บทที่ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้สาหร่าย Dunaliella salina สายพันธุ์ DS91008 ซึ่งได้รับการคัดแยกจากนาเกลือ จังหวัดสมุทรสงคราม (Powtongsook, 1993) และเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในห้องปฏิบัติการ ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำสาหร่ายมาเพิ่มจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้จำนวนมากพอเพียงจึงนำไปเพิ่มจำนวนเซลล์นอกห้องปฏิบัติการ โดยใช้สูตรอาหาร Modified J/1 (แสดงในภาคผนวกที่ 1) ในน้ำเกลือสินเธาว์ แล้วจึงนำสาหร่ายไปทดลองเลี้ยงในพื้นที่ทดลองที่ได้เตรียมไว้ โดยก่อนที่จะเริ่มทดลองในแต่ละการทดลอง ขณะที่มีการเตรียมบ่อ อุปกรณ์ และอื่นๆ ต้องมีการเตรียมเชื้อตั้งต้นให้พร้อมที่จะทดลอง ได้แบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

1. การทดลองที่ อ. บ้านดุง จ. อุดรธานี

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2538 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2539

1.1. การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

วัตถุประสงค์การทดลอง

- ศึกษาปริมาณไนเตรทและผลของ Fe-solution และ Trace element ตามสูตรอาหาร modified J/1 ต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา
- ศึกษาระดับความลึกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

1.1.1. การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร

การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร ทดลองในโหลแก้วขนาด 10 ลิตร จำนวน 10 โหล (แสดงในภาพที่ 4) ให้อากาศตลอดเวลา จากปั๊มลมผ่านสายยางลงที่หัวทราย เพื่อให้น้ำเลี้ยงมีการหมุนเวียนและเพิ่มอากาศ ขณะทำการทดลองจะรักษาปริมาตรน้ำไว้ที่ประมาณ 10 ลิตร โดยการเติมน้ำจืดชดเชยการระเหยของน้ำ ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง (โดยการใช้ Lux meter) pH (ใช้ pH meter เป็นเครื่องมือวัด) อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Haematocytometer slide) ผ่านกล้องจุลทรรศน์การตรวจนับเซลล์ทำการนับซ้ำละ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ เมื่อสาหร่ายอยู่ในระยะ Stationary ตามวิธีของ Borowitzka (1991)

เตรียมน้ำเกลือสินเธาว์ความเค็มประมาณ 220 ppt. แล้วเติมสารอาหารตามที่กำหนดในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการทดลองแต่ละการทดลองจะมี 2 ซ้ำ

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ปรับเปลี่ยนมาจากสูตรอาหาร Modified J/1

การทดลองที่	KNO_3 (g/l)	KH_2PO_4 (g/l)	$NaHCO_3$ (g/l)	Fe-solution (ml/l)	Trace element (ml/l)
I	1.0	0.035	0.043	10	10
II	0.5	0.035	0.043	10	10
III	0.5	0.035	0.043	10	10
IV	0.5	0.035	0.043	10	10

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ จากสาหร่ายดูนาลิเอลลา ทำการสกัดด้วย 90% Acetone และวัดค่าแคโรทีนอยด์ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 452 nm ซึ่งรายละเอียดได้แสดงในภาคผนวกที่ 3

ภาพที่ 4 รูปภาพการทดลองปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร

1.1.2. การทดลองระดับความลึก

บ่อที่ใช้ทดลองขนาด 5.4x1.3 ตารางเมตร ความลึก 20-30 เซนติเมตร จำนวน 3 บ่อ โดยใช้ไม้ไผ่ทำเป็นคันบ่อบนพื้นดินที่ปรับให้เรียบทั้งระดับและผิวหน้าดิน ปูพื้นบ่อด้วยพลาสติกใส เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง โดยปรับความเค็มของน้ำเกลือสินเธาว์ได้ความเค็มประมาณ 220 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solution และ Trace element ตามสูตรอาหาร Modified J/1 (แสดงในภาพที่ 5)

การทดลองทำที่ 4 ระดับ คือ 10, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร ขณะทำการทดลองจะรักษาระดับความลึกของน้ำตามกำหนด โดยการเติมน้ำชดเชยการระเหยของน้ำเลี้ยงสาหร่าย ปริมาตรน้ำเลี้ยงสาหร่ายระดับความลึก 10, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร รวมทั้งหมดประมาณ 702, 1,404, 1,755 และ 2,106 ลิตร ตามลำดับ ให้อากาศจากปั๊มลมผ่านสายยางไปออกที่หัวทราย เพื่อน้ำเลี้ยงสาหร่ายมีการหมุนเวียนตลอดเวลา ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายบ่อละ 4 จุดทั่วบ่อ นับเซลล์จุดละ 3 ครั้ง และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ เมื่อสาหร่ายอยู่ในระยะ Stationary ตามวิธีที่กล่าวถึงใน 1.1.1.

ระดับความลึก 4 ระดับ แบ่งทดลอง 2 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทดลองระดับความลึก 10,20 และ 30 เซนติเมตร

ครั้งที่ 2 ทดลองระดับความลึก 20,25 และ 30 เซนติเมตร

ภาพที่ 5 รูปภาพการทดลองระดับความลึก

1.2. การทดลองระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา

วัตถุประสงค์การทดลอง

- ศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลา แบบการใช้พื้นที่กว้าง แบบเข้ม และ การใช้อากาศผ่านท่อ PVC

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.1. ระบบการเพาะเลี้ยงแบบใช้พื้นที่กว้าง (Extensive culture)

สร้างบ่อดินขนาด 6x6 ตารางเมตร ความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ปูพื้นบ่อด้วยพลาสติกใส บนพื้นดินที่ปรับให้เรียบทั้งระดับและผิวหน้าดิน เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง โดยปรับความเค็มของน้ำเกลือสินเธาว์ได้ความเค็มประมาณ 220 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solution และ Trace element ตามสูตรอาหาร Modified J/1 การทดลองจะรักษาระดับความลึกของน้ำไว้ที่ประมาณ 20 เซนติเมตร โดยการเติมน้ำเพื่อชดเชยการระเหยของน้ำ ปริมาตรน้ำเลี้ยงสาหร่าย รวมทั้งหมดประมาณ 7,200 ลิตร

ในการเติมน้ำต้องดูกระแสลมด้วย เพื่อให้กระแสลมช่วยให้มวลน้ำผสมกันได้ดี ระหว่างที่เติมกับน้ำเลี้ยงสาหร่ายในบ่อ เพราะในการเลี้ยงระบบนี้จะไม่มีเครื่องมือช่วยให้น้ำหมุนเวียนผสมกัน เป็นระบบที่เลี้ยงเพื่อให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด (แสดงในภาพที่ 6)

ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด 25 จุดทั่วบ่อ นับเซลล์จุดละ 3 ครั้ง และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ตลอดช่วงระยะการทดลองเลี้ยง การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทำตามวิธีที่กล่าวใน 1.1.1.

ภาพที่ 6 รูปภาพการทดลองระบบการเพาะเลี้ยงแบบใช้พื้นที่กว้าง (Extensive culture)

1.2.2. ระบบที่ใช้อากาศผ่านท่อ PVC

ดำเนินการสร้างบ่อดินขนาด 25x6 ตารางเมตร ความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ปูพื้นบ่อด้วยพลาสติก บนพื้นบ่อที่ปรับให้เรียบแล้ว ใช้ท่อ PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์ 4 หุน ยาว 4 เมตร จำนวนทั้งหมด 30 ท่อน เจาะรูห่างกันมากพอสมควร ต่อท่อ PVC 30 ท่อน ด้วยข้อต่อ ให้เป็นท่อนยาว 5 ท่อนเท่าๆ กัน นำท่อ PVC ทั้ง 5 ท่อน มาต่อกันด้วยสายยางเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับท่อ PVC ยาวประมาณ 2 เมตร ให้เป็นเส้นเดียว นำลงมาวางเรียงในบ่อทั้ง 5ท่อนยาว ให้ห่างสมดุลกันทั้งบ่อ สามารถจัดโค้งงอตามต้องการได้เพราะข้อต่อแต่ละท่อนยาวเป็นสายยาง และปลายอีกด้านหนึ่งของ PVC ท่อนที่ 5 ที่ยังเปิดให้ปิดด้วยฝาครอบ ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของท่อนที่ 1 ทำการต่อด้วยสายยางกับเครื่องให้อากาศ เครื่องให้อากาศต้องสามารถให้อากาศได้ทั่วถึงทั้งบ่อ เพื่อให้น้ำหมุนเวียนทั้งบ่อ (แสดงในภาพที่ 7,8)

ใช้ถุงพลาสติกบรรจุดิน ถุงละประมาณ 1 กิโลกรัม รัดปากถุงด้วยเชือกฟาง แล้วนำไปรัดติดกับท่อ PVC เพื่อไม่ให้ท่อ PVC ลอยขึ้นบนผิวน้ำ ขณะให้อากาศเพื่อทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมน้ำเกลือสินเธาว์ความเค็มประมาณ 220 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solutionและ Trace element ตามสูตรอาหาร Modified J/1

รักษาระดับความลึกของน้ำประมาณ 20 เซนติเมตร โดยการเติมน้ำชดเชยการระเหยของน้ำ ปริมาตรน้ำเลี้ยงสาหร่ายทั้งหมดประมาณ 30,000 ลิตร ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด 15 จุดทั่วบ่อ นับเซลล์จุดละ 3 ครั้ง และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ตลอดช่วงการทดลอง การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทำตามวิธีที่กล่าวใน 1.1.1.

ภาพที่ 7 รูปภาพการทดลองระบบการเพาะเลี้ยงแบบใช้อากาศผ่านท่อ PVC

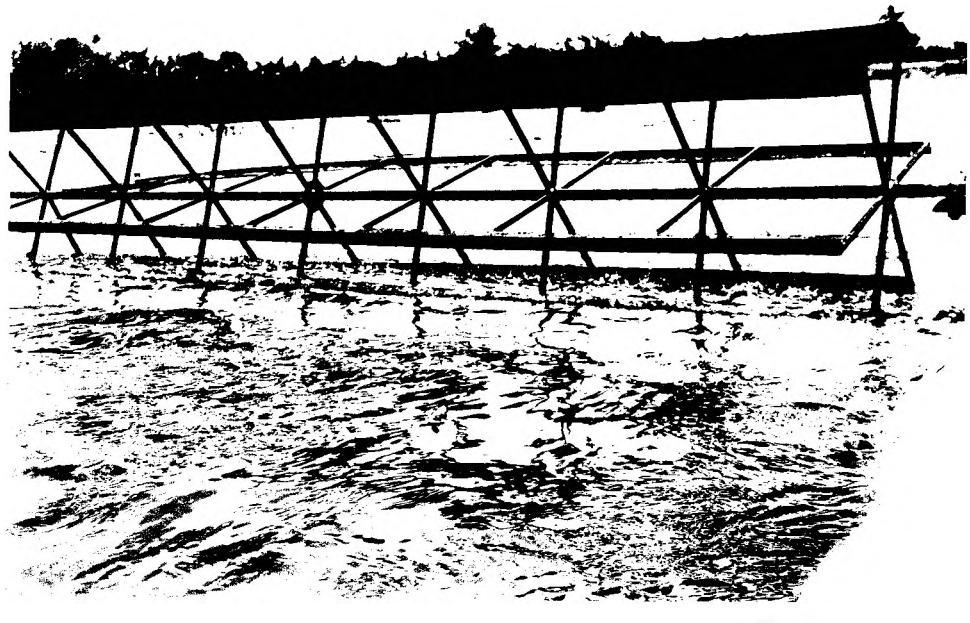
ภาพที่ 8 รูปภาพการทำงานของอากาศผ่านท่อ PVC ช่วยให้น้ำเลี้ยงเกิดการหมุนเวียน

1.2.3. ระบบการเพาะเลี้ยงแบบเข้ม (Intensive cuture)

ดำเนินการสร้างบ่อดินทดลองขนาด 38x15 ตารางเมตร ความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ตัวบ่อเป็นแบบ raceway รูปวงรี มีผนังกั้นกลางทำให้น้ำไหลเวียนได้อย่างต่อเนื่อง มีระบบหมุนเวียนน้ำโดยใช้ใบพัดขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1 แรงม้า และมีอัตราทดรอบของเกียร์ 1:60 ให้อัตราเร็วของการหมุนใบพัดประมาณ 9 รอบต่อนาที อัตราการไหลของน้ำในบ่อประมาณ 0.10 เมตรต่อวินาที พื้นบ่อปูด้วยพลาสติกใส (แสดงในภาพที่ 9,10)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมน้ำเกลือสินเธาว์ความเค็มประมาณ 220 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solutionและ Trace element ตามสูตรอาหาร Modified J/1 รักษาระดับความลึกของน้ำประมาณ 20 เซนติเมตร โดยการเติมน้ำชดเชยการระเหยของน้ำ ปริมาตรน้ำเลี้ยงสาหร่ายทั้งหมดประมาณ 114,000 ลิตร ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด 27 จุดทั่วบ่อ และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ตลอดระยะการทดลองเลี้ยง การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทำตามวิธีที่กล่าวใน 1.1.1.

ภาพที่ 9 รูปภาพการทดลองระบบการเลี้ยงแบบเข้ม (Intensive culture)



ภาพที่ 10 รูปภาพแสดงลักษณะใบพัด และการทำงานเพื่อให้น้ำเลี้ยงหมุนเวียน

2. การทดลองที่ อ. วังสามหมอ จ. อุดรธานี

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2539 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2540

2.1. ระบบการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (Two-step cuture)

วัตถุประสงค์การทดลอง

- เพื่อศึกษาความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในขั้นที่ 2 ของระบบการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน

ขั้นที่ 1. เตรียมเชื้อสาหร่ายตั้งต้น (ใช้พื้นที่บ่อปูน 1 ใน 3 บ่อ ของการทดลองประเมินความคุ้มค่าต่อการลงทุน) เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเกลือสินเธาว์ความเค็มประมาณ 100 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solutionและ Trace element ตามสูตรอาหาร modified J/1 ขณะทำการทดลองชดเชยการระเหยของน้ำ โดยการเติมน้ำจืดเพื่อรักษาระดับความเค็ม ทำการเลี้ยงให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $2x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร (แสดงในภาพที่ 11)

ขั้นที่ 2. เมื่อได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ จึงนำไปเลี้ยงที่ความเค็มประมาณ 200 ppt. ในทันที โดยใช้น้ำเกลือเพิ่มความเค็มและไม่เติมสารอาหารเพิ่ม ทำการทดลองจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างๆ กันคือ $0.5x10^4$, $1x10^4$, $2.5x10^4$, $5x10^4$ และ $10x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร

ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการนับเซลล์การทดลองละ 3 ครั้งทุกวัน และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ตลอดระยะการทดลอง การวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทำตามวิธีที่กล่าวใน 1.1.1.

ภาพที่ 11 รูปภาพการทดลองระบบการเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (ขั้นที่ 1)

2.2. การประเมินความคุ้มค่าต่อการลงทุน

การทดลองในบ่อปูนซีเมนต์ ดำเนินการสร้างบ่อขนาด 12.5 x 5 ตารางเมตร ความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร จำนวน 3 บ่อ เป็นบ่อปูนซีเมนต์ทาทับด้วยสีอีพ็อกซี่สีขาว ตัวบ่อเป็นแบบ raceway รูปวงรี มีผนังกั้นกลางทำให้น้ำไหลเวียนได้อย่างต่อเนื่อง มีระบบหมุนเวียนน้ำโดยใช้ใบพัดขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1 แรงม้า และมีอัตราทดรอบของเกียร์ 1: 60 ให้อัตราเร็วของการหมุนใบพัดประมาณ 9 รอบต่อนาที อัตราการไหลของน้ำในบ่อประมาณ 0.10 เมตรต่อวินาที (แสดงในภาพที่ 12-14)

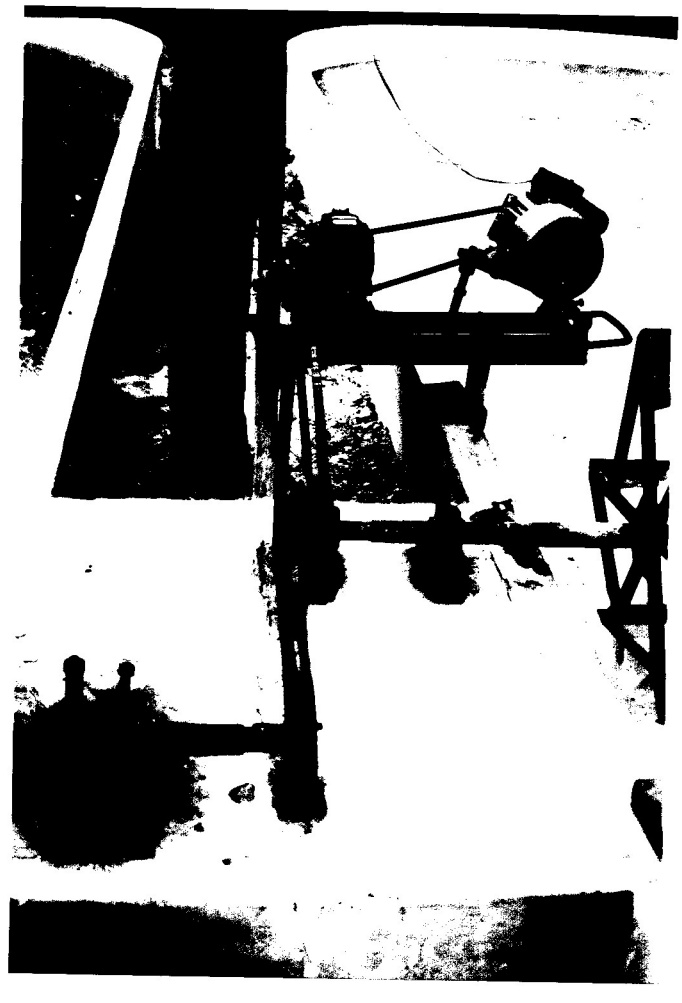
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมน้ำเกลือสินเธาว์ความเค็มประมาณ 220 ppt. เติมสารอาหาร KNO_3 0.5 g/l + KH_2PO_4 0.035 g/l + $NaHCO_3$ 0.043 g/l + Fe-solutionและ Trace element ตามสูตรอาหาร modified J/1 รักษาระดับความลึกของน้ำประมาณ 20-22 เซนติเมตร

โดยการเติมน้ำชดเชยการระเหยของน้ำ ปริมาตรน้ำทั้งหมดประมาณ 12,500 ลิตร ทำการบันทึกปัจจัยสภาพแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง pH อุณหภูมิ ความเค็ม ตรวจวัดการเจริญโดยการนับเซลล์ ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งหมด 4 จุดทั่วบ่อ นับเซลล์จุดละ 3 ครั้ง และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ เมื่อสาหร่ายอยู่ในระยะ Stationary ตามวิธีที่กล่าวใน 1.1.1.

การประเมินผล การรวบรวมค่าใช้จ่ายทั้งหมดจากการทดลอง แบ่งแยกค่าใช้จ่ายออกเป็นประเภทต่างๆ และคิดผลตอบแทนที่ได้ (ผลผลิตxราคาในตลาด) นำข้อมูลตัวเลขมาวิเคราะห์การตัดสินใจเพื่อการลงทุน โดยใช้เกณฑ์การตัดสินใจแบบปรับค่าของเวลา (ประสิทธิ์ ตงยิ่งศิริ, 2540) เกณฑ์ที่เลือกใช้ คือ มูลค่าปัจจุบันสุทธิ (Net present value method หรือ NPV)

ภาพที่ 12 รูปภาพแสดงลักษณะบ่อ raceway รูปวงรี ขนาด 12.5x5x0.3 ลูกบาศก์เมตร การทดลอง เพื่อประเมินความคุ้มค่าต่อการลงทุน

ภาพที่ 13 รูปภาพแสดงลักษณะใบพัดที่ใช้ในการทดลองประเมินความคุ้มค่าต่อการลงทุน



ภาพที่ 14 รูปภาพแสดงอุปกรณ์ที่ช่วยให้ใบพัดหมุนเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำ