บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Visible spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 MV ของบริษัท Bausch & Lomb

เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G 560 E ของบริษัท Scientific Industries ,Inc. USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

เครื่องเขย่า (Platform Shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific CO.,USA

เครื่องควบแน่น (Condenser) ขนาด 300 มิลลิลิตร กราวจอยด์ด้านนอกขนาด 24/40 ของบริษัท Gerhardt, Germany

เคมีภัณฑ์

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (trypic, soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (trypic soy agar) ของบริษัท Difco Laboratories , USA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทีซีบีเอส (TCBS agar) ของบริษัท Difco Laboratories , USA

สารละลายเฟอร์โรอิน (Ferroin reagent) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

ซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (B.mixed)

1. *Bacillus subtilis* (P_1)
2. *Bacillus megaterium* (P_3)
3. *Bacillus firmus* (P_4)
4. *Bacillus lentus* (S_{22})
5. *Bacillus marinus* (S_{29})

เป็นชนิดที่คัดแยกจากตะกอนดินและน้ำในบ่อกุ้ง และศึกษาชนิดและสกุลโดย เปรมสุดา สมาน (2539)

วิธีดำเนินการทดลอง

การตรวจสอบรูปร่างลักษณะแบคทีเรีย

เพื่อใช้ในการติดตามชนิดและจำนวน *Bacillus* spp. ในระหว่างการทดลอง

ศึกษาลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสี (pigment) ของโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) และลักษณะการเจริญในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

การติดสีแกรม

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) อายุ 24 ชม. นำไปย้อมแกรม (ภาคผนวกข้อ ข ข้อ 1-4) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมเอ็นโดสปอร์

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) อายุ 48 ชั่วโมง นำมาย้อมเอนโดสปอร์ (ภาคผนวกข้อ ข ข้อ 5) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 5 ชนิด (B.mixed) สำหรับเติมในน้ำและในอาหารเลี้ยงกุ้ง

เขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* (P_1) 1 ลูป จากอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ3) ที่เติมเกลือ 1% ลงในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ2) ที่เติมเกลือ 1% ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงชมพู่ขนาด 250 มล. ตลอดการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม

เกลือ 1% เตรียมแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (P_3) , *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{25}) เช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย P_1 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 °ซ ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

การเตรียมแบคทีเรียสำหรับการเติมในน้ำเลี้ยงกุ้ง ทำได้โดยการนำเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่ปั่นได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ผสมส่วนเซลล์ให้เข้ากับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นม. ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 1.0 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% นำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิด เพื่อเติมในน้ำเลี้ยงกุ้งต่อไป

การเตรียมแบคทีเรียสำหรับการเติมในอาหารเลี้ยงกุ้ง ทำได้โดยการนำเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิด *Bacillus megaterium* (P_3) , *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{25}) ที่ปั่นได้มาในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในแต่ละครั้งของการเตรียมอาหารใช้แบคทีเรียชนิดละประมาณ 0.3-0.5 กรัม นำมาคลุกผสมกับอาหารกุ้งในอัตราส่วน 1: 3 น้ำหนัก/น้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดี ใช้ในการเลี้ยงกุ้งต่อไป อัตราส่วน 1:3 ได้จากการศึกษาของ วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (2539) พบว่าการผสมกับอาหารกุ้ง ในอัตราส่วน 1:3 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม เม็ดอาหารยังคงรูปและไม่เหลวเกินไป

- การหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้เติมในการทดลอง

นำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus spp.* (B.mixed) แต่ละชนิดที่เตรียมได้ ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus subtilis* (P_1) , *Bacillus megaterium* (P_3) , *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{25}) เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำ total plate count บนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียในสารแขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มี OD_{600} = 1.0

ชั่งอาหารกุ้งที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย (B.mixed) 0.1 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำ total plate count บนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร

การหาปริมาณสารอินทรีย์ด้วยวิธี COD (APHA,1989)

การหาความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เจือจางสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ค ข้อ 1.1) 10 มล. ให้มีปริมาตร 100 มล. เติมกรดซัลฟุริครีเอเจนท์ (ภาคผนวก ค ข้อ 1.2) 30 มล. ตั้งไว้ในที่มืด 5 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ค ข้อ 1.4) โดยใช้เฟอร์โรอิน (ภาคผนวก ค ข้อ 1.3) จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\text{นอร์มัลลิตี (normality)} = \frac{\text{มล.โปตัสเซียมไดโครเมต} \times 0.25}{\text{มล.เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต}}$$

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

1. เติมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์ 10 มล. หรือใช้ตัวอย่างน้ำน้อยกว่าแต่เติมน้ำกลั่นให้เป็น 10 มล. ลงในขวดรีฟลักซ์ ใส่เม็ดแก้ว 5-10 เม็ด แล้วจึงเติมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ค ข้อ1.1) 5.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ค ข้อ1.2) 15 มล.

2. นำขวดรีฟลักซ์ในข้อ 1 ไปต่อกับเครื่องรีฟลักซ์ (ดังแสดงในรูปที่ 4) เปิดน้ำหล่อเย็น เปิดไฟแล้วรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชม.

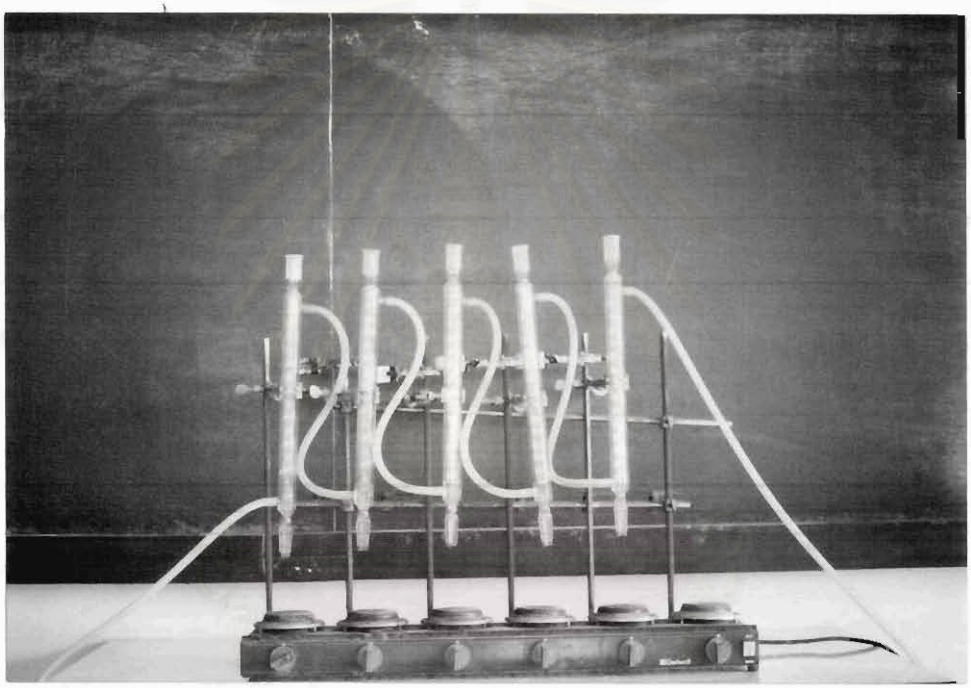
3. ทำแบลงค์พร้อมกับตัวอย่างน้ำโดยใช้น้ำกลั่น 10 มล. ใช้สารเคมีต่าง ๆ เหมือนกับตัวอย่างน้ำ ทำการรีฟลักซ์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

4. เมื่อรีฟลักซ์ครบ 2 ชม.แล้ว ปิดไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงที่ปากเครื่องรีฟลักซ์ 40 มล. เพื่อล้างไอสารภายในคอนเดนเซอร์ แล้วจึงปิดน้ำหล่อเย็น

5.นำขวดรีฟลักซ์มาไตเตรตหาปริมาณโปตัสเซียมไดโครเมตที่เหลือด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ค ข้อ 1.4) โดยใช้เฟอร์โรอิน (ภาคผนวก ค ข้อ 1.3) ประมาณ 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ควรใช้ปริมาณอินดิเคเตอร์เท่า ๆกันทุกอย่าง จุดยุติจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาล บันทึกปริมาตรเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไตเตรต

6. การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มก.ออกซิเจน/ล.)} = \frac{(A-B)xNx8000}{\text{มล.ของตัวอย่างที่ใช้}}$$



รูปที่ 4 เครื่องกลั่นสำหรับวัดค่าซีโอดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A=มล.ของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์

B=มล.ของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

C=ความเข้มข้นของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นนอร์มัลลิตี

การหาแอมโมเนีย (NH_3-N) จากน้ำตัวอย่าง (Strickland and Parsons, 1972)

1. ดูดน้ำตัวอย่าง 50 มล. (น้ำที่ใช้ไม่ต้องกรอง) และน้ำกลั่น 50 มล. เพื่อเปรียบเทียบเป็นแบลงค์ ใส่ลงในขวดแก้วมีจุกขนาด 100 มล.

2. เติมฟีนอลรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ค ข้อ 2.2) 2 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน

3. เติมโซเดียมไนโตรพรัสไซด์รีเอเจนท์(ภาคผนวก ค ข้อ2.3) 2 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน

4.เติมออกซิไดซิงรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ค ข้อ 2.6) 5 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน

ตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชม. แต่ไม่ควรเกิน 24 ชม. เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน หลังจากนั้นนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้เซลล์ขนาดความกว้าง 1 ซม. แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่หักค่าแบลงค์ของน้ำกลั่นออกแล้วลบด้วยค่าแบลงค์ของตัวอย่าง (ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่รีเอเจนท์อีกครั้งหนึ่ง ต่อจากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

วิธีการวิเคราะห์หาไนไตท์ (NO_2-N) ในน้ำตัวอย่าง (Strickland and Parsons, 1972)

1. ดูดน้ำตัวอย่าง 50 มล. และน้ำกลั่น 50 มล. เพื่อทำเป็นแบลงค์ เปรียบเทียบใส่ลงในขวดแก้วมีจุกปิด ขนาด 80-100 มล.

2. เติมสารละลายซัลฟานิลามีด (ภาคผนวก ค ข้อ 3.1) ลงไปตัวอย่างละ 1 มล. เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3.เติมสารละลายเอ็นอีดี (ภาคผนวก ค ข้อ 3.2) ลงไปตัวอย่างละ 1 มล. เขย่าให้ผสมกัน หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชม. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ใช้เซลล์ความกว้าง 1 ซม. บันทึกค่าที่วัดได้ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลบค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ออกแล้วไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตในน้ำ (NO_3-N) (Strickland and Parsons, 1972)

การเตรียมคอลัมน์สำหรับรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรท์

1. ชั่งแคดเมียม (Cadmium filling) (ภาคผนวก ค ข้อ 4.1.1) 5 กรัม ใส่ลงในขวดทรงชมพู่ขนาด 125 มล. ที่มีกรดไฮโดรคลอริก 2 N (ภาคผนวก ค ข้อ 4.1.3) อยู่ประมาณ 25 มล. ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชม. และใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราว

2. รินส่วนที่เป็นของเหลวออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งแน่ใจว่าไฮโดรคลอริกถูกล้างออกหมดแล้ว จากนั้นรินน้ำออก

3. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวก ค ข้อ 4.1.2) 10 มล. ใช้แท่งแก้วคนจนกระทั่งสีฟ้าของสารละลายหมดไป

4. ใช้คีมคีบใยแก้ว (glass wool) ชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในคอลัมน์ (ดังรูปที่ 5) เติมน้ำกลั่นลงในคอลัมน์ให้เต็ม

5. ใช้ช้อนตักแคดเมียมจากข้อ 3 ค่อย ๆใส่ลงในคอลัมน์ให้เต็มจนหมดระวังไม่ให้แคดเมียมอัดตัวแน่นเกินไป ขณะเดียวกันก็ไขน้ำออกอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันน้ำล้นคอลัมน์ แต่ควรให้น้ำเต็มคอลัมน์อยู่เสมอ เพื่อช่วยให้แคดเมียมถูกอากาศน้อยที่สุด

6. ใช้คีมคีบใยแก้ว (glass wool) ใส่ลงในคอลัมน์ พยายามเกลี่ยใยแก้วอย่างเบา ๆ ให้ชิดส่วนบนสุดของแคดเมียม แล้วไขน้ำออกจนระดับน้ำอยู่เหนือส่วนบนของใยแก้วเล็กน้อย

7. เติมสารละลายให้เต็มด้วยสารละลายเจือจางแอมโมเนียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ค ข้อ 4.3) 200 มล. ปรับอัตราการไหลให้ได้ประมาณ 100 มล.ในเวลา 8-12 นาที ถ้ามีอัตราการไหลช้ากว่านี้ต้องบรรจุคอลัมน์ใหม่

8. เติมน้ำกลั่นให้เต็มคอลัมน์ ปิดจุกให้น้ำหยุดไหล เพื่อพักคอลัมน์ไว้จนกว่าจะถึงเวลาใช้ครั้งใหม่

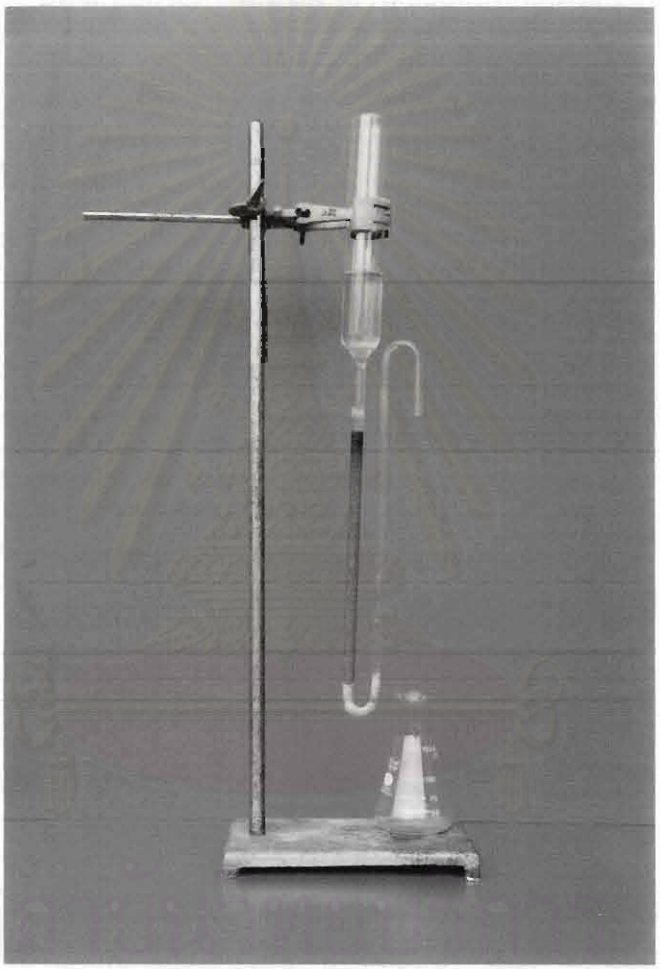
การทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

1. ดูดสารละลายไนเตรตมาตรฐาน (ภาคผนวก ค ข้อ 4.8) 50 มล.เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น (ภาคผนวก ค ข้อ 4.2) 1 มล. เขย่าให้ผสมเข้ากัน

2. นำสารละลายที่ได้ไปผ่านคอลัมน์โดยดำเนินตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 เติมสารละลายลงในคอลัมน์ 10 มล. รอจนกระทั่งสารละลายไหลผ่านคอลัมน์จนระดับน้ำอยู่เหนือใยแก้วเล็กน้อย จึงเติมสารละลายลงไปอีก 10 มล.

2.2 หลังจากรอให้สารละลายที่ใส่ลงไปครั้งที่ 2 นี้ไหลผ่านคอลัมน์จนมีระดับอยู่เหนือ



รูปที่ 5 คอลัมน์รีดักชันไนเตรตเป็นไนไตรท์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยแก้วเล็กน้อย จึงเติมสารละลายที่เหลืออีกประมาณ 30 มล. แล้วจึงใช้กระบอกตวงขนาด 25 มล. รองสารละลายที่ผ่านออกมา เมื่อได้ปริมาตรครบ 25 มล. ก็ถ่ายสารละลายนั้นลงในขวดแก้วมีจุกขนาดประมาณ 50 มล.

2.3 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นดีไอออไนซ์ อีก 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ 10 มล. แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้เต็มคอลัมน์ ปิดจุกที่ปลายคอลัมน์ไม่ให้น้ำไหลออกเพื่อพักคอลัมน์จนกว่าจะนำสารละลายอันใหม่มาผ่าน

3. เติมสารละลายซัลฟานิลามีด (ภาคผนวก ค ข้อ 4.4) ลงในสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แล้ว 0.5 มล. เขย่าให้ผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

4. เติมสารละลายเอ็นอีดี (ภาคผนวก ค ข้อ 4.5) ลงในสารละลาย 0.5 มล. เขย่าให้ผสมกัน แล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชม. เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง(บานเย็น)จึงนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นม. ใช้เซลล์ขนาดความกว้าง 1 ซม. นำค่าที่ได้ทั้งสองมาคิดเทียบเป็นเปอร์เซนต์ประสิทธิภาพของคอลัมน์ดังนี้

วัดค่าการดูดกลืนแสงของไนเตรตได้ A และของไนไตรท์ได้ B ประสิทธิภาพของคอลัมน์เป็น A/B x 100 ถ้าต่ำกว่านี้ต้องเตรียมคอลัมน์ใหม่ และทดสอบประสิทธิภาพใหม่ด้วย

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในตัวอย่างน้ำ

1. ดูดตัวอย่างน้ำ 50 มล. และน้ำกลั่น (deionized water) เพื่อเปรียบเทียบเป็นแบลงค์ใส่ลงในขวดแก้ว

2. เติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น (ภาคผนวก ค ข้อ 4.2) 1 มล. เขย่าให้ผสมกัน

3. นำสารละลายไปผ่านคอลัมน์เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ จนได้สารละลาย 25 มล.

4. เติมสารละลายซัลฟานิลามีด (ภาคผนวก ค ข้อ 4.4) 0.5 มล. เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

5. เติมสารละลายเอ็นอีดี (ภาคผนวก ค ข้อ 4.5) 0.5 มล.เขย่าให้ผสมกัน หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชม. เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีบานเย็น แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นม. ใช้เซลล์ขนาดความกว้าง 1 ซม. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่หักค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ออกแล้ว ไปหาความเข้มข้นจากกราฟ

มาตรฐานของไนเตรตที่ทำไว้

6. ค่าความเข้มข้นไนเตรตที่ได้จากข้อ 5 จะเป็นค่ารวมของ NO_3+NO_2 nitrigen ดังนั้นจึงต้องใช้การคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของ NO_3-N (ไมโครกรัม/ลิตร) = X - (100 / Z) Y

X = ความเข้มข้นของ NO_3-N + NO_2-N

Y = ความเข้มข้นของ NO_2-N

Z = % ประสิทธิภาพของคอลัมน์

การวิเคราะห์หา Soluble reactive phosphorus ในน้ำ (Strickland and Parsons, 1972)

1. ดูดน้ำกลั่นเพื่อทำแบลงค์ และน้ำตัวอย่าง 25 มล.ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล.

2. เติมสารผสมของรีเอเจนท์ (ภาคผนวก ค ข้อ 5.5) ตัวอย่างละ 5 มล. แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชม. เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 885 นม. ใช้เซลล์ขนาดความกว้าง 5 ซม. ต่อจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้โดยหักค่าแบลงค์ (ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น) ออก แล้วนำไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

ศึกษาการใช้แบคทีเรียเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำและดัชนีทางชีวภาพในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในโรงเพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาการใช้แบคทีเรียเติมเพื่อเสริมผลผลิตการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับขวดโหลและตู้กระจก ดังนี้คือ

1. ศึกษาผลของการเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (B.mixed) แต่ละชนิด ต่ออัตรารอดและคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

กลุ่มทดลองในการทดลองนี้ประกอบด้วย 7 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ

1. กลุ่มควบคุม
2. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (P_1)
3. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (P_3)
4. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus firmus* (P_4)
5. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus lentus* (S_{22})
6. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus marinus* (S_{25})

7. กลุ่มเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (B.mixed) ทั้ง 5 ชนิด ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1

การทดลองเลี้ยงกุ้งขนาด PL 8 ในขวดโหลพลาสติก จัดหน่วยทดลองให้อยู่ในบ่อซีเมนต์ขนาด 70x70x70 ซม. เติมน้ำในส่วนบ่อซีเมนต์ (รูปที่ 6) ปรับรักษาอุณหภูมิให้คงที่ด้วยอุปกรณ์ให้ความร้อน อุณหภูมิ 28-29 °ซ เติมน้ำ 3 ลิตร ความเค็ม 30 ppt แต่ละขวดปล่อยกุ้งจำนวน 60 ตัว ทำการเติมแบคทีเรีย ตามกลุ่มทดลองที่ตั้งไว้ ทั้ง 7 กลุ่ม โดยเติมแบคทีเรียทุกๆ 3 วัน ชนิดละ 0.08-0.64 มล. เพื่อให้มีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำแต่ละชนิดมีปริมาณ $1.5x10^4$ cfu/ml โดยใช้แบคทีเรียในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ จากการเตรียมหัวเชื้อข้างต้น ให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกกุ้งขนาดเล็ก (เบอร์ 0) วันละ 3 เวลาคือ 9.00 น., 13.30 น. และ 18.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 3 วัน อัตราการเปลี่ยนน้ำ 30% เก็บตัวอย่างน้ำทุก ๆ 5 วัน นำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่า COD แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรต ฟอสเฟต DO พีเอช อุณหภูมิ ความเค็ม และเก็บตัวอย่างน้ำมาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

2. การหาปริมาณแบคทีเรีย (B.mixed) ทั้ง 5 ชนิดที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง

ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL15 ในตู้กระจก ขนาด 25x50x50 ซม. เติมน้ำปริมาตร 25 ลิตร ความเค็ม 30 ppt แต่ละตู้ปล่อยกุ้งจำนวน 300 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เติมแบคทีเรีย 5 ชนิด *Bacillus subtilis* (P_1) , *Bacillus megaterium* (P_3) , *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{25}) ลงในน้ำ จากการเตรียมหัวเชื้อข้างต้น โดยเติมแต่ละชนิดในปริมาณ 0.7-5.4 มล. เพื่อให้แต่ละชนิดมีปริมาณ $1.5x10^4$ cfu/ml โดยมีการเติมแบคทีเรียเพียงครั้งแรกครั้งเดียวเท่านั้น จากนั้นทำการเลี้ยงกุ้งในกลุ่มดังกล่าวโดยการให้อาหารสำเร็จรูป เบอร์ 1 วันละ 3 เวลาคือ 9.00 น., 13.30 น. และ 18.00 น. ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ไม่มีการดูดตะกอนทิ้ง เวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำไปทำการ spread plate ทุก ๆ วัน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมดและ *Bacillus* spp. (B.mixed) ที่เติมในน้ำครั้งแรก

3. ทดลองเลี้ยงกุ้งระยะ PL15 เติมแบคทีเรีย (B.mixed) ผสม 5 ชนิด ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 ปริมาณแต่ละชนิด $1.5x10^2$ cfu/ml และ $1.5x10^4$ cfu/ml ลงในน้ำ

เลี้ยงกุ้งขนาด PL 15 ในตู้กระจกขนาด 25x50x50 ซม. เติมน้ำเค็ม 25 ลิตร ความเค็ม 30 ppt จำนวน 9 ตู้ แต่ละตู้ปล่อยกุ้งจำนวน 120 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปเบอร์ 1 วันละ 3 เวลา คือ 9.00 น., 13.30 น. และ 18.00 น. ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

รูปที่ 6 บ่อทดลองสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุม ไม่มีการเติมแบคทีเรียในน้ำ

2. กลุ่มเติมแบคทีเรีย 5 ชนิด (B.mixed) ปริมาณชนิดละ $1.5x10^2$ cfu/ml

ทำโดยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus spp.* (B.mixed) 5 ชนิด ที่เตรียมเป็นหัวเชื้อแล้ว โดยการนำหัวเชื้อดังกล่าวมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % 100 เท่า แล้วเติมลงในน้ำเลี้ยงกุ้ง ชนิดละ 0.7-5.4 มล. แบคทีเรียเตรียมใหม่ทุก ๆ 3 วัน ตลอดการทดลอง

3. กลุ่มเติมแบคทีเรีย 5 ชนิด (B.mixed) ปริมาณชนิดละ $1.5x10^4$ cfu/ml

ทำได้โดยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (B.mixed) 5 ชนิดที่เตรียมเป็นหัวเชื้อแล้ว เติมลงในน้ำชนิดละ 0.7-5.4 มล. แบคทีเรียเตรียมใหม่ทุกๆ 3 วัน ตลอดการทดลอง

บันทึกอัตรารอดกุ้งกุลาดำ อัตราการเจริญเติบโต เก็บตัวอย่างน้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำต่าง ๆ ได้แก่ค่าแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรตและฟอสเฟต COD DO ความเค็ม พีเอช และอุณหภูมิของน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อคัดแยกหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* spp. (B.mixed) ทั้ง 5 ชนิดที่เติมลงในน้ำโดยการทำ Total plate count ในอาหารแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio* sp. ในอาหารแข็งทีซีบีเอส ตามลำดับ

4.ทดลองเลี้ยงกุ้งขนาด 1 เดือน เติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (B.mixed) ลงในน้ำและในอาหาร

เลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 1 เดือน น้ำหนักประมาณ 0.67-0.73 กรัม ในตู้กระจกขนาด 30x60x30 ซม. ซึ่งมีอุปกรณ์กรองน้ำดังแสดงในรูปที่ 7 เติมน้ำเค็ม 35 ลิตร จำนวน 9 ตู้ แต่ละตู้ปล่อยกุ้งจำนวน 10 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปเบอร์ 2 ปริมาณ 10 % ของน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน วันละ 3 เวลา คือ 9.00 น., 13.30 น. และ 18.00 น. ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง ทำการดูดตะกอนเศษอาหารและขี้กุ้งทิ้งไป เลี้ยงเป็นระยะเวลา 56 วัน แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ คือ

1. กลุ่มควบคุม ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

2. กลุ่มเติมแบคทีเรีย (B.mixed) 5 ชนิด ในน้ำปริมาณชนิดละ $1.5x10^4$ cfu/ml

ทำโดยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (B.mixed) 5 ชนิดประกอบด้วย *Bacillus subtilis* (P_1), *Bacillus megaterium* (P_3), *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{25}) ที่เตรียมเป็นหัวเชื้อแล้ว โดยการนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น เติมลงในน้ำเลี้ยงกุ้ง

รูปที่ 7 ตู้กระจกและระบบกรองสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดละ 1.0-7.5 มล. เพื่อให้มีปริมาณชนิดละ $1.5x10^4$ cfu/ml แบคทีเรียเตรียมใหม่ทุก ๆ 3 วัน ตลอดการทดลอง

3. กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมแบคทีเรีย (B.mixed) 5 ชนิด

ทำโดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเติม *Bacillus* spp. 5 ชนิด ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* (P_1), *Bacillus megaterium* (P_3) , *Bacillus firmus* (P_4), *Bacillus lentus* (S_{22}) และ *Bacillus marinus* (S_{28}) ในอัตราส่วนแบคทีเรียต่ออาหาร เท่ากับ 1: 3 น้ำหนัก/น้ำหนัก โดยเตรียมอาหารผสมแบคทีเรียสำหรับเลี้ยงกุ้งได้คราวละ 2-3 วัน ใช้อาหารผสมแบคทีเรีย (B.mixed) เลี้ยงกุ้งทุกมื้อตลอดการทดลอง

บันทึกอัตรารอดกุ้งกุลาดำ และการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยบันทึกค่าน้ำหนักและความยาว ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างน้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำต่าง ๆ ได้แก่ค่าแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรตและฟอสเฟต COD DO ความเค็ม พีเอช และอุณหภูมิของน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อคัดแยกหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด B.mixed ทั้ง 5 ชนิด ที่เติมลงไปโดยการทำ Total plate count ในอาหารแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio* sp. ในอาหารแข็งทีซีบีเอส

ในการวัดอัตรารอดและน้ำหนักครั้งสุดท้ายแล้ว สุ่มเก็บกุ้งจากทุก ๆ ตู้ ตู้ละ 1 ตัว มาแยกส่วนของลำไส้กุ้ง และชี้กุ้งมาทำการแยกหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด B.mixed ทั้ง 5 ชนิดที่เติมลงไปโดยการทำ Total plate count ในอาหารแข็งทริปติกซอย และ*Vibrio* sp. ในอาหารแข็งทีซีบีเอส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย