

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์

3.1.1 อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น CH-2
เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Denver Instrument รุ่น Model 215
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของ Gallenkamp รุ่น IOI400.XX2.C
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Hach รุ่น DR/4000 V
เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Shimadzu รุ่น Libror EB-4000 H
เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius Analytic รุ่น A 200 S
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ของ Sanyo รุ่น Falcon 6/300
เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (sonicator) ของ Sonics vibra cell รุ่น VCX 500
ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) ของ Issco รุ่น BVT 123
ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของ WTB Binder รุ่น ED53
ไมโครปิเปตต์ ของ Eppendorf รุ่น 500-5000 μ L
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของ Hirayama รุ่น HA-300 MIV
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Clifton รุ่น NE2-22D
เฮมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ชนิด improved neubauer ของ Boeco
เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในสูตรอาหาร N-8
สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้สาหร่ายสร้างแคโรทีนอยด์
สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

3.1.3 จุลินทรีย์

สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyceae) ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำบริเวณน้ำตกกระทิงและน้ำตก
ป่าละอู จำนวน 72 ไอโซเลต

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อการคัดแยกสาหร่าย

3.2.1.1 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 2 สถานที่ คือ แหล่งน้ำบริเวณน้ำตกกระทิง อุทยานแห่งชาติเขาคิซมภูฏ เขตจังหวัดจันทบุรี และแหล่งน้ำบริเวณน้ำตกป่าละอู อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน เขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.2.1.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างแบ่งเป็นสถานที่ละ 2 ครั้ง คือ บริเวณน้ำตกกระทิง ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 8 เดือนกันยายน พ.ศ. 2546 และวันที่ 14 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 สำหรับบริเวณน้ำตกป่าละอู ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 16 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2547 และวันที่ 16 เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 โดยแต่ละครั้งทำการเก็บตัวอย่างสถานที่ละ 10 จุด ทั้งนี้ในแต่ละจุดทำการบันทึกค่าอุณหภูมิและค่าพีเอชของแหล่งน้ำในจุดนั้นๆ ไว้ จากนั้นเก็บตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณนั้น เพื่อนำมาคัดแยกสาหร่ายต่อไป

3.2.2 การคัดแยกและการจัดจำแนกสาหร่าย

นำตัวอย่างดินและน้ำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่าย โดยเติมอาหารเหลวสูตร N-8 (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 ส่วน ต่ออาหาร 4 ส่วน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง และให้อากาศโดยเขย่าเป็นครั้งคราว เพาะเลี้ยงประมาณ 3 สัปดาห์ จึงนำไปคัดแยก

3.2.2.1 การคัดแยกสาหร่ายและการทำให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาสเปรด (spread) บนอาหารแข็งสูตร N-8 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อสาหร่ายเจริญจนเห็นโคโลนีชัดเจน นำไปคัดแยกต่อโดยการใช้หลอดเข็มเชื้อแยกเอาโคโลนีเดี่ยวๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจานใหม่ ทำการคัดแยกซ้ำจนโคโลนีสาหร่ายที่ได้มีลักษณะเหมือนกันและไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ จากนั้นถ่ายลงเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นเอียง (slant) เพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป

3.2.2.2 การจัดจำแนกสาหร่าย

การจัดจำแนกทำโดยถ่ายสาหร่ายจากหลอดอาหารวุ้นเอียงลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N-8 โดยให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง และให้อากาศโดยเขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อสาหร่ายเจริญจึงนำมาสังเกตรูปร่างลักษณะผ่านกล้องจุลทรรศน์และจัดจำแนกสาหร่าย

3.2.3 การเตรียมสาหร่ายตั้งต้น

ถ่ายเซลล์สาหร่ายจากหลอดอาหารวันเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมเป็นเซลล์ตั้งต้นต่อไป

3.2.4 การคัดเลือกสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์

นำสาหร่ายที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงไอโซเลทละ 3 ข้ว ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทั้งนี้เตรียมเซลล์ตั้งต้นให้มีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 โดยใช้สาหร่ายตั้งต้นร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงจึงทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อวัดค่าการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ หลังจากนั้นคัดเลือกสาหร่ายที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 3 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.5 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์

