

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างน้ำ ใช้ขวดพลาสติกชนิด Polyethylene ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างดินตะกอน
 - 2.1 เครื่องมือสำหรับเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งแบบ core sampler
 - 2.2 ขวดเก็บตัวอย่างดินตะกอน ใช้ขวดพลาสติกชนิด Polyethylene ขนาด 500 มิลลิลิตร
3. เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ
 - 3.1 เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ YSI 58
 - 3.2 UV/VIS Spectrophotometer (Milton Roy 1001 plus)
 - 3.3 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Automatic balance)
 - 3.4 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Automatic balance)
 - 3.5 ตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส (hot air oven)
 - 3.6 ชุดกรอง (milli-pore filter set)
 - 3.7 กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
 - 3.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
4. วัสดุและอุปกรณ์ในการทดสอบการย่อยสลายของเสียในห้องปฏิบัติการ
 - 4.1 ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
 - 4.2 ขวดซีรัม (serum bottles) พร้อมด้วยจุกยางสำหรับปิดขวด (butyl rubber stoppers)
 - 4.3 ที่ปิดขวดซีรัม (aluminium crimp)
 - 4.4 ตู้อบอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส และ 700 องศาเซลเซียส
 - 4.5 จานเพาะเชื้อ (petri-dish)
 - 4.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 - 4.7 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

- 4.8 เครื่องเขย่า (shaker)
- 4.9 กระบอกนํ้าขนาด 1 มิลลิลิตร และขนาด 5 มิลลิลิตร
- 4.10 เข็มฉีดยา
- 4.11 micro tube
- 4.12 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตัวอย่าง
 - 5.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย
 - 5.1.1 Sodium hypochlorite
 - 5.1.2 Sodium hydroxide
 - 5.1.3 Sodium citrate
 - 5.1.4 Sodium nitropusside
 - 5.1.5 Phenol
 - 5.1.6 Ammonium chloride
 - 5.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์
 - 5.2.1 Sulphanilamide
 - 5.2.2 N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dichroride
 - 5.2.3 Sodium Nitrite (NaNO_2)
 - 5.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท
 - 5.3.1 Sodium arsenite
 - 5.3.2 Brucine sulfate
 - 5.3.3 Sulfanilic acid
 - 5.3.4 Sulfuric acid
 - 5.3.5 Sodium chloride
 - 5.3.6 Possium nitrate (KNO_3)
 - 5.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต
 - 5.4.1 Ammonium molybdate
 - 5.4.2 H_2SO_4
 - 5.4.3 Ascorbic acid
 - 5.4.4 Potassium antimonyl-tartrate
 - 5.4.5 Potassium dihydrogen phosphate

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์

6.1.1 BT medium

6.1.2 Tryptic soy agar (TSA)

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบการย่อยสลาย

6.2.1 Defined minimal salt medium (DMSM)

6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

6.3.1 Nutrient agar (NA)

6.3.2 MacConkey agar (MAC agar)

6.3.3 Tryptic soy agar (TSA)

6.3.4 Tryptone broth

6.3.5 O-F medium (1% glucose)

6.3.6 Triple Sugar Iron (TSI) agar

6.3.7 Simmon's Citrate agar

6.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

6.4.1 Nutrient agar (NA)

6.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับถ่ายเชื้อ (subculture)

6.5.1 Tryptic soy broth (TSB)

6.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับนับจำนวนจุลินทรีย์

6.6.1 Plate count agar (PCA)

6.7 สารเคมีที่ใช้เติมเป็นแหล่งทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ที่ ย่อยสลายสารแต่ละชนิด

6.7.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายแอมโมเนีย คือ Ammonium chloride

6.7.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไนไตรต์ คือ Sodium nitrite

6.7.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไนเตรท คือ Potassium nitrate

6.7.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฟอสเฟต คือ Disodium hydrogen phosphate

7. สารเคมีสำหรับใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์

- 7.1 Crystal violet
- 7.2 Gram iodine
- 7.3 Ethanol 95%
- 7.4 Safranin O
- 7.5 Methyl red
- 7.6 paraffin liquid
- 7.7 α -naphthol
- 7.8 40% KOH reagent
- 7.9 Kovac's reagent
- 7.10 3% hydrogen peroxide (3% H_2O_2)
- 7.11 oxidase test reagent

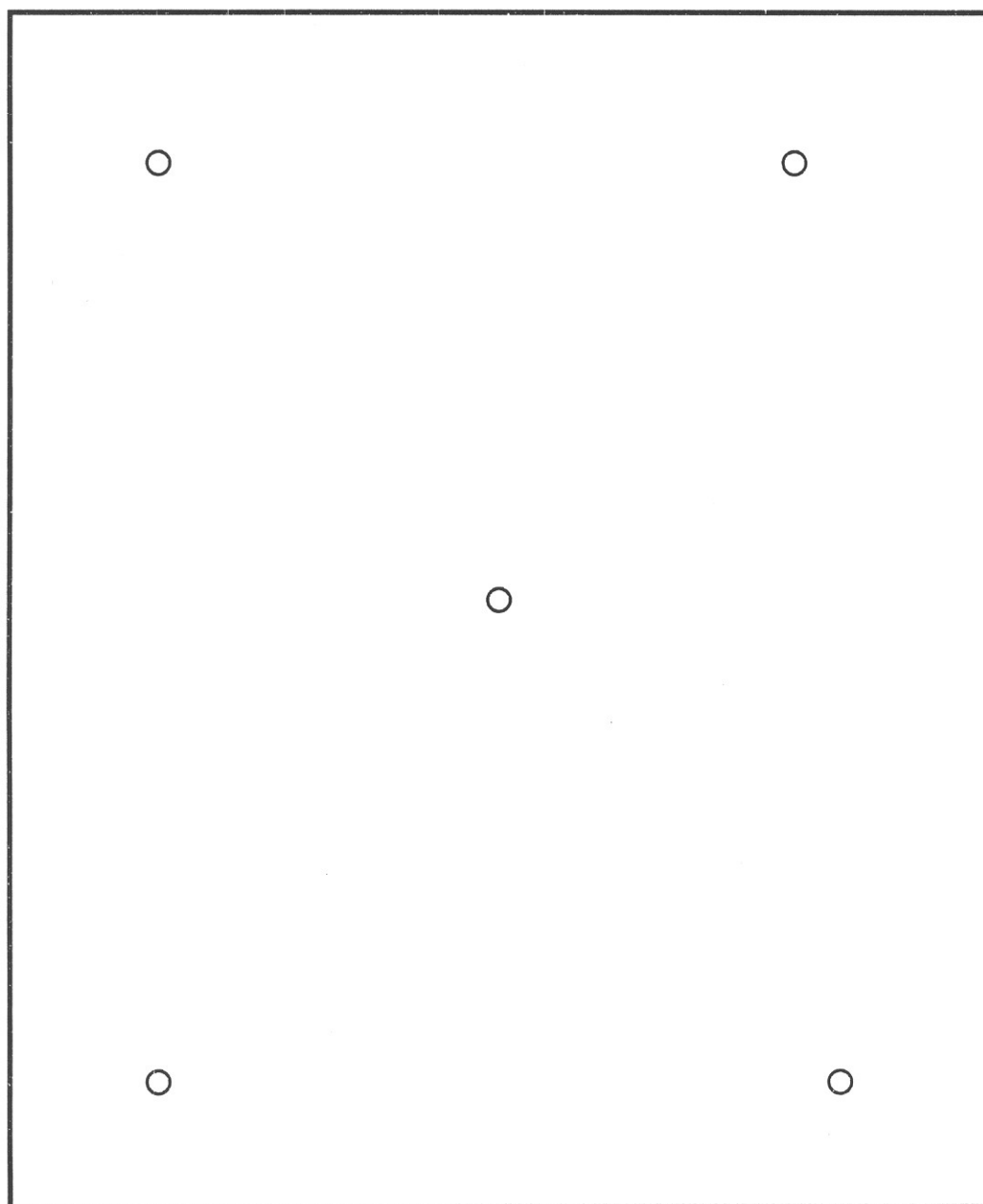
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

