บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างสาหร่าย

1. ช้อน
2. กระปุกพลาสติค ขนาด 100 มล.

อุปกรณ์ในการคัดแยกสาหร่าย

1. ปากคีบ
2. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
3. ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์
4. หลอดทดลองขนาด 150 มล.
5. เหล็กเขี่ยเชื้อรูปวงกลม (Loop)
6. เข็มเขี่ยเชื้อ
7. กล้องจุลทรรศน์ (Nikon ECLIPSE E100)
8. แผ่นสไลด์
9. ตู้เขี่ยเชื้อ Lamina (Holten) รุ่น HVR 2448

อุปกรณ์ในการผลิต เก็บผลผลิต และอบสาหร่ายเพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kobuta 5100)
2. เครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius รุ่น AC2115
3. หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง
4. ขวดพลาสติกขนาด 1.5 ลิตร
5. ก้านลูกโป่งพลาสติก

6. สำลี
7. สายยาง
8. เครื่องให้อากาศ (Yamano AP-120)
9. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท WTB biner รุ่น 78532 Tuttlingen/germany

อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงสาหร่ายและการเลี้ยงปลา

1. ขวดพลาสติกขนาด 1.5 ลิตร
2. ก้านลูกโป่งพลาสติก
3. สำลี
4. สายยาง
5. เครื่องให้อากาศ (Yamano AP-120)
6. ผ้าสำหรับกรองสาหร่าย 80 ไมครอน
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) บริษัท WTB biner รุ่น 78532 Tuttlingen/germany
8. เครื่องปั่น
9. ตะแกรงล่อนสาหร่าย 150 ไมครอน
10. ตู้กระจกสำหรับเลี้ยงปลา ขนาด 12 × 24 × 15
11. ปั๊มน้ำ (Sonic AP 2500)

อุปกรณ์สำหรับการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและสีสันของปลา

1. เครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius รุ่น AC2115
2. ไม้บรรทัด
3. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
4. เครื่องวัดสี (Koniki Minolta color reader CR-10)
6. ตู้แช่ Sanyo 20 องศาเซลเซียส
7. เครื่อง Ultrasonic Multi Cleaner W-113 ของ Honda
8. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Sumsung)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kobuta 5100)
10. เครื่องวัดปริมาณการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Spectro SC)

11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
12. หลอดทดลอง
13. ชั้นวางหลอดทดลอง
14. หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยง

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนในการรวบรวม คัดแยก และคัดเลือกสายพันธุ์ *Nostoc* และ *Nostochopsis*

1. รวบรวมสายพันธุ์ *Nostoc* และ *Nostochopsis* จากแหล่งที่อยู่ต่างๆ จำนวน 5 แหล่ง ในบริเวณภาคเหนือ โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เกาะอยู่บน Substrate ชนิดต่างๆ ด้วยช้อนหรือมีด ใส่ลงในกระป๋องพลาสติก เก็บรักษาในอุณหภูมิประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส แล้วนำไปจำแนกชนิดสาหร่าย ในห้องปฏิบัติการโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปเส้นสายของแต่ละสปีชีส์ ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการจัดจำแนกตามวิธีการ Komarek and Anagnostidis (1989; 1999) และ Anagnostidis and Komarek (1990) คือ

2. นำโคโลนีของสาหร่าย *Nostoc* และ *Nostochopsis* ที่ทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว มาล้างด้วยน้ำกลั่น และฆ่าเชื้อด้วย Ethyl alcohol 10 % แล้วฆ่าเชื้อต่อด้วย Clorox 5 % แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วหลายๆครั้ง เขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้นกึ่งแข็ง โดยวิธีการขีดเชื้อ (Streak plate) แล้วเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อเดี่ยว (Uni-agal culture) ในอาหารวุ้น BG-11 สูตรปรับปรุง (ลภัสรดา, 2549)

3. นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 26$\pm$2 องศาเซลเซียส วางบนชั้นที่มีหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ให้แสงตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์

4. คัดเลือกสาหร่าย *Nostoc* 8 ไอโซเลท *และ Nostochopsis* 3 ไอโซเลท นำไปตรวจวิเคราะห์ไมโครซีสทิน ด้วยชุด The QuantiPlate TM Microcystin Kit (EP 022) (Envirologix^{TM}) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 450 nm จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณไมโครซีสทินในตัวอย่าง โดยตัวอย่างสาหร่ายที่ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป ต้องตรวจไม่พบสารพิษไมโครซีสทิน

5. คัดเลือกสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดของสาหร่าย *Nostoc* ที่มีปริมาณเมือกมาก เมือกปานกลาง และเมือกน้อยอย่างละ 2 ไอโซเลท และละคัดเลือกสาหร่าย *Nostochopsis*

ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด 1 ไอโซเลท เพื่อคัดเลือกสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตต่อไป โดย นำสาหร่ายทั้ง 7 ไอโซเลท ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น BG-11 สูตรปรับปรุง ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% ทั้งหมด 21 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตของสาหร่ายในวันที่ 14 โดยชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีการของ Oris (2003) นำน้ำหนักแห้งที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time: t_d) ตามสูตร

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{\ln (X_i/X_0)}{T_i - T_0}$$

$$\text{Doubling time : } t_d = 0.693/\mu$$

X_i = น้ำหนักเซลล์ในช่วงที่เพาะเลี้ยง
X_0 = น้ำหนักจำนวนเซลล์เริ่มต้น
T_i = ช่วงสัปดาห์ที่ทำการเพาะเลี้ยง
T_0 = สัปดาห์ที่เริ่มต้น

6. คัดเลือกสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดของสาหร่าย *Nostoc* ที่มีปริมาณเมือกมาก เมือกปานกลาง และเมือกน้อย และสาหร่ายที่มีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารวุ้นน้อยที่สุดอย่างละ 1 ไอโซเลท และคัดเลือกสาหร่าย *Nostochopsis* ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด 1 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่ผสมโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) 0, 0.25 และ 0.5% ตามลำดับ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายทั้งสองชนิด โดยแบ่งการทดลองทั้งหมด 15 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตของสาหร่ายในวันที่ 16 โดยชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีการของ Oris (2003) นำน้ำหนักแห้งที่ได้มาคำนวณค่า μ และ t_d ตามสูตรข้างบน

การเพาะเลี้ยง *Nostoc* และ *Nostochopsis* ระดับห้องปฏิบัติการ การเก็บเกี่ยวผลผลิต การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ และปริมาณรงควัตถุ

1. นำสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในข้อ 6 ของสาหร่าย *Nostoc* จำนวน 2 ไอโซเลท และสาหร่าย *Nostochopsis* จำนวน 1 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 สูตร

ปรับปรุงที่ผสม sodium alginate ในความเข้มข้นที่สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ระยะเวลา 21 วัน โดยแบ่งการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตของสาหร่ายในวันที่ 21 โดยชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีการของ Oris (2003) นำน้ำหนักแห้งที่ได้มาคำนวณค่า μ และ t_d ตามสูตรข้างบน

2. ทำการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงโดยใช้ขวดพลาสติกขนาด 1.5 ลิตร บรรจุอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุง และอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่ผสม sodium alginate ในความเข้มข้นที่สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ในอัตราส่วน อาหาร 1 ลิตร ต่อปริมาณสาหร่ายสดเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง 100 มิลลิกรัม ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อครบระยะเวลา 21 วัน นำสาหร่ายสดทั้งสองชนิดไปทำการวิเคราะห์ เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายสดที่เลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตร นำสาหร่ายสดส่วนที่เหลือไปอบด้วยตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 55 ^{0}C จนแห้ง นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น หลังจากนั้นนำไปล่อนด้วยตะแกรงล่อนสาหร่ายขนาด 150 ไมครอน เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการและปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายแห้งที่เลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตร

3. ทดสอบคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย *Nostoc* และ *Nostochopsis* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุง และอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่ผสม Sodium alginate ในความเข้มข้นที่สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการบางประการในสาหร่ายทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย ตามวิธีการ AOAC (1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556) ค่าแคโรทีนอยด์ ตามวิธีการของ KMUTT (2001) ค่าไฟโคไซ-ยานิน และไฟโคเออริธริน ตามวิธีการของ Lawrenz et al. (2011) ตามวิธีการต่าง ดังนี้

3.1 การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

การหาความชื้นในอาหารเป็นการหาค่าตัวอย่างเปียก แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณกลับโดยวิธีที่ทำได้ง่ายที่สุดคือ การทำให้แห้ง ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้คำนวณหาปริมาณน้ำที่สูญเสียไปหลังจากที่ทำให้วัสดุแห้งแล้ว ตามสูตรดังนี้

$$\text{คำนวณหา \% ความชื้น} = \left(\frac{\text{ก} - \text{ข}}{\text{ค}}\right) \times 100$$

เมื่อ ก = น้ำหนักขวดชั่งรวมตัวอย่างก่อนอบแห้ง

ข = น้ำหนักขวดชั่งรวมตัวอย่างหลังอบแห้งจนได้น้ำหนักที่แน่นอน

ค = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

3.2 การวิเคราะห์เถ้า (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

ทำการวิเคราะห์โดยการใช้ความร้อนในการเผาผลาญสารอินทรีย์ให้หมดไป ให้คงเหลือแต่ปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารตามสูตรดังนี้

$$\text{คำนวณหา \% เถ้าทั้งหมด} = \left(\frac{\text{ก} - \text{ข}}{\text{ค}}\right) \times 100$$

เมื่อ ก = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมตัวอย่างหลังเผา

ข = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังเผา

ค = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3 การวิเคราะห์โปรตีน (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่อยู่ในสารอาหารนั้นๆ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจน ทำได้โดยการเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีในอาหารให้กลายเป็น $(NH_4)_2SO_4$ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาไตเตรท ด้วยสารละลาย NaOH ที่ทำให้เป็นกลางด้วยปริมาณของที่ได้จากไนโตรเจนในอาหาร จากนั้นคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนได้ตามต้องการ ตามสูตรดังนี้

$$\text{คำนวณหา \% ไนโตรเจน} = \left(\frac{(\text{ข} - \text{ก}) \times 0.014 \times \text{ค}}{\text{ต}}\right) \times 100$$

เมื่อ ก = มิลลิลิตรของ NaOH มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจากตัวอย่าง

ข = มิลลิลิตรของ NaOH มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจาก Blank

ค = ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH มาตรฐานที่ใช้

ต = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

ดังนั้น % โปรตีน = % ไนโตรเจน × 6.25

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ether extract หรือ crude fat) ทำได้โดยการสกัดตัวอย่างอาหาร โดยใช้ตัวทำละลายไขมันที่เป็นสารละลายประเภท organic solevent โดยใช้ชุดอุปกรณ์ที่เรียกว่า extraction apparatus ตามสูตรดังนี้

$$\text{คำนวณ \% ไขมัน} = \left(\frac{\text{ข} - \text{ก}}{\text{ต}}\right) \times 100$$

เมื่อ ก = น้ำหนักขวดก้นแบน

ข = น้ำหนักขวดก้นแบนหลังสกัดไขมันและอบแห้ง

ค = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.5 การวิเคราะห์เยื่อใย (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

สามารถทำได้โดยการต้มตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริก แล้วให้นำตัวอย่างไปกรองจนแห้งสนิท จากนั้นนำการตัวอย่างที่ได้มาไปต้มอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำตัวอย่างมากรองอีกครั้งหนึ่งแล้วนำการที่ได้ไปอบ แล้วทำการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างส่วนที่เหลือซึ่งน้ำหนักที่ได้นี้จะนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเยื่อใย โดยส่วนที่หายไปนั่นคือ เยื่อใยหยาบ (crude fiber) ซึ่งประกอบด้วย hemicelluloses, cellulose และ lignin

3.6 การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 1995 อ้างโดย นิวุฒิ, 2556)

การคำนวณหาคาร์โบไฮเดรตเป็น % ทำได้โดยการนำเอา 100 มาลบออกจาก % ความชื้นของตัวอย่าง % เถ้าของตัวอย่าง % โปรตีนของตัวอย่าง % ไขมันของตัวอย่าง % เยื่อใยของตัวอย่าง ค่าที่ได้ คือ ค่าของ % ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก หรือ คาร์โบไฮเดรตนั่นเอง ตามสูตรดังนี้

$$\text{\% ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (คาร์โบไฮเดรต)} = 100 - \text{ช} - \text{ถ} - \text{ป} - \text{ข} - \text{ย}$$

เมื่อ ช = % ความชื้นของตัวอย่าง

ถ = % เถ้าของตัวอย่าง

ป = % โปรตีนของตัวอย่าง

ข = % ไขมันของตัวอย่าง

ย = % เยื่อใยของตัวอย่าง

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ (KMUTT, 2001)

