บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ / อุปกรณ์

1.1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp.

- เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้ว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ขวดโหล ขนาด 12 ลิตร ถังพลาสติกใสขนาด 50 ลิตร บีกเกอร์, กระบอกตวง, ท่อแก้ว
- จุกยาง, สายยาง ขนาดเล็ก
- เครื่องให้อากาศ (Air pump)
- ตู้เพาะเลี้ยงสาหร่าย
- พันธุ์สาหร่าย *Spirulina* sp. จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา
- ถุงแพลงก์ตอนขนาดตา 60 ไมครอน

1.2 การศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Spirulina* sp.

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-1201V, Shimadzu Corporation, Japan)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Cyberscan 500, Eutech Cyber Netics PTE, LTD, Singapore)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ Olympus (Olympus Optical Co., LTD, Japan) พร้อมอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง
- เทอร์โมมิเตอร์

1.3 การเก็บรักษาอาหาร

- ตู้เย็น
- ภาชนะ ถังน้ำขนาด 10 ลิตร, ขวดแก้วขนาด 5 ลิตร

1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

- เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์, แท่งแก้ว, กระบอกตวง
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo , AG 245 , Mettle-Toledo, Thailand Ltd.)
- ผ้าขาวบาง
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy SS-320, Tomy Seiko Co. LTD., Japan)

1.5 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ข)

- ไนเตรท
- ไนไตรท์
- แอมโมเนีย
- ฟอสเฟต

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 แผนการทดลอง และวิเคราะห์ผล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test (Duncan, 1992) การทดลองประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง คือ

2.1.1 การทดลองที่ 1 การเจริญทวีจำนวนของสาหร่าย *Spirulina* sp.ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ได้จากน้ำหมักมูลไก่ไข่ น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ และน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

การทดลองย่อยที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp.ในน้ำหมักมูลไก่ไข่ ความเข้มข้น 1.25, 25, 5.0, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร Zarrouk (Venkataraman, 1983)

การทดลองย่อยที่ 2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk

การทดลองย่อยที่ 3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา ความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk

ตาราง 5 ปริมาณธาตุอาหาร ($\overline{X} \pm SD$, มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารทดลองความเข้มข้น 100%

อาหาร	ไนเตรท	ไนไตรท์	แอมโมเนีย	ฟอสเฟต
น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ	47.90±0.01	6.50±0.02	12.8±0.02	5.20±0.12
น้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา	0.131±0.01	0.004±0.01	0.976±0.03	0.601±0.02
น้ำหมักมูลไก่ไข่	2.374±0.01	0.009±0.01	0.700±0.01	0.974±0.02

2.1.2 การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบการเจริญทวีจำนวนของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงสูตร Zarrouk น้ำเลี้ยงที่ใส่เฉพาะธาตุอาหารหลัก คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต โซเดียมไนเตรท และไดโปแตส-เซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ตามปริมาณในอาหารสูตร Zarrouk และน้ำเลี้ยงที่ดีที่สุด ที่ได้จากการทดลองย่อยในการทดลองที่ 1 ทุกสูตรน้ำเสีย ทำ 3 ซ้ำ

อุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 27±5 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมการทดลอง

2.2.1 การเตรียมพันธุ์สาหร่าย

ใช้พันธุ์สาหร่าย *Spirulina* sp. จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลาทำการเพาะขยายสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารสูตร Zarrouk ปริมาณ 1 ลิตร จำนวน 5 ขวด เพื่อใช้เป็นพันธุ์สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ใช้ความหนาแน่นเริ่มต้น 0.6 (OD $560_{นม.}$) ให้แสงสว่างความเข้ม 3,500-4,000 ลักซ์ วันละ 16 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 06.00-22.00 น. และให้อากาศตลอดเวลาทำการตรวจวัดปริมาณความหนาแน่นของสาหร่าย *Spirulina* sp. ทุกวัน โดยการวัด OD ($560_{นม.}$) อุณหภูมิน้ำ 27±5 องศาเซลเซียส ระหว่างเวลา 08.00-09.00 นาฬิกา ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นสูงสุด และหยุดการเพาะเลี้ยงเมื่อสาหร่าย *Spirulina* sp. มีความหนาแน่นลดลงเป็นวันที่สอง จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ สาหร่าย *Spirulina* sp. ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบเดิมอีกครั้ง ในถังขนาดปริมาตร 50 ลิตร จำนวน 4 ถัง โดยใช้สาหร่าย *Spirulina* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในขวด 1 ลิตร และใช้สาหร่าย *Spirulina* sp. ในระยะ log phase ก่อนวันที่มีความหนาแน่นสูงสุด 1 วัน และจะใช้สาหร่าย *Spirulina* sp. ในระยะนี้เป็นพันธุ์สาหร่ายทุกการทดลอง

2.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 อาหารสูตร Zarrouk (ตาราง 3)

อาหารสูตร Zarrouk ประกอบด้วยสารละลาย 3 ชุด คือ สารละลายหลัก, สารละลาย A5 และสารละลาย B6 ซึ่งสารหลักแต่ละตัวตามปริมาณที่กำหนด ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมสารละลาย A5 และ B6 ชุดละ 1 มิลลิลิตร

ธาตุอาหารหลัก (macro elements)		
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	16.8	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	2.5	กรัม
โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	1	กรัม
เกลือแกง (NaCl)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.04	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
เอทธิลีนไดอะมีนอะซิติคไดโซเดียม ($Na_2EDTA.2H_2O$)	0.08	กรัม
ธาตุอาหารรอง (Micro elements)		
สารละลาย A5 ประกอบด้วย		
กรดบอริค (H_3BO_3)	2.85	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	1.81	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H2O$)	0.22	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.08	กรัม
โมลิบดินัมออกไซด์ (MoO_3)	0.015	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ใช้สารละลาย A5 ปริมาตร	1	มิลลิลิตร
สารละลาย B6 ประกอบด้วย		
แอมโมเนียมวานาเดท (NH_4VO_3)	230.0	ไมโครกรัม
โปแตสเซียมไดโครมิคซัลเฟต 24- ไฮเดรต [$K_2Cr_2(SO_4)_4.24H_2O$]	960.0	ไมโครกรัม
นิคเกิลซัลเฟต ($NiSO_4.7H_2O$)	478.5	ไมโครกรัม
โซเดียมทั้งสเตท ($Na_2WO_4.2H_2O$)	179.4	ไมโครกรัม
ทิทาเนียมซัลเฟต [$Ti_2(SO_4)_3$]	400.0	ไมโครกรัม
โคบอลท์ไนเตรต 6 – ไฮเดรต [$Co(NO_3)_2.6H_2O$]	439.8	ไมโครกรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ใช้สารละลาย B6 ปริมาตร	1	มิลลิลิตร

2.2.2.2 อาหารทดลองอย่างง่าย

การเตรียมอาหารอย่างง่ายใช้ส่วนประกอบ 3 ชนิด คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร (เท่ากับปริมาณที่มีในอาหารทดลองสูตร Zarrouk) โดยละลายสารเคมีทั้ง 3 ชนิดลงในน้ำประปาที่พักให้อากาศไว้ไม่น้อยกว่า 5 วัน

2.2.2.3 อาหารจากน้ำแช่มูลไก่ไข่

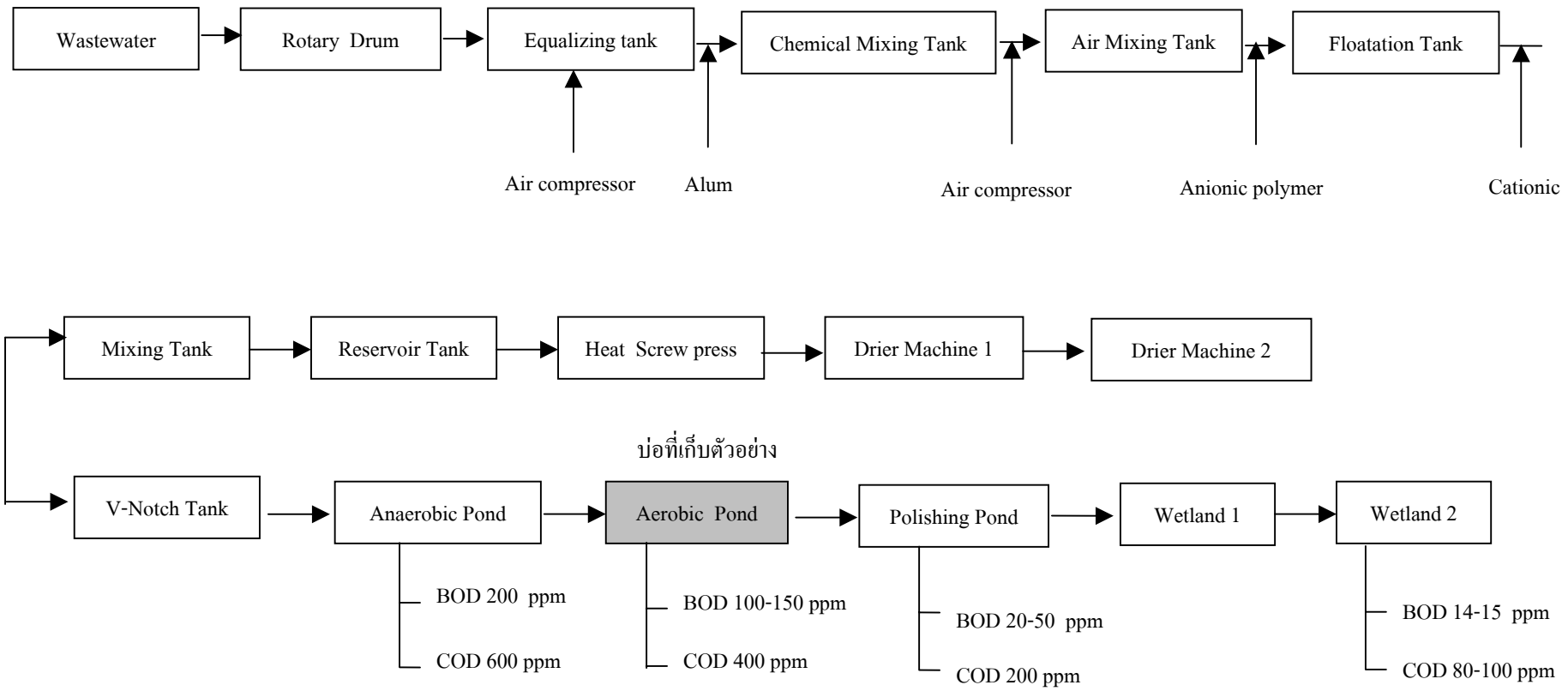
นำมูลไก่ไข่ที่ซื้อมาจากฟาร์มในจังหวัดนครศรีธรรมราช มาแยกสิ่งเจือปน จำพวกขนไก่ หรือขยะต่างๆ ออก นำไปตากให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ใช้มูลไก่ไข่ 6% (น.น. / ปริมาตร) (กุลวัฒน์ และปฐมชาติ, 2543) แช่ในน้ำประปาที่พักและให้อากาศไว้นาน 5 วัน ในปริมาตร 10 ลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดคนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ใช้เฉพาะส่วนใส นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำที่กรองได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลายเข้มข้น 100% สำหรับทดลอง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการ นำน้ำแช่มูลไก่ไข่ 100% ที่เตรียมไว้ไปเจือจางด้วยน้ำประปาที่พักและให้อากาศไว้ไม่น้อยกว่า 5 วัน ให้มีความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เพื่อใช้สำหรับดำเนินการทดลองต่อไป

2.2.2.4 น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ

ใช้น้ำทิ้งที่เก็บจากบ่อพักน้ำทิ้ง (Aerobic pond, ภาพ 1) ของบริษัทแปซิฟิคแปรรูปสัตว์น้ำ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหลังจากเก็บรวบรวมมาเพื่อให้ตกตะกอน ทำการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.3 (หน้า 26) แต่เจือจางความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร / ปริมาตร)

ภาพ 1 แผนผังบ่อที่เก็บน้ำตัวอย่างที่โรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ



ที่มา : บริษัทแปซิฟิกแปรรูปสัตว์น้ำ (2546) (ติดต่อส่วนตัว)

2.2.2.5 น้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา

ใช้น้ำทิ้งที่ปล่อยออกมาจากโรงงานยางพารา ของบริษัท ยางไทยปักษ์ใต้ ตำบลท่าช้าง อำเภอบางกล่ำ จังหวัดสงขลา ตั้งน้ำทิ้งหลังจากเก็บรวบรวมไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ตกตะกอน ทำการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.3 (หน้า 26) แต่เจือจางความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร / ปริมาตร)

3. การดำเนินการทดลอง

3.1 การทดลองที่ 1 การเจริญทวีจำนวนของสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ได้จากน้ำหมักมูลไก่ไข่ น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ และน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา

3.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารที่ได้จากน้ำหมักมูลไก่ไข่ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารสูตร Zarrouk (ชุดควบคุม ข้อ 2.2.2.1 หน้า 25) และในอาหารน้ำหมักมูลไก่ไข่ (ข้อ 2.2.2.3 หน้า 26) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรในขวดแก้ว ใช้สาหร่าย *Spirulina* sp. (ข้อ 2.2.1 หน้า 24) ความหนาแน่นเริ่มต้น 0.6 (OD $560_{นม.}$) เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับ(ข้อ 2.2.1 หน้า 24)

3.1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารที่ได้จากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารสูตร Zarrouk (ชุดควบคุม ข้อ 2.2.2.1 หน้า 25) และในอาหารน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ (ข้อ 2.2.2.4 หน้า 26) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับ (ข้อ 2.2.1 หน้า 24)

3.1.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารที่ได้จากน้ำทิ้งโรงงานยางพาราทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ในอาหารสูตร Zarrouk (ชุดควบคุมข้อ 2.2.2.1 หน้า 25) และในอาหารน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา (ข้อ 2.2.2.5 หน้า 28) ทำการเพาะเลี้ยงใน สภาวะเช่นเดียวกับ (ข้อ 2.2.1 หน้า 24) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต ได้ 8 ± 0.5

3.2 การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบการทวีจำนวนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในน้ำหมักมูลไก่ไข่ น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ และน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ปริมาตร 10 ลิตร ใช้สาหร่าย *Spirulina* sp. ความหนาแน่นเริ่มต้น0.6 (OD, $560_{นม.}$) ดำเนินการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายเช่นเดียวกับ (ข้อ 2.2.1 หน้า 24) ในระดับความเข้มข้นที่สาหร่ายมี

การเจริญทวีจำนวนได้ดีที่สุด (ผลจากการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.1, 3.1.2 และ 3.1.3 หน้า 28 ตามลำดับ) ในอาหารทดลองอย่างง่าย และอาหารสูตร Zarrouk

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

4.1 การวัดการเจริญทวีจำนวนของสาหร่าย

การวัดการเจริญทวีจำนวนของสาหร่าย ทำการวัดความหนาแน่นของสาหร่ายทุกวัน หลังเวลา 08.00 นาฬิกา โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ตรวจวัดที่ค่าความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ตรวจวัดความหนาแน่นของสาหร่ายจำนวน 3 ซ้ำ ในทุกซ้ำของทุกการทดลองจนกระทั่งความหนาแน่นของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงลดลงเป็นวันที่สองหลังจากมีความหนาแน่นสูงที่สุดจึงยุติการทดลอง

4.2 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิน้ำเลี้ยงทุกวันระหว่างเวลา 8.00-12.00 นาฬิกา ในการทดลองที่ 2 ทำการตรวจวัดปริมาณไนเตรท ไนไตรท์ ฟอสเฟตและแอมโมเนีย (Boyd & Tucker, 1992) ของอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina* sp. ทุกซ้ำๆ ละ 3 ตัวอย่างทำการตรวจวัดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ระหว่างเวลา 08.00-12.00 นาฬิกา ตลอดการทดลอง