บ่อเลี้ยงกุ้งมีขนาดโดยประมาณ 2 ไร่ กว้าง 40 เมตร ยาว 80 เมตร ระดับน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งลึก 1.50 เมตร สีของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งเป็นสีเขียวอมเหลือง สีของดินคันบ่อเป็นสีเทาดำ ส่วนสีของดินตะกอนเป็นสีดำและมีกลิ่นคาว อายุของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง 3 เดือน 7 วัน

1.1 ตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำลึกจากผิวน้ำประมาณครึ่งหนึ่งของบ่อ โดยเก็บน้ำบริเวณริมบ่อจำนวน 4 จุด และบริเวณกลางน้ำ 1 จุด โดยเก็บ เก็บจุดละ 3 ซ้ำ (ภาพที่ 7)

1.2 ตัวอย่างดินตะกอน เก็บตัวอย่างดินตะกอนจากพื้นบ่อกุ้งบริเวณจุดเดียวกับตัวอย่างน้ำโดยใช้ core sampler และเก็บลึกจากผิวดินประมาณ 5-6 เซนติเมตร เก็บจุดละ 1 ซ้ำ (ภาพที่ 7)



หมายเหตุ ○ = จุดเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน

ภาพที่ 7 แผนผังแสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ทำการศึกษา

2. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

2.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ณ จุดที่เก็บตัวอย่างน้ำ

2.1.1 ค่าออกซิเจนละลาย

2.1.2 ความเป็นกรดด่าง

2.1.3 อุณหภูมิ

2.1.4 ความเค็ม



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะทางกายภาพโดยทั่วไปของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะการให้อากาศในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะการเก็บตัวอย่างดินตะกอน

2.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 ปริมาณแอมโมเนีย และปริมาณฟอสเฟต ตามวิธีของไมตรี ดวงแก้ว

และจารุวรรณ สมศิริ (2528)

2.2.2 ปริมาณไนเตรท ตามวิธีของม้นสิน ตันทุลเวสม์ (2538)

2.2.3 ปริมาณไนไตรท์ ตามวิธีของ สติกแลนด์ และ พาร์สัน (Stickland & Parson,

1972)

3. การเตรียมสารละลายดินตะกอน

3.1 ชั่งดินตะกอนจากข้อ 1.2 มา 10 กรัม

3.2 เตรียมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำเครื่องหมายแสดงระดับ น้ำบนภาชนะที่บรรจุ จากนั้นดูดน้ำกลั่นออกมา 10 มิลลิลิตร และเติมดินตะกอนจากข้อ 1) ลงไป

3.3 ปรับปริมาตรของระดับน้ำในขวดให้พอดีกับเครื่องหมายที่ได้ทำไว้ โดยการเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไป

3.4 ปิดฝาขวดให้แน่น จากนั้นเขย่าให้ตะกอนและน้ำรวมเป็นเนื้อเดียวกัน

3.5 ดูดสารละลายดินตะกอนลงในขวดซีรัม ขวดละ 5 มิลลิลิตร

4. วิธีทดสอบการย่อยสลายสารที่เป็นของเสียจากบ่อกึ่งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (ภาพที่ 11)

4.1 ในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารที่เป็นของเสียทำโดยนำ serum bottle ขนาด 100 มิลลิลิตร มาจำนวน 7 ขวด 3 ขวดแรกนำมาเติม 45 มิลลิลิตรของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง และ 5 มิลลิลิตร ของดินตะกอนซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งของจุลินทรีย์

4.2 ส่วนอีก 2 ขวดจะนำมาใช้เป็นชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่ดินตะกอนที่ต้องการ ทดสอบ (background bottles) เติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 50 มิลลิลิตร

4.3 ส่วนอีก 2 ขวดที่เหลือจะนำมาใช้เป็นชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ (sterile bottles) โดยจะมีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1) ยกเว้นจะมีการฆ่าเชื้อโดยวิธีการ autoclave

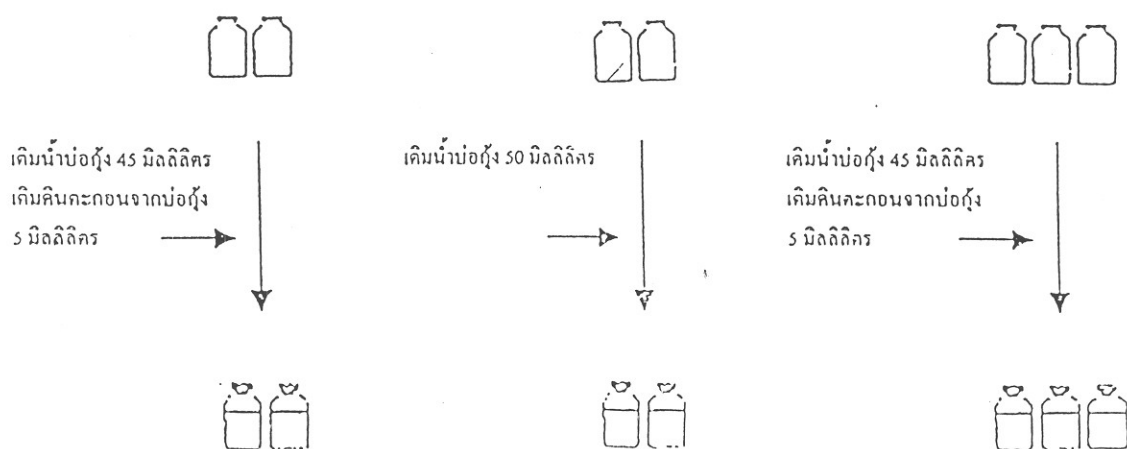
4.4 ปิดฝาขวดซีรัมและทำให้ความดันภายในขวดเป็นศูนย์ด้วยเข็มฉีดยา แล้วนำขวดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโดยการตรวจวัดปริมาณสารแอมโมเนีย ไนโตรท ไนไตรต์ และฟอสเฟต ในระยะเวลาที่เหมาะสมตามวิธีประยุกต์ในข้อ 6. พร้อมทั้งวัดแก๊สที่เกิดขึ้นในขวดซีรัม

4.5 จากนั้นทำการแยกเชื้อและจำแนกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารจากขวดในชุดทดลอง

ชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ
(Sterile bottles)

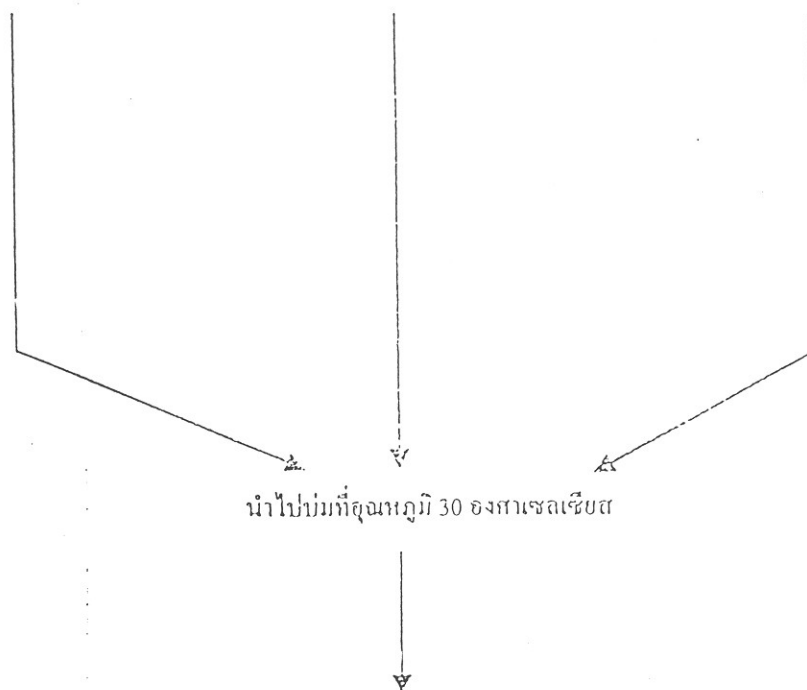
ชุดควบคุมแบบที่ไม่ได้คั่นตะกอน
(Background bottles)

ชุดทดลอง
(Active bottles)



นำไปนั่งฆ่าเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต

ภาพที่ 11 แสดงชุดการทดลองเพื่อศึกษาการย่อยสลายของเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

5. วิธีทดสอบการย่อยสลายสารที่เป็นของเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรท

ทำเหมือนในสภาวะที่มีออกซิเจน (ข้อ 4.) แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรทลงไปให้ในขวดซีรั่มทุกขวดให้ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างในทุกขวดของทั้ง 3 ชุด ปริมาตรขวดละ 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต

6.1 การวัดปริมาณแอมโมเนีย (ภาพที่ 12) วิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจากคุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมงของไมตรี ดวงแก้วและจารูวรรณ สมศิริ (2528) (การเจือจางที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.1.1 ทำการเจือจาง 10 เท่าก่อน โดยดูดตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร แล้วเติม phenol reagent ปริมาตร 80 ไมโครลิตร Sodium nitroprusside 80 ไมโครลิตร Alkaline stock solution 200 ไมโครลิตร

6.1.2 ปิดปลายหลอดทดลองเพื่อป้องกันแอมโมเนียจากบรรยากาศลงไปเจือปน ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้เพื่อให้สารละลายทำปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน ประมาณ 60 นาที

6.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

6.2 การวัดปริมาณไนเตรท (ภาพที่ 13) วิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจากคู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของมนัส ดันทุลเวศม์ (2538) (การเจือจางที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.2.1 ทำการเจือจาง 40 เท่าก่อน โดยดูดตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,950 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตรแล้วเติม Sodium chloride ปริมาตร 400 ไมโครลิตร Sulfuric solution 2,000 ไมโครลิตร นำไปตั้งให้เย็นในน้ำแข็ง

6.2.2 นำไปเติม Brucine-Sulfanilic 100 ไมโครลิตร นำไปอังไอน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาแช่ให้เย็นในน้ำแข็ง

6.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงเป็น %T ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

6.3 การวัดปริมาณไนไตรต์ (ภาพที่ 14) วิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจากคู่มือวิเคราะห์น้ำของ สติกแลนด์ และพาร์สัน (Stickland & Parson, 1972) (การเจือจางที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.3.1 ทำการเจือจาง 10 เท่าก่อน โดยดูดตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร แล้วเติม Sulfanilamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร NNED 40 ไมโครลิตร

6.3.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาจนสมบูรณ์ เกิดเป็นสีบานเย็น นาน 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง

6.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

6.4 การวัดปริมาณฟอสเฟต (ภาพที่ 15) วิธีการนี้ได้ประยุกต์มาจากคุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมงของไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ (2528) (การเจือจางที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

6.4.1 ทำการเจือจาง 2 เท่าก่อน โดยดูดตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร แล้วเติม Mixed molybdate ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

6.4.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาจนสมบูรณ์ เกิดเป็นสีน้ำเงิน นาน 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง

6.4.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

ชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ
(Sterile bottles) -



ชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่คีนตะกอน
(Background bottles)



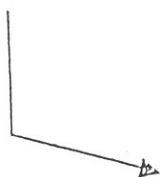
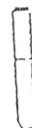
ชุดทดลอง
(Active bottles)



เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ชุด ปริมาตรขวดละ 3 มิลลิลิตร
นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที



ดูดส่วนใสมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร



เติม phenol reagent ปริมาตร 80 ไมโครลิตร
Sodium nitroprusside 80 ไมโครลิตร
Alkaline stock solution 200 ไมโครลิตร



ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยานาน 60 นาที
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

ภาพที่ 12 แสดงชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์แอมโมเนีย

ชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ
(Sterile bottles)



ชุดควบคุมแบบที่ไม่ได้คลินตะกอน
(Background bottles)



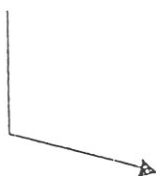
ชุดทดลอง
(Active bottles)



เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ชุด ปริมาตรขวดละ 3 มิลลิลิตร
นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที



ดูดส่วนใสมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1,950 ไมโครลิตร

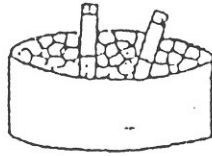


เติม Sodium chloride ปริมาตร 400 ไมโครลิตร
Sulfuric acid ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร



ผสมให้เข้ากัน

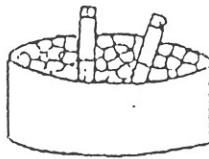
ภาพที่ 13 แสดงชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท



ทำให้เย็นโดยการแช่น้ำแข็ง



นำไปอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที



ทำให้เย็นโดยการแช่น้ำแข็ง



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ภาพที่ 13 (ต่อ) แสดงชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท

ชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ
(Sterile bottles)



ชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่คนตะกอน
(Background bottles)



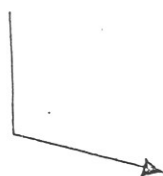
ชุดทดลอง
(Active bottles)



เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ชุด ปริมาตรขวดละ 3 มิลลิลิตร
นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที



ดูดส่วนใสมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร



เติม Sulphanilamide solution ปริมาตร 40 ไมโครลิตร
NNED ปริมาตร 40 ไมโครลิตร



ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

ภาพที่ 14 แสดงชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์ไนไตรต์

ชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ
(Sterile bottles)



ชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่ดินตะกอน
(Background bottles)



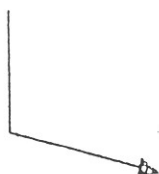
ชุดทดลอง
(Active bottles)



เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ชุด ปริมาตรขวดละ 3 มิลลิลิตร
นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที



ดูดส่วนใสมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1,000 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตร



เติม Mixed Molybdate solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร



ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

ภาพที่ 15 แสดงชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์ฟอสเฟต

7. การวัดปริมาณแก๊ส

7.1 นำหลอดนิตยาแก้วไปหล่อด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อก่อนการวัดเพื่อลดแรงเสียดทาน

7.2 วัดแก๊สในขวดซีรัม โดยใช้เข็มฉีดยาแทงลงไปในช่วงซีรัม

7.3 อ่านค่าของแก๊สที่ดันกระบอกสูบของหลอดนิตยาแก้วหน่วยที่อ่านได้เป็นมิลลิลิตร แล้วดันแก๊สนั้นลงไปในช่วงซีรัมระวังอย่าให้แก๊สภายในขวดออกมาภายนอกและต้องทำทุกขั้นตอนด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

8. การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต

8.1 การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟตจากชุดการทดลอง (active bottles) ในสถานะที่มีออกซิเจน สามารถทำได้โดย

8.1.1 ใช้เข็มฉีดยาคูคสารละลายจากขวดในชุดการทดลองทั้ง 3 ขวด ลงใน BT medium ที่มีสารเป็นแหล่งของสารอาหาร ดังนี้

8.1.1.1 แหล่งของสารอาหารที่ใช้ทดสอบย่อยสลายแอมโมเนียเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

8.1.1.2 แหล่งของสารอาหารที่ใช้ทดสอบย่อยสลายไนเตรทเป็นโปแตสเซียมไนเตรทที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

8.1.1.3 แหล่งของสารอาหารที่ใช้ทดสอบย่อยสลายไนไตรต์เป็นโซเดียมไนไตรต์ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิโมลาร์

8.1.1.4 แหล่งของสารอาหารที่ใช้ทดสอบย่อยสลายฟอสเฟตเป็นโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นเป็น 5 มิลลิโมลาร์

8.1.2 กระจายเชื้อ (spread) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

8.1.3 นำจานเพาะเชื้อที่บ่มไว้มาตรวจหาแบคทีเรียที่ขึ้นโดยเลือกโคโลนีเดียวใช้ loop เขี่ยเชื้อและถ่ายเชื้อลงบนอาหาร TSA เรือยไปจนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชืวดังกล่าวไปจําแนกเชื้อบริสุทธิ์ต่อไปและนำไปตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย

8.2 การแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟตจากชุดการทดลอง (Active bottles) ในสถานะที่มีออกซิเจนและไนเตรท ทำเหมือนสถานะที่มีออกซิเจน (ข้อ 8.1) แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรทลงไปให้ในจานเพาะเชื้อให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

9. การจำแนกแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนียมอออน ไนเตรท ไนไตรท์ หรือฟอสเฟต นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 8. มาศึกษาลักษณะ เพื่อจำแนกสกุล โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบดังต่อไปนี้

9.1 การย้อมสีแกรม ตามวิธีของ โคนีแมน (Koneman, 1983)

9.2 การสร้างเอนไซม์อะเลสตามวิธีของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537)

9.3 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ตามวิธีของ เจอร์ฮาร์ด และคณะ

(Gerhard et al., 1981)

9.4 การใช้กรด (oxidation-fermentation test) ตามวิธีของ เจอร์ฮาร์ด และคณะ

(Gerhard et al., 1981)

9.5 การใช้กรดแลกติกตามวิธีของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537)

9.6 การสร้างอินโดลจากทริปโตเฟน ตามวิธีของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537)

9.7 การใช้กรดกลูโคส แลคโตส และซูโครส ตามวิธีของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537)

9.8 การใช้ซิเตรต ตามวิธีของดวงพร คันทโชติ (2537)

9.9 การสร้างกรดและการหมักน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีของดวงพร คันทโชติ (2537)

9.10 การทดสอบการเจริญในอุณหภูมิสูง ตามวิธีของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537)

ทุก ๆ การทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ

10. การเตรียม cell suspension (ภาพที่ 16)

10.1 นำเชื้อที่แยกจนบริสุทธิ์จากข้อ 8.1 และ 8.2 มาเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 50 มิลลิลิตร และแบ่งออกเป็น 2 ขวด คือ ขวดรูปชมพู่ขวดแรกสำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน และขวดรูปชมพู่ที่สองสำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรท ซึ่งมีการเติมโปแตสเซียมไนเตรทลงไปให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.2 นำเชื้อในอาหารเหลวที่ได้จากข้อ 10.1 มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเป็นเซลล์ โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวดโดยใช้ TSB ขวดละ 200 มิลลิลิตร และแบ่งออกเป็น 2 ขวดเช่นเดียวกับข้อ 10.2

10.3 ทำการปั่นแยกเซลล์เพื่อเก็บเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้งไปแล้วล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline 3 ครั้ง โดยเติมบัฟเฟอร์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทของเหลวทิ้งไปแล้วเติม phosphate buffer saline และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์

10.4 นำเซลล์ที่ได้ไปละลายใน DMSO จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เท่ากับ 1.5 AU เพื่อให้ได้ cell suspension ของทั้งสองสถานะ

หมายเหตุ การนำเซลล์ที่ได้จากข้อ 10.3 ไปละลายในสารละลายใดขึ้นอยู่กับสารละลายที่จะใช้ในการตรวจสอบ

