บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. หัวเชื้อสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.)
2. เคยสด (krill : *Acetes* sp.)
3. ตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
4. ถังพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า ขนาด 5 ลิตร
5. ถังพลาสติกสำหรับทำการหมักน้ำ ขนาด 10 และ 20 ลิตร
6. ผ้าขาวบาง
7. กระดาษกรอง GF/C
8. ผ้ากรองขนาด 40 ไมครอน
9. ชุดกรองน้ำสุญญากาศ
10. เครื่องวัดแสง (luxmeter)
11. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
12. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
15. อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ เครื่องให้อากาศ สายอากาศ หัวทราย เป็นต้น
16. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตรซาร์รุค สารเคมีสำหรับวิเคราะห์รงควัตถุ และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอาหารทดลอง

1.1 น้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (FSAP : fermentation from sludge in the aquaculture pond) ดัดแปลงจากวิธีการของศิริพร ชูเชิด และคนอื่น ๆ (2553 : 28) โดยนำตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่ถูกทำให้แห้งแล้วมาหมักรวมกับน้ำประปาในอัตราส่วน 1 : 10 (น้ำหนัก : ปริมาตร) ในถังขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระหว่างทำการหมักหมั่นคนเป็นครั้งคราว จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางแล้วไปต้มเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แบ่งส่วนหนึ่งสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (total N)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ด้วยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 1995 อ้างถึงใน สุวรรณี ไทยอุดมทรัพย์, 2553 : 128) ปริมาณฟอสฟอรัส (P_2O_5) ด้วยวิธี spectrophotometer (เสาวณี หนูรักษา, 2546 : 26) สวนที่เหลือเมื่อจะทำการทดลองจึงทำการเจือจางด้วยน้ำประปาที่พักให้อากาศไว้อย่างน้อย 3 วัน ให้มีความเข้มข้นตามที่กำหนด

1.2 น้ำหมักเคย (KFW : krill fermented water) ดัดแปลงจากวิธีการของสุวรรณี ไทยอุดมทรัพย์ (2553 : 16)

นำเคยสดที่ได้มาจากชาวประมงชายฝั่งสมุทรปราการมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปหมักในถังพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 10 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศภายใต้สภาวะธรรมชาติ ใช้อัตราส่วน เคยสด : น้ำ : น้ำตาลทรายแดง เท่ากับ 1 : 1 : 0.1 (น้ำหนัก : ปริมาตร : น้ำหนัก) เป็นเวลา 30 วัน ระหว่างทำการหมักหมั่นคนเป็นครั้งคราว เมื่อครบกำหนดนำน้ำหมักมากรองผ่านผ้าขาวบาง (เคยสดที่ใช้ในการหมัก 3 ลิตร จะได้น้ำหมักปริมาตร 4.2 ลิตร) แบ่งส่วนหนึ่งสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารเช่นเดียวกับน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่วนที่เหลือนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารการทดลองต่อไป เมื่อจะทำการทดลองจึงทำการเจือจางน้ำหมักที่เตรียมไว้ด้วยน้ำประปาที่พักให้อากาศไว้อย่างน้อย 3 วัน ให้มีความเข้มข้นตามที่กำหนด

ปริมาณธาตุอาหารที่มีในน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ และน้ำหมักเคยความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณธาตุอาหารของน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำและน้ำหมักเคย ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของน้ำหมัก	ปริมาณธาตุอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	
	ไนโตรเจนรวม (total N)	ฟอสฟอรัส (P_2O_5)
น้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ	1.61	0.32
น้ำหมักเคย	1.76	0.35

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1.3 อาหารสูตรซาร์รุค (Zarrouk's medium) เตรียมชั่งสารเคมีตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ในภาคผนวก ก. ละลายในน้ำประปาที่พักให้อากาศไว้แล้วอย่างน้อย 3 วัน

1.4 หัวเชื้อสไปรูลิน่า เตรียมโดยทำการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าในอาหารสูตรซาร์รุคดัดแปลง (ไม่เติมสารละลาย A5 และ B6) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสไปรูลิน่าเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase จึงทำมาใช้สำหรับการทดลอง

2. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 2 การทดลอง ทุกการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD : completely randomized design) มีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การทดลองประกอบด้วย

2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานิน ของสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำในสัดส่วนที่แตกต่างกัน มี 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตรซาร์รุค (สูตรควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 FSAP 10 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 3 FSAP 15 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 4 FSAP 20 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 5 FSAP 25 เปอร์เซ็นต์

2.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานิน ของสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (จากการทดลองที่ 1) ผสมน้ำหมักเคยในสัดส่วนที่แตกต่างกัน มี 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตรซาร์รุค (สูตรควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 FSAP + KFW 0.1 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 3 FSAP + KFW 0.3 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 4 FSAP + KFW 0.5 เปอร์เซ็นต์
ชุดการทดลองที่ 5 FSAP + KFW 0.7 เปอร์เซ็นต์

3. วิธีดำเนินการ

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานิน ของสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงสไปรูลิน่าในน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำความเข้มข้น 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรซาร์รุค ในถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร ให้ความหนาแน่นเซลล์ (OD, 560nm) เริ่มต้นใกล้เคียงกัน ปริมาตรรวม 4 ลิตร ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (โดยใส่น้ำหมักตามปริมาตรที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลองลงในถังพลาสติก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำประปาตามปริมาตรที่คำนวณไว้ แล้วจึงเติมหัวเชื้อสไปรูลิน่า ทั้งนี้ปริมาตรรวมในแต่ละถังที่ทำการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 ลิตร) ให้อากาศในถังเลี้ยงผ่านหัวทรายถังละ 1 หัว ตลอดการทดลองเป็นเวลา 10 วัน ตามวิธีการของ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ณัฐพร จันทร์ฉาย และจุฑารัตน์ สนธิรอด (2561 : 197) ให้แสงสว่างตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ ความเข้มแสง 3,800-4,000 ลักซ์ วัดด้วยเครื่องวัดความเข้มแสง ในระหว่างทำการทดลองดำเนินการดังต่อไปนี้

3.1.1 ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยวัดความหนาแน่นเซลล์ (OD, 560nm) โดยสุ่มตัวอย่างจากถังเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า จำนวน 3 ซ้ำ มาวัดค่าความหนาแน่นเซลล์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร วันละ 1 ครั้ง ระหว่างเวลา 11.00-12.00 น.

3.1.2 วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง คลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ (Parsons, et al., 1984 อ้างถึงใน สุวรรณี ไทยอุดมทรัพย์, 2553 : 126) และไฟโคไซยานิน (Evans, 1988 อ้างถึงใน สุวรรณี ไทยอุดมทรัพย์, 2553 : 127) ในวันที่ 5 และวันที่ 10 ของการทดลอง และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995 อ้างถึงใน สุวรรณี ไทยอุดมทรัพย์, 2553 : 128) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาคผนวก ข.) แต่ละพารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์ จะทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

3.1.3 ตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ และความเป็นกรดเป็นด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง วันละ 1 ครั้ง ระหว่างเวลา 11.00 - 12.00 น.

3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานิน ของสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ผสมน้ำหมักเคยในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงสไปรูลิน่าในน้ำหมักเคยความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำหมักตะกอนของเสียจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำที่ได้จากการทดลองที่ 1 และอาหารสูตรซาร์รุค ซึ่งดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ประกอบด้วย ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณไฟโคไซยานิน และปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี