บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ในการทดลอง

การใช้ปลานิล *Oreochromis niloticus* และสาหร่ายสไปรูลินา *Spirulina platensis* ในการบำบัดน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบความเค็มต่ำ ครั้งนี้ ได้ใช้อุปกรณ์ที่สำคัญ คือ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotomemter) รุ่น SPECTRONIC GENESYS TM ของบริษัท MILTON ROY ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) YSI model 33
3. เครื่องวัดค่ากรดเบส (pH) รุ่น HI 8418 ของบริษัท HANNA INSTRUMENTS
4. เครื่องวัดค่าความเค็ม (Hand refractometer) ของบริษัท ATAGO Co, Ltd. JAPAN
5. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux Meter) รุ่น LX-101 ของบริษัท Lutron
6. เครื่องให้อากาศ
7. ถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร
8. กระชังเลี้ยงปลานิลขนาด 1 ตารางฟุต
9. ชั้นและแผงไฟฟลูออเรสเซนต์สำหรับใช้เลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาหร่ายสไปรูลินา และปลานิล ในการควบคุมคุณภาพน้ำเพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนั้นจึงออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด 2 ปัจจัย (Completely Randomized Design involved factorials) คือ ความหนาแน่นของสาหร่ายสไปรูลินา 3 ระดับ (0, 4.2×10^8 และ 8.4×10^8 ไตรโคมต่อลิตร) และความหนาแน่นของปลานิล 3 ระดับ (0, 3 และ 6 ตัวต่อบ่อ) การทดลองแต่ละ treatment ทำ 2 ซ้ำ

การเตรียมการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ ได้มีการเตรียมการ 2 ส่วน คือ ในส่วนของระบบการเลี้ยงความเค็มต่ำ และการเตรียมสัตว์ทดลอง

1. **การเตรียมระบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำความเค็มต่ำ**

1.1 **สถานที่ทดลอง** หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะพื้นที่แปลงงาน เป็นรูปสี่เหลี่ยมพื้นผ้า โดยมีขนาดความกว้าง X ความยาว เท่ากับ 7.0 X 4.0 เมตร คิดเป็นพื้นที่ 28 ตารางเมตร บริเวณแปลงงานอยู่ใกล้อาคารสูง มีร่มไม้ใหญ่

ทำการปรับพื้นที่ให้เรียบ และวางท่อระบบระบายน้ำออกจากบ่อทดลองเพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของน้ำความเค็มต่ำลงสู่ดิน (ภาพที่ 3-1)

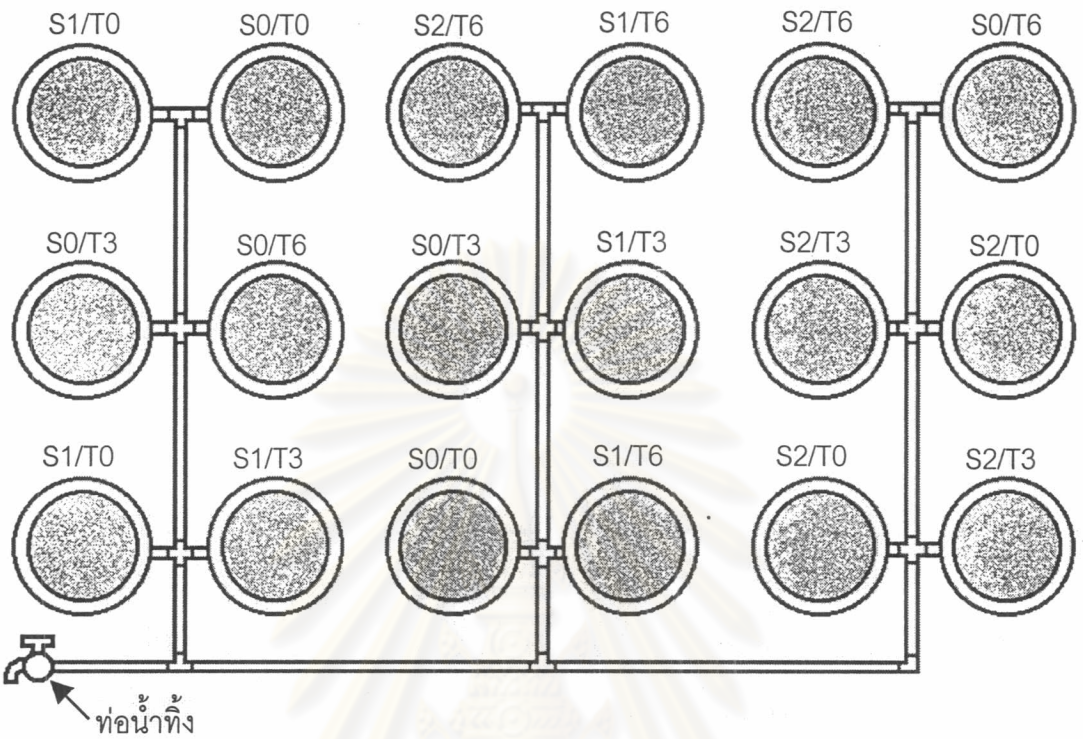
1.2 **บ่อทดลอง** เป็นถังไฟเบอร์ทรงกลม ขนาด 200 ลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.72 เมตร สูง 0.45 เมตร พื้นที่ก้นถัง 0.4 ตารางเมตร แต่ละถังจะมีท่อพีวีซีขนาด 1 นิ้ว ต่อออกมาจากบริเวณกลางถัง (ภาพที่ 3-2) เพื่อควบคุมความสูงของน้ำให้คงที่ ส่วนด้านบนของบ่อทดลองแต่ละใบจะมีพลาสติกใสคลุมเป็นกระโจม เพื่อป้องกันฝนและกันกุ้งกระโดดออกจากถัง

1.3 **กระชังเลี้ยงปลานิล** มีขนาด 1 x 1 x 1 ฟุต มีฝาเปิดด้านบน ตัวกระชังทำจากท่อพีวีซีสีเทาขนาด 0.5 นิ้ว ภายในท่อบรรจุทรายเพื่อถ่วงกระชังไม่ให้ลอย และหุ้มด้วยตาข่ายสีฟ้าตาถี่ (ภาพที่ 3-2)

1.4 **น้ำเค็ม ที่ระดับความเค็ม** 5 **พีพีที** เตรียมโดย นำน้ำประปามาให้อากาศเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำน้ำความเค็มสูงจากนาเกลือ จังหวัดสมุทรสาคร มาผสมให้ได้ความเค็มของน้ำที่ 5 พีพีที และให้อากาศอีก 3 วัน จึงนำน้ำมาใช้ในการทดลอง

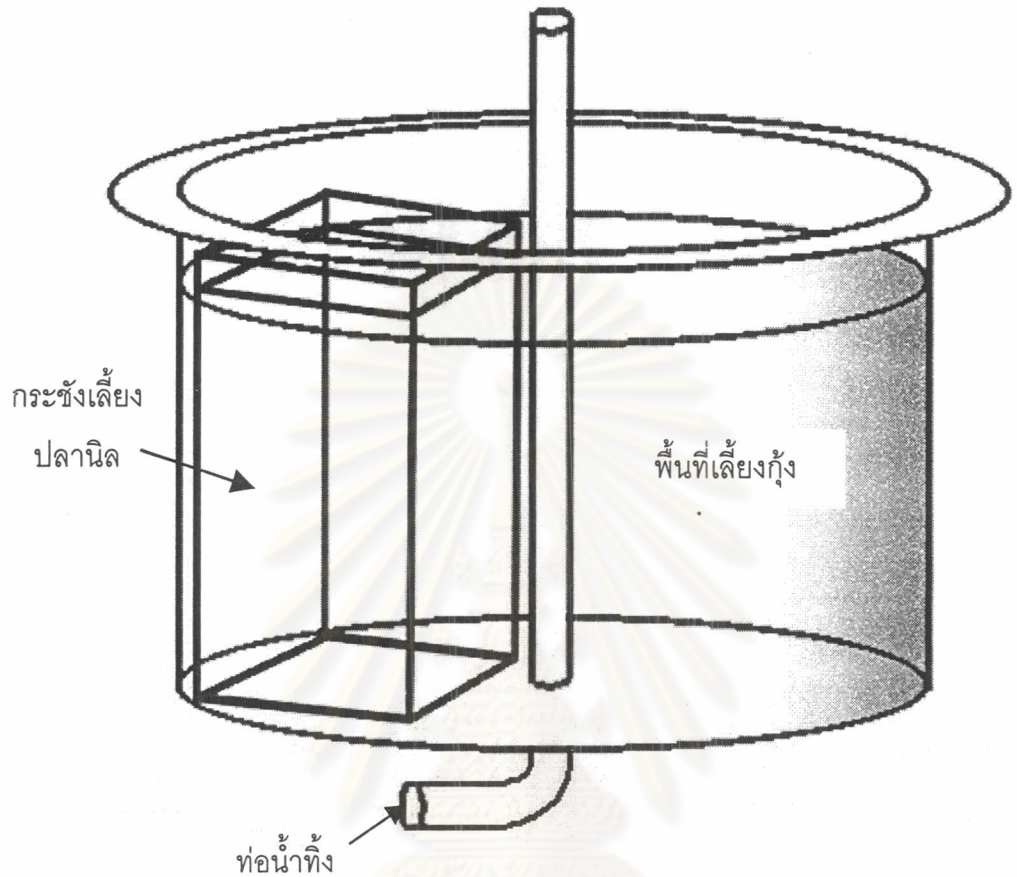
ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิดแบบน้ำเดียว ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังการวางชุดการทดลองการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบความเค็มต่ำ โดยวางแผนการทดลอง Completely Randomized Design involved factorials และวางตำแหน่งบ่อการทดลองแบบสุ่ม เมื่อ S0, S1 และ S2 แทนปริมาณสาหร่ายสไปรูลินาที่ใช้ 0, $4.2x10^8$ และ $8.4x10^8$ ไตรโคมต่อลิตร ตามลำดับ และ T0, T3 และ T6 แทนจำนวนปลานิลที่ปล่อยในกระชังในบ่อทดลอง 0, 3 และ 6 ตัวต่อบ่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3-2 บ่อทดลอง เป็นถังไฟเบอร์ทรงกลม ขนาด 200 ลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.72 เมตร สูง 0.45 เมตร พื้นที่ก้นถัง 0.4 ตารางเมตร แต่ละถังจะมีท่อพีวีซีขนาด 1 นิ้ว ต่อออกมาจากบริเวณกลางถัง

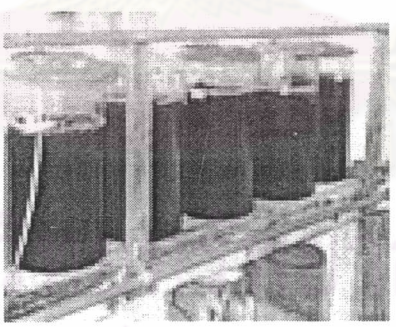
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **การเตรียมสัตว์ทดลอง**

2.1 **กุ้งกุลาดำ** นำกุ้งกุลาดำอายุ P_{45} วัน ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 12 พีพีที จากฟาร์มที่คลองแปด รังสิต จังหวัดปทุมธานี พักในบ่อซีเมนต์ขนาด 0.25 X 0.75 X 0.75 เมตร เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเริ่มปรับความเค็มน้ำ โดยการเติมน้ำจืดที่ให้ออกซิเจนเต็มที่ไว้แล้ว ปรับระดับความเค็มน้ำให้ลดลงจนอยู่ในระดับ 5 พีพีที อนุบาลกุ้งกุลาดำให้ปรับสภาพอยู่ในนี้ประมาณ 1 สัปดาห์ จึงนำไปคัดกุ้งขนาดเท่ากัน เพื่อใช้ในการทดลอง