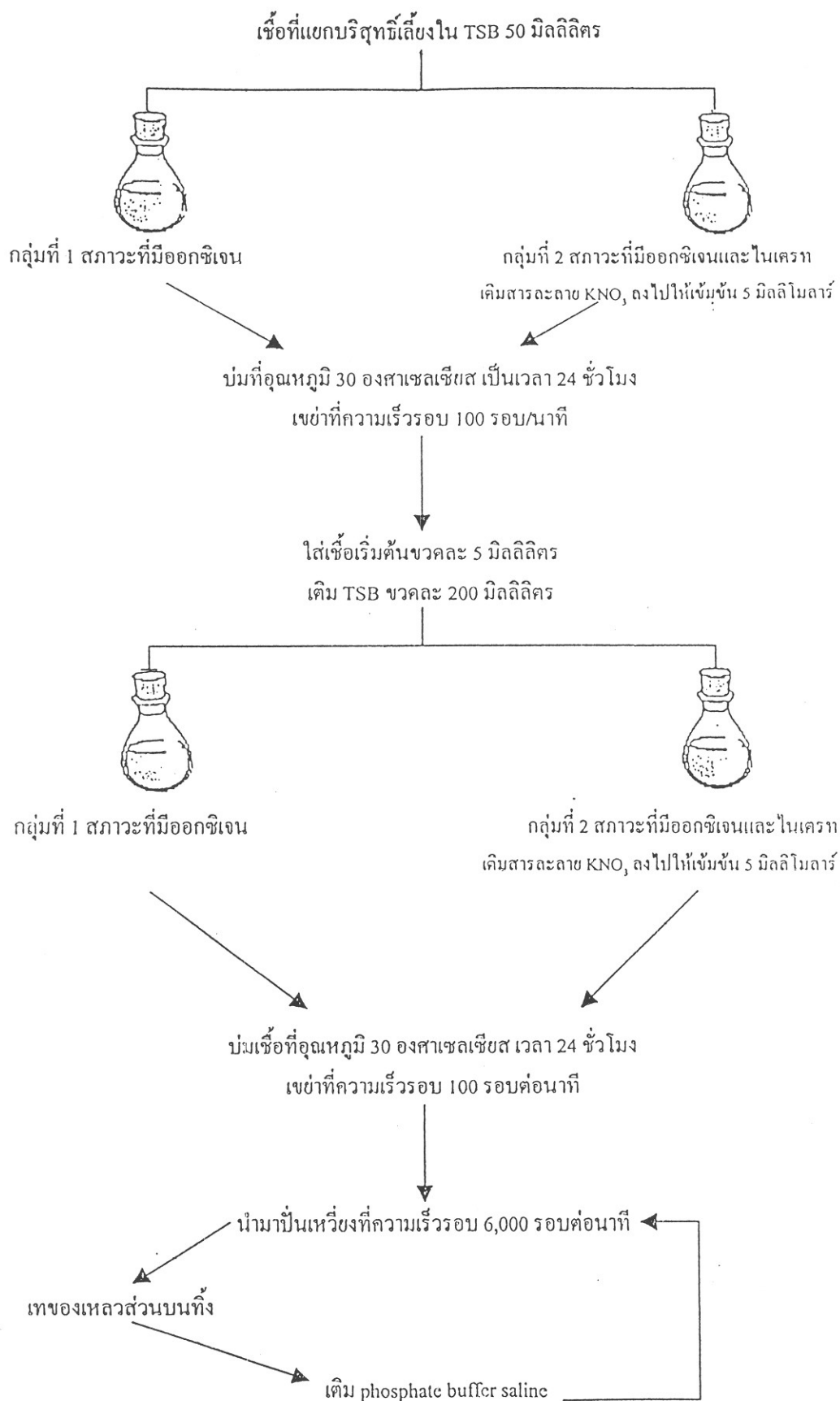
11. การเตรียมแบคทีเรียผสมที่แยกได้และจำแนกสกุลได้จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์และฟอสเฟต

11.1 เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้ว จะนำมาทำ cell suspension ตามวิธีในข้อ 10.

11.2 คูณสารละลายแบคทีเรียบริสุทธิ์ในแต่ละหลอดทดลองมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งมี TSB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ในสถานะที่มีออกซิเจน ส่วนในสถานะที่มีออกซิเจนและไนเตรท จะมีการเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรทลงไปให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

11.3 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

11.4 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียผสมจากข้อ 11.3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี TSB ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ในสถานะที่มีออกซิเจน ส่วนในสถานะที่มีออกซิเจนและไนเตรท ก็จะต้องเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรท แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 16 แสดงการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลล์และการเตรียม cell suspension

↓

นำเซลล์ที่ได้ละลายใน DMSM

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.5 A.U.

↓

ได้ cell suspension

ภาพที่ 16 (ต่อ) แสดงการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลล์และการเตรียม cell suspension

12. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์ และฟอสฟอรัส ในสถานะที่มีออกซิเจน โดยใช้ DMSM (ภาพที่ 17)

12.1 ในการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย สามารถทำได้โดยนำ serum bottle ขนาด 100 มิลลิลิตร มาจำนวน 5 ขวด โดยแต่ละขวดเติม DMSM 45.7 มิลลิลิตร แบ่งขวดชีรั่มออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม 2 ขวด เติมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ อีก 3 ขวด เป็นชุดทดลอง นำขวดชีรั่มทั้ง 5 ขวด ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12.2 เมื่ออุณหภูมิของขวดชีรั่มทั้ง 5 ลดลงเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส เติม trace salt ที่ผ่านการกรองขวดละ 0.25 มิลลิลิตร เติมวิตามินที่ผ่านการกรองขวดละ 0.05 มิลลิลิตร เติมไบคาร์บอเนตที่ผ่านการกรองขวดละ 1.45 มิลลิลิตร และเติมเมธานอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนที่ผ่านการกรองแล้ว ขวดละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรทให้ในขวดมีความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ให้ในขวดมีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้เติมจะต้องผ่านการกรองเรียบร้อยแล้ว

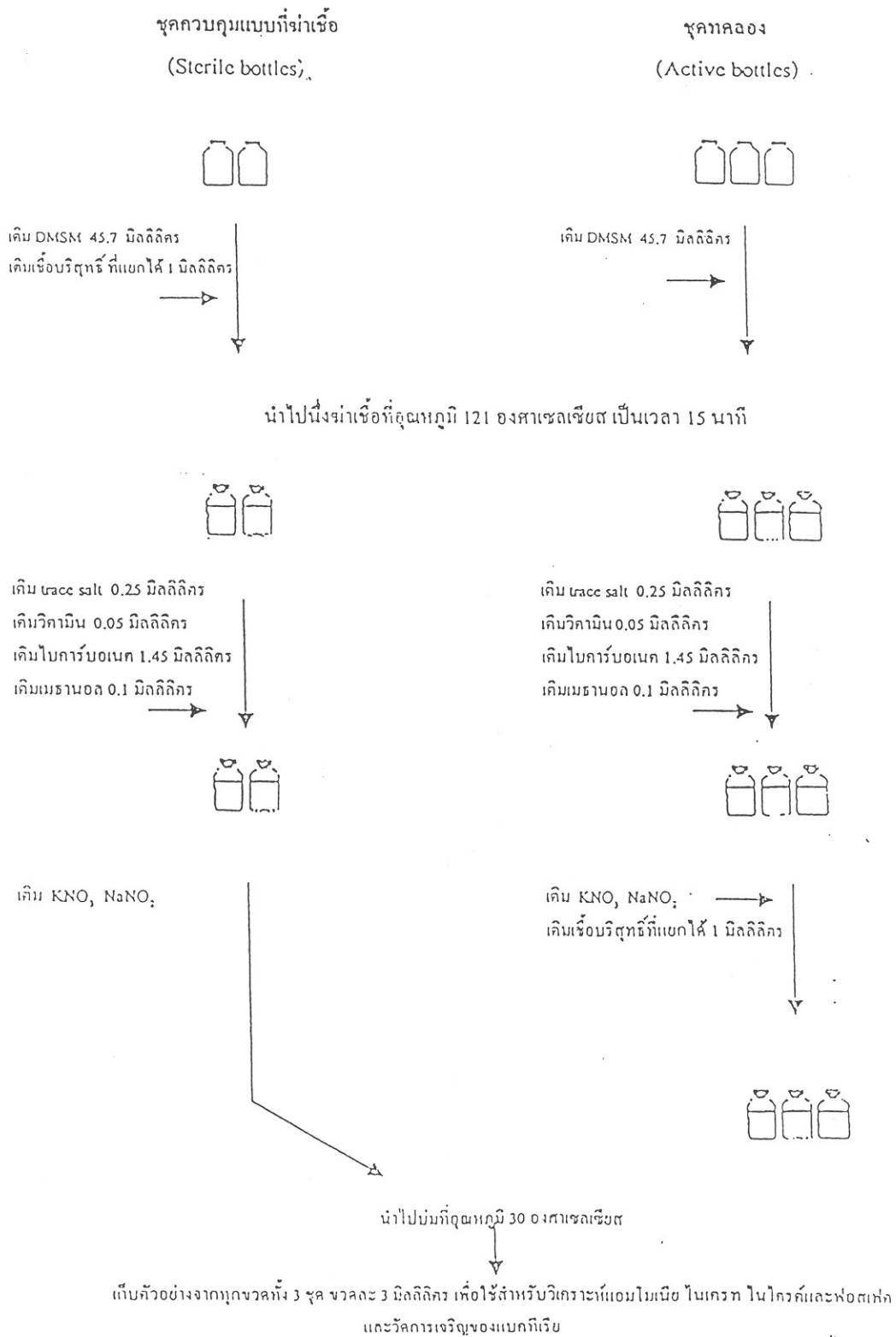
12.3 เติมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ลงในชุดทดลองทั้ง 3 ขวด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

12.4 นำทั้งสองชุดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายโดยการตรวจวัดปริมาณสารแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์ และฟอสเฟต ในระยะเวลาที่เหมาะสมตามวิธีประยุกต์ในข้อ 6. พร้อมทั้งวัดแก๊สที่เกิดขึ้นในขวดชีรั่ม และวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร

หมายเหตุ ในสูตรอาหาร DMSM มีส่วนประกอบของแอมโมเนียมไอออน และฟอสเฟต จึงต้องมีการปรับให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียและฟอสเฟตในขวดชีรั่มแต่ละขวดเป็น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

13. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์ และฟอสฟอรัส ในสถานะที่มีออกซิเจนและไนเตรท โดยใช้ DMSM

ทำเหมือนในสถานะที่มีออกซิเจน (ข้อ 12.) แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียมไนเตรทลงไปให้ในขวดชีรั่มทุกขวดมีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 17 แสดงชุดการทดลองเพื่อศึกษาการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต
ของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้อาหาร DMSM ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

15. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย และไนเตรท โดยใช้น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 18)

15.1 ในการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย และไนเตรท ทำโดยนำ serum bottle ขนาด 100 มิลลิลิตร มาจำนวน 7 ขวด 3 ขวดแรกนำมาเติม 47 มิลลิลิตร ของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ในขวดมีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมโปแตสเซียมไนเตรทให้ในขวดมีความเข้มข้น 9.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการกรองแล้ว และเติมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ อย่างละ 1 มิลลิลิตร

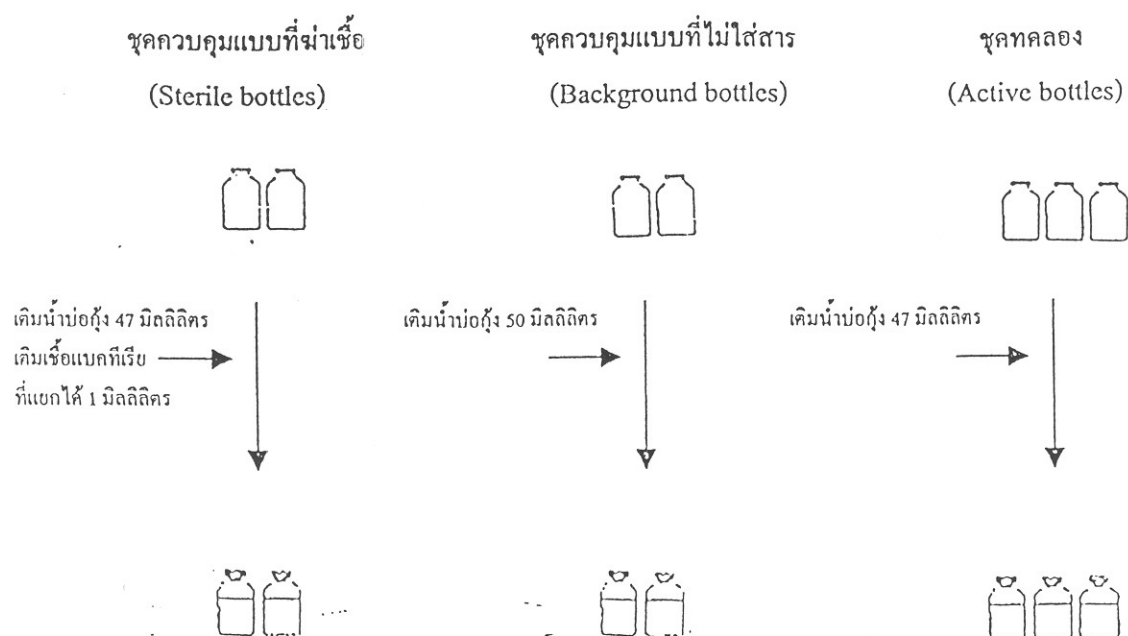
15.2 ส่วนอีก 2 ขวดจะนำมาใช้เป็นชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไนเตรท และเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ (background bottles) เติมน้ำจากบ่อเลี้ยง 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

15.3 ส่วนอีก 2 ขวดที่เหลือจะนำมาใช้เป็นชุดควบคุมแบบที่ฆ่าเชื้อ (sterile bottles) โดยจะมีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1) ซึ่งจะมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ก่อน ยกเว้นจะมีการฆ่าเชื้อ แล้วจึงเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์และโปแตสเซียมไนเตรทที่ผ่านการกรอง

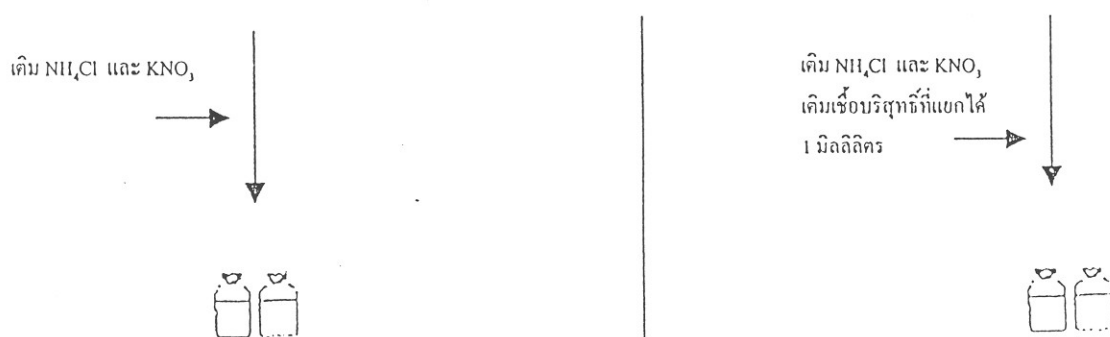
15.4 นำขวดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายโดยการตรวจวัดปริมาณสารแอมโมเนียและไนเตรท ในระยะเวลาที่เหมาะสมตามวิธีประยุกต์ในข้อ 6. พร้อมทั้งวัดแก๊สที่เกิดขึ้นในขวดซีรัมและวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร

16. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย และไนเตรท โดยใช้น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบไม่ฆ่าเชื้อ

วิธีทำเหมือนกับข้อ 15. แต่จะไม่มี การนึ่งฆ่าเชื้อในชุดการทดลองและชุด Background



นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่างจากทุกขวดทั้ง 3 ชุด ขวดละ 3 มิลลิลิตร
เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต

ภาพที่ 18 แสดงชุดการทดลองเพื่อศึกษาการย่อยสลายแอมโมเนียและไนเตรทของเชื้อแบคทีเรีย
บริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบฆ่าเชื้อ

17. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท และไนไตรต์ โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 19)

วิธีทำเหมือนข้อ 4. แต่จะปรับปริมาตรของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในขวดซีรัมให้เป็น 42 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมโปแตสเซียมไนเตรทให้มีความเข้มข้น 8.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมโซเดียมไนไตรต์ให้ในขวดมีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการกรองแล้ว และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในชุดทดลอง

18. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรทและไนไตรต์ โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบไม่ฆ่าเชื้อ

วิธีทำเหมือนกับข้อ 17. แต่จะไม่มีกรนึ่งฆ่าเชื้อในชุดการทดลองและชุด Background

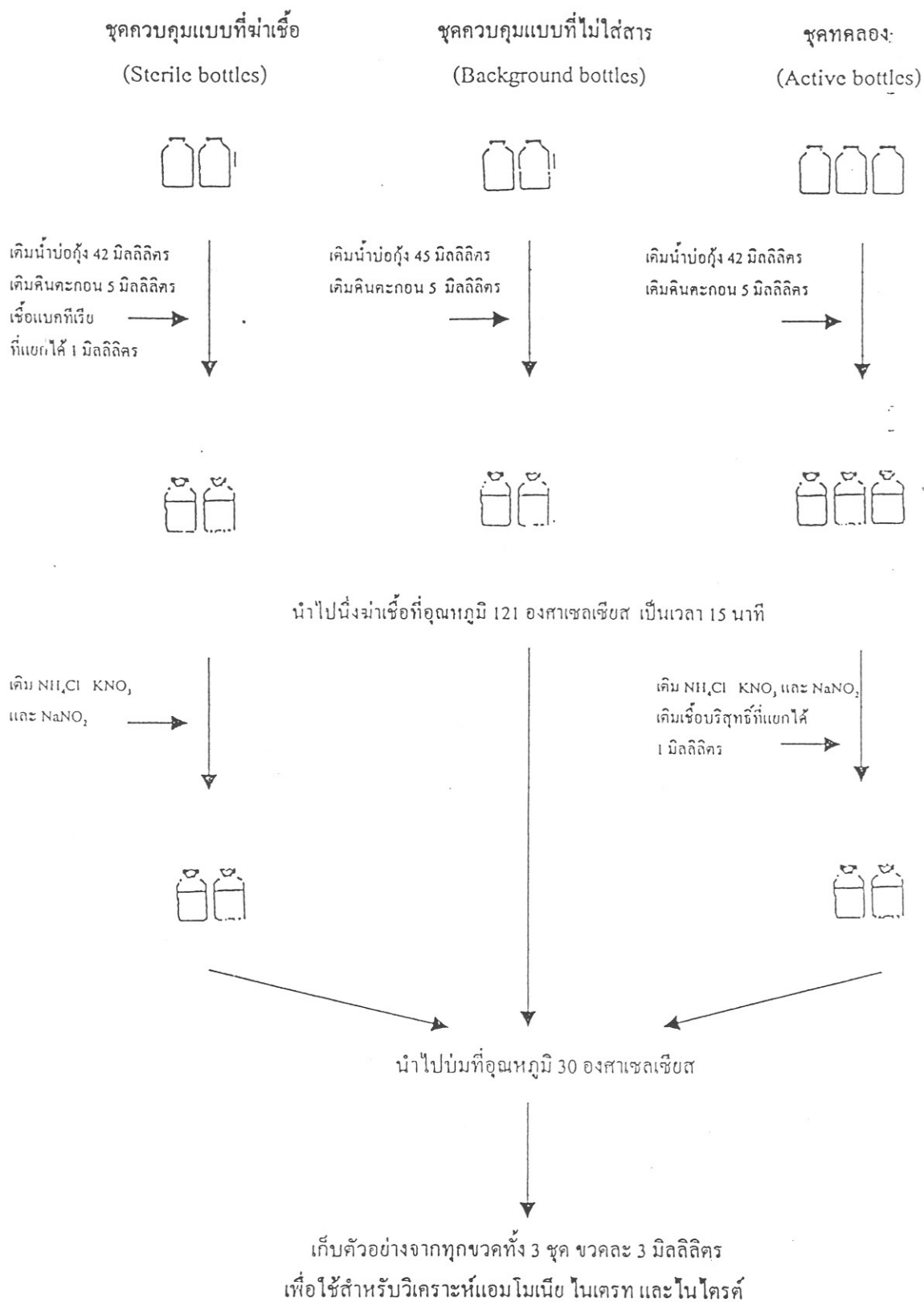
19. การนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากขวดซีรัม

19.1 คูดสารละลายตัวอย่างจากขวดซีรัมมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้อัตราความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

19.2 กระจายเชื้อ (spread) ตัวอย่างบนอาหารแข็ง PCA จานละ 0.1 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

19.3 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง

19.4 นับจำนวนโคโลนีบน PCA คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 19 แสดงชุดการทดลองเพื่อศึกษาการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรทและไนไตรต์ของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบฆ่าเชื้อ

20. การทำให้จุลินทรีย์ขึ้นเคกับสารที่ต้องการย่อยสลายและการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์

20.1 การทำให้จุลินทรีย์ขึ้นเคกับสารที่ต้องการย่อยสลายและการเพิ่มจำนวน
จุลินทรีย์จากดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

20.1.1 เตรียมดินตะกอนเช่นเดียวกันกับวิธีในข้อ 3.

20.1.2 ดูดสารละลายจากข้อ 20.1.1 มา 50 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร DMSM 50
มิลลิลิตร

20.1.3 เติมนเมธานอล 50% (v/v) 0.1 มิลลิลิตร

20.1.4 เติมนเมธานอล 50% (v/v) 0.1 มิลลิลิตร, โปแตสเซียมไนเตรท, โซเดียมไนไตรต์และ
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตให้ในขวดมีความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เขย่าเพื่อให้ผสมกันดี
แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงอาหาร DMSM ตามข้อ 20.1.2-20.1.3 และเพิ่มความ
เข้มข้นของสารที่ต้องการให้ย่อยสลายถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ และถ่ายเชื้อจนกว่าดินตะกอนในขวดซีรุ่ม
หมดไป

20.1.5 ถ่ายเชื้อจากข้อ 20.1.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงใน TSB ปริมาตร 75
มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เวลา 24 ชั่วโมง
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

20.1.6 ทำการเพิ่มปริมาตรเชื้อ โดยการถ่ายเชื้อจากข้อ 20.1.5 ปริมาตร 20
มิลลิลิตร ลง TSB ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว
100 รอบ/นาที เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อที่ได้จะใช้ตรวจสอบการย่อยสลาย
ต่อไป

20.2 การทำให้จุลินทรีย์ขึ้นเคกับสารที่ต้องการย่อยสลายและการเพิ่มจำนวน
จุลินทรีย์จากดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไนเตรท

ทำเหมือนในสภาวะที่มีออกซิเจน ข้อ 20.1 แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียม
ไนเตรทลงไปให้ในขวดซีรุ่มทุกขวดมีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

21. วิธีทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และ
ฟอสเฟต ของกลุ่มจุลินทรีย์จากดินตะกอนที่ผ่านการทำให้ขึ้นเคกับสารที่ต้องการย่อยสลายและ
ผ่านการเพิ่มจำนวน (enriched consortiums derived from shrimp pond sediments) โดยใช้น้ำและดิน
ตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

วิธีทำเหมือนข้อ 4. แต่จะปรับปริมาตรของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในขวดซีรุ่มให้เป็น 40
มิลลิลิตร เติมนเมธานอล 50% (v/v) 0.1 มิลลิลิตร, โปแตสเซียมไนเตรท, โซเดียมไนไตรต์และ
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตให้ในขวดมีความเข้มข้น 2.30 มิลลิกรัมต่อลิตร โปแตสเซียม
ไนเตรทให้ในขวดมีความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร โซเดียมไนไตรต์ให้ในขวดมีความเข้มข้น

1.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมโซเดียมฟอสเฟตให้ในขวดมีความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมจุลินทรีย์จากดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งข้อ 20.1 อย่างละ 1 มิลลิลิตร

22. วิธีทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเตรท ในไตรต์และฟอสเฟต ของกลุ่มจุลินทรีย์จากดินตะกอนที่ผ่านการทำให้คุ้นเคยกับสารที่ต้องการย่อยสลายและผ่านการเพิ่มจำนวน (enriched consortiums derived from shrimp pond sediments) โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและในเตรท

ทำเหมือนในสภาวะที่มีออกซิเจน ข้อ 21. แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียมในเตรทลงไปให้ในขวดซีรั่มทุกขวดมีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

23. การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเตรท ในไตรต์และฟอสเฟตของกลุ่มแบคทีเรีย (mixed cultures) โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในสภาวะที่มีออกซิเจน

วิธีทำเหมือนข้อ 21. แต่จะมีการเติมกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากชุดทดลองข้อ 21.

24. การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเตรท ในไตรต์และฟอสเฟต ของกลุ่มแบคทีเรีย (mixed cultures) โดยใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและในเตรท

ทำเหมือนในสภาวะที่มีออกซิเจน ข้อ 23. แต่มีการเติมสารละลายโปแตสเซียมในเตรทลงไปให้ในขวดซีรั่มทุกขวดมีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

25. การทดสอบความสามารถและวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเตรท ในไตรต์ และฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง

25.1 เลือกสภาวะที่เหมาะสมระหว่างสภาวะที่มีออกซิเจนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนและในเตรทมาทดสอบการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเตรท ในไตรต์และฟอสเฟต เพียง 1 สภาวะ โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย (mixed cultures) เช่นเดียวกับข้อ 23. และ 24.

25.2 สร้างบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองด้วยไฟเบอร์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าเพื่อใช้ทดสอบความสามารถและวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนาด 0.8x1.2x0.6 เมตร จำนวน 6 บ่อ แบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดทดลอง 3 บ่อ และชุดควบคุม 3 บ่อ (ภาพที่ 21) โดยแต่ละบ่อจะมีการเติมดินค้นบ่อกุ้งที่พื้นบ่อหนา 7 เซนติเมตร และฉาบด้วยดินตะกอนบริเวณผิวหน้าดินพื้นบ่อปริมาตร 1 ลิตร (ภาพที่ 22) แล้วเติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งให้ต่ำกว่าปากบ่อ 10 เซนติเมตร (ภาพที่ 23) น้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจะต้องปรับค่าความเค็มให้มีค่าเท่ากับ 7 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

25.3 ลงกุ้งกุลาดำทุกบ่อ ซึ่งกุ้งกุลาดำที่ใช้เลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองจำนวน 17 ตัวต่อบ่อน้ำหนักของกุ้งเฉลี่ย 28.8 กรัม และมีความยาวของลำตัว 15 เซนติเมตร และในชุดทดลองจะมีการ

เติมกลุ่มแบคทีเรียลงไป 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร ในวันที่เริ่มต้นทำการทดลอง, วันที่ 8 ของการทดลองและวันที่ 22 ของการทดลองตามลำดับ ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปนั้นจะต้องมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 1×10^{12} CFU/มิลลิลิตร แต่ในชุดควบคุมจะไม่มีเติมกลุ่มแบคทีเรีย ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางเคมี ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต ตามวิธีในข้อ 2. ตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดค่า และออกซิเจนละลาย วัดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นตามวิธีในข้อ 19. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำและความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรต์และฟอสเฟต ในระยะเวลาที่เหมาะสม และวัดปริมาณสารอินทรีย์ในดินตะกอนที่ตกลง ตามวิธีในข้อ 28.

26. การหาอินทรีย์วัตถุโดยวิธี Loss on ignition ตามวิธีของทัศนีย์ อัดตะนันทน และจรงค์ จันทรเจริญสุข (2542)



ภาพที่ 20 แสดงการเก็บชีเลนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง



ภาพที่ 22 แสดงลักษณะการเตรียมดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง



ภาพที่ 23 แสดงลักษณะการเตรียมน้ำลงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง