บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอนคือ

ตอนที่ 1. ศึกษาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลนาที่เลี้ยงในจังหวัด สงขลา นครศรีธรรมราช ตรัง พังงา พิจิตร และ กรุงเทพมหานคร จำนวน 10 แห่ง ในลักษณะต่อไปนี้

1. โรงเรือน และ ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง
2. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง
3. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง
4. เทคนิคการเก็บเกี่ยวและผลผลิต
5. การเก็บรักษาสาหร่ายสดก่อนถึงผู้บริโภค

วิธีการเก็บข้อมูล

1. ออกแบบสัมภาษณ์
2. สำรวจแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลนาในจังหวัดที่กำหนด
3. สัมภาษณ์เกษตรกรที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นรายบุคคล
4. จดบันทึก ถ่ายภาพ
5. สรุปผลจากการสัมภาษณ์ ประเมินผลที่ได้

ตอนที่ 2. ศึกษาคุณภาพผลิตภัณฑ์สาหร่ายสไปรูไลนาสดที่ผลิตจากแหล่งสำรวจ โดยนำมาตรวจสอบวิเคราะห์ ดังนี้

1. วิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา ได้แก่

1.1 ตรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ มีวิธีการดังนี้

นำสาหร่ายที่ได้จากแหล่งเพาะเลี้ยงมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบวัดขนาดรูปร่างของสาหร่าย วัสดุที่ปนเปื้อน บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

1.2 Viable Count ของแบคทีเรีย หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Aerobic plate count) โดยมีวิธีการดังนี้

ตัวอย่าง 50±0.1 กรัม + สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450

↓

ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที

↓

เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10^2,10^3

↓

ปิเปตต์ใส่จานเพาะเลี้ยงจานละ 1 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นละ 3 จาน

↓

เทอาหาร PCA 12-15 มิลลิลิตร

↓

บ่ม 48±2 ชั่วโมง,35 ±1องศาเซลเซียส

↓

นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี

↓

คำนวณรายงานผลเป็น CFU/g

ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.3 รา ตรวจสอบโดยวิธี AOAC 1990

วิธีการตรวจสอบ

เจือจางตัวอย่างอาหาร

↓

ปิเปตต์ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะ

1 ตัวอย่างทำ 3 จาน

↓

เทอาหาร PDA ที่มีกรดทาร์ทาริก

(อาหาร 100 มิลลิลิตร,กรดทาร์ทาริก 1.1 มิลลิลิตร)

บ่มจานเพาะเลี้ยง 2-5 วัน.30 องศาเซลเซียส

↓

นับจำนวนโคโลนี คำนวณเป็น CFU/g

ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการตรวจสอบหาเชื้อรา

1.4 Coliforms Fecal coliform

1.5 *Escherichia coli* ใช้วิธี MPN,3:3:3 (Multiple tubes) ดังภาพที่ 3-3

ตัวอย่าง 50±0.1 กรัม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450มิลลิลิตร

ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน 1-2 นาที

↓

เจือจางตัวอย่างเป็น 10^2,10^3 ปิเปตต์ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากแต่ละความเข้มข้นใส่ใน

อาหาร Lauryl tryptose broth (LTB)

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีแก๊ส 1 loop ลงในอาหาร EC broth

บ่มที่ 44.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

เลือกหลอดที่สร้างแก๊ส ถ่ายเชื้อ 1 loop มา streak บนอาหาร L-EMB agar

บ่มที่35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

เลือกโคโลนีที่มีสีดำกลางโคโลนี ทั้งที่มีหรือไม่มี metallic sheen

บันทึกผลและต่อเชื้อลงใน PCA slant หรือ NA slant

บ่มที่35±0.1 องศาเซลเซียส นาน 18 -24 ชั่วโมง

↓

นำไปทดสอบทางชีวเคมี

คำนวณปริมาณ *E.coli* MPN/g จากจำนวนหลอดอาหาร EC ที่ให้ผลบวก

ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการตรวจสอบ *Escherichia coli*

1.6 *Staphylococcus aureus* มีขั้นตอนตามภาพที่ 3-4

เตรียมตัวอย่างอาหารมีความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2} ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.2

↓

ดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละความเข้มข้น ใส่จานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร Baird Parber medium เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายผิวหน้าอาหาร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

↓

ตรวจโคโลนีลักษณะเฉพาะ(โคโลนีสีดำ ขอบขาว แววใส รอบโคโลนีมีบริเวณใส)

↓

ถ่ายเชื้อที่คาดว่าเป็น *S. aureus* ลงในอาหาร BHI บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

Coagulae test

0.1 มิลลิลิตร ของ broth culture + rabbit plasma 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 4,4+2 ชั่วโมง

↓

Clot formation

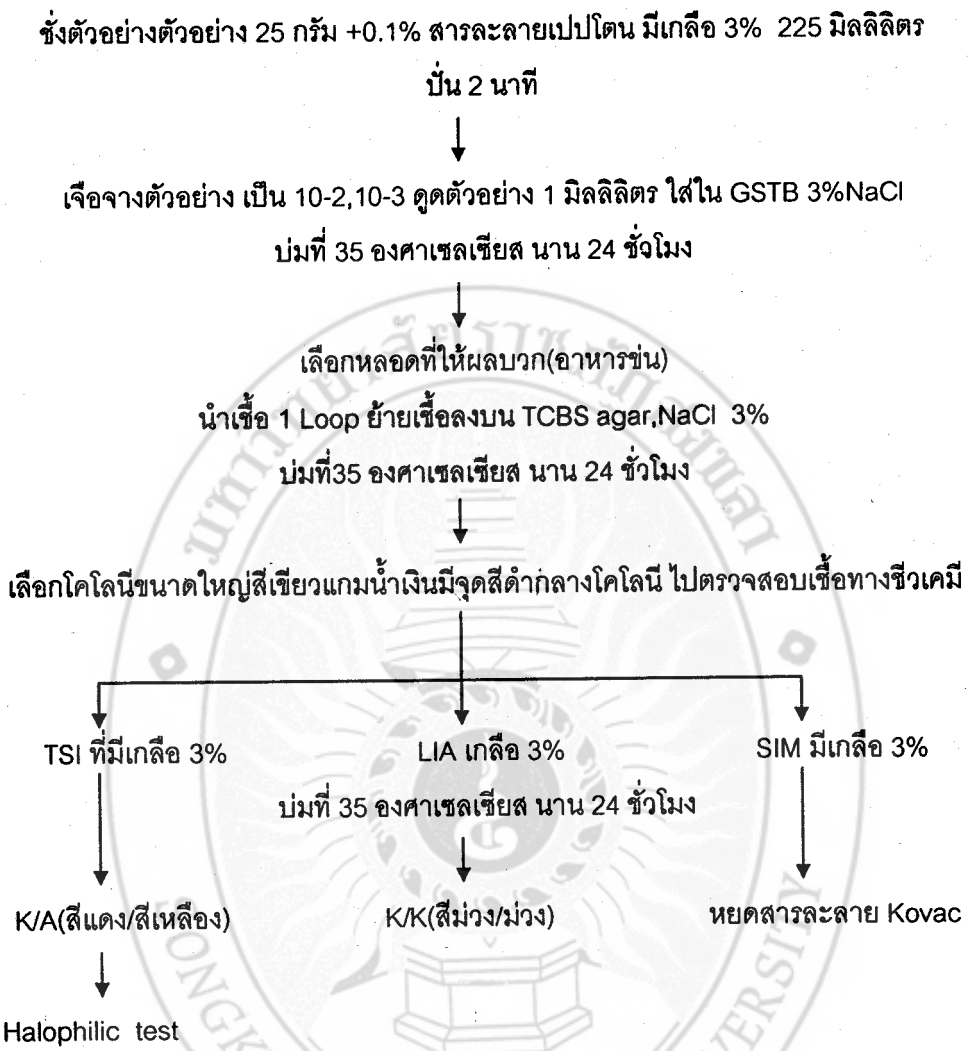
↓

S. aureus รายงานผล *S. aureus*/กรัม ตัวอย่าง

กรณี มี Clot formation เกิดขึ้นบ้าง นำไปตรวจยืนยันโดยการตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีและตรวจดูรูปร่างเซลล์

ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการตรวจสอบ *S. aureus*

1.7 *Vibrio parahaemolyticus* วิธี MPN 3:3:3 series มีขั้นตอนตามภาพที่ 3-5



1% เปปโตน เกลือ 0% ผล ลบ (ไม่ขุ่น)

1% เปปโตน เกลือ 3% ผล บวก (ขุ่น)

1% เปปโตน เกลือ 6% ผล บวก (ขุ่น)

1% เปปโตน เกลือ 8% ผล บวก (ขุ่น)

1% เปปโตน เกลือ 10% ผล ลบ (ไม่ขุ่น)

ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus*

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2. วิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่
   2.1 เถ้า
   2.2 โปรตีน
   2.3 ลิปิด
   2.4 คาร์โบไฮเดรต
   2.5 ความชื้น
   2.6 คลอโรฟิลล์
   2.7 ไฟโคไซยานิน
   2.8 วิตามิน วิเคราะห์ เบต้าแคโรทีน
   2.9 โลหะหนัก ได้แก่ ตะกั่ว และ แคดเมียม
   2.10 แร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม และ เหล็ก
3. การประเมินทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัส

ตอนที่ 3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้สูตรอาหารแตกต่างกัน 5 ตำรับการทดลอง ตำรับการทดลองละ 3 ซ้ำ ได้แก่

สูตรที่ 1 ใช้สูตรดัดแปลงมาจากสูตร ธิดา 2546 ประกอบด้วยสารประกอบดังนี้

สูตร 9 ตัว โดยใช้ปุ๋ยชนิดการค้า ได้แก่

การเตรียมอาหาร 1 ตัน (1000 ลิตร)

$NaHCO_3$	5,160 g
$NaNO_3$	835
K_2HPO_4 หรือ Na_2HPO_4	250
K_2SO_4	300
NaCl	3,335
$MgSO_4.7H_2O$	100
$CaCl_2$	20
$FeSO_4.7H_2O$	5
$Na_2EDTA.2H_2O$	40

2
579.8
ส 25ศ
151400
11 ก.พ. 2551

สูตรที่ 2 ใช้สารประกอบเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 แต่ใช้สารเคมีเป็นประเภทสารเคมีวิเคราะห์

สูตร 3 ตัว

อาหาร 1 ตัน

$NaNO_3$	835 g
K_2HPO_4 หรือ Na_2HPO_4	250
$NaHCO_3$	5,162
NaCl	3,335

สูตรที่ 4 ใช้ปุ๋ยอินทรีย์

เตรียมอาหาร 1 ตัน	กรัม
ปุ๋ยอินทรีย์	1,970
เกลือแกงเม็ด	3,335
$NaHCO_3$	5,162

สูตรที่ 5 ปุ๋ยอนินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตร

เตรียม 1 ตัน	กรัม
ทวินเฟอร์ตี้ 21-21-21	1,970
เกลือแกงเม็ด	3,335
$NaHCO_3$	5,162

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เก็บผลผลิต โดยการชั่งน้ำหนักผลผลิต นำมาวิเคราะห์หาสารอาหาร ได้แก่ เถ้า โปรตีน ลิปิด คาร์โบไฮเดรต ความชื้น คลอโรฟิลล์ ไฟโคไซยานิน เบต้าแคโรทีน ตะกั่ว แคดเมียม แคลเซียม เหล็ก

ตอนที่ 4 ศึกษาทดลองการล้างสาหร่าย แบ่งออกดังนี้

1. การล้างสาหร่ายแบบให้น้ำไหลผ่าน โดยกำหนดออกเป็น เวลา 4 ตำรับการทดลอง คือ 15, 30, 60 และ 120 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำ 1 ครั้ง นำน้ำที่ผ่านการล้างครั้งสุดท้ายไปวิเคราะห์ ค่า แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ และฟอสเฟต

2. การล้างสาหร่ายโดยให้อยู่ในน้ำปริมาณมาก ดังนี้

ใช้น้ำหนักสาหร่าย 50 กรัม/ปริมาณน้ำ 2 , 4, 6 และ8 ลิตร เป็นเวลา 15 30 และ 60 นาที หลังจากแช่สาหร่ายตามตำรับการทดลองที่กำหนด ทำการล้างสาหร่ายอีกครั้ง นำน้ำที่ได้มาวิเคราะห์ ค่า แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ และฟอสเฟต

ตอนที่ 5 ประเมินผลที่ได้จากการสำรวจ ตอนที่ 1 และที่ 2 นำมาออกแบบเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และจัดสร้างเครื่องมือ โดยมีวิธีการดังนี้

1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตอนที่ 1 และ ตอนที่ 2

2 ออกแบบเครื่องมือ ได้แก่

2.1 โรงเรือนที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.2 บ่อเพาะเลี้ยง

2.3 เครื่องเก็บสาหร่าย

2.4 เครื่องล้างสาหร่าย

3. เขียนแบบและจัดสร้างเครื่องมือ

4. ทดสอบเครื่องมือโดยการเพาะเลี้ยงใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองในตอนที่ 3

5. เก็บผลผลิต โดยการชั่งน้ำหนักสด

6. นำผลผลิตมาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 3

7. ทดสอบเครื่องมือล้างสาหร่าย ตรวจสอบโดยวิเคราะห์ ค่า แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ และฟอสเฟต

ตอนที่ 6 ศึกษาทดลองการเก็บรักษาสาหร่าย โดยใช้ประสาทสัมผัส มีวิธีการดังนี้

1. ทดลองเก็บรักษาสาหร่าย 3 ตำรับการทดลอง ได้แก่ เก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เก็บรักษาในตู้เย็นช่องแช่แข็ง และ เก็บในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 วัน

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของสาหร่ายทุกๆวัน ติดต่อกัน เป็นเวลา 10 วัน โดยใช้ผู้ตรวจสอบ จำนวน 5 ท่าน

3. ตรวจสอบคุณสมบัติ ในลักษณะ 4 ประการ คือ สี กลิ่น รส และ เนื้อสัมผัส

4. นำข้อมูลมาวิเคราะห์และ ประเมินผล