2.2 **ปลานิล** นำลูกปลานิลอายุ 30 วัน เลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร โดยพักให้ปลานิลปรับสภาพ 2 วัน จากนั้นเริ่มทำการปรับระดับความเค็มน้ำขึ้นครั้งละ 2 พีพีที จนถึง 5 พีพีที ปล่อยให้ปลานิลปรับสภาพประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนคัดขนาดเพื่อทำการทดลอง

2.3 **สาหร่ายสไปรูลินา** เลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาใน flask ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ด้วย Zarrouk's medium ความเค็ม 5 พีพีที ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ให้อากาศด้วยหัวทราย เมื่อสาหร่ายสไปรูลินาที่ระดับความเค็ม 5 พีพีที โตได้จำนวนมาก จึงขยายขนาดไปเลี้ยงในขวดโหลเพื่อใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 3-3)



ภาพที่ 3-3 การเพิ่มจำนวนสาหร่ายสไปรูลินาในโหลแก้ว ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการศึกษา

1.ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่าง และการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ ในการบำบัดน้ำทางชีวภาพ โดยใช้กุ้งกุลาดำที่ความหนาแน่น 30 ตัว/ตารางเมตร หรือถังละ 12 ตัวต่อบ่อทดลองในน้ำ 150 ลิตร

ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design involved factorials โดยมีอัตราความหนาแน่นของปลานิลและสาหร่ายสไปรูลินา เป็น factors ที่ factor ละ 3 ระดับ รวม 9 treatments แต่ละ treatment ทำ 2 ซ้ำ ดังนี้

treatment ที่ 1 ความหนาแน่นของสาหร่ายสไปรูลินาและปลานิลเป็นศูนย์ เขียนแทนด้วย S0/T0

treatment ที่ 2 ใช้สาหร่ายสไปรูลินาความหนาแน่น 4.2 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตรไม่มีปลานิล เขียนแทนด้วย S1/T0

treatment ที่ 3 ใช้สาหร่ายสไปรูลินาความหนาแน่น 8.4 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตร ไม่มีปลานิล เขียนแทนด้วย S2/T0

treatment ที่ 4 ใช้ปลานิล ความหนาแน่น 3 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร ไม่มีสาหร่ายสไปรูลินา เขียนแทนด้วย S0/T3

treatment ที่ 5 ใช้ปลานิล ความหนาแน่น 6 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร ไม่มีสาหร่ายสไปรูลินา เขียนแทนด้วย S0/T6

treatment ที่ 6 ใช้สาหร่ายสไปรูลินา ความหนาแน่น 4.2 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตร และปลานิล ความหนาแน่น 3 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร เขียนแทนด้วย S1/T3

treatment ที่ 7 ใช้สาหร่ายสไปรูลินา ความหนาแน่น 4.2 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตร ปลานิล ความหนาแน่น 6 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร เขียนแทนด้วย S1/T6

treatment ที่ 8 ใช้สาหร่ายสไปรูลินา ความหนาแน่น 8.4 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตร และปลานิล ความหนาแน่น 3 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร เขียนแทนด้วย S2/T3

treatment ที่ 9 ใช้สาหร่ายสไปรูลินา ความหนาแน่น 8.4 $x10^8$ ไตรโคม/ลิตร และปลานิล ความหนาแน่น 6 ตัวต่อน้ำ 150 ลิตร เขียนแทนด้วย S2/T6

ตารางที่ 3-1 การออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design involved factorials

	ไม่มีสไปรูลินา	สไปรูลินา $4.2x10^8$ ไตรโคม/ลิตร	สไปรูลินา $8.4x10^8$ ไตรโคม/ลิตร
ไม่มีปลานิล	S0/T0	S1/T0	S2/T0
ปลานิล 3 ตัว	S0/T3	S1/T3	S2/T3
ปลานิล 6 ตัว	S0/T6	S1/T6	S2/T6

ทำการคัดขนาดจากกุ้งกุลาดำที่ทำการปรับความเค็มเตรียมไว้แล้วที่ 5 พีพีที ชั่งและบันทึกน้ำหนักก่อนนำลงบ่อทดลอง ตลอดการทดลองจะให้อาหารเฉพาะกุ้งกุลาดำอย่างเดียว วันละ 2 มื้อ คือ ในช่วงเช้า 8.00 น. และในช่วงเย็น 18.00 น. ปริมาณที่ให้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักกุ้ง ไม่มีการให้อาหารปลา

ในชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงปลานิลร่วมด้วย จะเลี้ยงปลานิลในกระชังขนาด 1 X 1 X 1 ฟุต ซึ่งใส่ไว้ในบ่อทดลอง ปลานิลในกระชังมี 2 ความหนาแน่น คือ 3 ตัว และ 6 ตัวต่อกระชัง ทำการคัดขนาดปลานิลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน บันทึกน้ำหนักและความยาวของปลานิล

ชุดการทดลองที่มีการเติมสาหร่ายสไปรูลินา จะทำการเติมสาหร่ายสไปรูลินาโดยกรองสาหร่ายสไปรูลินาด้วย Plankton net ขนาด pore size 60.ไมครอน แล้วนำมาล้างด้วยน้ำความเค็ม 5 พีพีที หลายๆครั้ง เพื่อล้าง Zarrouk's medium ซึ่งมีความเข้มข้นของไนเตรทอยู่สูงออก ก่อนเติมในถังทดลอง

2.การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนและฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ตรวจวัดคุณภาพน้ำโดยการเก็บน้ำจากบ่อการทดลอง วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟต ทุกๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 3 เดือน

3.การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาหร่ายสไปรูลินาในบ่อทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

โดยสุ่มน้ำจากถังทดลองจากแต่ละถัง ตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสไปรูลินา ทุกๆ 2 วัน

4.การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

บันทึกน้ำหนักและความยาวของกุ้งกุลาดำและปลานิลทุกตัวในถัง ก่อนทำการทดลองและตรวจวัดทุกๆ 30 วัน จนเสร็จสิ้นการทดลองรวมระยะเวลา 3 เดือน โดยการตรวจวัดกุ้งกุลาดำและปลานิลทุกตัว

การเก็บข้อมูลอื่น ๆ

ตรวจสอบพารามิเตอร์ของคุณภาพน้ำต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ออกซิเจนละลาย ความเค็ม ทุกวัน ตลอดการทดลอง 3 เดือน วัดความเข้มแสงบริเวณพื้นที่ทดลองเพื่อหาค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของพื้นที่ทดลอง

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำในห้องปฏิบัติการ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทันที โดยกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง GF/C ยี่ห้อ Whatman และนำน้ำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนียม (NH_4-N) ไนไตรท์ (NO_2-N) และฟอสเฟต (PO_4-P) ตามวิธีของ Strickland and Parson (1972) ส่วนไนเตรท (NO_3-N) และคลอโรฟิลล์ วิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Method (1992) (ภาคผนวก ก) ถ้าวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำไม่ได้ทันที จะเก็บตัวอย่างน้ำไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ 4^0C

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลในแต่ละชุดการทดลอง และแต่ละระยะเวลา มาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยการทดสอบความแปรปรวน (analysis of variance) ของกลุ่มข้อมูลด้วยวิธี F-test สำหรับข้อมูลชุดใดที่ค่า F จากการทดสอบที่ทำให้ค่า $P<0.05$ จะนำเอาค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำมาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan 's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลกับเวลาด้วยการวิเคราะห์เชิงเส้นตรงแบบถดถอย (Linear Regression Analysis)