หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ที่ใช้ในการทดลองมีอยู่สองสายพันธุ์ สายพันธุ์แรกเป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ส่วนสายพันธุ์ที่สอง เป็นสาหร่ายที่แยกจากบ่อน้ำเลี้ยงเต่าในวัดเบญจมบพิตรดุสิตวนาราม

1.1 การนำสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี unialgal culture

แยกสายพันธุ์สาหร่ายสไปรูไลน่าให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Hoshaw และ Rosowski (1973) ทำได้โดยแบ่งสารอาหารของ Zarrouk (ดูในภาคผนวก) ลงใน culture tissue dish หลุมละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วใช้ capillary pipette เพื่อแยกแต่ละ filament ของสาหร่ายสไปรูไลน่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เลี้ยง culture tissue dish ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์ อุณหภูมิประมาณ 25 °C เป็นเวลา 1 ถึง 2 สัปดาห์ แยกสาหร่ายที่เจริญในแต่ละหลุมมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อเตรียมใช้เป็นสาหร่ายเริ่มต้น

1.2 การเตรียมสาหร่ายเริ่มต้น

การเตรียมเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) เพื่อใช้เป็นสาหร่ายเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดลอง โดยเตรียมสารละลายอาหารตามสูตรของ Zarrouk ทำการเติมสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ที่แยกให้บริสุทธิ์จากข้อ 1.1 ลงในสารละลายอาหารสูตรของ Zarrouk ปริมาณ 1 ลิตรซึ่งบรรจุในขวดลูกชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นประมาณ 9 ปรับค่า $O.D._{560}$ อาหารเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้นให้มีค่า 0.1 อุณหภูมิ 25 °C พ่นให้อากาศโดยใช้ปั๊มอากาศขนาดเล็กตลอดการทดลอง ให้ความเข้มของแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ประมาณ 1000 ลักซ์ และให้แสงสว่างตลอดเวลา สาหร่ายที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมีอายุในช่วง 10-12 วัน

2. ศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

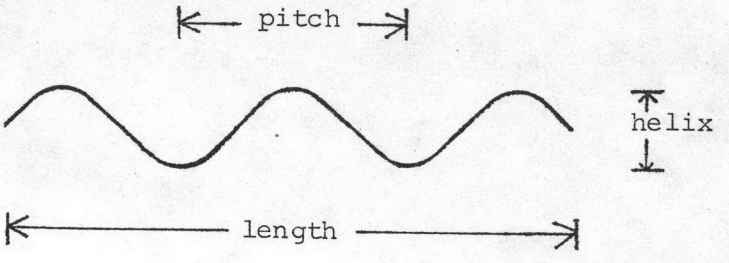
2.1 ความเข้มแสง

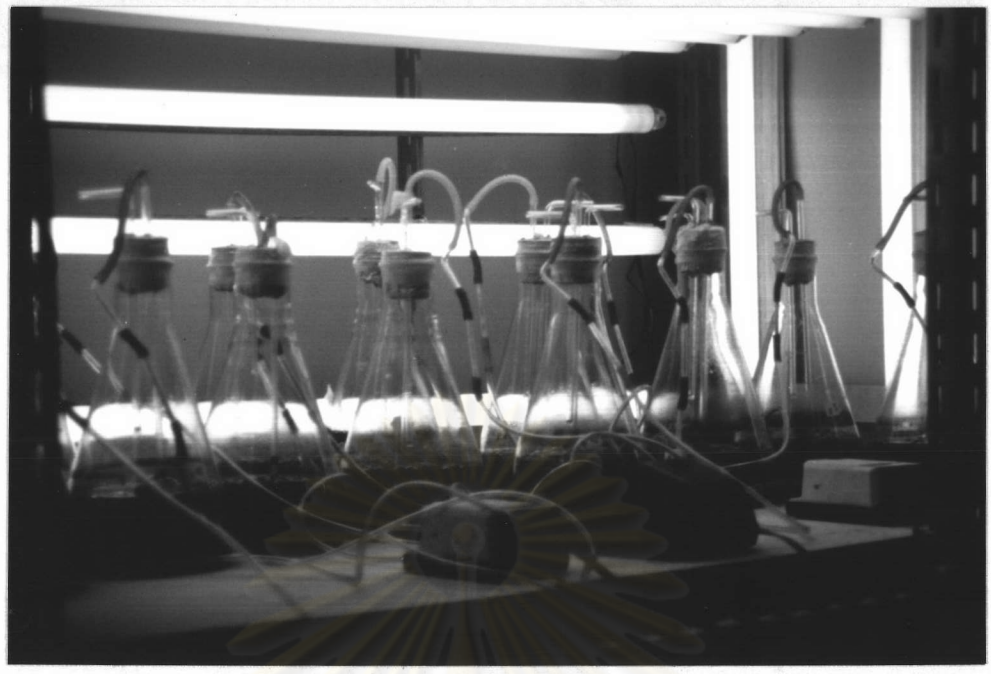
เลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ทั้งสองสายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Zarrouk ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ขนาด 20 และ 40 วัตต์ โดยควบคุมให้มีปริมาณความเข้มของแสงต่าง ๆ กันคือ 2500, 5000, 7500 และ 10000 ลักซ์ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ในการทดลองมีวิธีการเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่า เพื่อเตรียมเป็นสาหร่ายเริ่มต้น แต่มีข้อแตกต่างบางประการกล่าวคือค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9±0.10 ค่า $O.D._{560}$ ของสารละลายอาหารเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้นที่ 0.200±0.010 อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง 25 °C ให้อากาศโดยใช้ปั๊มอากาศขนาดเล็กตลอดการทดลอง ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง สลับที่ขวดทดลองทุก 2 วันเพื่อให้ได้รับปริมาณแสงเท่า ๆ กัน ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำทั้งสองสายพันธุ์ (รูปที่ 2)

การเก็บข้อมูลทำทุก 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่เวลาเดียวกัน โดยทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการไร้เชื้อ โดยใช้หลอดและเข็มฉีดยาซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐานคือ อุณหภูมิ 121 °c ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที โดยหลอดฉีดยามีขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างขึ้นมาประมาณ 12-15 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำมาตรวจวัดดังต่อไปนี้

- วัดการเจริญของสาหร่าย โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสง Optical Density ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ($O.D._{560}$) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Spectronic 21 ของ Bausch & Lomb
- วัดขนาดสาหร่ายโดยวัดความยาวของ trichome (length) ระยะห่างระหว่างเกลียว (pitch) และความกว้างของเกลียว (helix) ดังรูป โดยใช้ occular และ stage micrometer





รูปที่ 2 ตู้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) โดยเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่ขนาด 2 ลิตร ผ่านให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศและให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารที่สไปรูไลน่าเจริญอยู่ โดยใช้ pH meter ของ Suntex model: SP-5A

- การตวรจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยนำตัวอย่างสารละลายอาหารที่มีสาหร่ายสไปรูไลน่ามา 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเอาเซลล์ที่ 2000 xg นาน 10 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 N (NaOH) 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในน้ำเดือด 30 นาที แล้วนำไปปั่นแยกเอาตะกอนออกที่ 2000 xg นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายที่ต้องการวิเคาะห์มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลายผสม Lowry D 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จากนั้นนำเอาไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น

จากการทดลองในข้อที่ 2.1 ความเข้มแสงที่เลือกใช้ในการทดลองขั้นต่อไป สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่า (Spirulina sp.) ทั้งสองสายพันธุ์คือ ความเข้มแสง 10000 ลักซ์ การทดลองในขั้นนี้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารละลายอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตามสูตรของ Zarrouk เป็น 7, 8, 9, 10 และ 11 โดยสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายเป็นเช่นเดียวกันกับการทดลองในข้อ 2.1 ยกเว้นความเข้มแสงซึ่งปรับให้เป็น 10000 ลักซ์ ดังได้กล่าวไปแล้ว

นอกจากนี้เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของอาหารสูตรของ Zarrouk จึงได้จัดชุดการทดลองให้เหมือนการทดลองข้างต้นคือ ปรับสารละลายอาหารให้มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7, 8, 9, 10 และ 11 แต่ไม่มีการเติมสาหร่ายลงไป ทำการบันทึกข้อมูลค่าความเป็นกรด-ด่างทุก 2 วัน

2.3 ความเค็ม

ผลการทดลองในข้อ 2.1.2 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารละลายอาหารที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารละลายอาหารเป็น 9

ในการทดลองขั้นนี้เปลี่ยนความเค็มของสารละลายอาหาร โดยใช้โซเดียมคลอไรด์เป็น 0.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.5, 10 และ 15 เท่า ของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายอาหารตามสูตรของ Zarrouk ตามลำดับ พร้อมกันนี้ยังมีชุดควบคุมที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และใช้ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ตามสูตรอาหารของ Zarrouk คือ 1.0 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองพบว่าความเค็มของสารละลายอาหารต่าง ๆ ในช่วง 0-15 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย จึงได้ทำการทดลองเพิ่มความเค็มของสารละลายอาหาร โดยให้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 20, 25, 30, 35 กรัมต่อลิตร พร้อมกับมีชุดควบคุมซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตรในอาหารตามสูตรของ Zarrouk

3. ศึกษาปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

3.1 ศึกษาปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การทดลองในข้อ 2 พบว่าปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูไลน่าคือ ปริมาณความเข้มของแสง 10000 ลักซ์ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารละลายอาหารเป็น 9 ในสาหร่ายสไปรูไลน่าทั้งสองสายพันธุ์ สำหรับปัจจัยด้านความเค็มในสารละลายอาหาร พบว่าความเค็มในสารละลายอาหารที่เลือก คือ 15 กรัมต่อลิตร สำหรับสาหร่ายจากสวนจิตรลดา และ 10 กรัมต่อลิตร สำหรับสาหร่ายจากบ่อเลี้ยงเต่า

ในการทดลองขั้นต่อไปคือ การปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โดยให้มีปริมาณของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็น 1.05, 2.10, 4.20, 8.40, 33.60 และ 50.4 กรัมต่อลิตรซึ่งทำให้ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็น 0.625, 0.125, 0.25, 0.5, 2 และ 3 เท่าของความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ในสารละลายอาหารตามสูตรของ Zarrouk ตามลำดับ พร้อมกันนี้มีชุดควบคุมซึ่งให้ปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตตามสูตรอาหารของ Zarrouk คือ 16.80 กรัมต่อลิตร

3.2 ศึกษาแหล่งและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ

3.2.1 แหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองในข้อ 3.1 ปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสม และจะเลือกใช้ในการทดลองต่อไปคือ 33.60 กรัมต่อลิตร การทดลองในขั้นนี้เลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจาก 3 แหล่งคือ โซเดียมไนเตรต (soduim nitrate) ซึ่งใช้ในอาหารสูตรของ Zarrouk ไดแอมโมเนียมทาร์เทรต (di- ammomium tartrate) และยูเรีย (urea) โดยใส่สารดังกล่าวในปริมาณ 2.50, 2.71 และ 0.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อให้มีประมาณของไนโตรเจนปริมาณเท่ากับที่มีในสูตรอาหารของ Zarrouk นอกจากนี้ยังมีการทดลองอีกหนึ่งชุด ซึ่งไม่เติมแหล่งไนโตรเจนลงในสารละลายอาหาร

3.2.2 ปริมาณไนโตรเจน

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือโซเดียมไนเตรต ซึ่งจะเลือกในการทดลองต่อไป การทดลองในขั้นนี้เปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนในสารละลายอาหารโดยให้มีโซเดียมไนเตรตเป็น 0, 0.625, 1.25, 12.5 และ 25 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีปริมาณโซเดียมไนเตรตเป็น 0 , 0.25 , 0.5, 5 และ 10 เท่าของปริมาณโซเดียมไนเตรตที่มีอยู่ในอาหารสูตรของ Zarrouk พร้อมกันนี้ยังมีการทดลองชุดควบคุมซึ่งให้มีปริมาณโซเดียมไนเตรตตามสูตรอาหารของ Zarrouk

อนึ่งในการทดลองที่ 3.2.1 ปริมาณเริ่มต้นในเชื้อเริ่มต้นทำให้มีการคลาดเคลื่อนของการทดลอง จึงได้ทำการกำจัดไนโตรเจนในสาหร่ายซึ่งเป็นเชื้อเริ่มต้นดังนี้ นำสาหร่ายซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตรของ Zarrouk ที่พร้อมจะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมากรอง นำสาหร่ายที่กรองได้ใส่ในสารละลายอาหารตามสูตรของ Zarrouk ที่เตรียมขึ้นใหม่โดยไม่เติมไนโตรเจน จากนั้นจึงนำไปใช้เป็นสาหร่ายเริ่มต้น วิธีการทั้งหมดทำโดยวิธีการไร้เชื้อ

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 2 และ 3 โดยดูจากอัตราการเจริญซึ่งหาได้จากความชัน (slope) ของการเจริญในช่วง exponential ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 6 หรือ 8 ของการทดลอง