 มิลลิเมตร

2. <u>การอบแห้งด้วยตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน</u> (Oven drying)

เกลี่ยสาหร่ายลงบนแผ่นอลูมิเนียม ให้สาหร่ายมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร นำไปอบแห้งในตู้อบแบบมีลมเป่าผ่าน ที่มีความเร็วลม 0.25-0.70 เมตรต่อนาที และเปิดช่องระบายอากาศทั้งหมด ปรับอุณหภูมิในการอบจนคงที่เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส แผ่นสาหร่ายที่ได้นำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องเครื่องบดแบบ Pin Mill โดยใช้ตะแกรงขนาด 0.08 มิลลิเมตร

3. <u>การอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย</u> (Spray drying) (รูปที่ 6)

นำสาหร่ายป่นเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย ด้วยอัตราเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งควบคุมด้วย peristaltic pump โดยตั้งอุณหภูมิลมร้อนเข้าเท่ากับ 210 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิลมร้อนออกเท่ากับ 114 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส

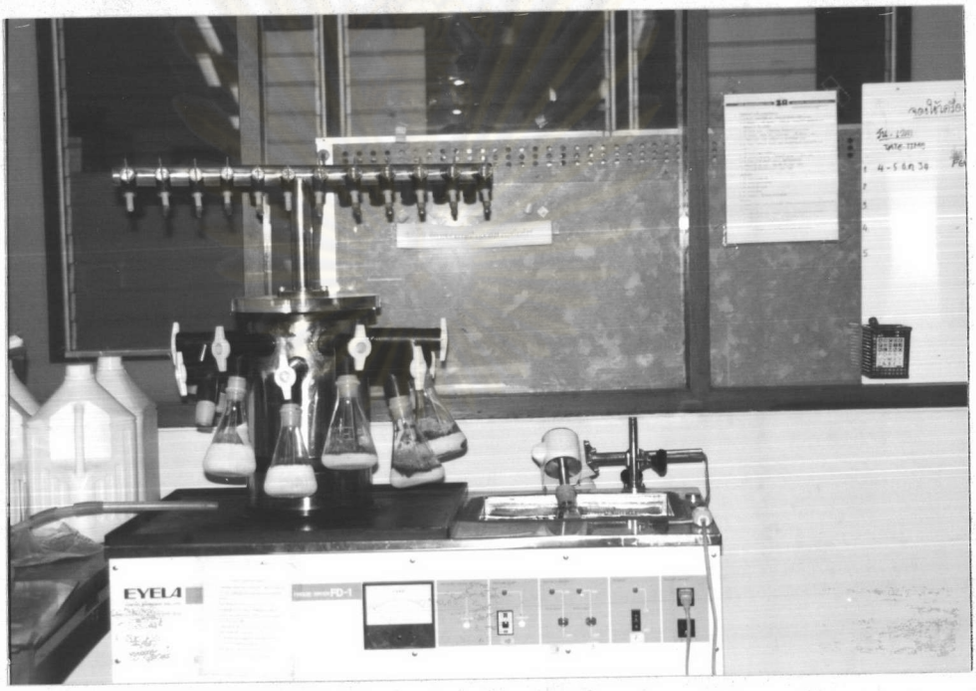
4. การทำแห้งโดยวิธี (Freeze drying) (รูปที่ 7)

นำสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำการแช่เยือกแข็งสาหร่ายที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการระเหิด โดยนำอาหารเข้าอบใน Freeze dryer ใช้เวลาในการอบแห้งประมาณ 12 ชั่วโมง สาหร่ายที่ได้นำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องเครื่องบดแบบ Pin Mill โดยใช้ตะแกรงขนาด 0.08 มิลลิเมตร

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันของสาหร่ายที่ทำแห้งในแต่ละวิธี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 เครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย



รูปที่ 7 เครื่อง Freeze dryer

2.2.5 ผลของสาหร่ายเกลียวทองที่มีต่ออัตราการรอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

นำสาหร่ายเกลียวทองที่ได้จากวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 2.2.4 เพื่อนำมาใช้ทดลองเป็นอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ตั้งแต่ระยะ zoea I จนถึงระยะ mysis II โดยนำผงสาหร่ายเกลียวทองมาละลายน้ำและกรองด้วยผ้ากรองขนาด 20 ไมครอน จากนั้นจึงนำมาทดลองใช้เป็นอาหารของลูกกุ้งดังนี้

1. ใช้สาหร่ายสด Chaetoceros sp. เพียงอย่างเดียวเป็นอาหารของลูกกุ้ง โดยสาหร่ายมีความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 100% (เทียบโดยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.49 มิลลิกรัม)
2. ใช้สาหร่ายสด Chaetoceros sp. 75% และผงสาหร่ายเกลียวทอง 25%
3. ใช้สาหร่ายสด Chaetoceros sp. 50% และผงสาหร่ายเกลียวทอง 50%
4. ใช้สาหร่ายสด Chaetoceros sp. 25% และผงสาหร่ายเกลียวทอง 75%
5. ใช้ผงสาหร่ายเกลียวทองเพียงอย่างเดียว 100%

ศึกษาอัตราการรอด (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์) ของลูกกุ้ง โดยเมื่อลูกกุ้งเจริญเข้าสู่ระยะ zoea I สุ่มตัวอย่างลูกกุ้งมาวัดความยาวเหยียด (total length) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ย้ายลูกกุ้งลงในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร จำนวน 100 ตัวต่อบีกเกอร์ เติมน้ำทะเลให้ทุกบีกเกอร์มีปริมาตรเท่ากันเป็น 1500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ในช่วง 30-32 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater probe ทำการเปลี่ยนน้ำ 25 % ทุก 2 วัน ตรวจหาปริมาณไนไตรท์ แอมโมเนีย อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดด่างของน้ำทุกวัน เมื่อลูกกุ้งเจริญถึงระยะ mysis 2 นับจำนวนลูกกุ้งที่เหลืออยู่ และสุ่มตัวอย่างลูกกุ้งมาวัดความยาวเหยียด บีกเกอร์ละ 10 ตัว

$$\text{เปอร์เซ็นต์รอดตาย} = \frac{\text{จำนวนลูกกุ้งที่เหลือรอดตาย} \times 100}{\text{จำนวนลูกกุ้งที่เริ่มทดลอง}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณอัตราการเจริญ (Growth rate) ของสาหร่าย

จากข้อมูลการเจริญนำมาเขียนกราฟการเจริญ (growth curve) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural logarithms กับเวลาเป็นวัน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญจากความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยเลือกช่วงของการเจริญที่อยู่ในระยะ exponential phase เนื่องจากเป็นระยะที่สภาพแวดล้อมอื่นๆในการเลี้ยงไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเจริญเติบโตในระยะนี้จึงเป็นผลมาจากปัจจัยที่กำหนดให้เท่านั้น (Fogg, 1987)

สมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$N = N_o e^{kt}$$

ดังนั้น

$$k = \frac{\ln N - \ln N_o}{t}$$

k = อัตราการเจริญของสาหร่าย

N, N_o = ค่าการเจริญที่อ่านได้จาก spectrophotometer ในวันแรกและวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงช่วง exponential phase

t = เวลา

การคำนวณหาผลผลิตของสาหร่าย (g/l)

$$yield = D.W._f - D.W._i$$

$D.W._f$ = น้ำหนักแห้งของสาหร่ายในวันสุดท้ายของการเลี้ยง (g/l)

$D.W._i$ = น้ำหนกแห้งของสาหร่ายในวันแรกของการเลี้ยง (g/l)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญต่อวันของสาหร่าย โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ Analysis of covariance ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลอื่นๆ ได้แก่ ค่าของผลผลิตน้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันของสาหร่าย อัตราการรอดและความยาวเหยียดที่เพิ่มขึ้นของลูกกุ้ง ใช้สถิติการวิเคราะห์ Analysis of variance โดยโปรแกรม SPSS/PC^{+} studentware

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย