

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์

1. หัวเชื้อสไปรูลิना (*Spirulina* sp.)
2. เคย
3. ถังหมักพลาสติกขนาด 6 ลิตร
4. ถังพลาสติกสำหรับทดลองขนาด 5 ลิตร
5. ชุดกรองน้ำสุญญากาศ
6. กระจกครอบ GF/C
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
9. อุปกรณ์ให้อากาศ
10. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตรซาร์รุก

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. การเตรียมอาหารทดลอง

1.1 อาหารอินทรีย์ (น้ำหมักจากเคย) การเตรียมอาหารอินทรีย์ดัดแปลงจากวิธีการของสุวรรณณี ไทยอุดมทรัพย์ (2553)

1.1.1 นำเคยจำนวน 3 กิโลกรัม ไปหมักในถังขนาด 6 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศภายใต้สภาวะธรรมชาติ กลางแจ้ง ใช้อัตราส่วน เคย : น้ำ : น้ำตาลทรายแดง เท่ากับ 1 : 1 : 0.1 (w : v : w)

1.1.2 หมักนาน 30 วัน

1.1.3 เมื่อครบกำหนดกรองน้ำหมักด้วยผ้าขาวบาง น้ำหมักที่ได้เป็นความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

1.1.4 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองต่อไป

1.1.5 เมื่อทำการทดลองจึงทำการเจือจางน้ำหมัก 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมไว้ด้วยน้ำประปาที่พักให้อากาศไว้อย่างน้อย 3 วัน

1.1.6 ทดสอบคุณภาพของน้ำหมักเคย ด้วยวิธีการของ Boyd and Tucker (1992) ได้แก่ ปริมาณไนเตรท ไนไตรท์ แอมโมเนีย และออร์โธฟอสเฟต (น้ำหมักเคย 0.1 %

ประกอบด้วย ไนเตรท ไนไตรท์ แอมโมเนีย และออร์โธฟอสเฟต เท่ากับ 4.76, 0.14, 5.76 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ)

## 2. เตรียมอาหารสูตร Zarrouk

เตรียมสารละลายตั้งต้น (stock solution) ของสารเคมีแต่ละชนิด ในน้ำประปาที่พักให้ อากาศไว้แล้วอย่างน้อย 3 วัน เมื่อต้องการใช้จึงนำมาผสมกันตามปริมาณที่กำหนดจากน้ำหนักสาร ตามสูตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำตามทีระบุในสูตร (ภาคผนวก ข)

## 3. เตรียมอาหารสูตร Zarrouk ดัดแปลง 100 %

อาหารสูตร Zarrouk ดัดแปลง 100% หมายถึง อาหารทดลองที่ใช้ส่วนประกอบหลัก 9 ชนิด ของอาหารสูตร Zarrouk ไม่มีสารละลาย A5 และ B6 (ภาคผนวก ข)

## 4. การเตรียมพันธุ์สไปรูลิน่า

ตัวอย่างสไปรูลิน่าสายพันธุ์ที่นำมาทดลอง คือ *Spirulina* sp. ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Zarrouk (ดัดแปลง) ความเข้มข้น 50% ใช้สไปรูลิน่าในระยะ log phase สำหรับการทดลอง โดยในการทดลองให้มีความหนาแน่นของเซลล์ (Optical density : OD) เริ่มต้น  $0.5 \pm 0.05$  ค่า OD วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm)

## 5. การวางแผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized completely block design, RCBD) ประกอบด้วย 13 ทรีตเมนต์ จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละทรีตเมนต์จะประกอบด้วยอาหารสูตร Zarrouk ดัดแปลง (mZM : modified Zarrouk's Medium) และ น้ำหมักเคย (KF : Krill Fermented Water) โดยมีอาหารสูตร Zarrouk ปกติ เป็นชุดควบคุม ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ชุดควบคุม (อาหารสูตร Zarrouk ปกติ)

ทรีตเมนต์ที่ 2 สูตร Zarrouk ดัดแปลง 100% + น้ำหมัก 0.5%  
(mZM 100% + KF 0.5%)

ทรีตเมนต์ที่ 3 สูตร Zarrouk ดัดแปลง 100% + น้ำหมัก 0.3%  
(mZM 100% + KF 0.3%)

ทรีตเมนต์ที่ 4 สูตร Zarrouk ดัดแปลง 100% + น้ำหมัก 0.1%  
(mZM 100% + KF 0.1%)

ทรีตเมนต์ที่ 5	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 75% + น้ำหมัก 0.5% (mZM 75% + KF 0.5%)
ทรีตเมนต์ที่ 6	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 75% + น้ำหมัก 0.3% (mZM 75% + KF 0.3%)
ทรีตเมนต์ที่ 7	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 75% + น้ำหมัก 0.1% (mZM 75% + KF 0.1%)
ทรีตเมนต์ที่ 8	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 50% + น้ำหมัก 0.5% (mZM 50% + KF 0.5%)
ทรีตเมนต์ที่ 9	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 50% + น้ำหมัก 0.3% (mZM 50% + KF 0.3%)
ทรีตเมนต์ที่ 10	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 50% + น้ำหมัก 0.1% (mZM 50% + KF 0.1%)
ทรีตเมนต์ที่ 11	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 25% + น้ำหมัก 0.5% (mZM 25% + KF 0.5%)
ทรีตเมนต์ที่ 12	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 25% + น้ำหมัก 0.3% (mZM 25% + KF 0.3%)
ทรีตเมนต์ที่ 13	สูตร Zarrouk ดัดแปลง 25% + น้ำหมัก 0.1% (mZM 25% + KF 0.1%)

## 6. วิธีดำเนินการ

ทำการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าความหนาแน่นเริ่มต้น 0.55 (OD, 560<sub>nm</sub>) ปริมาตร 5 ลิตร ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ในสภาวะแสงธรรมชาติ (ภาพที่ 3.1) จนกระทั่งความหนาแน่นสูงที่สุดจึงยุติการทดลอง และทำการเก็บรวบรวมสไปรูลิน่า นำผลผลิตที่ได้ไปอบแห้ง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำสาหร่ายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995) และในระหว่างการทำลองทำการตรวจวัดข้อมูลต่าง ๆ ตามวิธีการของ สุวรรณิ ไทยอุดมทรัพย์ (2553)

6.1 การเจริญเติบโตของสไปรูลิน่า (OD, 560<sub>nm</sub>) ทุกวัน (เวลา 10.00 น.)

6.2 อุณหภูมิอากาศและน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และความเข้มแสงทุกวัน (ในเวลา 12.00 น.)

6.3 วัดปริมาณ chlorophyll a, carotenoids (Parsons et al., 1984) และ phycocyanin (Evans, 1988)



ภาพที่ 3.1 การทดลองเลี้ยงสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) ด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาวะแสงธรรมชาติ

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์ด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี