บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์สาหร่าย

สาหร่ายดูนาลิเอลลา (*Dunaliella salina*) ที่ใช้ในการทดลองเป็นหัวเชื้อสายพันธุ์ DS91008 ซึ่งเก็บรวบรวมจากนาเกลือจังหวัดสมุทรสงคราม (Sorawit Powtongsook, 1993) นำมาจำแนกชนิด แยกให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (monoculture) ซึ่งได้รับการศึกษาพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเบตาแคโรทีนได้ดีที่สุด ดูนาลิเอลลาสายพันธุ์ DS91008 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเป็นสาหร่ายตั้งต้น (stock culture) เพื่อนำไปเลี้ยงแบบมหมวล (mass culture) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ต่อไป

ภาวะการเจริญและการเพาะเลี้ยง

อาหารเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา (culture medium) ใช้สูตร J/1 medium ซึ่งได้รับการศึกษาปรับภาวะเหมาะสมในระดับที่ชักนำให้สาหร่ายดูนาลิเอลลามีการสะสมเบตาแคโรทีนได้ดีที่สุด (Borowitzka, 1988 อ้างโดย Sorawit Powtongsook, 1993) รายละเอียดสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแสดงไว้ในภาคผนวก ข ปรับความเค็มระดับที่ต้องการโดยใช้เกลือแกง (โซเดียมคลอไรด์ (NaCl))

แสงที่ใช้ได้จากหลอดฟลูออเรสเซนต์มีหน่วยเป็นลักซ์ (lux) ปรับความเข้มแสงโดยการเปิด-ปิดหลอดไฟให้ได้ความเข้มแสงในระดับที่ต้องการ วัดระดับแสงโดยใช้ลักซ์มิเตอร์ (luxmeter) DIGICON รุ่น LX-50 ติดตั้งเครื่องตั้งเวลาปิดเปิดไฟชนิด 24 ชั่วโมงเพื่อการทดลองผลของคาบการให้แสงในรอบวัน (diurnal cycle) แบบ สว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง และแบบให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง

เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิได้ด้วยเครื่องปรับอากาศ ปรับอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ตั้งเวลาเปิดปิดการทำงานของเครื่องปรับอากาศ โดยให้เปิดในเวลา 6.00 นาฬิกา และปิดเวลา 18.00 นาฬิกาของทุกวัน

จำนวนเซลล์ของสาหร่ายวัดด้วยการนับโดยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ส่องผ่านใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการนับ 4 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย เพื่อความถูกต้องยิ่งขึ้น จากนั้นนำมาหาค่าอัตราการเจริญ (specific growth rate) คำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ μ คืออัตราการเจริญ, X_2 และ X_1 คือจำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับในวันที่ 2 (t_2) และวันที่ 1 (t_1) ตามลำดับ

จากนั้นนำอัตราการเจริญที่ได้มาคำนวณเวลาการแบ่งเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time) หรือ t_g ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์สาหร่ายที่ใช้ในการแบ่งตัวออกเป็นสองเซลล์ มีหน่วยเป็นวัน สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$t_g = \frac{0.6931}{\mu}$$

เซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาจะถูกเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (exponential growth phase) และช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary growth phase) เพื่อนำมาหาปริมาณผลผลิตรงควัตถุ ได้แก่ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid) และคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) โดยใช้คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll-a) เป็นตัวแทนของปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในเซลล์

ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมวิเคราะห์ได้จากการสกัดเซลล์ดูนาลิเอลลาด้วยอะซิโตน (acetone) 90% และวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น SPECTRONIC GENESIS 5 ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร รายละเอียดการหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมแสดงไว้ในภาคผนวก ค

ปริมาณคลอโรฟิลล์วิเคราะห์ได้จากการสกัดเซลล์สาหร่ายด้วยอะซิโตน 90% เช่นเดียวกัน แต่วัดที่ความยาวคลื่น 664 และ647 นาโนเมตร รายละเอียดการหาปริมาณคลอโรฟิลล์แสดงดังภาคผนวก ง

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

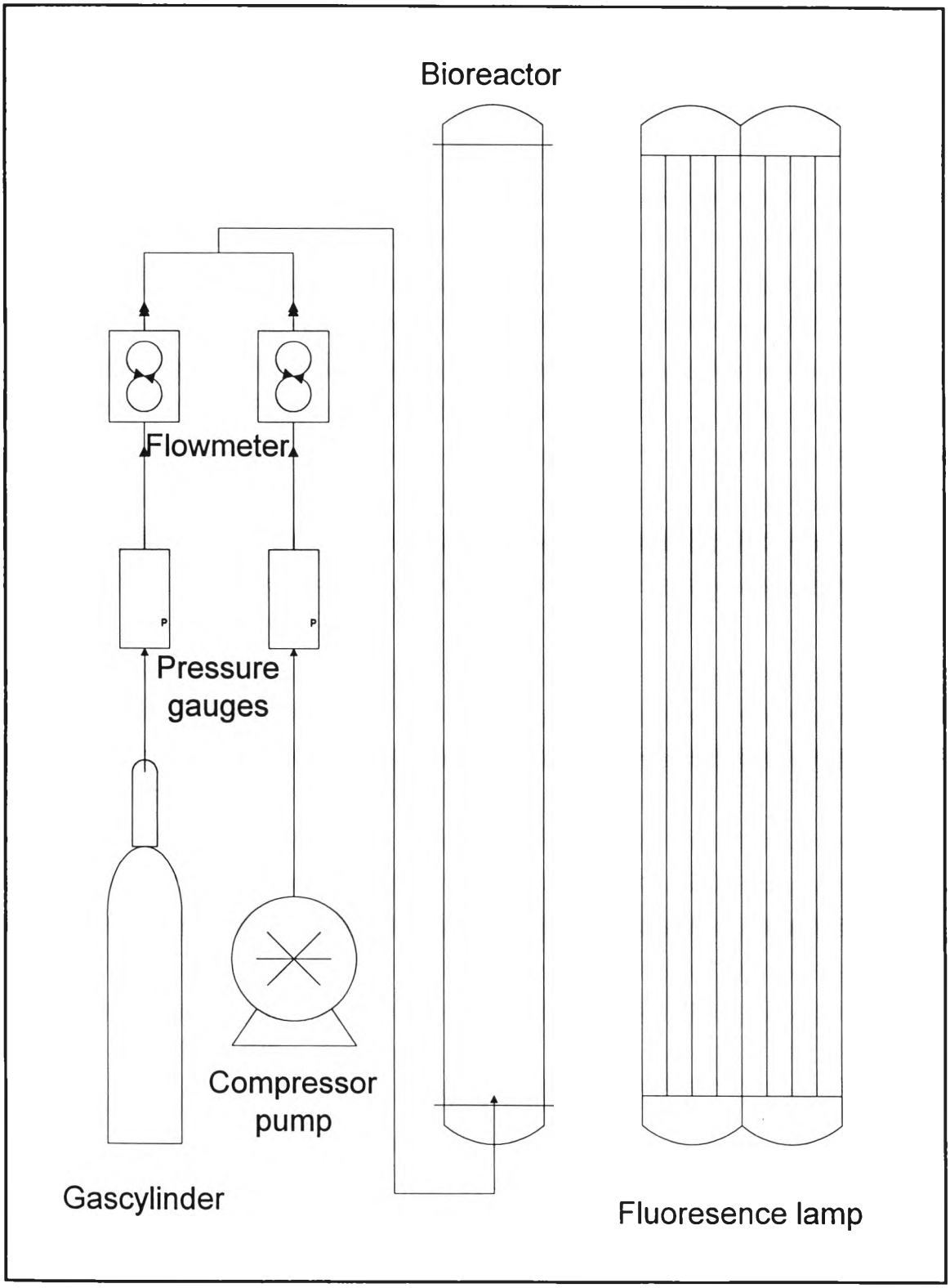
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำจากท่อแก้วใสทรงกระบอก (vertical column) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.4 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร ปริมาตรรวมประมาณ 1,250 มิลลิลิตร แผนผังระบบการทำงานและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแสดงดังรูปที่ 3.1 อาหารเลี้ยงสาหร่ายจะถูกหมุนเวียนอยู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยระบบให้อากาศแบบพ่นจากด้านล่าง (air bubble) ฟองอากาศที่ได้จะมีลักษณะเล็กละเอียดโดยจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางของฟองที่วัดจากบริเวณแผ่นแก้วพรุน (sintered glass plate) และบริเวณตอนบนของอาหารเลี้ยงสาหร่ายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ประมาณ 20-60 และ 80-120 ไมครอน (μm) ตามลำดับ แรงดันอากาศได้จากปั๊มลมชนิดอัดถัง (compressor air pump) และถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยต่อท่อสายอากาศทั้งสองมารวมเข้าไว้ด้วยกันที่เครื่องปรับและมาตรวัดอัตราการไหลของอากาศ (air flow meter adapter) เพื่อนำอากาศมาใช้กับการทดลองเรื่องผลของการผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีต่อระบบการเพาะเลี้ยง

การเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

การผลิตสาหร่ายดูนาลิเอลลาในบ่อเปิดระดับใหญ่ต้องใช้แหล่งคาร์บอนอนินทรีย์ (soluble inorganic carbon) ที่ต่อเนื่องเพื่อรักษาการเจริญให้อยู่ในระดับสูง จึงจำเป็นต้องเติมคาร์บอนอนินทรีย์ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ Ben-Amotz and Avron (1989) สันนิษฐานว่าผลผลิตดูนาลิเอลลา 20 กรัมต่อตารางเมตรต่อวันจะต้องการคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อรักษาผลผลิต (ประมาณว่าใช้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 50% ของน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้า (ash-free dry weight, AFDW) ของสาหร่าย) เท่ากับ 20 x 0.5 x 44/12 = 37 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน หรือ 37 กิโลกรัมต่อวันสำหรับหน่วยการผลิตระดับอุตสาหกรรม 1,000 ตารางเมตร ดังนั้นปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างน้อยที่สุดที่เติมในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 50% ของน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้าของสาหร่าย การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้าของสาหร่ายแสดงดังภาคผนวก จ

ขอบเขตการศึกษา

การศึกษาแบ่งออกเป็นสองช่วง โดยในช่วงแรกจะเป็นการเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญของสาหร่ายดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ภาวะเหมาะสม และช่วงที่สองเป็นการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous cultivation) โดยใช้ภาวะการเจริญที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในช่วงแรก และแต่ละช่วงจะมีการเก็บตัวอย่างผลผลิตสาหร่ายเพื่อนำมาวิเคราะห์กับค่าปัจจัยต่าง ๆ ต่อไป



รูปที่ 3.1 แผนผังระบบการทำงานและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ขั้นตอนการทดลอง

1 การศึกษาภาวะเหมาะสมในการเจริญของสาหร่ายดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.1 ผลของความเค็มกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

ทำการเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาในอาหารเลี้ยงสูตร J/1 ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกา ตามลำดับ พร้อมกันในแต่ละวัน อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม (refractometer) ควบคุมระดับ pH ที่ประมาณ 7.5 โดยปรับ pH ด้วย Tris-buffer

ทำการเพาะเลี้ยงโดยแบ่งความเค็มออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 180, 200 และ 220 ppt (part per thousand) ตามลำดับ (18, 20 และ 22 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ โดยมวลตามลำดับ)

ตรวจนับเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาทุกวันเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ และช่วงการเจริญแบบคงที่ ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสัดส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์

ทำการเลี้ยงเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดมาพิจารณาหาความเค็มที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.2 ผลของความเข้มแสงต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

1.2.1 ผลของระดับความเข้มแสงต่อระบบการผลิต

นำสาหร่ายดูนาลิเอลลามาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร J/1 ที่ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกา ตามลำดับ พร้อมกันในแต่ละวัน อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม ตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม ควบคุมระดับ pH ที่ประมาณ 7.5 โดยปรับ pH ด้วย Tris-buffer

ทำการเพาะเลี้ยงโดยแบ่งความเข็มแสงออกเป็น 3 ระดับ คือ 10,000, 15,000 และ 20,000 ลักซ์ (หรือ 136, 203 และ 270 $\mu E/m^2/s$ ตามลำดับ)

ตรวจนับเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาทุกวันเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ และช่วงการเจริญแบบคงที่ ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสัดส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์

ทำการเลี้ยงเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาหาความเข้มแสงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.2.2 ผลของคาบการให้แสงในรอบวัน (diurnal cycle) ต่อระบบการผลิต

นำสาหร่ายดูนาลิเอลลามาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร J/1 ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส โดยเครื่องปรับอากาศ ระดับความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม ควบคุมระดับ pH ที่ประมาณ 7.5 โดยปรับ pH ด้วย Tris-buffer

ทำการเพาะเลี้ยงโดยแบ่งคาบการให้แสง 2 ระดับแบบ คือ แบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมงต่อวัน (ตั้งเวลาให้เปิดและปิดแสงไฟและเครื่องปรับอากาศในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกาของทุกวันตามลำดับ) และแบบให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง (เปิดเครื่องปรับอากาศ 24 ชั่วโมง)

ตรวจนับเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาทุกวันเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณและช่วงการเจริญแบบคงที่ ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสัดส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์

ทำการเลี้ยงเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาหาคาบการให้แสงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.3 ผลของระดับ pH กับระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

1.3.1 การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในรอบวันของระบบเพาะเลี้ยง

นำสาหร่ายดูนาลิเอลลามาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร J/1 ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกาของทุกวันพร้อมกันตามลำดับ อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม

ทำการเพาะเลี้ยงที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ไม่ต้องควบคุมค่า pH เพื่อสังเกตระดับ pH ที่เปลี่ยนแปลงไปในรอบวัน (24 ชั่วโมง) ใช้ pH มิเตอร์ (HANNA รุ่น HI 8418) ซึ่งสามารถบันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้

ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งแต่เปลี่ยนเป็นระบบที่ไม่มีเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลา (ระบบควบคุม) เพื่อนำผลที่ได้จากการทดลองในระบบที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายมาเปรียบเทียบ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาเปรียบเทียบกับการทดลองในข้อ 1.4.1 เรื่องการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในรอบวันของระบบเพาะเลี้ยงที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

1.3.2 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

ทำการเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาในอาหารเลี้ยงสูตร J/1 ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกา ตามลำดับพร้อมกันในแต่ละวัน อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับ pH ให้คงที่ด้วย Tris-buffer และปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม

ทำการเพาะเลี้ยงโดยแบ่งค่า pH ออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ppt ตามลำดับ

ตรวจนับเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาทุกวันเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ และช่วงการเจริญแบบคงที่ ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสัดส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์

ทำการเลี้ยงเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาหาระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.4 ผลของการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

1.4.1 การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในรอบวันของระบบเพาะเลี้ยงที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

นำสาหร่ายดูนาลิเอลลามาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร J/1 ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกาของทุกวันพร้อมกันตามลำดับ อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 1.5 มิลลิลิตรต่อนาทีเข้าไปในระบบเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ไม่ต้องควบคุมค่า pH เพื่อสังเกตระดับ pH ที่เปลี่ยนแปลงไปในรอบวัน (24 ชั่วโมง) โดยใช้ pH มิเตอร์

ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งแต่เปลี่ยนเป็นระบบที่ไม่มีเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลา (ระบบควบคุม) เพื่อนำผลที่ได้จากการทดลองในระบบที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายมาเปรียบเทียบ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาเปรียบเทียบกับการทดลองในข้อ 1.3.1 เรื่องการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในรอบวันของระบบเพาะเลี้ยง (ไม่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์)

1.4.2 ผลของการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับอากาศในปริมาณต่าง ๆ ต่อการเจริญและผลผลิตของสาหร่ายดูนาลิเอลลาในระบบการเพาะเลี้ยง

ทำการเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาในอาหารเลี้ยงสูตร J/1 ความเค็ม 200 ppt ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตรเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร ระบบทั้งหมดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ปรับตั้งคาบการให้แสงเป็นแบบสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกา ตามลำดับ พร้อมกันในแต่ละวัน อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบอยู่ที่ระดับ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นอันเกิดจากการระเหยของน้ำให้คงที่โดยเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และตรวจความเค็มอีกครั้งด้วยเครื่องวัดความเค็ม ควบคุมระดับ pH ที่ประมาณ 7.5 โดยปรับ pH ด้วย Tris-buffer

ทำการเพาะเลี้ยงโดยแบ่งอัตราการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ (คำนวณปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จาก 50% ของน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้าของสาหร่ายที่เจริญในช่วงทวีคูณระยะต้น)

ตรวจนับเซลล์สาหร่ายดูนาลิเอลลาทุกวันเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ และช่วงการเจริญแบบคงที่ ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสัดส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์

ทำการเลี้ยงเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาหาอัตราการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous cultivation) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ทำการเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้ภาวะการเจริญที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองข้อ 1 ทั้งหมด ได้แก่ ความเค็ม 200 ppt pH 7.5 ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ (270 $\mu E/m^2/s$) ภายในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส คาบการให้แสงแบบ 12:12 ชั่วโมง โดยแสงไฟและเครื่องปรับอากาศจะถูกตั้งเวลาให้เปิดและปิดพร้อมกันแต่ละวันในเวลา 6.00 และ 18.00 นาฬิกา ตามลำดับ ไม่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อัตราการให้อากาศเพื่อหมุนเวียนระบบภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 5.4 มิลลิลิตรต่อนาที เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตรวจนับเซลล์สาหร่ายเพื่อหาค่าอัตราการเจริญเมื่อสาหร่ายดูนาลิเอลลาเจริญจนถึงระยะทวีคูณ จึงเริ่มการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแบบกึ่งต่อเนื่องโดยกำหนดปริมาณการเก็บเกี่ยวผลผลิต

2.1.1 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องทำโดยการเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายบางส่วน (subcultue) ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่าย J/1 ชุดใหม่ด้วยปริมาตรการเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร)

การเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายบางส่วนในแต่ละครั้งทำโดยเติมน้ำจืดเพื่อชดเชยน้ำที่ระเหยไปในแต่ละวันให้เท่ากับปริมาตรเริ่มต้น และเพื่อเจือจางความเข้มข้นเซลล์ที่แท้จริงและถูกต้อง จากนั้นนับเซลล์ดูนาลิเอลลาก่อนเก็บเกี่ยว ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตตามปริมาตรที่กำหนดไว้ (5%, 50 มิลลิลิตร) โดยจะต้องเติมอาหารเลี้ยงชุดใหม่ให้เท่ากับปริมาตรสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวมาในแต่ละวัน ตรวจนับเซลล์สาหร่ายภายหลังจากที่เติมอาหารเลี้ยงชุดใหม่ทุกครั้ง

2.1.2 นำค่าความหนาแน่นเซลล์ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวแต่ละครั้งมาคำนวณหาอัตราการเจริญ และสร้างกราฟการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องของสาหร่ายดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.1.3 นำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละครั้งไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตรงควัตถุ

2.1.4 ทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องทุกวันจนได้ค่าการเก็บเกี่ยวที่คงที่

2.1.5 ทำการทดลองซ้ำข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.4 แต่เปลี่ยนปริมาตรการเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายเป็น 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิลิตร ตามลำดับ)

2.1.6 นำค่าการเก็บเกี่ยวที่ได้ทั้งหมดมาพิจารณาหาปริมาตรการเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายดูนาลิเอลลาที่เหมาะสมที่สุด

2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแบบเก็บเกี่ยวผลผลิตกึ่งต่อเนื่องโดยใช้มาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและค่าร้อยละของการเก็บเกี่ยวผลผลิต

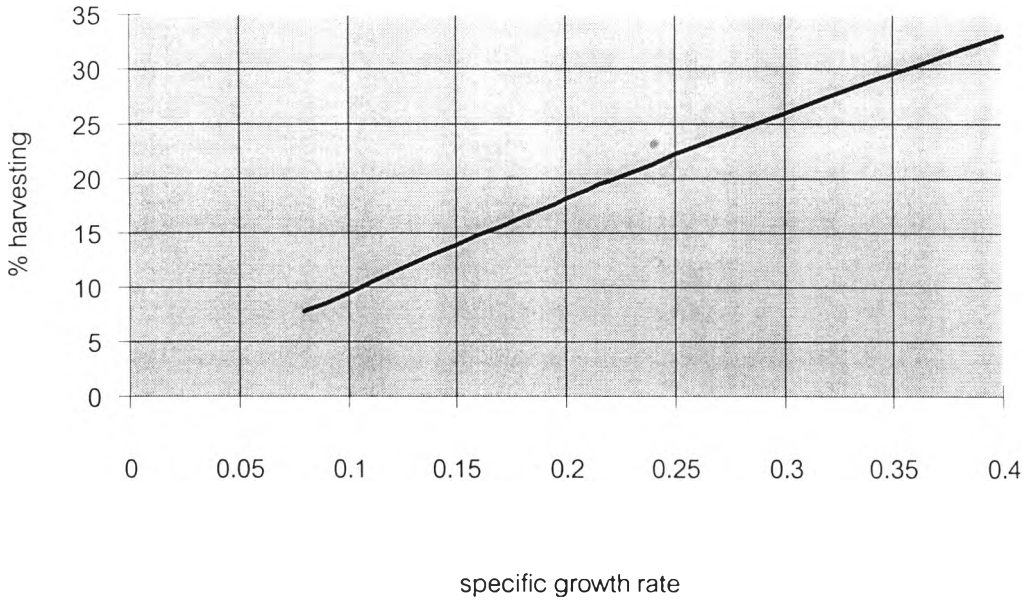
การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องทำโดยการเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายบางส่วนด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่าย J/1 ชุดใหม่ ปริมาตรการเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงจะพิจารณาจากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและค่าร้อยละของการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายกึ่งต่อเนื่องแบบเก็บเกี่ยวทุกวันและทุกสองวัน (รูปที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ) รายละเอียดของมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและค่าร้อยละของการเก็บเกี่ยวผลผลิต แสดงไว้ในภาคผนวก ฉ

<u>การเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงบางส่วนและการใช้กราฟมาตรฐานเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่าย</u>

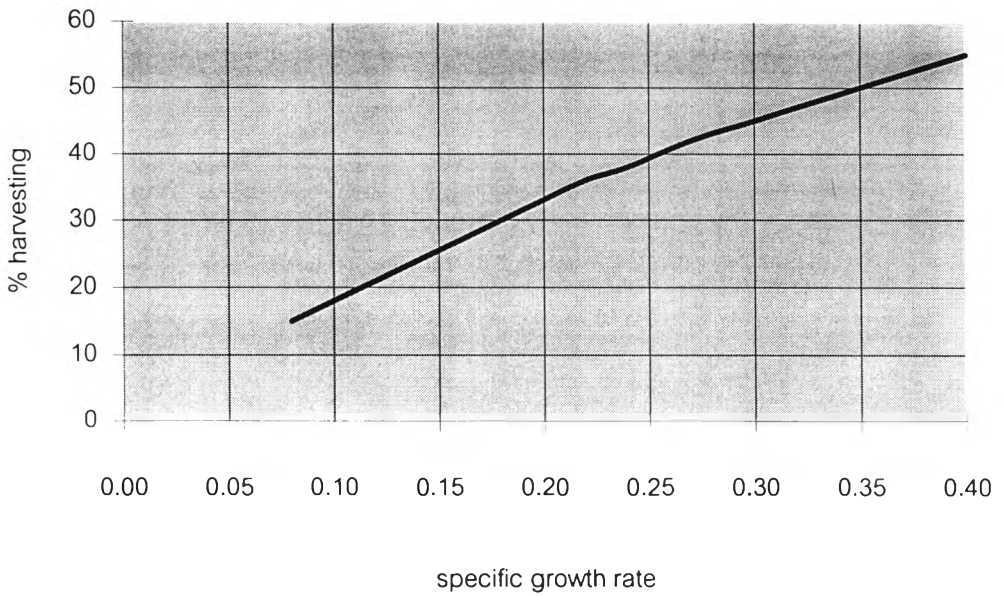
การเปลี่ยนเติมอาหารเลี้ยงบางส่วนทำโดยเติมน้ำจืดเพื่อชดเชยน้ำที่ระเหยไปในแต่ละวันให้เท่ากับปริมาตรเริ่มต้นและเพื่อเจือจางความเข้มข้นเซลล์ที่แท้จริงและถูกต้อง จากนั้นตรวจนับเซลล์ดูนาลิเอลลาก่อนเก็บเกี่ยว นำมาคำนวณหาอัตราการเจริญกับความหนาแน่นเซลล์หลังเก็บเกี่ยวในครั้งก่อน เมื่อได้ค่าอัตราการเจริญแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.2 หรือ 3.3) จะได้ค่าร้อยละของการเก็บเกี่ยวเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาตรเก็บเกี่ยวสาหร่ายต่อไป เมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วจะต้องเติมอาหารเลี้ยงชุดใหม่ให้เท่ากับปริมาตรสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวในแต่ละครั้ง ตรวจนับเซลล์หลังจากเติมอาหารเลี้ยงชุดใหม่ทุกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณอัตราการเจริญสำหรับการเก็บเกี่ยวในครั้งต่อไป

นำค่าความหนาแน่นเซลล์ดูนาลิเอลลาทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในแต่ละครั้งมาสร้างกราฟการเจริญแบบกึ่งต่อเนื่องของสาหร่ายดูนาลิเอลลาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นนำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาตรผลผลิตรงควัตถุ

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าความสัมพันธ์ต่าง ๆ



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานการเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายดูนาลิเอลลากึ่งต่อเนื่องแบบเก็บเกี่ยวทุกวัน



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานการเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่ายดูนาลิเอลลากึ่งต่อเนื่องแบบเก็บเกี่ยวทุกสองวัน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

2.2.1 การเพาะเลี้ยงกึ่งต่อเนื่องแบบเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกวัน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาดังกล่าวข้างต้น โดยทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกวันหลังจากสาหร่ายดูนาลิเอลลาเจริญอยู่ในระยะทวีคูณ เป็นเวลาอย่างน้อย 20 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 1 ซ้ำ

2.2.2 การเพาะเลี้ยงกึ่งต่อเนื่องแบบเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกสองวัน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาดังกล่าวข้างต้น โดยทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกสองวันหลังจากสาหร่ายดูนาลิเอลลาเจริญอยู่ในระยะทวีคูณ เป็นเวลาอย่างน้อย 20 วัน จนได้ค่าที่คงที่ ทำการทดลองจำนวน 1 ซ้ำ

นำผลการทดลองทั้งสองมาเปรียบเทียบและพิจารณาภาวะการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลาแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