

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอนคือ

ตอนที่ 1. ศึกษาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนาที่เลี้ยงในจังหวัด สงขลา นครศรีธรรมราช ตรัง พังงา พิจิตร และกรุงเทพมหานคร จำนวน 10 แห่ง ในลักษณะต่อไปนี้

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

วิธีการเก็บข้อมูล

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

ตอนที่ 2. ศึกษาคุณภาพผลิตภัณฑ์สาหร่ายสไปรูลีนาสดที่ผลิตจากแหล่งสำรวจ โดยนำมาตรวจสอบวิเคราะห์ ดังนี้

1. วิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา ได้แก่
  - 1.1 ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ มีวิธีการดังนี้  
นำสาหร่ายที่ได้จากแหล่งเพาะเลี้ยงมาสองด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบ  
วัดขนาดรูปร่างของสาหร่าย วัสดุที่ปนเปื้อน บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป
  - 1.2 Viable Count ของแบคทีเรีย หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Aerobic plate count) โดยมีวิธีการดังนี้

ตัวอย่าง  $50 \pm 0.1$  กรัม + สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450



ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที



เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น  $10^2, 10^3$



ปิเปตใส่จานเพาะเลี้ยงจานละ 1 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นละ 3 จาน



เทอาหาร PCA 12-15 มิลลิลิตร



บ่ม  $48 \pm 2$  ชั่วโมง,  $35 \pm 1$  องศาเซลเซียส



นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี



คำนวณรายงานผลเป็น CFU/g

ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.3 ภา ตรวจสอบโดยวิธี AOAC 1990

วิธีการตรวจสอบ

เจาะจางตัวอย่างอาหาร



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  $50 \pm 0.1$  กรัม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450 มิลลิลิตร

ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน 1-2 นาที



เจือจางตัวอย่างเป็น  $10^2, 10^3$  ปีเปตต์ตัวอย่าง 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

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



เลือกโคโลนีที่มีสีดำกลางโคโลนี ทั้งที่มีหรือไม่มี metallic sheen

บันทึกผลและต่อเชื้อลงใน PCA slant หรือ NA slant

บ่มที่  $35 \pm 0.1$  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 ใส่จานเพาะเลี้ยงที่มี  
อาหาร Baird Parber medium เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายผิวหน้าอาหาร

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง



ตรวจโคโลนีลักษณะเฉพาะ(โคโลนีสีดำ ขอบขาว แฉกใส รอบโคโลนีมีบริเวณใส)



ถ่ายเชื้อที่คาดว่า เป็น *S. aureus* ลงในอาหาร BHI

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



Coagulase test

0.1 มิลลิลิตร ของ broth culture + rabbit plasma 0.3 มิลลิลิตร

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 4,4+2 ชั่วโมง



Clot formation

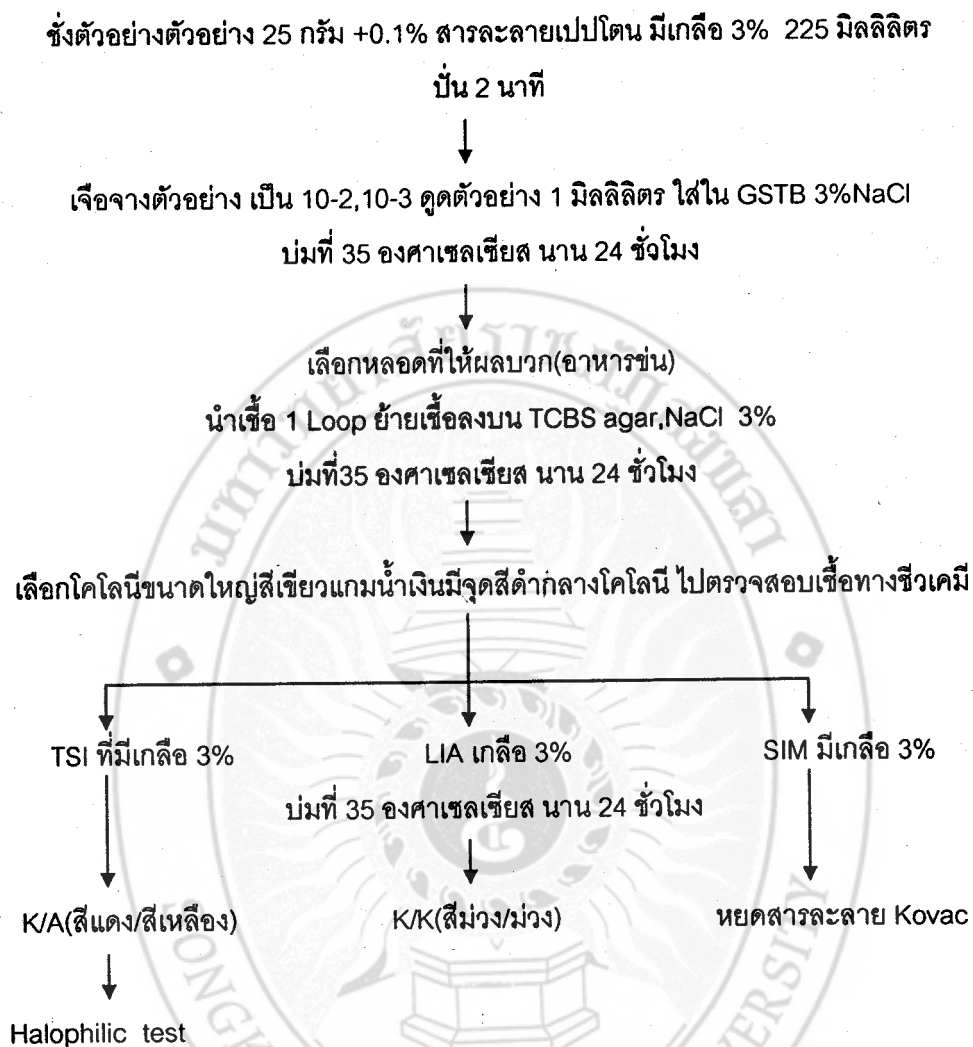


*S. aureus* รายงานผล *S. aureus*/กรัม ตัวอย่าง

กรณี มี Clot formation เกิดขึ้นบ้าง นำไปตรวจยืนยันโดยการตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์  
โดยย้อมสีและตรวจดูรูปร่างเซลล์

ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการตรวจสอบ *S. aureus*

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



- 1% เปปโติน เกลือ 0% ผล ลบ (ไม่ขุ่น)
- 1% เปปโติน เกลือ 3% ผล บวก (ขุ่น)
- 1% เปปโติน เกลือ 6% ผล บวก (ขุ่น)
- 1% เปปโติน เกลือ 8% ผล บวก (ขุ่น)
- 1% เปปโติน เกลือ 10% ผล ลบ (ไม่ขุ่น)

ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus*



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 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้สูตรอาหาร  
 แตกต่างกัน 5 ตำรับการทดลอง ตำรับการทดลองละ 3 ซ้ำ ได้แก่

สูตรที่ 1 ใช้สูตรดัดแปลงมาจากสูตร ธิดา 2546 ประกอบด้วยสารประกอบดังนี้  
 สูตร 9 ตัว โดยใช้หน่วยการค่า ได้แก่

การเตรียมอาหาร 1 ตัน (1000 ลิตร)

NaHCO <sub>3</sub>	5,160 g
NaNO <sub>3</sub>	835
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> หรือ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	300
NaCl	3,335
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub>	20
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	40

สูตรที่ 2 ใช้สารประกอบเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 แต่ใช้สารเคมีเป็นประเภทสารเคมี

วิเคราะห์

สูตร 3 ตัว

อาหาร 1 ตัน

$\text{NaNO}_3$	835 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	250
$\text{NaHCO}_3$	5,162
$\text{NaCl}$	3,335

สูตรที่ 4 ใช้ปุ๋ยอินทรีย์

เตรียมอาหาร 1 ตัน	กรัม
ปุ๋ยอินทรีย์	1,970
เกลือแกงเม็ด	3,335
$\text{NaHCO}_3$	5,162

สูตรที่ 5 ปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตร

เตรียม 1 ตัน	กรัม
ทวินเฟอร์ตี 21-21-21	1,970
เกลือแกงเม็ด	3,335
$\text{NaHCO}_3$	5,162

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เก็บผลผลิต โดยการชั่งน้ำหนักผลผลิต นำมาวิเคราะห์หาสารอาหาร ได้แก่ ไขมัน โปรตีน ลิพิด 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 และ 8 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