ทำการสกัดแคโรทีนอยด์ โดยการใช้เอทานอลและโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ตามลำดับ แล้วนำเข้าไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ แล้วเก็บสารละลายใส่กรวยแยก หลังจากนั้นเติมไดเอทธิลอีเทอร์และเกลือ เขย่าให้เข้ากันรอให้แยกชั้นทิ้งสารละลายส่วนล่าง เก็บสารละลายส่วนบนและเติม Na_2SO_4 anhydrous เล็กน้อยเพื่อดูดน้ำ แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยไดเอทธิลอีเทอร์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมแห้งสาหร่าย)} = \frac{A_{250} \times 25 \times 1000}{260 \times \text{น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (มิลลิกรัม)}}$$

เมื่อ A_{250} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.8 การวิเคราะห์ไฟโคบิลิน (Lawrenz et al., 2011)

กรณีใช้ตัวอย่างแห้ง ชั่งตัวอย่างสาหร่าย ตัวอย่างละ 0.005 กรัม กรณีสาหร่ายสด นำสาหร่ายสดในปริมาณเทียบเท่าสาหร่ายแห้ง 0.005 กรัม เติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 M ต่อลิตร pH 6 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม นำไป vortex ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารส่วนใสทิ้ง นำสาหร่ายที่อยู่ก้นหลอด มาเติมด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M ต่อลิตรที่ pH 6 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไป vortex ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแช่แข็งที่ -20 ^{0}C จนแข็ง (ประมาณ 2 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 3 รอบ รอบที่ 3 นำไปแช่ในตู้เย็น 4 ^{0}C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เริ่มจับเวลาเมื่อละลาย หลังจากนั้นนำไป sonicated บนน้ำแข็งระยะเวลา 10 นาที จับเวลาหลังแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 วินาที ที่ 8 W pulses หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 48 ชั่วโมง ที่ 545 nm สำหรับไฟโคเออริ- ธรินและ 620 nm สำหรับไฟโคไซยานิน และ 750 nm สำหรับไฟโคบิลิน จดบันทึกค่า ใช้คิวเวทแก้ววัด และใช้ phosphate buffer เป็น blank นำสาหร่ายที่ก้นหลอดไปทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง บันทึกค่าที่ได้เป็น ค่าที่ 96 ชั่วโมง ทำการคำนวนปริมาณไฟโคบิลิน (c) (μgL^{-1}) จากสูตร

$$C = \frac{A}{\varepsilon d} \times MW \times \frac{Vsample}{Vbuffer} \times 10^6$$

เมื่อ ε และ MW สำหรับคำนวณค่าไฟโคเออริธริน มีค่า

ε ของไฟโคเออริธริน = 2.41×10^6 $Lmol^{-1}$ cm^{-1}

MW ของไฟโคเออริธริน = 240,000 $gmol^{-1}$

เมื่อ ε และ MW สำหรับคำนวณค่าไฟโคไซยานิน มีค่า

ε ของไฟโคไซยานิน = 1.9×10^6 $Lmol^{-1}$ cm^{-1}

MW ของไฟโคไซยานิน = 264,000 $gmol^{-1}$

d = ความกว้างของคิวเวท

Vsample = ปริมาตรของตัวอย่าง

Vbuffer = ปริมาตรของบัฟเฟอร์

ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุในเนื้อและหนังปลา และสีของปลาทองที่เลี้ยงโดยใช้สาหร่าย *Nostoc*, *Nostochopsis* และ *Spirulina* แห้งเคลือบอาหารสำเร็จรูป

นำสาหร่ายแห้งแต่ละชนิดไปเคลือบอาหารเม็ด แล้วไปเลี้ยงปลาทองออรันดา (*Carassius auratus*) น้ำหนักเริ่มต้น 1.99±0.17 กรัม ความยาวมาตรฐาน (standard length) 2.83±0.15 เซนติเมตร โดยให้กินจนอิ่มวันละ 2 มื้อ เป็นเวลา 42 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 11 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารปลาเคลือบไข่ขาว (negative control)

ชุดการทดลองที่ 2-4 อาหารผสมสาหร่าย *Nostoc* ไอโซเลท 1

ชุดการทดลองที่ 5-7 อาหารผสมสาหร่าย *Nostoc* ไอโซเลท 2

ชุดการทดลองที่ 8-10 อาหารผสมสาหร่าย *Nostochopsis*

ชุดการทดลองที่ 11 อาหารผสมสาหร่าย *Spirulina* 5% (positive control)

โดยชุดการทดลอง 2-10 ใช้สาหร่ายแห้งของแต่ละไอโซเลท อัตราส่วน 5, 7.5 และ 10% ของน้ำหนักอาหาร

1. ทำการชั่งน้ำหนักของปลาเริ่มต้น ในชุดควบคุมและชุดที่ผสมสาหร่าย เมื่อสิ้นสุดการทดลองวิเคราะห์วัดค่าการการเจริญเติบโต และลักษณะรูปร่างของปลา ตามวิธีการของ Khatoon et al. (2010) ดังนี้

Body weight gain (BWG percentage) = [(Final body weight (g) - Initial body weight (g))/ Initial body weight (g)] x 100

Specific growth rate (SGR) = [(ln Final body weight (g) -ln Initial body weight(g)) / Number of days] x 100

Feed conversion ratio (FCR) = Dry feed fed (g) / Live body weight gain (g)

2. ทำการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ไฟโคเออริธริน และไฟโคไซยานิน ในเนื้อและหนังปลา ตามวิธีการข้อ 2.2.3.7 และข้อ 2.2.3.8

3. ทำการอ่านค่าสีของหนังปลาด้วยเครื่องวัดสี (Koniki Minolta color reader CR-10) โดยจดบันทึกค่า สีแดง (A) สีเหลือง (B) ความสว่าง (L) ของปลาทอง เมื่ออายุครบ 42 วัน

ศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลาทองที่เลี้ยงโดยใช้สาหร่าย *Nostoc*, *Nostochopsis* และ *Spirulina* แห้งเคลือบอาหารสำเร็จรูป

1. กิจกรรม Lysozyme (Lysozyme Activity) (Sarder et al., 2001)

Lysozyme เป็นโปรตีนในน้ำเลือดที่สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียแกรมลบและบวกได้โดยการทำให้เซลล์แตก ซึ่งสามารถวัดโดยผสม serum กับแบคทีเรียที่ทราบความเข้มข้น lysozyme ใน serum ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและความขุ่นค่อยจางลงซึ่งสามารถวัดความขุ่นได้ด้วย Microplate Reader ที่ 450 nm โดยวัดด้วย Kinetic mode ทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 20 นาที

การคำนวณผล

หาค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงต่อนาที (ΔOD) = A (ถ้าเป็น mOD ให้เปลี่ยนเป็น OD โดยหารด้วย 1000)

1 Unit lysozyme = ปริมาณ serum ที่ทำให้ค่า OD ลดลง 0.0012/นาที

0.001 (ΔOD) = 1 Unit

A = (1× A) / 0.001 = B Unit

รายงานเป็น Unit / ml Serum

25 µl = B Unit

1000 µl = (B × 1000) / 25 = C Unit

2. การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) (ดัดแปลงจาก Danayadol et al., 2000; Tondiew, 2007; Kledmanee, 2010)

นำเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น $4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับยีสต์ความเข้มข้น $2x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ดูดส่วนผสมดังกล่าว 200 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที เทของเหลวที่อยู่ด้านบนสไลด์ออก แล้วล้างด้วย RPMI1640 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ติดสไลด์ออก ย้อมเซลล์ด้วยวิธี diff quick ด้วยน้ำยาชุด Wright instant stain set โดยนำสไลด์จุ่มลงใน Wright stain A แล้วจุ่มลงใน Wright stain B ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นรอให้แห้งจากนั้นนับเม็ดเลือดขาวทั้งที่จับกินยีสต์และไม่กินยีสต์จำนวนเซลล์ 200 เซลล์ต่อสไลด์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

$$\text{Phagocytic activity} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่กินเซลล์ยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่นับ}} \times 100$$

3. ปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell) (ไพศาล, 2548)

เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม แบ่งออกเป็น 2 พวก โดยพิจารณาจากแกรนูลในไซโตพลาสซึม และลักษณะของนิวเคลียส ได้แก่

3.1 Agranulocyte เป็นพวกที่ไม่มีแกรนูลชนิดพิเศษในไซโตพลาสซึม ได้แก่ lymphocyte และ monocyte

3.1.1 Lymphocyte เป็นเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 6–8 ไมครอน มีนิวเคลียสกลม มีบทบาทสำคัญในการสร้างแอนติบอดี มีประมาณ 20–45 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ต่อสู้การติดเชื้อแบคทีเรียเรื้อรัง และการติดเชื้อไวรัสเฉียบพลัน

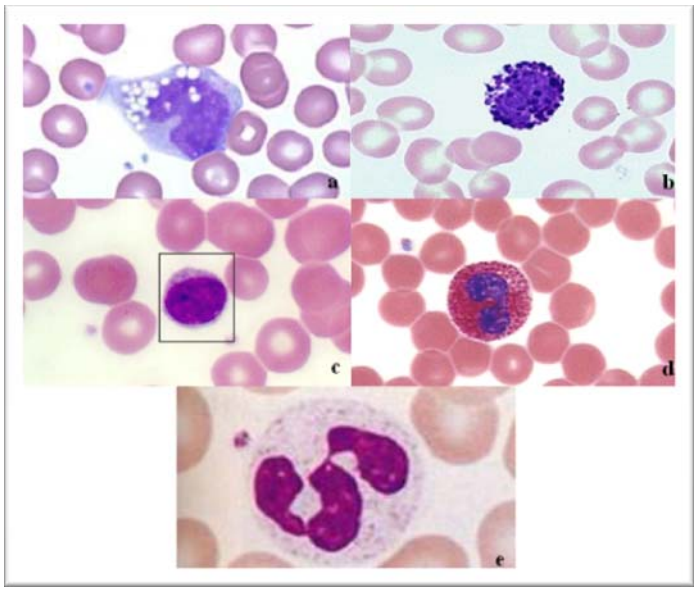
3.1.2 Monocyte เป็นเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 9–12 ไมครอน นิวเคลียสรูปไต ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม เมื่ออยู่ในเนื้อเยื่ออื่นๆ จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นแมโครเฟจ พบประมาณ 3–8 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกลืนกินเซลล์สูงกว่า neutrophils ซึ่งสามารถย่อยเชื้อจุลชีพต่างๆ ได้มากกว่าถึง 10 เท่า

3.2 Granulocyte เป็นพวกที่มีแกรนูลชนิดพิเศษ ซึ่งจะติดสีย้อมต่างกันตามสภาพความเป็นกรดและด่าง ได้แก่ neutrophil, eosinophil และ basophil

3.2.1 Neutrophil เป็นเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 12 ไมครอน นิวเคลียสมี 2–5 พู ซึ่งมีสายโครมาตินบางๆ เชื่อมให้ติดกัน ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลพิเศษขนาดเล็กมาก ภายในมีเอนไซม์ alkaline phosphatase และสารทำลายแบคทีเรีย neutrophil มีประมาณ 50–70 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ทำหน้าที่ทำลายเชื้อแบคทีเรีย ถ้าร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรีย จะทำให้นิวโทรฟิลสูงขึ้น

3.2.2 Eosinophil เป็นเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 10–14 ไมครอน นิวเคลียสมี 2 พู ภายในมีแกรนูลพิเศษที่หยาบขนาดใหญ่ย้อมติดสีแดงเป็นจำนวนมาก eosinophil สามารถเคลื่อนที่ และยื่น pseudopodium ไปหุ้มสิ่งแปลกปลอมได้ แต่ช้ากว่า neutrophil เพราะจะเลือกจับแต่เฉพาะสารประกอบที่เกิดจากการรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดีแล้วเท่านั้น อีโอซิโนฟิลมีประมาณ 1–4 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ และ การติดเชื้อจากพยาธิ

3.2.3 Basophil เป็นเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 12 ไมครอน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน แกรนูลพิเศษขนาดใหญ่ย้อมติดสีน้ำเงิน และมักจะบังนิวเคลียสไว้เกือบทั้งหมด ภายในแกรนูลมีสาร histamine และ heparine ที่เซลล์สร้างขึ้นคล้ายกับที่พบใน mast cell นอกจากนี้ basophil สามารถเคลื่อนที่และจับสิ่งแปลกปลอมได้เช่นเดียวกับเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ มีประมาณ 0.5–1 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคได้โดยการหลั่งเอนไซม์ หรือสารเคมี



ภาพ 1 ชนิดของเม็ดเลือดขาว; a: Monocyte, b: Lymphocyte, c: Basophil, d: Eosinophil, E: Neutrophil

ที่มา: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทย์ศาสตร์ (2556)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%