

บทที่ 3 วิธีวิจัย

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp. ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น

นำหัวเชื้อแพลงก์ตอนพืช (*Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp.) ระยะเวลาเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วที่เพาะขยายได้ในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตรคอนเวย์ (Conway medium) มาเพาะเลี้ยงต่อแบบปริมาณมากนอกห้องปฏิบัติการตามไดอะแกรมการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช (ภาพที่ 1) โดยเพาะเลี้ยงภายในถังพลาสติกทรงกระบอกขนาดความจุ 200 ลิตร ในอัตราส่วนหัวเชื้อต่อน้ำเลี้ยงเท่ากับ 1:25 ใช้ความเค็ม 28 ± 1 ppt โดยแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอม (*Chaetoceros calcitrans*) ใช้อาหารสูตรของซาโตะและซาริกาวา (Sato and Serikawa medium) ส่วนแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียว (*Chlorella* sp.) ใช้อาหารสูตรสำหรับเพาะขยายแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียว โดยการเตรียมธาตุอาหารและอัตราส่วนการใช้ดำเนินการตามวิธีการของลัดดา (2543)

เพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำแพลงก์ตอนพืชมาเพาะขยายต่อในถังไฟเบอร์ปริมาตร 2,000 ลิตร ระหว่างการเลี้ยงจะสุ่มตรวจนับปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชโดยใช้ haemocytometer นับด้วย hand counter ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มลดลง (death phase) เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate, K) ของแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดดังสมการ

$$K = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t}$$

เมื่อ K = อัตราการเจริญเติบโต (cells/day) N_o = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชเริ่มต้น (cells) N_t = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชเมื่อนำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต (cells) ที่ระยะเวลา t

1.2 การเก็บเกี่ยวแพลงก์ตอนพืชด้วยการตกตะกอนโดยใช้โคโคซานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เก็บเกี่ยวแพลงก์ตอนพืชด้วยการตกตะกอนโดยใช้โคโคซานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามวิธีของ Lertsutthiwong *et al.* (2009) โดยเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดแบบปริมาณมากภายในถังไฟเบอร์ปริมาตร 2,000 ลิตร ตามวิธีการในข้อ 1) จนแพลงก์ตอนพืชเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (exponential phase) หรือที่อายุวันที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1) นับปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ก่อนการตกตะกอนโดยใช้ haemocytometer นับด้วย hand counter ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากนั้นทำการตกตะกอนแพลงก์ตอนพืชโดยใช้โคโคซานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm บันทึกผลการตกตะกอนโดย เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดที่เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยใช้ปิเปตดูดที่ระดับผิวน้ำ และกลางน้ำ ระดับความลึกละ 1 มล. นำน้ำทั้ง 2 ระดับมารวมกันในหลอดทดลองขนาด 15 มล. และเขย่าเพื่อให้เซลล์แพลงก์ตอนพืชแยกออกจากกัน แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้ haemocytometer เพื่อหาประสิทธิภาพในการตกตะกอน (e) ของแพลงก์ตอนพืชตามวิธีการดังนี้

$$e = \frac{(t - l)}{t} \times 100$$

เมื่อ e = ประสิทธิภาพในการตกตะกอน (%) t = จำนวนเซลล์แพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในบ่อ (cells) l = จำนวนเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่ไม่ตกตะกอน (cells)

โดยหาจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในบ่อ (t) ได้จากสมการ

$$t = d_1 \times v_1$$

เมื่อ t = จำนวนแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในบ่อ (cells) d_1 = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชเริ่มต้น (cells/ml) v_1 = ปริมาตรน้ำเลี้ยงทั้งหมด (ลิตร)

และหาจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่ไม่ตกตะกอน (l) ได้ดังนี้

$$l = d_2 \times v_2$$

เมื่อ l = จำนวนแพลงก์ตอนพืชที่ไม่ตกตะกอน (cells) d_2 = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่วัดได้จากระดับผิวน้ำและกลางน้ำ (cells/ml) v_2 = ปริมาตรน้ำส่วนบนที่แยกชั้นออกจากแพลงก์ตอนชั้นที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นบ่อ (ลิตร)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยนำข้อมูลของประสิทธิภาพการตกตะกอน (e) แพลงก์ตอนพืชด้วยโคโคซาน 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm ที่ 30, 60, 90 และ 120 นาที มาเปรียบเทียบเพื่อเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดแบบปริมาณมากภายในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2,000 ลิตร โดยวางแผนการทดลองสุ่มตลอด (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพในการตกตะกอนด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิเคราะห์ และประมวลผลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic version 21

2. ศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนสัตว์ (โรติเฟอร์) ที่เหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงโรติเฟอร์

นำหัวเชื้อคลอเรลลา (*Chlorella* spp.) จากห้องปฏิบัติการที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 3×10^6 เซลล์/มล. หรือหัวเชื้อที่อยู่ในระยะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มาเพาะขยายปริมาณมากภายในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ที่อัตราส่วนหัวเชื้อ : น้ำขยาย เท่ากับ 1:25 ในน้ำความเค็ม 15 ppt ใส่ปุ๋ยสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวน้ำเค็ม เพาะขยายเป็นเวลา 2 วัน จึงนำคลอเรลลามาเพาะขยายต่อในบ่อคอนกรีตขนาด 3,000 ลิตร ประมาณ 2-3 วัน หรือคลอเรลลาที่มีความหนาแน่นประมาณ $1-2 \times 10^6$ เซลล์/มล.

2) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของโรติเฟอร์ในบ่อคอนกรีตขนาด 3,000 ลิตร

เมื่อได้คลอเรลลาตามวิธีการในข้อ 1) ให้ใส่เชื้อโรติเฟอร์ลงในบ่อเพาะเลี้ยงคลอเรลลา โดยใช้ความหนาแน่นของโรติเฟอร์ประมาณ 10-20 ตัว/มล. สุ่มนับจำนวนโรติเฟอร์ทุกวัน โดยใช้สไลด์นับแพลงก์ตอน (Sedgwick-Rafter Counting chamber) นับด้วย hand counter ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 12 ชั่วโมง จนกว่าโรติเฟอร์ไม่เพิ่มจำนวน หรือจนกว่าความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มลดลง เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (K) ตั้งสมการ

$$K = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t}$$

เมื่อ K = อัตราการเจริญเติบโต (ตัว/วัน) N_o = ความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มต้น (ตัว) N_t = ความหนาแน่นของโรติเฟอร์เมื่อนำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต (ตัว) ที่ระยะเวลา t

3) การเตรียมโรติเฟอร์เพื่อการเก็บเกี่ยวแบบเข้มข้น

เลี้ยงโรติเฟอร์ และเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์ตามวิธีในข้อ 1) และ 2) โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสม โดยนับจำนวนโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยว จากนั้นเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์โดยใช้สวิงขนาดตา 75 ไมครอน ด้วยการเปิดท่อใต้บ่อ นำถุงกรองที่มีขนาดตาใหญ่กว่า 200 ไมครอน มากรองที่ปากท่อเพื่อดักจับตะกอน รอจนกว่าเก็บเกี่ยวโรติเฟอร์หมดบ่อ แล้วเก็บรวบรวมโรติเฟอร์ใส่ในถังขนาด 5 ลิตร จากนั้นนำมารองผ่านสวิงขนาดตา 75 ไมครอนอีกครั้ง เพื่อเก็บโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น (น้ำหนักเปียก)

4) นำโรติเฟอร์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปศึกษาผลการเก็บรักษาต่อไป

3. เปรียบเทียบผลการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์แบบเข้มข้นโดยพิจารณาจากคุณภาพของแพลงก์ตอนที่เก็บรักษา

เก็บรักษาแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดแบบเข้มข้น และเก็บรักษาโรติเฟอร์แบบเข้มข้นโดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยนำมาเก็บรักษาด้วยวิธีการต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เก็บรักษาที่ความเย็น 4 °C (Refrigerating)

ชุดการทดลองที่ 2 เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 ถึง -20 °C (Biomass-freezing)

ชุดการทดลองที่ 3 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -18 ถึง -20 °C

ชุดการทดลองที่ 4 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -18 ถึง -20 °C

ชุดการทดลองที่ 5 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -18 ถึง -20 °C

เก็บรักษาแพลงก์ตอนพืช (*Chaetoceros calcitrans* และ *Chlorella* spp.) แบบเข้มข้นในถุงซิปปิที่ปริมาตรถุงละ 1 ลิตร และเก็บรักษาโรติเฟอร์แบบเข้มข้นในถุงซิปปิที่ปริมาตรถุงละ 50 กรัม (น้ำหนักเปียก) ตรวจสอบคุณภาพของแพลงก์ตอนพืชด้วยการหาอัตราการรอดของเซลล์ การตรวจสอบสภาพเซลล์ การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย และการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ตรวจสอบคุณภาพของแพลงก์ตอนสัตว์ด้วยการตรวจสอบสภาพเซลล์ การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย และการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1) การหาอัตราการรอดของเซลล์

หาอัตราการรอดของเซลล์โดยการย้อมสีเซลล์แพลงก์ตอนพืชด้วย Even's blue ตามวิธีของ Harrison (1988) โดยเตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเข้มข้นให้มีความหนาแน่นประมาณ 5×10^5 cell/ml ปริมาตร 2 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม Even's blue ความเข้มข้น 1% ลงไป 0.1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาหาความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้ haemocytometer นับด้วย hand counter ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลอัตราการรอดของเซลล์ (s) โดยเปรียบเทียบเซลล์ที่ไม่ติดสีย้อมกับจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด ซึ่งเซลล์ที่ติดสี Even's blue คือเซลล์ที่ตายแล้ว โดยคำนวณเป็นร้อยละดังสมการ

$$s = \frac{n}{t} \times 100$$

เมื่อ s = อัตรารอดของเซลล์ (%) n = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่ไม่ติดสีย้อม (cells/ml) t = ความหนาแน่นของเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่นับได้ทั้งหมด (cells/ml)

2) การตรวจสอบสภาพเซลล์

ใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (Cell Condition Index) ตามวิธีของ Heasman *et al.* (2001) ดังนี้

ระดับ	ความหมาย
5	ดีมาก สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
4	ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 10%
3	น่าพอใจ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 50%
2	ไม่ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 50%
1	แย่มาก สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 75%

3) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

นำตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียโดยใช้อาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ บันทึกรูปผล หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง (CFU/ml) ดังสมการ

$$b = c \times 10 \times 10^f$$

เมื่อ b = ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml) c = จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ (CFU) f = จำนวนเท่าของความเจือจางที่นับจำนวนได้

4) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมทั้งกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid ; PUFA) ได้แก่ eicosapentaenoic acid (20:5n3; EPA) และ docosahexaenoic acid (22:6n3; DHA) ของแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000) และ ISO-Analysis animal feed stuffs. โดยมีรายละเอียดดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 วิธีวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์แบบหนาแน่น

รายการ	วิธีวิเคราะห์	ความถี่
โปรตีน (Protein)	Kjeldal method	ทุกสองสัปดาห์
คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)	Nitrogen free extract (NFE)	ทุกสองสัปดาห์
ไขมัน (Fat)	Ether Extract	ทุกสองสัปดาห์
กรดไขมัน (EPA และ DHA)	Gas chromatography	ทุกสองสัปดาห์

5) การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลคุณภาพแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิเคราะห์ และประมวลผลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic version 21