3.2.5.1 ผลของปริมาณโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

นำสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร N-8 ดัดแปลง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท เท่ากับ 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 เท่าของสูตร N-8 ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ข้ว เตรียมเซลล์ตั้งต้นให้มีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 ใช้เซลล์ตั้งต้นร้อยละ 20 ของปริมาตรอาหาร ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อวัดค่าการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารและปริมาณแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.5.2 ผลของปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ร่วมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

นำสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร N-8 ดัดแปลงซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตรวมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตตามอัตราส่วนสูตรอาหาร N-8 เท่ากับ 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 เท่าของสูตร N-8 ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ข้ว และเก็บผลวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.5.1

ทั้งนี้ค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮดรทที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.5.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร

นำสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร N-8 ดัดแปลงซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทและความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮดรทที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.8 5.8 6.8 7.8 และ 8.8 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ในการปรับค่าพีเอช ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ขั้ว และเก็บผลวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.5.1 โดยค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ทั้งนี้เมื่อจบการทดลองในขั้นตอนนี้จะทำการคัดเลือกสาหร่ายที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.6 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

นำสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงโดยสูตรอาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.2.5 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เตรียมเซลล์ตั้งต้นให้มีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 ใช้เซลล์ตั้งต้นร้อยละ 20 ของปริมาตรอาหาร ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อวัดค่าการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารและปริมาณแคโรทีนอยด์ จนกระทั่งสาหร่ายมีการเจริญถึงเต็มสารชักนำ ดังนี้

3.2.6.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจนมีค่าการเจริญถึงเต็มสารละลายโซเดียมคลอไรด์โดยแปรผันความเข้มข้นสำหรับชักนำเป็น 0.0 2.0 4.0 8.0 16.0 และ 32.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ขั้ว โดยเพาะเลี้ยงต่ออีก 14 วัน ในสภาวะตามข้อ 3.2.6 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวัดค่าการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารและวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจะนำไปใช้ร่วมกับสารชักนำในการทดลองต่อไป

3.2.6.2 ผลของโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจนมีค่าการเจริญถึงเต็มสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่เหมาะสม และทำการเติมโซเดียมอะซิเตต โดยแปรผันความเข้มข้นสำหรับชักนำเป็น 0.0 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ขั้ว และเก็บผล

วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.1 ทั้งนี้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตที่เหมาะสมจะนำไปใช้ร่วมกับสารชักนำในการทดลองต่อไป

3.2.6.3 ผลของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4)

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจนมีค่าการเจริญคงที่มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นทำการเติมเฟอร์รัสซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นสำหรับชักนำเป็น 0 0.01 0.02 0.04 0.08 และ 0.16 กรัมต่อลิตรทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเก็บผลวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.1

3.2.7 การวัดค่าการเจริญของสาหร่าย

3.2.8.1 การนับจำนวนเซลล์

นับจำนวนเซลล์สาหร่ายโดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ชนิด improved neubauer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นคำนวณหาจำนวนเซลล์โดยดัดแปลงจากวิธีการของยูดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาสะบุตร (2546) (ภาคผนวก ข)

3.2.8.2 การวัดค่าความขุ่น

วัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

3.2.8.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์สาหร่าย 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วรินส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ (ถัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

3.2.9 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ดัดแปลงจาก กนกอร (2543) Gross (1991) และ Jeffrey และคณะ (1997)

นำเซลล์สาหร่าย 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วรินส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติเมทานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อสกัดแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ แล้วนำมาเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแยกเซลล์ออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาใส่ลงในกรวยแยก แล้วเติมไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ความเข้มข้นร้อยละ 99.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วรอจนแยกชั้น ไขชั้นสีเขียวชั้นล่างออก จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป จนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส นำชั้นสีเหลืองที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยไดเอทิล

อีเทอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร แล้วนำค่ามาคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ดังสมการ

$$\text{ไมโครกรัมแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์} = \frac{\text{OD}_{445} \times V \times 10^6}{2550 \times 100 \times G}$$

เมื่อ OD_{445} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคโรทีนอยด์ที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร

V = ปริมาตรของสารละลายแคโรทีนอยด์ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

G = น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายปริมาณเท่ากับที่นำมาสกัดแคโรทีนอยด์ หน่วยเป็นกรัม

3.2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้ทุกการทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำข้อมูลปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 for Windows และการเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) จำนวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%