บทที่ 2
วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในภาคสนาม ได้แก่

1.1.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างตะกอนดิน (core sampler)

1.1.2 ถุงพลาสติกสะอาดสำหรับเก็บตัวอย่างดิน

1.1.3 ไม้บรรทัด

1.1.4 ปากกาและสมุดจดบันทึก

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

1.2.1 เครื่องแก้ว

1.2.2 pH meter

1.2.3 UV – VIS spectrophotometer

1.2.4 Electrical conductivity meter

1.2.5 Hot plate

1.2.6 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

1.2.7 หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave)

1.2.8 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่นPB303-SDR

1.2.9 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB204

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ดูในภาคผนวก ค)

2.1.1 Nitrite-formation medium

2.1.2 Nitrate-formation medium

2.1.3 Nitrate broth

2.1.4 N_2-free medium for *Azotobacter* sp.

2.1.5 Peptone medium

2.1.6 Standard plate count agar

2.2 น้ำยาทดสอบ (การเตรียมน้ำยาทดสอบ ดูในภาคผนวก ค)

2.2.1 Diphenylamine

2.2.2 α -Naphthylamine

2.2.3 Sulfanilic acid 1%

2.2.4 Nessler's reagent

3. การสอบถามข้อมูลลักษณะทั่วไปของบ่อกุ้งและการจัดการบ่อกุ้ง

สอบถามข้อมูลลักษณะทั่วไปของบ่อกุ้ง ได้แก่ พื้นที่ อายุบ่อกุ้ง และข้อมูลการจัดการบ่อกุ้ง ได้แก่ อัตราการปล่อยกุ้งลงเลี้ยง การให้อาหาร การให้ออกซิเจน การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

4. การศึกษาภาคสนาม

4.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง บ่อกุ้งที่ทำการศึกษาเป็นบ่อเลี้ยงกุ้งขาว *(Litopenaeus vannamai)*แบบพัฒนาที่อยู่ในฟาร์มเดียวกันอยู่ในขอบเขตใกล้เคียงกันในตำบลน้ำน้อย อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำหรับดินชุดควบคุมซึ่งเป็นดินชุดเดียวกับดินที่ใช้เลี้ยงกุ้งเป็นดินที่อยู่ในบริเวณใกล้กับบ่อกุ้งที่เก็บตัวอย่างซึ่งไม่เคยผ่านการเลี้ยงกุ้งและไม่ได้รับน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยมีสภาพพื้นที่เป็นป่าเสม็ด ทำการเลือกเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว จำนวน 4 บ่อ โดยบ่อ 3A และ 3B เป็นบ่อที่มีอายุการใช้งาน 3 ปี มีพื้นที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 3.5 ไร่ แต่มีอัตราการปล่อยกุ้งความหนาแน่นไม่เท่ากัน ได้แก่ 90 ตัว/ตารางเมตร และ 125 ตัว/ตารางเมตรในบ่อ 3A และ 3B ตามลำดับ ในอีก 2 บ่อที่ทำการศึกษา คือ บ่อ 5A และ 5B เป็นบ่อที่มีอายุการใช้งาน 5 ปี มีพื้นที่ประมาณ 3 ไร่ และปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นเท่ากันคือ 146 ตัว/ตารางเมตรรายละเอียดดังตารางที่ 3 และภาพประกอบที่ 1

ตารางที่ 3 ข้อมูลทั่วไปของบ่อเลี้ยงกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา

บ่อ	**ขนาด (ไร่)**	**อัตราความหนาแน่น** (ตัว/ตารางเมตร)	**วิธีการเลี้ยง**	**ระยะเวลาการใช้บ่อเลี้ยงกุ้ง (ปี)**
3A	3.5	90	แบบพัฒนา	เลี้ยงกุ้งมาเป็นเวลา 3 ปี
3B	3.5	125	แบบพัฒนา	เลี้ยงกุ้งมาเป็นเวลา 3 ปี
5A	3	146	แบบพัฒนา	เลี้ยงกุ้งมาเป็นเวลา 5 ปี
5B	3	146	แบบพัฒนา	เลี้ยงกุ้งมาเป็นเวลา 5 ปี

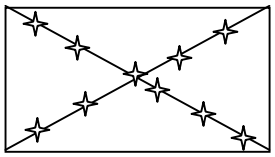
ก

ข

ภาพประกอบที่ 1 สภาพของบ่อเลี้ยงกุ้งขาวที่ใช้เก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา โดยภาพ **ก** เป็นบ่อที่ เลี้ยงกุ้งมาเป็นเวลา 3 ปี ส่วนภาพ **ข** เป็นบ่อที่เลี้ยงกุ้ง มาเป็นเวลา 5 ปี

4.2 จุดเก็บตัวอย่าง

4.2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนดินจำนวน 10 จุด ตามเส้นทแยงมุมของบ่อ ดังภาพ



หมายเหตุ เครื่องหมาย ✧ แสดงจุดเก็บตัวอย่าง

4.2.2 ระดับความลึกที่เก็บ การเก็บตัวอย่างตะกอนดินใช้อุปกรณ์เก็บตะกอนดินซึ่งเป็นท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร ปักลงไปบนพื้นบ่อและดึงขึ้นมา ดันตะกอนดินที่อยู่ในท่อออกมาตัดแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองท่อนๆ ละ 5 เซนติเมตร โดยวัดความยาวจากส่วนบนสุดของท่อนดินลงมา 5 เซนติเมตร (ระดับความลึกจากผิว - 5 เซนติเมตร) และ 10 เซนติเมตร (ระดับความลึก > 5 – 10 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ดูภาพประกอบที่ 2) รวมตัวอย่างตะกอนดินที่ได้จากความลึกเดียวกันเข้าด้วยกัน เพื่อเป็นตัวอย่างรวม (composite sample) เก็บตัวอย่างตะกอนดินทั้งหมดใส่ถุงพลาสติกเขียนฉลากติดไว้ แล้วแช่ตัวอย่างในถังน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพของตัวอย่าง (ไม่ให้ถูกความร้อนและแสง) และป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นรีบนำมายังห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ในส่วนของดินที่จะใช้วิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพใช้ตะกอนดินที่ 0 – 10 เซนติเมตร เก็บรักษาตัวอย่างโดยแช่ตัวอย่างในถังน้ำแข็ง เมื่อนำมายังห้องปฏิบัติการแล้วทำการวิเคราะห์ pH และ การนำไฟฟ้า และแบ่งตัวอย่างดินในส่วนที่จะทำการวิเคราะห์ธาตุอาหาร (แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ ตัวอย่างตะกอนดินอีกส่วนหนึ่งนำมาผึ่งลมจนแห้ง บดตัวอย่างตะกอนดินด้วยโกร่งบดดิน ร่อนดินผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร เก็บส่วนที่ผ่านตะแกรง (ขนาดเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร) ไว้ในภาชนะมีฝาปิด พร้อมทั้งปิดป้ายหมายเลขนำไปวิเคราะห์อินทรียวัตถุ อินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนรวมต่อไป นำตะกอนดินส่วนหนึ่งที่ระดับความลึก 5 - 10 เซนติเมตร และ > 5 – 10 เซนติเมตร รวมทั้งตะกอนดินที่ 0 – 10 เซนติเมตร ไปหาค่าความชื้นในดิน เพื่อใช้ในการคำนวณบางพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดต่อหน่วยกรัมน้ำหนักแห้ง

ก

ข

ภาพประกอบที่ 2 ลักษณะตัวอย่างตะกอนดินบ่อเลี้ยงกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา โดยภาพ **ก** เป็นดินตัวอย่างที่เก็บและดันออกมาจากท่อพีวีซี และภาพ **ข** เป็นการแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนบนเป็นตะกอนดินที่ระดับความลึกจากผิว-5 เซนติเมตรและส่วนล่างเป็นตะกอนดินที่ระดับความลึก > 5 – 10 เซนติเมตร

5. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพของตะกอนดิน

ทำการสกัดธาตุอาหาร (แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท) จากตะกอนดินด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ ทำการกรองสารละลายที่ได้โดยใช้การผ่านกระดาษกรอง Whatman ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการวิเคราะห์แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท ดูวิธีการวิเคราะห์ในภาพประกอบที่ 3 และตารางที่ 4

5.1 แอมโมเนียม วิเคราะห์โดยวิธี modified indophenol (Sasaki and Sawada, 1980)

5.2 ไนไตรท์ วิเคราะห์โดยวิธี diazotization (Bendschneider and Robinson, 1952)

5.3 ไนเตรท วิเคราะห์โดยนำตัวอย่างน้ำผ่าน cadmium reduction column แล้ววิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปของไนเตรทโดยใช้วิธี diazotization

5.4 ความชื้นในดิน (Moisture content) อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

5.5 ความเป็นกรดและด่าง (pH) (Thomas, 1996) ใช้สารละลายโพแทสเซียม คลอไรด์ 1 โมลาร์ เป็นสารสกัด โดยใช้อัตราส่วนของดินต่อสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 1 : 5 วัดค่า pH โดยใช้ pH meter

5.6 การนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ใช้อัตราส่วนของดินต่อน้ำเท่ากับ 1:5 แล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายโดยใช้เครื่อง conductivity meter

5.7 ไนโตรเจนรวม (TKN) โดยวิธี Kjeldahl method (Bremner, 1996)

5.8 อินทรียวัตถุและอินทรีย์คาร์บอน โดยวิธี Walkey - Black method (Walkey and Black, 1934) โดยวิเคราะห์อินทรีย์คาร์บอนก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นอินทรียวัตถุ

เนื่องจากอินทรียวัตถุประกอบด้วยอินทรีย์คาร์บอน 58 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น

เปอร์เซ็นต์ของอินทรียวัตถุ = % อินทรีย์คาร์บอน x 1.7241

5.9 อัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนรวม (C/N ratio) เป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณอินทรีย์คาร์บอนกับ TKN

ตารางที่ 4 ชนิดของการตรวจและวิธีวิเคราะห์ตะกอนดิน

ชนิดของการตรวจ	วิธีวิเคราะห์	อ้างอิง
1. pH	soil in 1M KCl (1 : 5) method	Thomas, 1996
2. การนำไฟฟ้า	soil in water (1 : 5) method	-
3. ความชื้น	105 °C overnight	-
4. แอมโมเนียม	modified indophenol	Sasaki and Sawada, 1980
5. ไนไตรท์	diazotization	Bendscheider and Robinson, 1952
6. ไนเตรท	cadmium reduction column และ diazotization	Bendscheider and Robinson, 1952
7. อินทรียวัตถุและอินทรียคาร์บอน	Walkey-Black method	Walkey-Black, 1934
8. ไนโตรเจนรวม (TKN)	Kjeldahl method	Bremner, 1996
9. total bacterial count	standard plate count	Rodina, 1972
10. Azotobacteraceae	standard plate count	Rodina, 1972
11. ammonifiers	most probable number	Rodina, 1972
12. ammonia oxidizing bacteria	most probable number	Rodina, 1972
13. nitrite oxidizing bacteria	most probable number	Rodina, 1972
14. denitrifiers	most probable number	Rodina, 1972

6. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจน

นำตัวอย่างตะกอนดิน 10 กรัม เติมสารละลาย 0.85% normal saline 90 มิลลิลิตร ลงไป ได้กำลังเจือจางเป็น 10^{-1} นำไปเขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที วางทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนประมาณ 5 นาที ดูดเอาน้ำบริเวณผิวหน้าดินขึ้นมาแล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% normal saline ลงครั้งละ 10 เท่าและนำมาใช้จำนวน 3 ระดับที่ติดต่อกัน นำไปวิเคราะห์ total bacterial count (TBC), ammonifiers, ammonium oxidizing bacteria (AOB), nitrite oxidizing bacteria (NOB), denitrifiers และ azotobacteraceae ดูวิธีการวิเคราะห์ในตารางที่ 4 และภาพประกอบที่ 4

6.1 การหา total bacterial count

นำตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วในช่วงที่เหมาะสม เช่น 10^{-4} – 10^{-6} แต่ละกำลังเจือจางทำ 2 ซ้ำ ดูดมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร standard plate count agar จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมานับจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดจากกำลังเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณ azotobacteraceae

เติมตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วแต่ละกำลังเจือจางโดยทำ 2 ซ้ำ ดูดมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร N_2- free medium จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีบนผิวอาหารซึ่งมักมีลักษณะมัน เยิ้ม ใส ขุ่น มีสีหรือไม่มีก็ได้ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ จากนั้นนับจำนวนทั้งหมดจากกำลังเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณ ammonifiers

เติมตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วแต่ละกำลังเจือจางในช่วง 10^{-1} – 10^{-3} ลงใน peptone broth อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ 3 กำลังเจือจางต่อกัน แต่ละกำลังเจือจางทำ 4 ซ้ำ แล้วนำหลอดทั้งหมดรวมทั้งหลอดควบคุม (ไม่เติมตัวอย่าง) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิดแอมโมเนียโดยหยด Nessler' s reagent ใน spot plate โดยดูดมา 1 มิลลิลิตร จากแต่ละหลอดลงไปผสมให้เข้ากัน ถ้าเกิดสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลแสดงว่ามีแอมโมเนียเกิดขึ้นแล้วโดยเทียบกับหลอดควบคุม นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPN ในภาคผนวก ง

6.4 การวิเคราะห์ปริมาณ ammonium oxidizing bacteria (AOB)

เติมตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วแต่ละกำลังเจือจาง ลงใน nitrite- formation medium อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ 3 กำลังเจือจางต่อกัน โดยแต่ละกำลังเจือจางทำ 4 ซ้ำ แล้วนำหลอดทั้งหมดรวมทั้งหลอดควบคุม (ไม่เติมตัวอย่าง) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการเกิดไนไตรท์โดยหยดตัวอย่างลงใน spot plate แต่ละหลุมจากแต่ละหลอดจากนั้นหยด sulfanilic acid 1% ลงไป 1 หยด และ naphthylamine ที่หยดผสมให้เข้ากัน หากมีไนไตรท์จะเกิดสีแดงหรือสีชมพู นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPNในภาคผนวก ง

6.5 การวิเคราะห์ปริมาณ nitrite oxidizing bacteria (NOB)

เติมตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วแต่ละกำลังเจือจางลงใน nitrate- formation medium อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ 3 กำลังเจือจางต่อกัน โดยแต่ละกำลังเจือจางทำ 4 ซ้ำ แล้วนำหลอดทั้งหมดรวมทั้งหลอดควบคุม (ไม่เติมตัวอย่าง) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้ว

ทดสอบว่ามีไนไตรท์หรือไม่ หากหลอดใดไม่มีไนไตรท์แสดงว่าไนไตรท์อาจถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรทโดยสมบูรณ์ ทดสอบการเกิดไนเตรท โดยหยด diphynylamine 2-3 หยด หากมีไนเตรทจะมีสีน้ำเงิน นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPN ในภาคผนวก ง

6.6 การวิเคราะห์ปริมาณ denitrifiers

เติมตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วแต่ละกำลังเจือจางลงใน nitrate broth อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ 3 กำลังเจือจางต่อกัน โดยแต่ละกำลังเจือจางทำ 4 ซ้ำ แล้วนำหลอดทั้งหมดรวมทั้งหลอดควบคุม (ไม่เติมตัวอย่าง) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเกิดก๊าซในหลอด Durham tube ถ้าหากไนเตรทถูกรีดิวซ์ไปเป็นก๊าซไนโตรเจน อาหารดังกล่าวจะต้องมีไนเตรทน้อยลงหรือไม่มีเลยและจะเกิดก๊าซในหลอด Durham tube ทดสอบไนเตรทเช่นเดียวกับการเกิดออกซิเดชัน ไนไตรท์เป็นไนเตรท หากไม่มีสีเกิดขึ้นหรือสีอ่อนแสดงว่าไนเตรทถูกใช้ไป นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPN ในภาคผนวก ง

7. วิธีประมวลผล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 12 โดยแบ่งการวิเคราะห์เป็น

7.1 ข้อมูลสมบัติทางเคมี-กายภาพและปริมาณแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนในตะกอนดิน ใช้สถิติเชิงพรรณา หาค่าเฉลี่ย (Mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation), ค่าต่ำสุด (minimum), ค่าสูงสุด (maximum) และค่าพิสัย (range)

7.2 วิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ของปริมาณแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนในตะกอนดินระหว่างที่ระดับความลึกจากพื้นบ่อ ถึง 5.0 เซนติเมตร กับที่ระดับความลึกมากกว่า 5.0 เซนติเมตร ถึง 10.0 เซนติเมตร เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียในตะกอนดินแต่ละชั้นเป็นอิสระต่อกัน จึงใช้การทดสอบแบบ independent sample t–test

7.3 วิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ของแต่ละพารามิเตอร์ที่ตรวจสอบระหว่างดินชุดควบคุมกับตะกอนดินบ่อกุ้งที่มีอายุการใช้งาน 3 ปี และ 5 ปี โดยใช้การวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA ซึ่งการวิเคราะห์แบบนี้จะวิเคราะห์กับกลุ่มย่อยที่มีหลายกลุ่ม จะวิเคราะห์พร้อมกันทีเดียว ถ้าไม่พบความแตกตางระหว่างกลุ่มก็จะไม่ต้องวิเคราะห์ต่อ แต่ถ้าพบความแตกต่างจึงจะวิเคราะห์ว่ากลุ่มใดแตกต่างกันโดยใช้ post hoc multiple comparisons

7.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนและสมบัติทางเคมี-กายภาพของตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้งขาว โดยใช้สถิติ Spearman rank correlation เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ทั้งหมด