บทที่ 3
วิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ทำการทดลอง

1 กระดาษกรอง

2 กระบอกตวง

3 กล้องจุลทรรศน์

4 ขวดก้นแบน

5 ขวด BOD

6 เครื่องกลั่น

7 เครื่องย่อยเยื่อใย

8 เครื่องย่อยอาหาร

9 เครื่อง pH meter

10 เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

11 เครื่อง sonicator

12 เครื่อง spectrophotometer รุ่น DR/4000U version 2.4

13 เครื่อง water bath

14 เครื่อง vacuum pump

15 เครื่อง vortex

16 ตาชั่งไฟฟ้า

18 ตู้กระจกขนาด 15 × 24 × 15 นิ้ว

19 ตู้อบ

20 โถดูดความชื้น (desiccator)

21 น้ำกลั่น

22 บิกเกอร์

23 บ่อซีเมนต์ receway pond ขนาด 1.6 × 3.4 × 0.6 เมตร

24 บิวเรต

25 ปั๊มลม

26 ปิเปต

27 สายออกซิเจน

28 สารเคมีในการวิเคราะห์ ß- carotene

29 หลอดไฟฟ้า

30 หัวทราย

31 โหลแก้ว

32 หัวเชื้อสาหร่าย *Oscillatoria* sp.

33 อุปกรณ์เครื่องตีน้ำ

34 Erlenmeyer flask

35 Kjeldahl flask

36 Thermometer

สารเคมี

1 ปุ๋ยมูลไก่

2 ปุ๋ยสูตร N : P : K (16:16:16)

3 ปุ๋ยสูตร N : P : K (46:0:0)

4 $CuSO_4$

5 Diethyl Ether

6 Ethanol

7 Glycerol

8 HCL

9 H_2SO_4

10 KH_2PO_4

11 KOH

12 K_2HPO_4

13 K_2SO_4

14 $MgSO_4$

15 NaCl

16 $NaHCO_3$

17 NaOH

18 $NaNO_3$

19 NaN_3

20 Na_2 EDTA

21 Na_2HPO_4

22 Na_2SO_4

23 $Na_2S_2O_3$ $5H_2O$

24 NH_4Cl

25 $(NH_4)_6$ MO_7 $4H_2$

26 Phenol

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

หัวเชื้อสาหร่าย *Oscillatoria* sp. โดยมีลักษณะแต่ละเส้นสายไม่แตกแขนง เซลล์เรียงแถวต่อเป็นสาย ทรัยโคมสานกันอย่างหลวมๆ เซลล์ปลายสุดมีลักษณะกลมมน ทรัยโคมเป็นเส้นตรง โดยมีความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย เส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ 1.5 - 2 ไมครอน ความยาวเซลล์ 2.5 - 3.2 ไมครอน ไม่มีรอยคอดที่ผนังกั้นเซลล์ ซึ่งบางมากจนเกือบมองไม่เห็น ซึ่งมีเม็ดเล็กๆ เรียงกันเป็นแถวภายในเซลล์ จากคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Zarrouk's ปรับปรุง จาก (จงกล และขจรเกียรติ์, 2548) เป็น stock culture ใส่หัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซนต์โดยปรับ pH อยู่ที่ 10 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ด้วยหลอดไฟสีขาวที่ความเข้มข้นประมาณ 5,000 ลักซ์

2 การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในห้องปฏิบัติการ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randommized design; CRD) โดยทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยมีการปรับ pH อยู่ที่ 10 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงสว่างอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟเรืองแสงสีขาวที่ ความเข้มข้นประมาณ 5,000 ลักซ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 หน่วยทดลอง แต่ละหน่วยทดลองแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ ดังนี้

หน่วยทดลองที่ 1 หมายถึง อาหารสูตรที่ 1
หน่วยทดลองที่ 2 หมายถึง อาหารสูตรที่ 2
หน่วยทดลองที่ 3 หมายถึง อาหารสูตรที่ 3
หน่วยทดลองที่ 4 หมายถึง อาหารสูตรที่ 4

ตาราง 2 สูตรอาหารที่แตกต่างกันใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. (กรัมต่อลิตร)

สารอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
ปุ๋ยนา N : P : K (16:16:16)	0.6	0.6	0.6	-
ปุ๋ย Urea N : P : K (46:0:0)	1	-	-	-
ปุ๋ยมูลไก่	-	10	-	-
Na_2HCO_3	-	-	1	2
NaCl	-	-	-	1
$MgSO_4$	-	-	-	1

หมายเหตุ ปุ๋ยมูลไก่หมักนาน 3 สัปดาห์ อัตราการหมัก (ตอนหมัก มูลไก่ 1 : น้ำ 5) แล้วกรองนำมาเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. (เปอร์เซ็นต์)

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร แต่ละสูตรด้วยปริมาตร 8 ลิตร ภายในโหลแก้วขนาด 10 ลิตร ทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน ณ ห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

2.1 การวัดค่าการเจริญเติบโต

2.1.1 การหาความหนาแน่นของเซลล์ (OD optical density) โดยการนำน้ำเลี้ยงสาหร่ายมาใส่หลอด จากนั้นทำการวัดความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ค่า optical density OD เท่ากับ 0.01 โดยวัดจากเครื่อง Spectrophotometer รุ่น DR/4000U version 2.42 ที่ค่า (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร

2.1.2 การหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) นำเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาใส่ในชุดกรองเมมเบรน (Millipore) กรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ที่ทำจากไนโตรเซลลูโลส ต่อชุดกรองเข้ากับเครื่อง vacuum pump

เพื่อดึงน้ำเลี้ยงออกเหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนเยื่อกรอง นำเซลล์สาหร่ายอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator)

2.2 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ ด้านกายภาพ และเคมี

โดยทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ด้านกายภาพ และเคมี ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ, อุณหภูมิอากาศ, DO, pH, NH_3-N, NO_3-N และ PO_4-P ตามวิธีของ (ศิริเพ็ญ, 2543; สมศักดิ์ และสุฤทธิ์, ม.ป.ป.)

2.3 การวิเคราะห์คุณค่าโภชนาการ การตรวจวัดหาปริมาณ รงควัตถุสารสี

โดยทำการวิเคราะห์คุณค่าโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ (นิวุฒิ, 2549) และการตรวจวัดหาปริมาณกรดไขมัน (Fatty acid) ตามวิธีของ (AOAC, 2001)

โดยทำการวิเคราะห์ตรวจวัดหาปริมาณรงควัตถุสารสี ได้แก่ การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์รวม ตามวิธีของ (Sommer *et al.*, 1992), การสกัด และการตรวจวัดหาปริมาณ C - phycocyanin ดัดแปลงจากตามวิธีของ (Silveira *et al.*, 2007) และการสกัด และการตรวจวัดหาปริมาณ ß - caroten ตามวิธีของ (Britton, 2005)

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไมโครซิสติน (Microcystin)

โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มสารพิษ ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณไมโครซิสติน (microcystin) ดัดแปลงจากตามวิธีของ (Harri *et al.*, 2005)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าต่างๆ ในข้อ 2.1 - 2.4 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิเคราะห์ one-way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Duncan's new multiple โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3 การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในบ่อกลางแจ้ง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randommized design; CRD) โดยทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ได้จากการทดลองที่ 1 เป็นสูตรอาหารที่สาหร่ายเจริญเติบโต คุณค่าทางโภชนาการ และรงควัตถุสารสีสูง มาทำการทดลองที่ 2 จากการทดลองที่ 1 สรุปได้ว่าสูตรอาหารสูตรที่ 3 และสูตรอาหารสูตรที่ 4 มีการเจริญเติบโต คุณค่าทางโภชนาการ และรงควัตถุสารสีสูง จึงทำการทดลอง โดยปรับ pH อยู่ที่ 10 ให้อากาศอย่างต่อเนื่องโดยใช้ใบพัดตีน้ำตลอดเวลา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 หน่วยทดลอง แต่ละหน่วยทดลองแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ ดังนี้

หน่วยทดลองที่ 1 หมายถึง สูตรอาหารสูตรที่ 3

หน่วยทดลองที่ 2 หมายถึง สูตรอาหารสูตรที่ 4

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร แต่ละสูตรด้วยปริมาตร 500 ลิตร ภายในถังพลาสติกสีดำขนาด 800 ลิตร ทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน ณ ฐานเรียนรู้สาหร่ายและแพลงก์ตอน คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

3.1 การวัดค่าการเจริญเติบโต

3.1.1 การหาความหนาแน่นของเซลล์ (OD optical density) โดยการนำน้ำเลี้ยงสาหร่ายมาใส่หลอด จากนั้นทำการวัดความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ค่า optical density OD เท่ากับ 0.01 โดยวัดจากเครื่อง Spectrophotometer รุ่น DR/4000U version 2.42 ที่ค่า (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร

3.1.2 การหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) นำเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาใส่ในชุดกรองเมมเบรน (Millipore) กรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ที่ทำจากไนโตรเซลลูโลส ต่อชุดกรองเข้ากับเครื่อง vacuum pump เพื่อดึงน้ำเลี้ยงออกเหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนเยื่อกรอง นำเซลล์สาหร่ายอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator)

3.2 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ ด้านกายภาพ และเคมี

โดยทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ด้านกายภาพ และเคมี ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ, อุณหภูมิอากาศ, DO, pH, NH_3-N, NO_3-N และ PO_4-P ตามวิธีของ (ศิริเพ็ญ, 2543; สมศักดิ์ และ สุฤทธิ์, ม.ป.ป.)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าต่างๆ ในข้อ 3.1 - 3.2 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิเคราะห์ one-way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย T-test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

4 การนำสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ไปเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์

นำสาหร่าย *Oscillatoria* sp. โดยคัดเลือกเลี้ยงในสูตรอาหารที่ดีที่สุดในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งพิจารณาร่วมกับ การเจริญเติบโต คุณภาพน้ำด้านกายภาพ และเคมี โดยนำไปเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ receway pond ขนาด 1.6 × 3.4 × 0.6 เมตร เพื่อเลี้ยงในเชิงพาณิชย์