บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

การทดลองระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดครั้งนี้ใช้อุปกรณ์ที่สำคัญคือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น SPECTRONIC GENESYS TM 5 ของบริษัท MILTON ROY ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) รุ่น S-C-T merter YSI model 33

3.เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น JA-14 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA

4. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HICLAVETM HVE-50 ของ HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น

5. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubater shaker)

6.ถังไนโตรเจนเหลวรุ่น DURA-MITE MVE cryogenics , DURA SERIESTM ของบริษัท BIG (Bangkok Industrial Gas)

7. ปั๊มน้ำ (Magnet sealless pump) รุ่น PMD-1521 บริษัท SANSO ELECTRIC ประเทศญี่ปุ่น

8. ปั๊มน้ำ (Circulating pump) รุ่น PMD-0311 บริษัท SANSO ELECTRIC ประเทศญี่ปุ่น

9. ปั๊มควบคุมปริมาณ (Peristaltic pump) รุ่น Masterflex (C/L TM 77120-05 ของบริษัท Cole- Parmer Instrument

10. เครื่องวัดค่าความเค็ม รุ่น Inpro 7100 conductivity และ Conductivity Transmitter 7400 ของบริษัท Mettler-Toledo

11. เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลาย รุ่น O_2 - Sensor Ø 12 mm. และ Oxygen Amplifier Model 170 ของบริษัท Mettler- Toledo

12. เครื่องวัดค่ากรดเบส (pH) รุ่น SUNTEX pH/ORP PC – 310 ของบริษัท Mettler-Toledo

13. เครื่องวัดอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ รุ่น TOHO TM 105 ของบริษัท Mettler-Toledo

14. เครื่องคอมพิวเตอร์ PC พร้อมโปรแกรม Visual Basic 4.0 และชุดอุปกรณ์ ควบคุมการทำงานและจัดเก็บข้อมูลจากเครื่องตรวจสอบคุณภาพน้ำ

15. ชุดกรองน้ำ NALGENE ประเทศสหรัฐอเมริกา

16. วัสดุเส้นใยสังเคราะห์ BIO-POLYMA จากบริษัท เอ็นไวร์-กรีน เอ็นจิเนียริ่ง จำกัด

การเตรียมการทดลอง

ระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดประกอบด้วยบ่อเลี้ยง บ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน และระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีลักษณะและรายละเอียดดังนี้

บ่อเลี้ยง (Culture tank) ทรงกลม มี 2 บ่อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบ่อละ 3.5 ม. สูง 90 ซม. โครงบ่อทำด้วยไม้อัดหนา 4 มม. และดงรูปให้เป็นทรงกลม ด้วยลวดสลิงขนาด 4 มม. บ่อละ 3 เส้น ปูบ่อด้วยวัสดุแผ่นพลาสติก พีวีซี ชนิดยืดหยุ่นและอ่อนตัวสูง สีดำ ความหนา 0.75 มม. ตัดต่อให้เป็นรูปร่างแล้วเชื่อมติดกันด้วยกาวเฉพาะ CP 019 ตรงกลางบ่อเลี้ยงแต่ละบ่อต่อท่อขนาด 1.5 นิ้ว เพื่อถ่ายน้ำออกไปบำบัดยังบ่อกรองทางชีวภาพโดยปั๊มน้ำ Magnet sealless pump รุ่น PMD-1521 (ดังแสดงในรูปที่ 2)

บ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน (Biological filtration tank) เป็นบ่อซีเมนต์ทรงสี่เหลี่ยม 2 บ่อ แต่ละบ่อมีขนาด 1.98 X 1.8 X 1.7 $ม^3$ ภายในบ่อบรรจุด้วยตัวกรองทางชีวภาพทำจากวัสดุเส้นใยสังเคราะห์ BIO-POLYMA ยึดติดกับโครงที่ทำจากท่อพีวีซีให้มีระยะห่างระหว่างแถว 13 ซม. คิดเป็น 40% ของพื้นที่บ่อทั้งหมด (แสดงลักษณะในรูปที่ 5)

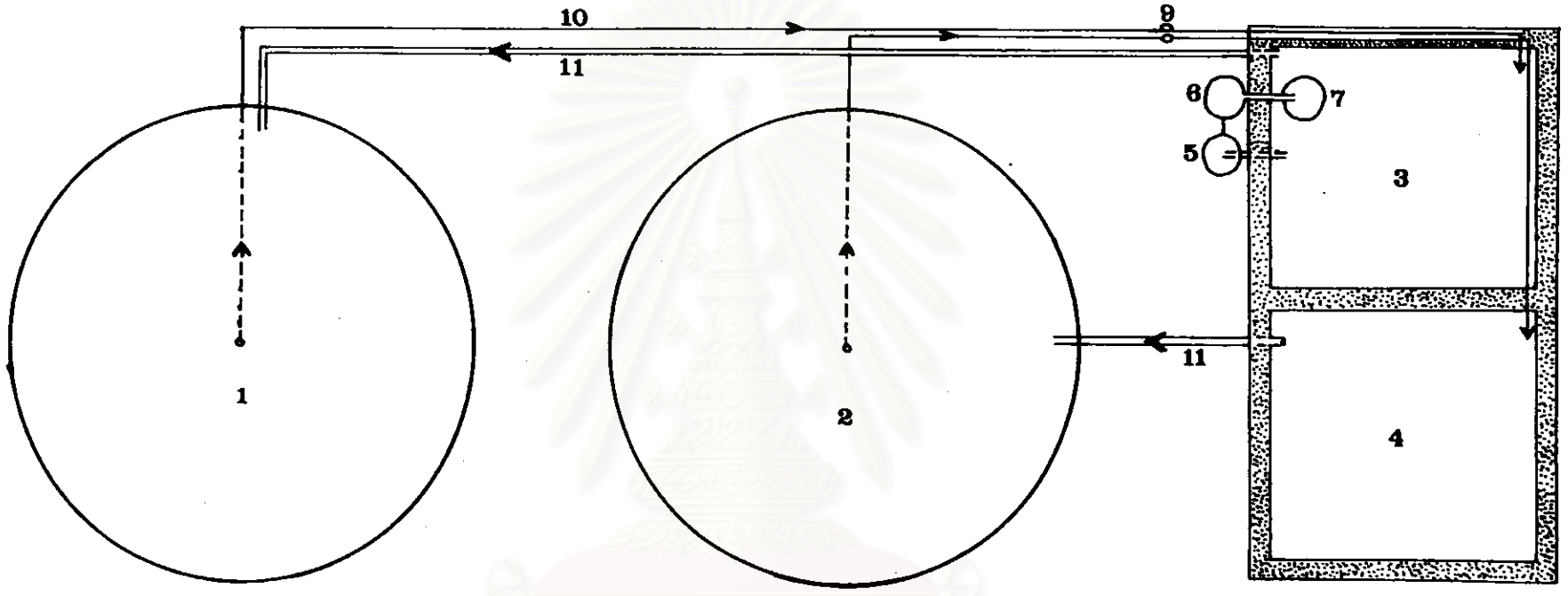
ระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (Denitrification system) มีเฉพาะในชุดทดลอง ซึ่งประกอบด้วย คอลัมน์จากท่อพีวีซี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว สูง 2 เมตร ได้แก่ คอลัมน์ลดปริมาณออกซิเจนละลาย (C1) คอลัมน์บรรจุวัสดุตรึงสำหรับดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย (C2) และคอลัมน์สำหรับเพิ่มออกซิเจนละลาย (C3) คอลัมน์ C1 เชื่อมต่อกับคอลัมน์ C2 ด้านล่าง ส่วนคอลัมน์ C2 มีท่อเชื่อมต่อกับคอลัมน์ C3 ด้านบน คอลัมน์ C1 มีอุปกรณ์สำหรับฟันก๊าซไนโตรเจนติดอยู่เพื่อลดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในคอลัมน์ C1

ส่วนคอลัมน์ C2 บรรจุด้วยวัสดุสำหรับตรึงสำหรับดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียและคอลัมน์ C3 มีอุปกรณ์เพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายติดอยู่ ลักษณะการติดตั้งระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนแสดงในรูปที่1, 2 และรูปที่ 5

อุปกรณ์ตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลระบบอัตโนมัติ (Data locking system)

อุปกรณ์ตรวจสอบคุณภาพน้ำจากบริษัท Metler toledo คือ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่ากรดเบส (pH) ความเค็มของน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) โดยเชื่อมต่อสัญญาณจากอุปกรณ์ตรวจสอบคุณภาพน้ำดังกล่าวกับชุดคอมพิวเตอร์ โปรแกรม Visual Basic 4.0 เพื่อตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำชุดควบคุม และบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำชุดทดลอง ทุก ๆ 30 นาที ตลอด 24 ชั่วโมง ระบบตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลน้ำระบบอัตโนมัติ แสดงไว้ในรูปที่ 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



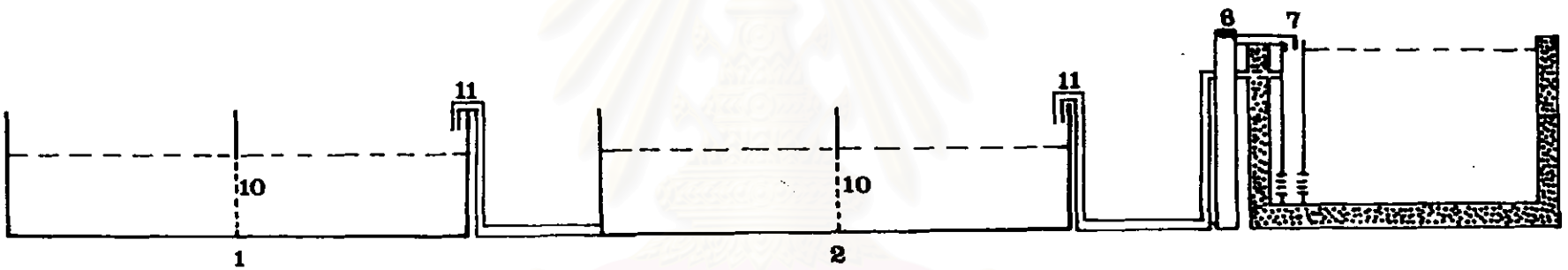
รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด 2 แบบ มุมมองด้านบน มาตราส่วน 1 ซม. : 50 ซม.

1,2 บ่อเลี้ยง 3,4 บ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน 5,6,7 ระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

9 ปั๊มน้ำจากบ่อเลี้ยงไปยังบ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน

10 ท่อส่งน้ำจากบ่อเลี้ยงไปยังบ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน

11 ท่อส่งน้ำจากบ่อกรองทางชีวภาพมายังบ่อเลี้ยง

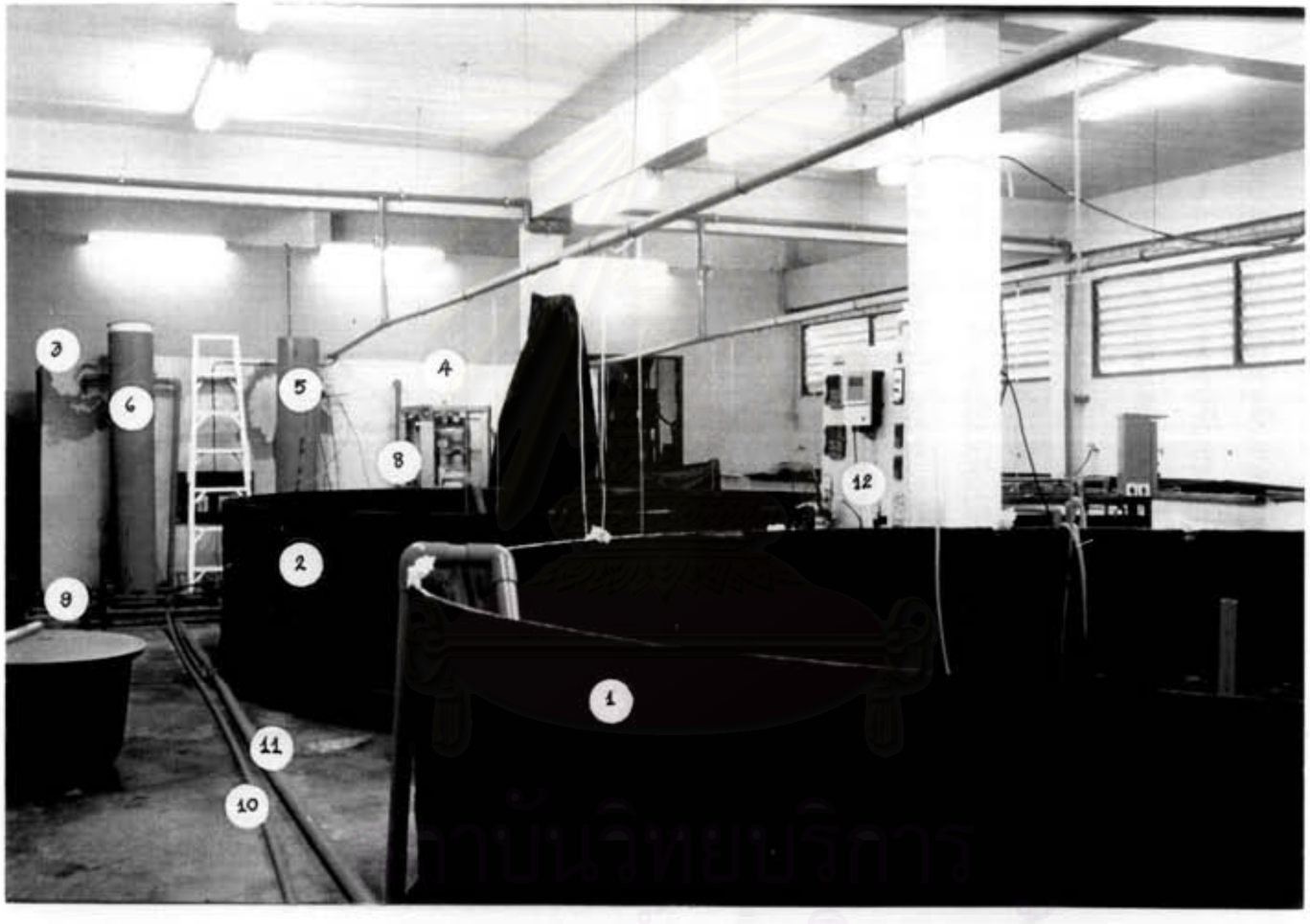


รูปที่ 3. ลักษณะโครงสร้างของระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด 2 แบบ มุมมองด้านข้าง มาตราส่วน 1 ซม. : 50 ซม.

1,2 บ่อเลี้ยง 6,7 ระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

10 ท่อส่งน้ำจากบ่อเลี้ยงไปยังบ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน

11 ท่อส่งน้ำจากบ่อกรองทางชีวภาพมายังบ่อเลี้ยง



รูปที่ 4. ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดชุดควบคุมและชุดทดลอง

โดยที่

หมายเลข 1 คือ บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำชุดทดลอง

หมายเลข 2 คือ บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำชุดควบคุม

หมายเลข 3 คือ ปอกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจนของชุดทดลอง

หมายเลข 4 คือ ปอกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจนของชุดควบคุม

หมายเลข 5 - 7 คือ ระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

หมายเลข 5 คือ คอลัมน์ลดปริมาณออกซิเจนละลาย (C1)

หมายเลข 6 คือ คอลัมน์บรรจุวัสดุตรึงสำหรับดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย (C2)

หมายเลข 7 คือ คอลัมน์เพิ่มปริมาณออกซิเจนละลาย (C3)

หมายเลข 8 คือ ถังบรรจุไนโตรเจนเหลวพร้อมอุปกรณ์ต่อไปยังคอลัมน์ C1

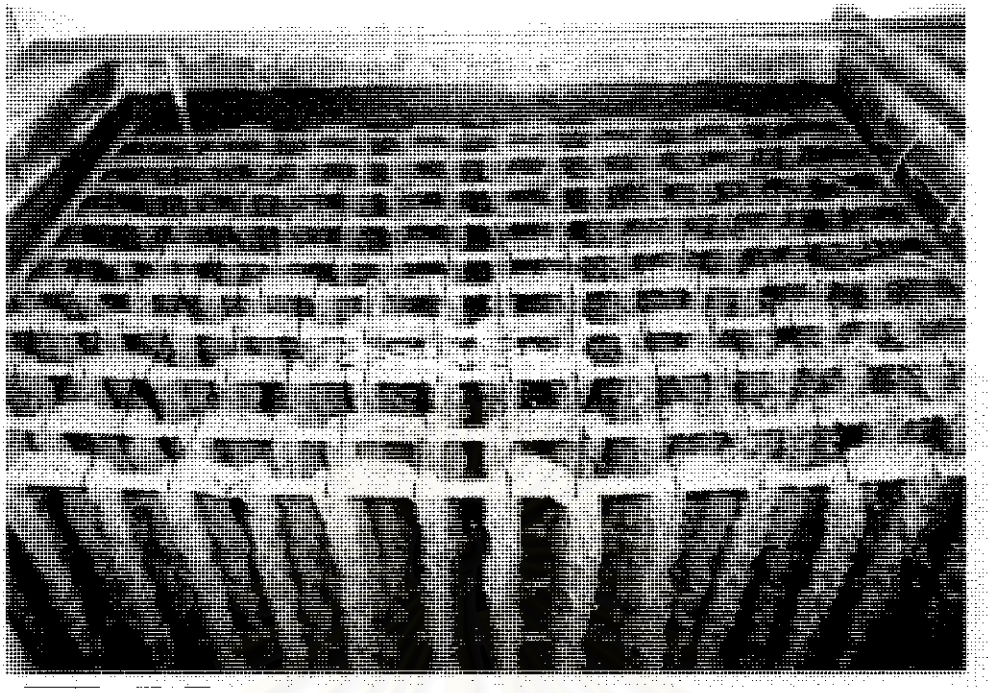
หมายเลข 9 คือ ปั๊มน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำไปยังปอกรองทางชีวภาพ

หมายเลข 10 คือ ท่อส่งน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำไปยังปอกรองทางชีวภาพ

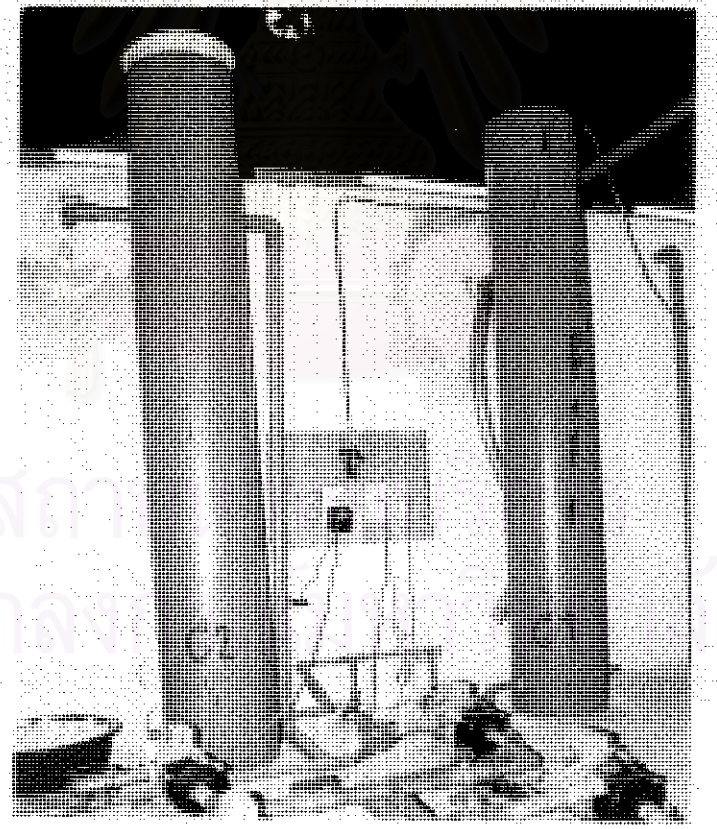
หมายเลข 11 คือ ท่อส่งน้ำจากปอกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจนมายังบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

หมายเลข 12 คือ ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำระบบอัตโนมัติ

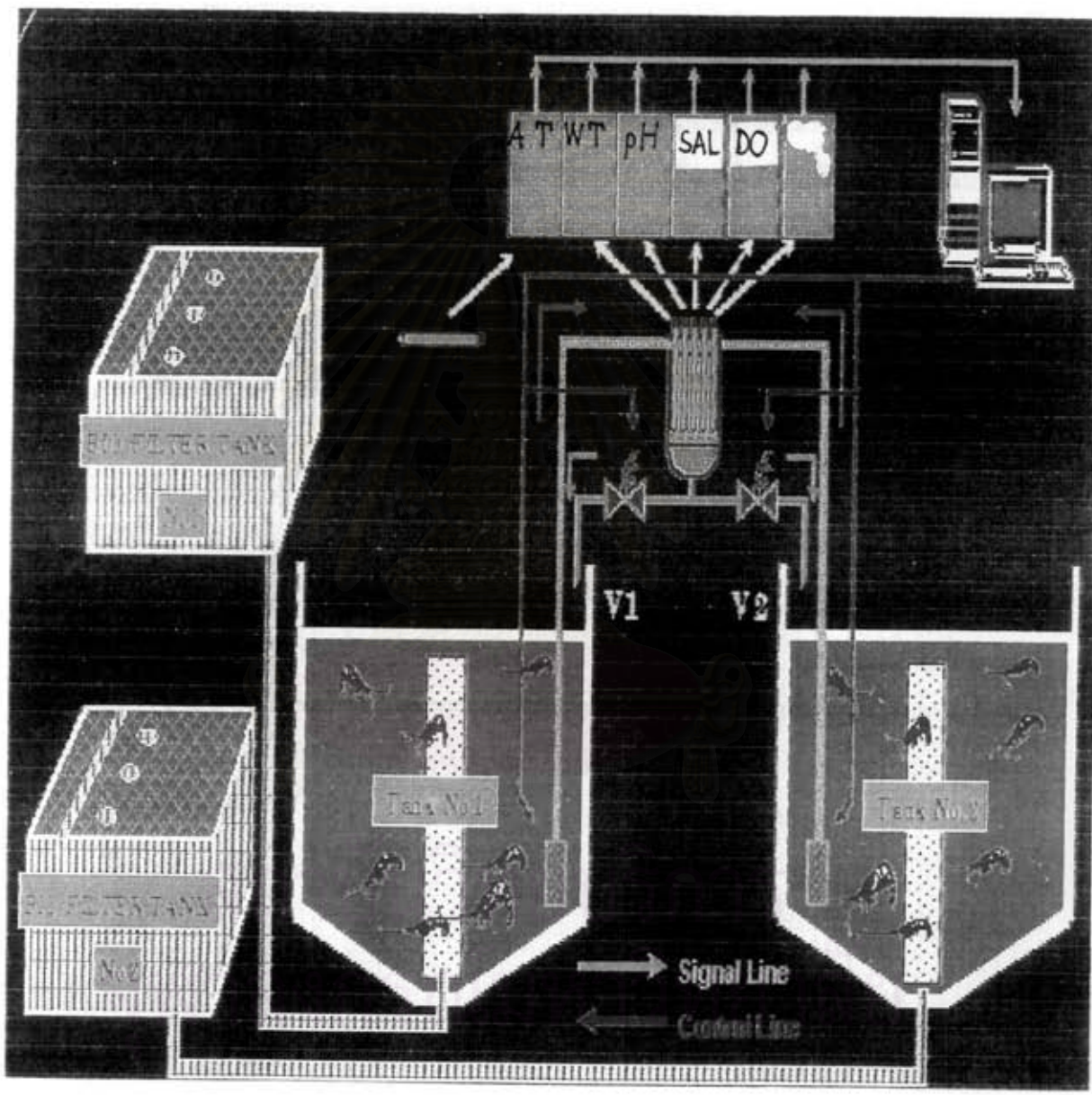
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ลักษณะการติดตั้งตัวกรองทางชีวภาพ (BIO-POLYMA) ภายในบ่อตัวกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน



รูปที่ 6 ลักษณะการติดตั้งระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนคือคอลัมน์ลดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (C1) และคอลัมน์ที่บรรจุวัสดุตรึงสำหรับดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย (C2)



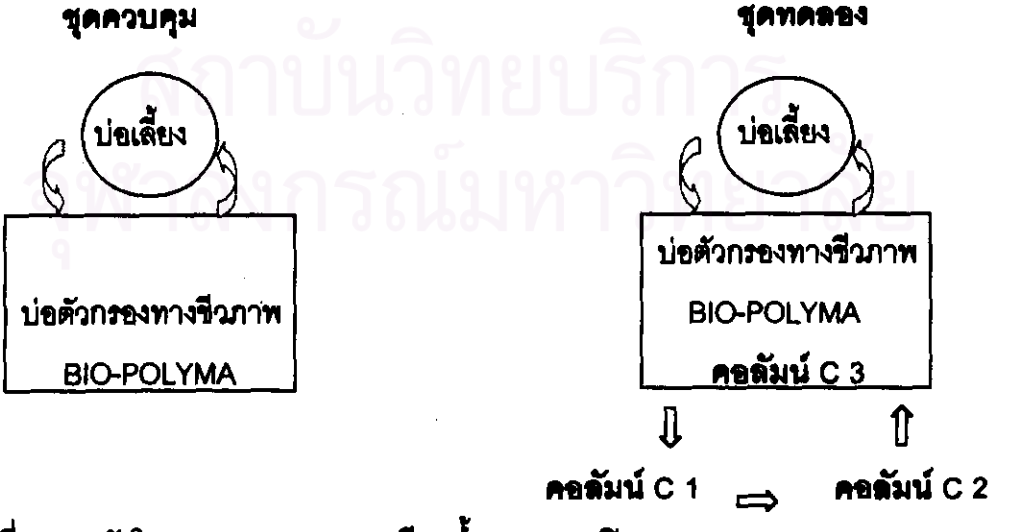
รูปที่ 7 ระบบตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำคือ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ความเค็ม ค่ากรดเบส และปริมาณออกซิเจนละลาย ของน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระบบอัตโนมัติ

วิธีดำเนินการทดลอง

การปรับสภาพการกรองทางชีวภาพในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดโดยไม่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 28-30 ppt ให้มีความสูงของน้ำในบ่อเลี้ยง 60 ซม. (ปริมาตร 5.76 ลบ.ม.) ความสูงของน้ำในบ่อตัวกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน 1.7 ม. (ปริมาตร 6.33 ลบ.ม.) และในระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน 2 คอลัมน์ (คอลัมน์ C1 และ C2) ปริมาตร 0.24 ลบ.ม. ต่อจากนั้นนำวัสดุพลาสติก ลักษณะเป็นขี่ทรงกลม สีฟ้า บรรจุในคอลัมน์ C2 เป็นวัสดุตรึงสำหรับแบคทีเรีย แล้วนำดินจากป่าชายเลนซึ่งคาดว่าจะมีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย และดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย ใส่ลงในบ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน และ ระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้อยู่ในช่วง 0-0.5 mg/l และเพิ่มแหล่งอาหารให้ดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียโดยใช้เอธานอลเข้มข้น 95 % 2 มล. ในน้ำกลั่น 2 ลิตร โดยใช้อัตราประมาณ 0.11 มล./นาที (คำนวณได้จากสมการการทำปฏิกิริยาของไนเตรทและเอธานอล ของ Lewandowski, 1985)

หลังจากได้นำดินจากป่าชายเลนซึ่งคาดว่าจะมีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย และดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย ใส่ลงในบ่อกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน และระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ต่อจากนั้นทำการปรับสภาพการกรองทางชีวภาพในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด โดยใช้สารละลายของแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น ประมาณ 2 mg/l ใส่ในบ่อเลี้ยง และเปิดระบบหมุนเวียนน้ำชุดควบคุมและชุดทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 7) ตรวจสอบคุณภาพน้ำ คือ แอมโมเนียม ไนไตรท์ และ ไนเตรท ของบ่อเลี้ยง ที่เปลี่ยนแปลงไปทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 วัน



รูปที่ 8 แผนผังโดยรวมของระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด ชุดควบคุม และชุดทดลอง

การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด

การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด แบ่งเป็น 2 ช่วง คือการทดลองช่วงที่ 1 และการทดลองช่วงที่ 2 โดยแต่ละช่วงการทดลองประกอบด้วย การทดลองชุดควบคุม และการทดลองชุดทดลอง ก่อนการทดลองนำกุ้งกุลาดำมาปรับสภาพในบ่อเลี้ยง และกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 30 ppm เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในระหว่างนี้ปิดระบบการหมุนเวียนของน้ำเพื่อป้องกันการตายของแบคทีเรีย ที่ได้ปรับสภาพแล้วในปอดัวกรองทางชีวภาพโดยมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดการทดลองช่วงที่ 1

การทดลองในช่วงที่ 1 ใช้น้ำทะเลซึ่งได้เตรียมไว้ในช่วงการเตรียมการทดลองเพียงแต่ปรับความเค็มให้อยู่ในช่วง 28-30 ppt แล้วนำกุ้งกุลาดำที่ได้ผ่านการปรับสภาพและกำจัด จุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว ในช่วงเตรียมการทดลองมาคัดขนาด ชั่งน้ำหนัก วัดความยาวลำตัว และตรวจสอบเพศ แล้วเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงของระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดชุดควบคุม และชุดทดลองบ่อละ 94 ตัว เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเท่ากันคือประมาณ 10 ตัว/ตร.ม. ให้อาหารกุ้งกุลาดำวันละ 3 ครั้ง คือ เวลา 8.30 น. และ 13.00 น. ให้อาหารเม็ดของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ ปริมาณ 3% ของน้ำหนักกุ้งกุลาดำรวม ในแต่ละชุดการทดลอง ส่วนในเวลา 18.30 น. ให้อาหารกุ้งกุลาดำจากหมึกหั่นเป็นเส้นในปริมาณมากกว่าน้ำหนักอาหารเม็ดที่ให้ในแต่ละครั้ง ประมาณ 5-6 เท่า

ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีการเติมน้ำจืดเพื่อปรับความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 28-30 ppt ในแต่ละวันมีการทำความสะอาดบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยการดูดตะกอนในบ่อเลี้ยงและตรวจสอบจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละชุดการทดลอง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดชุดควบคุมและชุดทดลองดังกล่าวเป็นระยะเวลา 22 สัปดาห์ (5 เดือน) โดยเก็บข้อมูลการผันแปรของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำชุดควบคุมและชุดทดลองได้แก่ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนไตรท์ (NO_2^-) และไนเตรท (NO_3^-) โดยกรองน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ด้วยชุดกรอง NALGENE สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนไตรท์ (NO_2^-) และไนเตรท (NO_3^-) ตามวิธีวิเคราะห์ของ Strickland and Parson (1972) ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้ทันตามกำหนดให้เก็บตัวอย่างน้ำไว้ในตู้แช่ 4 ^{o}C ส่วนข้อมูลคุณภาพน้ำคือ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ (ขณะเวลาเดียวกับอุณหภูมิน้ำ) ความเค็ม ค่ากรดเบสและปริมาณออกซิเจนละลายของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ชุดควบคุมและชุดทดลองโดยระบบตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลอัตโนมัติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง

เก็บข้อมูลการเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำ โดยชั่งน้ำหนัก วัดความยาวลำตัว และตรวจสอบเพศของกุ้งกุลาดำทุกตัวในแต่ละชุดการทดลอง เดือนละ 1 ครั้ง

การทดลองช่วงที่ 2

สำหรับการทดลองในช่วงที่ 2 นี้ ได้มีการปรับปรุงระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิดและระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนให้มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมมากขึ้นได้แก่ ปรับปรุงปริมาณการหมุนเวียนของน้ำระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำกับบ่อตัวกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน ลดปริมาณแสงภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เปลี่ยนวัสดุตรึงสำหรับดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียและปรับปรุงระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

การปรับปรุงปริมาณการหมุนเวียนของน้ำ ระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำกับบ่อตัวกรองทางชีวภาพให้มีความเหมาะสมขึ้นเนื่องจากพบว่าในการทดลองช่วงที่ 1 ชุดควบคุมมีอัตราการหมุนเวียนของน้ำ 540 มล./วินาที แต่ชุดทดลองมีอัตราการหมุนเวียนของน้ำ 480 มล./วินาที ทำให้มีอัตราต่างกัน 60 มล./วินาที หรือ 5,184 ลิตร/วัน จึงส่งผลต่อความเค็มของน้ำที่เพิ่มมากขึ้นจากการระเหยของน้ำ ซึ่งชุดควบคุมมีมากกว่าชุดทดลอง ในการทดลองช่วงนี้จึงปรับอัตราการหมุนเวียนของน้ำ ระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำกับบ่อตัวกรองทางชีวภาพสภาวะใช้ออกซิเจน ให้มีอัตราใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 480 มล./นาที

การลดปริมาณแสงภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชุดการทดลอง ทำได้โดยปิดปากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ประมาณ 80 % ของพื้นที่บ่อ ด้วยแผ่นพลาสติกชนิดบาง สีฟ้า

เปลี่ยนวัสดุตรึงเซลล์ของดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียในคอลัมน์บรรจุวัสดุตรึง (C1) จากวัสดุทรงกลมลักษณะเป็นรู สีฟ้า ที่ใช้ในการทดลองช่วงที่ 1 มาเป็นวัสดุตรึงจากเปลือกหอยนางรมขนาดเล็กและทรายหยาบ การปรับปรุงระบบกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ทำได้โดยนำ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย จำพวก Aerobic spore forming bacteria (รูปที่ 9 และรูปที่ 10) ที่ย้อมติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีสีเหลืองขุ่น เยิ้ม และมีประสิทธิภาพสูงในการรีดิวส์ไนเตรท ซึ่งคัดเลือกและแยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน (สุรีย์พร โพธิ์ศรีทอง, 2539) มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nitrate marine denitrifying bacteria จำนวน 100 ml (ส่วนประกอบดังแสดงในภาคผนวก ค.) เขย่าด้วยความเร็ว 220 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็น inoculum เพิ่มปริมาณเชื้อโดยใช้ inoculum 30 ml ที่เตรียมได้ใส่ในอาหารเหลวชนิดเดิม

ปริมาณ 1,000 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 220 rpm อุณหภูมิ 30 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรวบรวมเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ JA-14 ความเร็ว 4,000 rpm ที่ 4 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ที่ได้อีกครั้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียที่ได้ใส่ในคอลัมน์ C1 และC2 ในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด จำนวน 5 ครั้ง (รายละเอียดในตารางที่ 2) ช่วงนี้ต้องปรับอัตราการถ่ายน้ำจากคอลัมน์ C1 ไปยังคอลัมน์ C2 ให้อยู่ในอัตรา 40 มล./นาที และต่อท่อพลาสติกจากคอลัมน์ C2 ให้หมุนเวียนน้ำกลับไปยังคอลัมน์ C1 เพื่อช่วยตรึงเซลล์ของดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียบนวัสดุตรึงให้มากที่สุด

หลังจากการปรับปรุง ระบบหมุนเวียนน้ำทะเลแบบปิด มีการเตรียมน้ำทะเล และเตรียมกุ้งกุลาดำเหมือนในการทดลองช่วงที่ 1 แล้วจึงดำเนินการทดลองเหมือนกับการทดลองในช่วงที่ 1 เพียงแต่ในช่วงการทดลองที่ 2 นี้ เปลี่ยนความหนาแน่นของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในระบบประมาณ 30 ตัว/ตร.ม. (บ่อละ 280 ตัว) และให้อาหารกุ้งกุลาดำ 4 ครั้งต่อวัน คือเวลา 8.30 น. 11.30 น. และ 14.30 น. ให้อาหารเม็ดของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์ ส่วนเวลา 18.30 น. ให้อาหารสดจากหมึกหั่นเป็นเส้นเหมือนการทดลองช่วงที่ 1

ระหว่างทำการทดลองมีการเพิ่มดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียลงไปในระบบตัวกรองทางชีวภาพสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนจำนวน 4 ครั้ง (ดังรายละเอียดในตารางที่ 2) โดยปรับอัตราการถ่ายน้ำจากคอลัมน์ C1 ไปยังคอลัมน์ C2 ให้อยู่ในอัตรา 40 มล./นาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนช่วงเวลาหลังจากนี้ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียจึงปรับอัตราเร็วของ การถ่ายน้ำจากคอลัมน์ C1 ไปยังคอลัมน์ C2 ให้อยู่ในอัตราไม่เกิน 110 มล./นาที

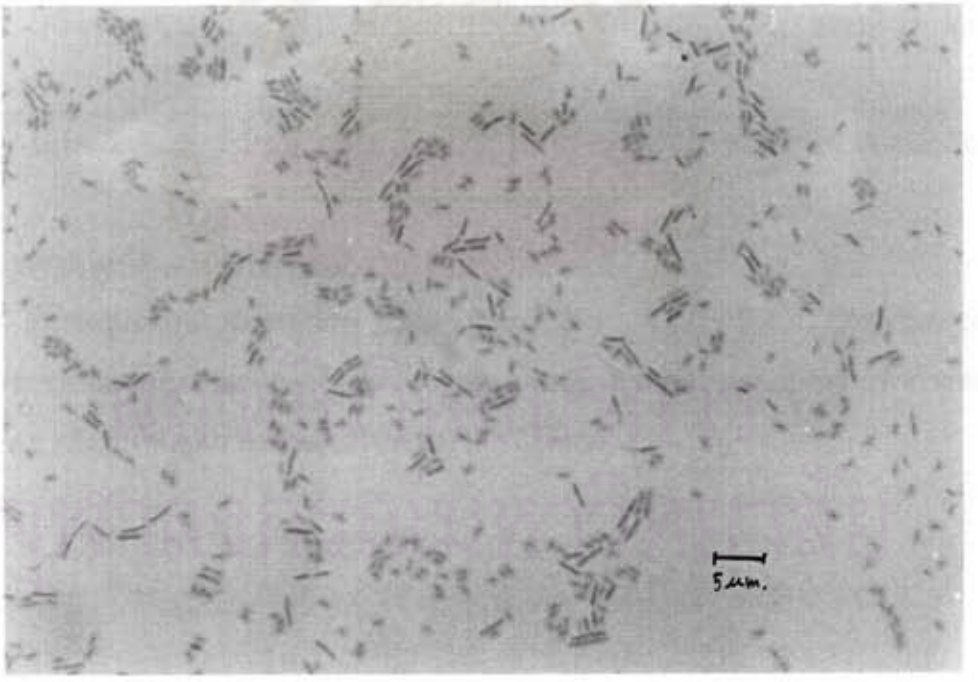
เลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดชุดควบคุมและชุดทดลองเป็นเวลา 21 สัปดาห์ (5 เดือน) โดยมีการเก็บรวบรวมข้อมูลของคุณภาพน้ำ อัตราการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งเหมือนกับการทดลองช่วงที่ 1

ตารางที่ 2 จำนวน ดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย (Denitrifying bacteria) *Bacillus* sp. ที่เติมในคอลัมน์เติมดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรียชุดทดลอง ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วงที่ 2

ช่วงเวลาการเติม	จำนวนเซลล์ (ประมาณ)
2 สัปดาห์ก่อนการทดลอง	
ครั้งที่ 1	11.66×10^{11}
ครั้งที่ 2	10.60×10^{11}
ครั้งที่ 3	10.60×10^{11}
ครั้งที่ 4	11.66×10^{11}
ครั้งที่ 5	10.60×10^{11}
ก่อนสัปดาห์ที่ 7 ระหว่างการทดลอง	10.60×10^{11}
ก่อนสัปดาห์ที่ 12 ระหว่างการทดลอง	10.60×10^{11}
ก่อนสัปดาห์ที่ 16 ระหว่างการทดลอง	10.60×10^{11}
ก่อนสัปดาห์ที่ 19 ระหว่างการทดลอง	11.66×10^{11}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ลักษณะ vegetative cell ซึ่งย้อมติดสีแกรมบวก ของ *Bacillus* sp. (ดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย) ที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วงที่ 2



รูปที่ 10 ลักษณะสปอร์ย้อมติดสีเขียว และ vegetative cell ย้อมติดสีแดง ของ *Bacillus* sp. ดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย เมื่อย้อมด้วยวิธี spore stain ที่ใช้เติมในคอลัมน์เติมดีไนตริฟายอิ้งแบคทีเรีย (C2) การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วงที่ 2

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ข้อมูลคุณภาพน้ำ

1.1 ปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+),ไนไตรท์ (NO_2^-) และ ไนเตรท(NO_3^-) วิเคราะห์โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Strickland และ Parson (1972) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอดการทดลอง 22 สัปดาห์ ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วงแรก และ ในการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วงที่ 2 เป็นเวลา 21 สัปดาห์

1.2 ตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูล อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่ากรดเบส (pH) ความเค็ม และปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) โดยระบบตรวจสอบและจัดเก็บข้อมูลระบบอัตโนมัติทุกๆ 30 นาที ตลอด 24 ชั่วโมงโดยใช้

- เครื่องวัดค่าความเค็ม รุ่น Inpro 7100 conductivity และ Conductivity Transmitter 7400 ของบริษัท Mettler- Toledo

-เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลาย รุ่น O_2 - Sensor Ø 12 mm. และ Oxygen Amplifier Model 170 ของบริษัท Mettler- Toledo (%)

-เครื่องวัดค่ากรดเบส (pH) รุ่น SUNTEX pH/ORP PC – 310 ของบริษัท Mettler-Toledo

-เครื่องวัดอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ รุ่นTOHO TM 105 ของบริษัท Mettler-Toledo

2. ข้อมูลการเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำ

เก็บข้อมูลการเติบโตและการรอดของกุ้งกุลาดำโดย ชั่งน้ำหนัก วัดความยาวลำตัว ตรวจสอบเพศและนับจำนวนของกุ้งกุลาดำทุกตัว ก่อนทำการทดลองและระหว่างทำการทดลองเดือนละ 1 ครั้ง จนสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อดูความแตกต่างของคุณภาพน้ำระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ชุดควบคุมและชุดทดลอง คือแอมโมเนียม (NH_4^+) ไนไตรท์ (NO_2^-) ไนเตรท (NO_3^-) ค่ากรดเบส และ ปริมาณออกซิเจนละลาย โดยใช้สถิติ Analysis of covariance โปรแกรม SAS (ดังแสดงในภาคผนวก จ.) โดยแยกเป็นการทดลองช่วงที่ 1 และการทดลองช่วงที่ 2

2. วิเคราะห์ข้อมูลด้านคุณภาพน้ำ และข้อมูลการเติบโตของกุ้งกุลาดำเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นของการแปรผันตามระยะเวลา โดยการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Linear regression analysis จากโปรแกรม SAS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย