บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ดำเนินการที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีวัตถุประสงค์ของการทดลองมุ่งเน้นถึง ผลของความเข้มข้นของก๊าซโอโซนต่อกุ้งกุลาดำและสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของก๊าซโอโซน เพื่อการควบคุมคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การทดลองแบ่งเป็นสามระยะ โดยขั้นแรกเป็นการดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นโอโซนผลิตสุทธิ (total ozone output, TOO) จากเครื่องผลิต และก๊าซโอโซนตกค้างที่ละลายในน้ำ (residual ozone concentration, ROC) ได้ผลลัพธ์เป็นสมการเส้นตรงของการผลิตก๊าซโอโซน สมการที่ได้นำมาใช้ในการคำนวณ เพื่อหาความเข้มข้นของก๊าซโอโซนที่เครื่องผลิตได้ในเวลาต่างๆ กัน การทดลองขั้นที่สอง เป็นการหาผลของ TOO ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และวิธีการสัมผัสต่างกัน ต่อระบบการหายใจและความผิดปกติของเนื้อเยื่อลูกกุ้งกุลาดำ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อลูกกุ้งกุลาดำ ในทำนองเดียวกันเชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ ก็นำมาผ่านก๊าซโอโซนละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ บันทึกปริมาณและลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อหน่วยเวลาหลังจากสัมผัสก๊าซโอโซนละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ยังนำมาทดลอง หาความสามารถในการบำบัดค่าคุณภาพน้ำ ที่เกิดเป็นประจำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การทดลองขั้นสุดท้าย ได้จัดชุดการทดลองเลียนแบบการเลี้ยงจริง อันประกอบด้วยกุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงด้วยอาหารโพรไบโอติกเป็นเวลาหนึ่งเดือน เหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้นสูง จากนั้นจึงให้ก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่ทำอันตรายกุ้ง

ผลการทดลองที่ได้คาดว่า สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้โอโซน เพื่อการควบคุมคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องผลิตโอโซน

1. เครื่องผลิตโอโซน (Ozone Generator) รุ่น OZ 3050 อัตราการผลิต 2 กรัม/ชม. ผลิตก๊าซโอโซนด้วยวิธี "Corona Type" อัตราการไหลเวียนของก๊าซออกซิเจนหรืออากาศแห้ง 5-10 ลิตรต่อนาที

2. เครื่องผลิตโอโซน (Ozonisator) รุ่น Sander Modell 100 อัตราการผลิต 100 มก./ชม. ผลิตก๊าซโอโซนด้วยวิธี "Corona Type"

เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลาย (DO meter)

รุ่น HI 964400 HANNA instruments

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลาย (pH meter)

รุ่น HI 4818 AR/E 220 โวลท์ 5 วัตต์ HANNA instruments

เครื่อง Refractometer

รุ่น ATAGO S-28 Japan/EN 50082-1

เครื่องปั๊มอากาศ

รุ่น PUMA Air Compressor Heavy Duty Industrial ความดัน 1-2 กก./ลบ.ซม.

ก๊าซออกซิเจน

ก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ 99.7%

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

Spectrophotometer รุ่น Genesys 5 ใช้กับ Cuvette ขนาดความจุ 4 มล.

เครื่องวัดอัตราการหายใจ

Gilson Differential Respirometer รุ่น TGR 20 serial no.61001 U.S.A.

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำวัยอ่อน (โพสต์ลาวาที่ 15 และ 21)

กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของโอโซน ได้มาจากอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม อนุบาลกุ้งในน้ำทะเลความเค็ม 6 ส่วนในพันส่วน ปรับความเค็มทุกๆ 3 วันจาก 6 ส่วนในพันส่วน ให้เป็น 18 ส่วนในพันส่วน ให้ตัวอ่อนอาร์ทีเมีย (*Artemia* Nauplii) เป็นอาหาร 2 มื้อ/วัน เป็นเวลา 1 อาทิตย์ก่อนนำมาทดลอง

กุ้งกุลาดำวัยรุ่น

ใช้กุ้งกุลาดำน้ำหนักตัว 6-8 กรัม จากอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม อนุบาลกุ้งในน้ำทะเลความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน ปรับความเค็มทุกๆ 3 วันจาก 10 ส่วนในพันส่วนให้เป็น 20 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารเม็ด 3 ครั้ง/วัน เป็นเวลา 6 วันก่อนนำมาทดลอง

แบคทีเรีย

ใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D331 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่เป็นโทษและ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ S11 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เพื่อศึกษาผลของโอโซนต่อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง แหล่งของเชื้อแบคทีเรียได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

TCBS (thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose)

NA (nutrient agar)

NB (nutrient broth)

BHI (brain heart infusion)

NaCl (sodium chloride)

น้ำทะเลฆ่าเชื้อ (sterilised seawater)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของก๊าซโอโซนที่ผลิตได้จริงและที่ละลายในน้ำ

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของโอโซนที่ละลายน้ำ (APHA, 1976)

Indigo reagent (Spectroquant test kit, Merck)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ชุดสารเคมีวิเคราะห์แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Strickland and Parson,1972)

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ไนไตรต์-ไนโตรเจน (APHA, 1992)

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ไนเตรต-ไนโตรเจนวิธี cadmium reduction (APHA, 1992)

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ฟอสเฟต (APHA, 1992)

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity) (APHA, 1992)

ชุดสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณสารแขวนลอย (total suspended solids, TSS) (APHA, 1992)

อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของโอโซนที่ผลิตได้จริงและปริมาณที่ละลายในน้ำ

บิวเรตขนาด 50 มล. จำนวน	1	อัน
Volumetric flask ขนาด 1,000 มล. จำนวน	1	ใบ
Erlenmeyer flask ขนาด 100 มล. จำนวน	8	ใบ
Graduated cylinder ขนาด 10, 100, 500 และ 1,000 มล.อย่างละ	1	ใบ
ขวดแก้วทดลองขนาด 1,000 มล. จำนวน	3	ใบ
ขวดแก้วทดลองขนาด 500 มล. จำนวน	1	ใบ
ขวดสีชาขนาด 250 มล. จำนวน	8	ใบ

อื่นๆ ได้แก่ ลูกยาง หลอดหยด แท่งแก้วคนสาร ช้อนตักสาร เป็นต้น

อุปกรณ์ในการศึกษาหาความเข้มข้นของโอโซนที่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ

ตู้กระจกขนาด 30x31x61 ซม.^{3}จำนวน	1	ตู้
แผ่นพลาสติกเจาะรูขนาด 30x31 ซม.^{2}	2	แผ่น
หลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิดขนาด 10 มล.	30	หลอด
ตะแกรงช้อนกุ้งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม.	2	อัน
นาฬิกาจับเวลา		
สารละลาย Davidson fixative (น้ำยาดองสัตว์ทดลอง)		

อุปกรณ์ในการศึกษาผลของโอโซนต่อแบคทีเรียที่เป็นโทษและประโยชน์

ขวดแก้วทดลองขนาด 1000 มล. จำนวน	6	ขวด
Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. จำนวน	200	อัน
Erlenmeyer flask ขนาด 100 มล. จำนวน	1	ใบ
บีกเกอร์ ขนาด 100 มล. จำนวน	2	ใบ
หลอดทดลอง (test tube)		
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม.สูง 15 ซม.จำนวน	200	หลอด
ปิเปตขนาด 1, 5, 10 มล. อย่างละ	5	อัน
Autopipet ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร อย่างละ	1	อัน
อื่นๆ ได้แก่ แอลกอฮอล์ ตู้ Incubator Indigo reagent เป็นต้น		

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

บิวเรต ขนาด 50 มล.	1	อัน
ขวดสีชา ขนาด 1000 มล.	5	ใบ
ขวดสีชา ขนาด 500 มล.	5	ใบ
ขวดสีชา ขนาด 250 มล.	5	ใบ
ขวดสีชา ขนาด 100 มล.	3	ใบ
ขวดแก้ว Pyrex ขนาด 1000 มล.	6	ใบ
ขวดแก้ว Pyrex ขนาด 500 มล.	4	ใบ
ขวด BOD ขนาด 300 มล.	6	ขวด
บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 มล. อย่างละ	2	ใบ

Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล.	3	ใบ
Volumetric flask ขนาด 25 มล.	6	ใบ
ขนาด 50 มล.	2	ใบ
หลอดทดลอง (test tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม.สูง 15 ซม.)	50	หลอด
Volumetric pipet ขนาด 1, 5 และ 10 มล. อย่างละ	5	อัน
ออโตปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร		
ถังพลาสติก ขนาด 10 ลิตร	1	ถัง
อื่นๆ ได้แก่ พาราฟิล์ม (parafilm) กระดาษฟอยด์ ลูกยาง เป็นต้น		

<u>อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้ง</u>

ตู้กระจกขนาด 30x31x61 ซม.^{3} และชุดกรอง จำนวน	12	ตู้
ขวดพลาสติก ขนาด 25 มล.	12	ขวด
หัวทรายปั๊มอากาศ และสายยาง	12	ชุด
อาหารกุ้งชนิดเม็ดสำเร็จรูป		
กระชอนช้อนกุ้ง		
เทอร์โมมิเตอร์		
อุปกรณ์ที่ใช้ทำความสะอาด เช่น แปรงขัด		
ชุดเคมีวัดค่าความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity)		
ชุดเคมีวัดค่าแอมโมเนีย-ไนโตรเจน		
ชุดเคมีวัดค่าไนไตรต์-ไนโตรเจน		

3.1 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของโอโซนที่ผลิตได้จากเครื่อง

โอโซนจากเครื่องผลิตสามารถละลายน้ำได้เพียงบางส่วน ความเข้มข้นของโอโซน ณ เวลาที่ผลิต กับความเข้มข้นของโอโซนที่ละลายน้ำมีความแตกต่างกัน ความเข้มข้นของโอโซนที่ละลายน้ำจริงไม่สามารถตรวจวัดได้ แต่วัดได้เพียงค่าความเข้มข้นของโอโซนที่เครื่องผลิตได้ต่อหนึ่งหน่วยเวลา (TOO) และค่าความเข้มข้นของโอโซนที่เหลืออยู่ในสารละลาย (ROC) ในการทดลองใดๆ จำเป็นจะต้องกำหนดกลุ่มการทดลอง (treatment) คือค่าความเข้มข้นต่างๆของโอโซน ในการศึกษานี้ ได้เลือก TOO เป็นตัวแทน เนื่องจากสามารถกำหนดค่าที่แน่นอนได้เมื่อเริ่มการทดลองจากการคำนวณ ขณะที่ค่า ROC มีความผันแปรตลอดเวลา

วิธี Iodometric method (APHA, 1976) เพื่อตรวจวัดปริมาณโอโซนที่เครื่องผลิตได้ต่อหน่วยเวลา หลักการคือ การวัดก๊าซโอโซนที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ในรูปสารประกอบโพแทสเซียมไอโอเดต ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำแป้งเป็นสีน้ำเงินที่จุดยุติ เมื่อไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

แผนการทดลอง คือ วิเคราะห์ TOO จากเครื่องขนาดกำลังผลิต 100 มก./ชม. และ 2 กรัม/ชม. โดยมีแหล่งกำเนิดก๊าซออกซิเจนจากก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ และเครื่องปั๊มอากาศ ทำการพ่นก๊าซโอโซนลงสัมผัสสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น 20% นาน 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ นำค่าของปริมาณโอโซนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้มา สร้างสมการเส้นตรง และหาค่า Coefficient of determination (R^2) เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า TOO สำหรับการทดลองต่อๆ ไป

ส่วนการตรวจวัดปริมาณ ROC ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำ ในงานทดลองนี้กำหนดใช้ Indigo reagent (Merck Ltd., 1998) โดยกำหนดตรวจวัดปริมาณ ROC ทุกครั้งที่ทำการเป่าพ่นโอโซนในทุกบทการทดลอง เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TOO กับ ROC และแสดงค่า ROC ที่มีผลต่อสิ่งทดลองต่างๆ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ เชื้อแบคทีเรีย และค่าตัวแปรคุณภาพน้ำ

3.2 การศึกษาความเป็นพิษของโอโซนต่อกุ้งกุลาดำโพสต์ลาวา

โอโซนเป็นสารออกซิไดซิงเอเจนต์อย่างแรง ที่ระดับความเข้มข้นของโอโซนสูง อาจมีฤทธิ์กัดกร่อน และเป็นอันตรายต่อลูกกุ้งกุลาดำ จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาค่า TOO ที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อตัวกุ้ง การทดลองแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

3.2.1 การให้โอโซนโดยตรงในน้ำเลี้ยงกุ้ง ที่ระยะเวลาต่างๆ

นำลูกกุ้งโพสต์ลาวาที่ 15-21 จำนวน 50 ตัว หลังจากปรับความเค็มจาก 6 ส่วนในพันส่วน เป็น 18 ส่วนในพันส่วนภายในเวลา 1 อาทิตย์ ใส่ลงในภาชนะบรรจุน้ำทะเลความเค็ม 18 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 5 ลิตร พ่นก๊าซโอโซนที่ผลิตจากเครื่องผลิตโอโซนขนาดกำลังผลิต 100 มก./ชม. และแหล่งกำเนิดออกซิเจนในการผลิตเป็นเครื่องปั๊มอากาศ ลงในน้ำที่มีลูกกุ้งเป็นเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการตรวจวัดปริมาณ ROC ทันที ด้วยชุดเคมี Spectroquant test kit ของ Merck ส่วนลูกกุ้งนำมาทดลองวัดอัตราการหายใจ ด้วยเครื่อง Gilson Differential Respirometer เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการให้อากาศเพียงอย่างเดียว ค่าของอัตราการหายใจที่ได้ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยหลักการทางสถิติด้วย t-test แบบ one-way analysis

3.2.2 การให้โอโซนแบบต่อเนื่องในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

แบ่งตู้กระจกขนาด 30x31x61 ซม.^{3} ออกเป็น 3 ส่วน แทนการทดลอง 3 ซ้ำ ด้วยแผ่นพลาสติกเจาะรู เพื่อให้น้ำสามารถไหลผ่านไปมาถึงกันได้ เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 18 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 22 ลิตรลงในตู้กระจก นำลูกกุ้งโพสต์ลาวาที่ 21-30 ที่ปรับความเค็มแล้ว จำนวน 100 ตัวใส่ลงในแต่ละช่อง ให้อาร์ทีเมียมีชีวิตจำนวนหนึ่งเป็นอาหารแก่ลูกกุ้ง ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ แอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) ไนไตรต์-ไนโตรเจน (NO_2^--N) สภาพด่างของน้ำ (alkalinity) อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย (pH) ด้วยชุดเคมีวัดคุณภาพน้ำ ก่อนและหลังทำการทดลอง พ่นโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซนขนาดกำลังผลิต 100 มก./ชม. ที่มีเครื่องปั๊มอากาศเป็นแหล่งกำเนิดก๊าซออกซิเจนผ่านหัวทรายลงสู่ตู้กระจก ตรวจวัดปริมาณ ROC พร้อมทั้งสังเกตอาการและตรวจนับกุ้งที่แสดงความผิดปกติ คัดลูกกุ้งที่แสดงอาการออกทุกๆ 2 ชม.จนถึง 24 ชม. นำลูกกุ้งมารักษาสภาพด้วยสารละลาย Davidson fixative เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเหงือกกุ้ง ภายในห้องปฏิบัติการ ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

จัดเตรียมหน่วยการทดลองเหมือนข้างต้น แต่เปลี่ยนเครื่องผลิตโอโซนจาก Ozonisator เป็น Ozone Generator ขนาดกำลังผลิต 2 กรัม/ชม. ตรวจวัดปริมาณ ROC พร้อมทั้งสังเกตอาการ และคัดกุ้งที่แสดงอาการผิดปกติออกทุกๆ 2 ชม.จนถึง 24 ชม.

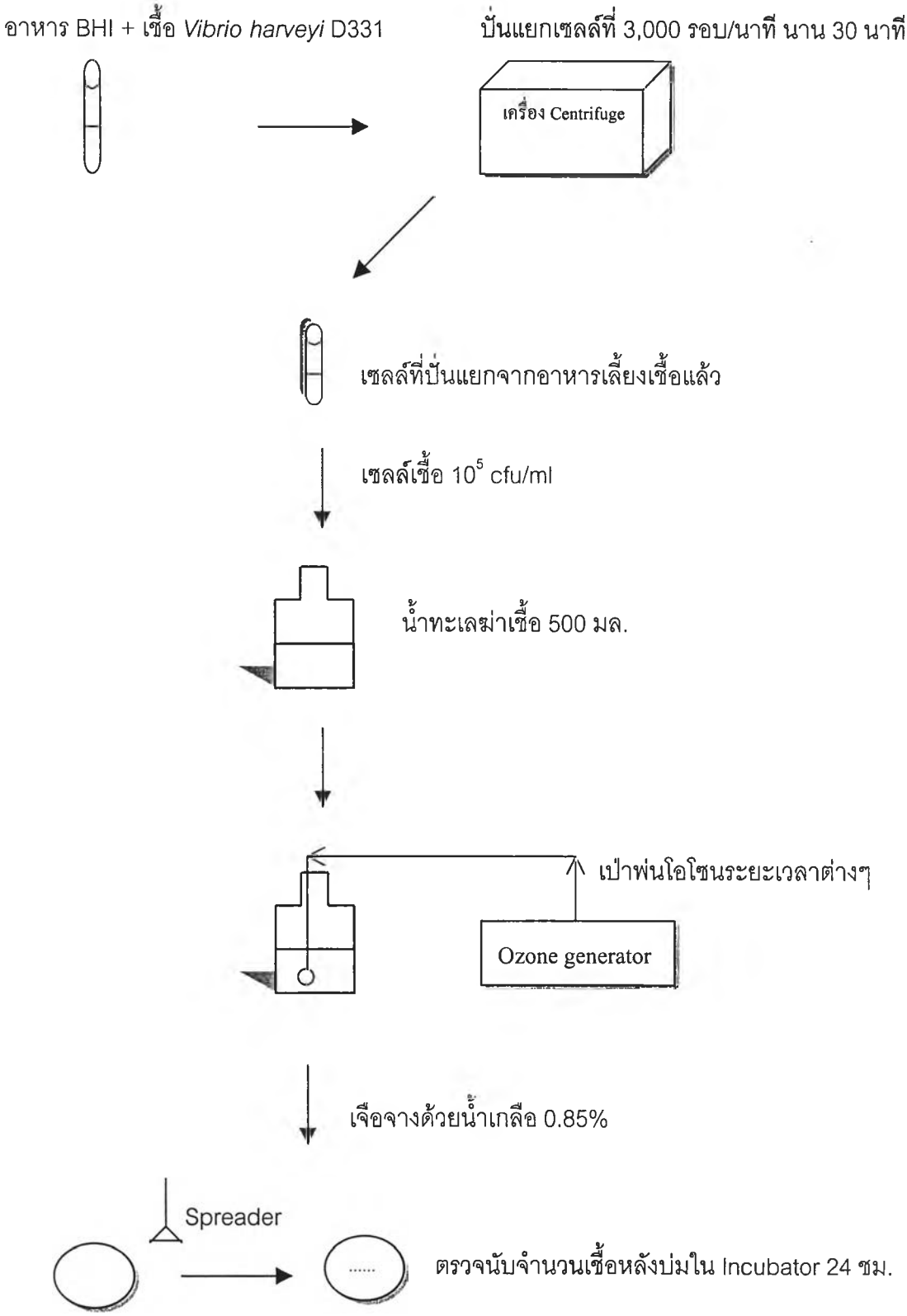
3.3 การศึกษาผลของโอโซนต่อแบคทีเรียที่เป็นโทษและเป็นประโยชน์

3.3.1 แบคทีเรียที่เป็นโทษ

โอโซนมีประสิทธิภาพสูงในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ด้วยการออกซิไดซ์ผนังเซลล์และออแกเนลล์ต่างๆ โดยแต่ละระดับความเข้มข้นให้ผลในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียต่างๆ กัน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุด ดำเนินการทดลองโดย เป่าพ่นโอโซนให้ได้ปริมาณ TOO ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรค เริ่มจากทำการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D331 (ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชม. ปั่นแยกเซลล์และทำการเจือจางเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้เซลล์จำนวน 10^5 cfu/ml เติมเชื้อที่ความเข้มข้นดังกล่าวลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 500 มล. ให้โอโซนจากเครื่องผลิตขนาดกำลังผลิต 2 กรัม/ชม. และมีแหล่งกำเนิดก๊าซออกซิเจนในการผลิตคือเครื่องปั๊มอากาศ เปรียบเทียบกับก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ เวลาในการให้โอโซน คือ 1, 5, 10 และ 20 นาที

เมื่อสิ้นสุดเวลาที่กำหนด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทดลองปริมาตร 5 มล. ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย 10% โซเดียมไทโอซัลเฟตปริมาตร 0.1 มล. เพื่อทำลายโอโซนที่อาจตกค้างอยู่ในน้ำตัวอย่าง นำสารละลายผสมที่ได้ 1 มล. เจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของน้ำเกลือต่อจำนวนเชื้อที่เหมาะสม เกลี่ยน้ำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรด้วย Spreader ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ทำการทดลอง 2 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อ ตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย และตรวจวัดค่า ROC ที่เวลา 30 วินาที, 15, 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชม. หลังการสัมผัสโอโซน จากนั้นบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนเชื้อหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จากการทดลอง 2 ซ้ำ (ภาพที่ 3.1)

I19460594X



ภาพที่ 3.1 วิธีการทดลองผลของโอโซนต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษ

3.3.2 แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์

ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นอกจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้วยังมีแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อกุ้ง ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคอาจมีผลต่อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ได้เช่นเดียวกัน จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของโอโซน ที่ปลอดภัยสำหรับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ วิธีการทดลองคือ เขี่ยเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ S11 (ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI บ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชม. ปั่นแยกเซลล์และทำการเจือจางเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้เซลล์จำนวน10^5 cfu/ml เติมเชื้อที่ความเข้มข้นดังกล่าวลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 500 มล. ให้โอโซนจากเครื่อง Ozone Generator ขนาดกำลังผลิต 2 กรัม/ชม. โดยมีแหล่งกำเนิดก๊าซออกซิเจนในการผลิตได้จากเครื่องปั๊มอากาศ และก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ เวลาในการให้โอโซน คือ 1, 5, 10 และ 20 นาที

หลังการให้โอโซนเสร็จ นำน้ำตัวอย่าง 5 มล.ผสมกับสารละลาย 10% โซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 มล. เพื่อทำลายโอโซนที่อาจตกค้างอยู่ในน้ำตัวอย่าง จากนั้นนำสารละลายผสม 1 มล. เจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ให้ได้ค่าความเข้มข้นของน้ำเกลือต่อจำนวนเชื้อที่เหมาะสมนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย และตรวจวัดค่า ROC ที่เวลา 30 วินาที, 15, 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชม.หลังการสัมผัสโอโซน ด้วยการเกลี่ยน้ำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ด้วย Spreader ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ทำการทดลอง 2 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อ บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม. จำนวนเชื้อที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จากการทดลอง 2 ซ้ำ

3.4 การศึกษาผลของโอโซนต่อคุณภาพน้ำ

น้ำที่ผ่านการเลี้ยงกุ้งจะมีการสะสมตัวของสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ต่างๆ เกิดเป็นก๊าซพิษและสารประกอบต่างๆ ที่ส่งผลให้น้ำเลี้ยงเน่าเสีย ก๊าซโอโซนสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเลี้ยงได้เมื่อมีการใช้ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของโอโซนที่เวลาในการเป่าพ่นต่างๆ ต่อค่าตัวแปรคุณภาพน้ำต่างๆ เริ่มการทดลองด้วยการเตรียมน้ำเลี้ยงกุ้ง

กุลาดำ โดยการนำดินเลนบ่อกุ้ง 500 กรัม ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 22 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 10 ลิตรทิ้งไว้ 2 คืน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศ เกิดเป็นน้ำเลี้ยงกุ้งที่เน่าเสีย จากนั้นกรองน้ำตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักแน่นอน คำนวณหาค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (total suspended solids = TSS) นำน้ำที่ผ่านการกรองแล้ว มาวิเคราะห์ตัวแปรคุณภาพน้ำต่างๆ ได้แก่ ค่าความเค็ม อุณหภูมิ ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen = DO) ค่าความต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ (biological oxygen demand = BOD) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) ค่าความกระด้าง (alkalinity) แอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) ไนไตรต์-ไนโตรเจน (NO_2^-- N) ไนเตรต-ไนโตรเจน (NO_3^-- N) และฟอสเฟต (PO_4^{3-})

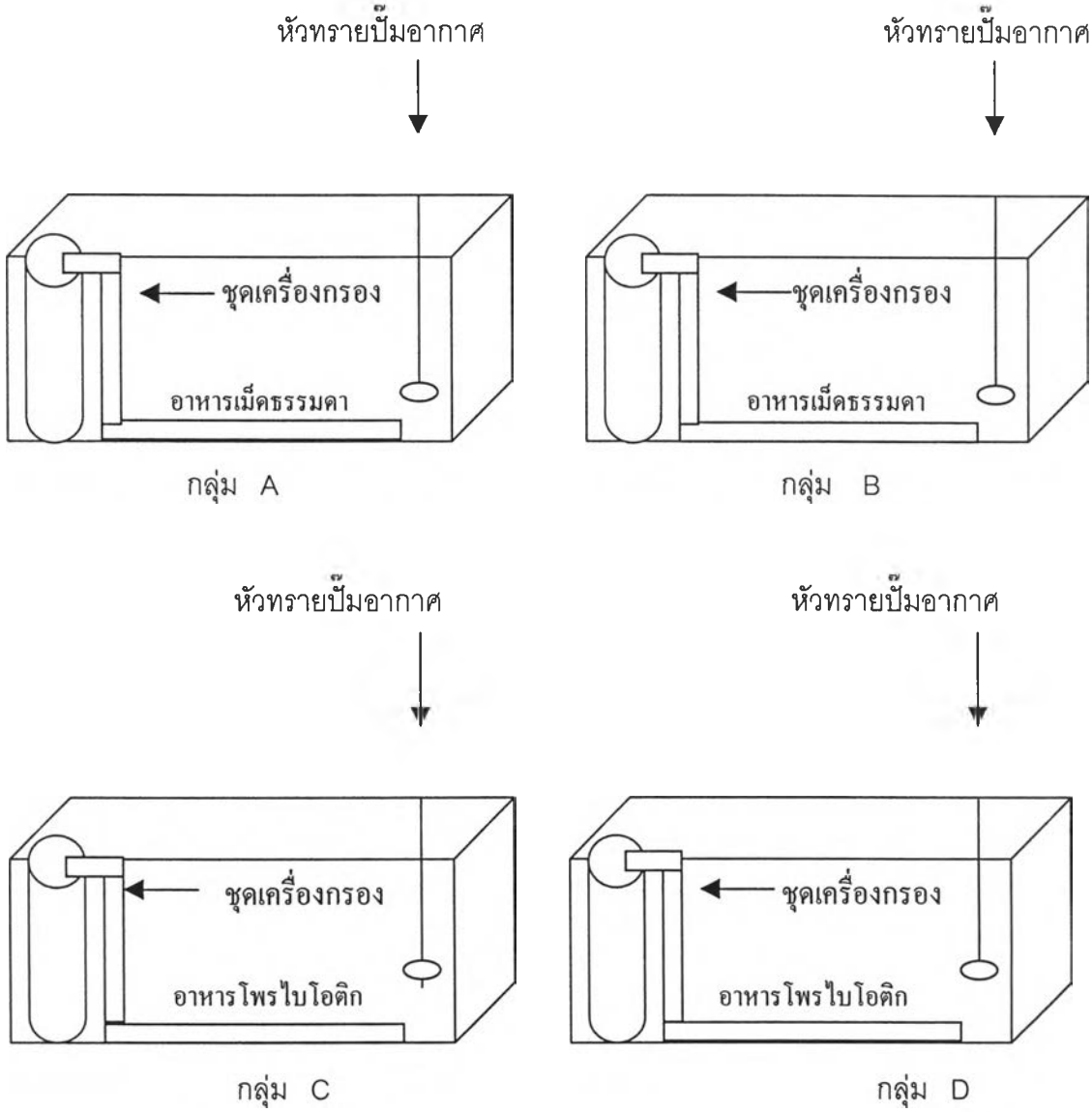
พ่นก๊าซโอโซนจากเครื่อง Ozone Generator ขนาดกำลังผลิต 2 กรัม/ชม. แหล่งกำเนิดออกซิเจนคือเครื่องปั๊มอากาศ ลงในน้ำตัวอย่างดังกล่าว เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับน้ำที่ผ่านการให้อากาศจากเครื่องปั๊มอากาศเพียงอย่างเดียว ตรวจวัดค่าคุณภาพน้ำตามที่บรรยายมาข้างต้น หลังการเป่าพ่นโอโซนและอากาศ นำค่าคุณภาพน้ำก่อนและหลังการให้โอโซนและอากาศ มาคำนวณหาประสิทธิภาพของโอโซนเทียบกับการให้อากาศเพียงอย่างเดียว ในการปรับปรุงค่าคุณภาพน้ำต่างๆ

3.5 <u>การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้โอโซนเพื่อบำบัดเชื้อโรคและควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง</u> (*In vivo* study)

ในสภาวะการเลี้ยงจริง ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิต และไม่มีชีวิตต่างๆ จำนวนมาก ก๊าซโอโซนจะทำปฏิกิริยากับสสารเหล่านั้นทั้งหมดในเวลาเดียวกัน ดังนั้นความเข้มข้นของโอโซนที่เหมาะสม ควรเป็นความเข้มข้นที่สามารถกำจัดเชื้อโรค ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง และบำบัดคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงได้ เพื่อศึกษาถึงผลของโอโซนต่อตัวแปรร่วมนี้ จึงจัดหน่วยทดลองเลียนแบบการเลี้ยงจริง ที่ประกอบไปด้วยกุ้ง แบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ โดยใช้โอโซนที่ความเข้มข้นพอเหมาะ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยรุ่นน้ำหนัก 6-8 กรัม จำนวน 180 ตัว ที่ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ในตู้ขนาด 30x31x61 ซม.^{3} (ภาพที่ 3.2) ด้วยอาหารควบคุม คืออาหารเม็ดสำหรับกุ้ง ที่วางขายใน

ท้องตลาด และอาหารผสมโพรไบโอติก ที่ได้จากอาหารเม็ดคลุกเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ S11 เข้มข้นประมาณ 10^{10} cfu/ml จำนวน 3 มื้อ/วัน แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ แต่ละกลุ่มประกอบด้วยกุ้ง 15 ตัว กลุ่ม A และ B ให้อาหารเม็ดธรรมดา ส่วนกลุ่ม C และ D ให้อาหารผสมเชื้อโพรไบโอติก เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 1 เดือนด้วยอาหารเม็ดที่กำหนดไว้ นับจำนวนกุ้งแต่ละบ่อทุกวัน ตรวจวัดค่าคุณภาพน้ำอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ดูดตะกอนก้นบ่อ และเปลี่ยนถ่ายน้ำเลี้ยงในบ่อที่ขุ่นและมีคุณภาพน้ำเสื่อมโทรม การทดลองนี้สามารถแสดงดังในภาพที่ 3.2



- อาหารโพรไบโอติก คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่คลุกด้วยเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ S11

ภาพที่ 3.2 สภาพการทดลองเลี้ยงกุ้งในตู้กระจก

หลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 1 เดือน ทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งอ่อนแอ โดยลดปริมาตรน้ำเลี้ยงให้เหลือ 15 ลิตร แล้วใส่เชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D 331 จำนวน 10^7 cfu/ml ทุกบ่อทดลอง ทิ้งไว้ 6 ชม. นับจำนวนกุ้ง จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษและเป็นประโยชน์ และวัดค่าตัวแปรคุณภาพน้ำต่างๆ แล้วจึงเป่าพ่นโอโซนจากเครื่องขนาดกำลังผลิต 2 กรัม/ชม. แหล่งกำเนิดก๊าซออกซิเจนคือ ก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์เป็นเวลา 30 นาที ในบ่อกลุ่ม B และ D เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษ เวลาในการเป่าพ่นโอโซน ได้จากการคำนวณค่าความเข้มข้นโอโซนที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค แต่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง (วิธีคำนวณอยู่ในภาคผนวก) วัดปริมาณ ROC ทันทีหลังการพ่นโอโซนเสร็จ จากนั้นนับจำนวนกุ้ง จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษ แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ และค่าตัวแปรคุณภาพน้ำต่างๆ แผนการทดลองหลังการเลี้ยงกุ้ง 1 เดือน สามารถแจกแจงได้ดังภาพที่ 3.3

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ด้วยหลักทางสถิติคือ ANOVA analysis

ปั่นแยกเซลล์เชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D 331 จำนวน 10^7 cfu/ml

↓

ใส่ลงบ่อทดลองทั้ง 4 กลุ่ม ทิ้งไว้ 6 ชม. เพื่อเหนี่ยวนำให้กุ้งอ่อนแอ

↓

- นับจำนวนกุ้ง
- ตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษและเป็นประโยชน์
- ตรวจวัดค่าตัวแปรคุณภาพน้ำต่างๆ

↓

พ่นโอโซนผ่านหัวทรายเป็นเวลา 30 นาที ในหน่วยการทดลอง
กลุ่ม B และ D

↓

วัดปริมาณ ROC ทันทีหลังการพ่นโอโซนเสร็จ

↓

- นับจำนวนกุ้ง
- นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษและเป็นประโยชน์
- ตรวจวัดค่าตัวแปรคุณภาพน้ำ

จากทั้ง 4 หน่วยการทดลอง

ภาพที่ 3.3 แผนการทดลองผลของโอโซนต่ออัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่เหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi*