

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. น้ำทิ้งก่อนการบำบัดจากกระบวนการผลิตปลาป่นของโรงงานบริษัทปัดตานีปลาป่น 1997, โรงงานบริษัทเกษมกิจปลาป่น และบริษัทมาริน โปรคักชั่น อายุไม่เกิน 1 สัปดาห์
2. เชื้อคลอเรลลา
3. เชื้อไรแดง
4. ถังลำเลียงเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น ขนาด 2000 ลิตร และขนาด 1000 ลิตร
5. ถังกักเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ขนาด 500 ลิตร และ 100 ลิตร
6. ถังเพาะเลี้ยงคลอเรลลา และไรแดง ขนาด 300 ลิตร และ 50 ลิตร
7. ตู้กระจกขนาด 30 ลิตร
8. เครื่องแก้วพื้นฐานห้องปฏิบัติการ
9. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ห้องปฏิบัติการประกอบเบื้องต้นทางกายภาพ ทางเคมีบางประการ และธาตุอาหารในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น (รายละเอียดดูในภาคผนวก ข)

3.2 วิธีการวิเคราะห์และสารเคมี

1. วิธีการวิเคราะห์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการเบื้องต้นทางกายภาพ ทางเคมีบางประการ และธาตุอาหารในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น (รายละเอียดดูในภาคผนวก ก)

3.3 วิธีดำเนินการ

ทำการศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น ในจังหวัดปัดตานี เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งมาเลี้ยงคลอเรลลาเพื่อการเลี้ยงไรแดง โดยทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารเบื้องต้นในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของน้ำทิ้งกับเวลาการกักเก็บและความเข้มข้นของซีโอดีในน้ำทิ้งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของคลอเรลลาโดยศึกษาประเมินการเพิ่มจำนวนคลอเรลลาจากการเพิ่มของปริมาณคลอโรฟิลล์ เพื่อนำค่าความเข้มข้นซีโอดีในน้ำทิ้งที่ได้ไปศึกษาการเพาะเลี้ยงไรแดงแบบหมวมวล พร้อมทั้งประเมินผลผลิตไรแดงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยน้ำทิ้ง ความคุ้มต้นทุนและความเป็นไปได้ในรูปแบบการนำไปใช้ พร้อมทั้งศึกษาคูลยภาพมวลไนโตรเจนและซีโอดีในระบบเพาะเลี้ยง โดยทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้ การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำ

ทิ้งจากโรงงานผลิตปลาป่น เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานปลาป่นในจังหวัดปัตตานีจำนวน 3 โรงงาน แต่ละโรงงานทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 เดือน เป็นเวลา 1 ปี น้ำทิ้งที่เก็บเป็นน้ำทิ้งจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้ง ซึ่งได้จากกระบวนการบดปลาลำเลียงเข้าสู่กระบวนการผลิตและน้ำล้างพื้น โดยนำภาชนะถังแบบมีฝาปิดขนาด 2000 ลิตร ขนลำเลียงด้วยรถบรรทุก และแบ่งเก็บใส่ภาชนะแบบมีฝาปิดขนาด 500 ลิตร การเก็บรักษาตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งใส่ขวดพลาสติก แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง

3.3.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้ง

ทำการศึกษาตามหลักการวิเคราะห์น้ำทิ้งของ APHA, AWWA and WPCF (1998) และ AOAC Official (2000) ซึ่งวิเคราะห์ น้ำทิ้ง จาก โรงงานปลาป่น โดยศึกษาข้อมูลพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดัง ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ทางเคมีและทางกายภาพบางประการและวิธีการวิเคราะห์ในน้ำทิ้ง

พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา	วิธีการวิเคราะห์
ความเป็นกรด-ด่าง	Electrometric Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-H ⁺ B, 1998)
อุณหภูมิ	Electrometric Method (APHA, AWWA & WEF No. 2550 B, 1998)
ความเค็ม	Electrometric Method (APHA, AWWA & WEF, 1998)
ค่าการนำไฟฟ้า	Electrometric Method (APHA, AWWA & WEF, 1998)
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	Gravimetric Method (AOAC Official Method No. 966.02, 2000)
ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้	Gravimetric Method (AOAC Official Method No. 966.02, 2000)
ปริมาณเถ้า	Gravimetric Method (AOAC Official Method No. 966.02, 2000)
ค่าซีโอดี	Close Reflux Titrimetric Method (AOAC Official Method No. 973.46, 2000)

3.3.2 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารและวิธีการวิเคราะห์ ในน้ำทิ้ง

ทำการศึกษาตามหลักการวิเคราะห์น้ำทิ้ง ของ APHA, AWWA & WEF (1998) และ AOAC official Method (2000) ซึ่งวิเคราะห์ น้ำทิ้ง จากโรงงานปลาป่น โดยศึกษาข้อมูลพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดัง ตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปริมาณธาตุอาหารและวิธีการวิเคราะห์ ในน้ำทิ้ง

พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา	วิธีการวิเคราะห์
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	Spectrophotometer Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-PE, 1998)
ไนโตรเจนในรูป ที เค เอ็น	Kjeldahl Method (AOAC Official Method No. 955.04, 2000)
แอมโมเนีย	Distillation Method (APHA, AWWA & WEF, 1995)
ไนเตรท	Brucine Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-NO ₃ E, 1998)
ไนไตรท์	Spectrophotometer (APHA, AWWA & WEF No. 4500-NO ₂ B, 1998)

3.3.3 ศึกษาอายุของน้ำทิ้งต่อการเปลี่ยนแปลงของสมบัติเบื้องต้นทางเคมีและกายภาพ

- 1) นำน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นใส่ถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร จำนวน 3 ถัง
- 2) เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมีบางประการและธาตุอาหาร ทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน
- 3) นำข้อมูลวิเคราะห์และสรุปการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำทิ้งต่อระยะเวลาการกักเก็บ

3.3.4 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์กับจำนวนเซลล์คลอเรลลา

- 1) นำหัวเชื้อคลอเรลลาจากการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำทิ้งใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 2) นับความหนาแน่นเซลล์หัวเชื้อด้วยสไลด์ Haemocytometer 3 ซ้ำ และไปเปิดหัวเชื้อคลอเรลลาใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด จากนั้นนำหัวเชื้อคลอเรลลาในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเอาน้ำส่วนใสแยกออกจาก

เซลล์คลอเรลลา หลังการปั่นเหวี่ยงสามารถเก็บรักษาตัวอย่างเซลล์คลอเรลลาไว้ได้ 24 ชั่วโมง โดยการเติมสารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร 2-3 หยด ลงไปเพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง และเก็บที่มีด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ถัดคาและโสภณา, 2546)

3) เติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในเซลล์คลอเรลลาที่ได้ และนำไปอุ่นให้ความร้อนในหม้อต้มน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์

4) ทำการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร (Aslan and Kapdan, 1994 อ้างโดย Becker, 2006)

5) จากนั้นนำหัวเชื้อคลอเรลลาที่เหลือเจือจางอัตราส่วน 1 : 1 ด้วยน้ำกลั่น ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนเหมือนข้อ 2)

6) ทำตามขั้นตอนเหมือนข้อ 3) โดยทำการเจือจางความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลาที่หกระดับความหนาแน่น

7) นำข้อมูลปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา ที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์

3.3.5 ศึกษาการปริมาณซีโอดีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคลอเรลลา

1) เตรียมเชื้อคลอเรลลา ที่ความหนาแน่นเซลล์ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) เจือจางน้ำทิ้งโรงงานผลิตปลาป่น ให้มีค่าซีโอดีในช่วง 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในโหลแก้วขนาด 8 ลิตร ที่ความเข้มข้นซีโอดีละ 3 ซ้ำ

3) ทำการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร (Aslan and Kapdan, 1994 อ้างโดย Becker, 2006), ความเป็นกรด-ด่าง, ค่าการนำไฟฟ้า และ อุณหภูมิ ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4) หลังการเลี้ยง 72 ชั่วโมง ปล่อยชุดการทดลองทุกชุดในสภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นทดสอบโดยใส่ไรแดงเพื่อดูความสามารถในการใช้แต่ละความเข้มข้นเลี้ยงไรแดงต่อไป

5) วิเคราะห์ข้อมูลและหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบสัดส่วนการเจือจางของน้ำทิ้งที่เหมาะสม

3.3.6 ศึกษาการลดลงของธาตุอาหารและผลผลิตไรแดงที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้ง

1) เพาะเลี้ยงคลอเรลลาด้วยน้ำทิ้งอุตสาหกรรมผลิตปลาป่นที่ความเข้มข้นซีโอดี 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตู้กระจกขนาด 30 ลิตร โดยทำการตรวจวัดปริมาณ ไนโตรเจนในรูป ที เค เอ็น, แอมโมเนีย, ไนเตรท, ฟอสฟอรัสทั้งหมด, ซีโอดี และพารามิเตอร์พื้นฐาน ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- 2) จากนั้นเติมหัวเชื้อไรแดงน้ำหนักสด อายุ 2 วัน ความหนาแน่นตู้ละ 0.1 กรัมต่อลิตร (ภาณุและคณะ, 2541) เลี้ยงไรแดงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนครบกำหนดเวลา 144 ชั่วโมง
- 3) เก็บน้ำเลี้ยงวิเคราะห์พารามิเตอร์ในข้อ 1) ก่อนและหลังเลี้ยงไรแดง
- 4) จากนั้นเก็บผลผลิตไรแดงแต่ละตู้ โดยวิธีการกรองด้วยผ้ากรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตาข่าย 0.1 มิลลิเมตร
- 5) นำผลที่ได้ไปประเมินเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธีทางสถิติ t-test

3.3.7 ศึกษาอัตราการให้อาหารของแม่พันธุ์ไรแดง

- 1) นำไรแดงเพศเมียที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวน 100 ตัว ลงเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2) เติมน้ำเลี้ยงคลอเรลลาปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความหนาแน่นเซลล์ 6×10^6 บันทึกเวลาเกิด และตรวจสอบจำนวนลูกไรแดง
- 3) นำลูกไรแดงที่ได้ อายุ 2 วัน คัดเฉพาะเพศเมียที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ลงเลี้ยงเป็นแม่พันธุ์ในหลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ตัวต่อหลอด
- 4) เติมน้ำเลี้ยงคลอเรลลาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำจำนวน 50 ขวด ทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงคลอเรลลาทุกวันจนสังเกตเห็นลูกไรแดง
- 5) แยกแม่ไรแดงออก บันทึกเวลาเกิดและนับจำนวนลูกไรแดง
- 6) นำแม่พันธุ์ลงเลี้ยงในขวดแก้วเช่นเดิม สังเกตจนได้ลูกไรแดงคลอกต่อไป และทำซ้ำอย่างเดิม จนแม่พันธุ์ตาย

3.3.8 ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการเติมหัวเชื้อไรแดง

- 1) เพาะเลี้ยงคลอเรลลาด้วยน้ำทิ้งโรงงานผลิตปลาป่นที่ความเข้มข้นซีโอดี 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร
- 2) ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงนำน้ำเลี้ยงคลอเรลลา ใส่งในตู้กระจกขนาด 30 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อไรแดงน้ำหนักเปียก อายุ 2 วัน ความหนาแน่นตู้ละ 0.1 กรัมต่อลิตร ภาณุและคณะ (2541) ลงเลี้ยงในตู้ โดยทำการเลี้ยงไรแดงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- 3) ทำการเพาะเลี้ยงคลอเรลลาที่เหลือในถัง 200 ลิตร ต่อไปจนครบเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเหมือนในข้อ 2)
- 4) ทำการเก็บผลผลิตไรแดงที่ได้แต่ละชุดทดลอง นำผลที่ได้ไปประเมินเปรียบเทียบด้วยวิธีทางสถิติ

3.3.9 ศึกษาการเลี้ยงคลอเรลลาและไรแดงแบบหมวมวลในน้ำทิ้ง

- 1) ทำการเพาะเลี้ยงคลอเรลลาด้วยสัดส่วนการเจือจางน้ำทิ้งความเข้มข้นซีโอดี 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถังขนาด 300 ลิตร โดยความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลาเริ่มเลี้ยง เท่ากับ 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 2) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ทำการเติมหัวเชื้อไรแดงน้ำหนักเปียก อายุ 2 วัน ความหนาแน่นถึงละ 0.1 กรัมต่อลิตร ภาณุและคณะ (2541) เลี้ยงไรแดงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนครบกำหนดเวลา 144 ชั่วโมง
- 3) ที่เวลา 144 ชั่วโมง ทำการเก็บผลผลิตไรแดงแต่ละถัง นำผลที่ได้ไปประเมินด้วยวิธีทางสถิติ
- 4) ทำการตรวจวัดพารามิเตอร์ ค่าความเป็น กรด-ด่าง, ค่าการนำไฟฟ้า, อุณหภูมิ และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร (Aslan and Kapdan, 1994 อ้างโดย Becker, 2006) ในน้ำเลี้ยง ขณะเริ่มเลี้ยงคลอเรลลาที่เวลา 0 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงไรแดงที่เวลา 72 ชั่วโมงและหลังเลี้ยงไรแดงที่เวลา 144 ชั่วโมง

3.3.10 ศึกษาคุณภาพมวลในโตรเจนและซีโอดีในระบบเลี้ยงไรแดง

- 1) วิเคราะห์สารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ไนโตรเจนในรูป ที เค เอ็น, แอมโมเนีย, ไนไตรท์, ไนเตรทและซีโอดีในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น
- 2) ทำการเพาะเลี้ยงคลอเรลลา ที่สัดส่วนการเจือจางความเข้มข้นซีโอดี 600 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถังขนาด 300 ลิตร โดยความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลาเริ่มการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 3) ทำการตรวจวัดติดตามวิเคราะห์สารประกอบไนโตรเจนคือ ไนโตรเจนในรูป ที เค เอ็น, แอมโมเนีย, ไนเตรท, ไนไตรท์ และซีโอดี และพารามิเตอร์พื้นฐาน ในระบบเลี้ยงคลอเรลลา และระบบเลี้ยงไรแดง
- 4) การเก็บตัวอย่างวิเคราะห์พารามิเตอร์ในข้อ 4) ก่อนเลี้ยงทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างใน น้ำทิ้ง, น้ำหัวเชื้อคลอเรลลา และน้ำประปา ก่อนนำลงเลี้ยงในระบบ ในรูปของสารละลาย ตะกอน และเซลล์คลอเรลลา ปริมาณพารามิเตอร์ต่างๆคำนวณจากปริมาตรที่ใช้ในการผสม หลังจากเลี้ยงคลอเรลลาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำคลอเรลลาไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ในข้อ 4) ในรูปของเซลล์คลอเรลลาที่เพิ่มขึ้น สารที่ละลายน้ำ และตะกอนแขวนลอย จากนั้นเติมหัวเชื้อไรแดงอายุ 2 วัน ความหนาแน่น 0.1 กรัมต่อลิตร ภาณุและคณะ (2541) เลี้ยงไรแดงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บผลผลิตไรแดงที่ได้ไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนจากเซลล์คลอเรลลาเป็นผลผลิตไรแดง เทียบกลับด้วยน้ำหนักไรแดงที่ได้จากการเลี้ยง และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในระบบในรูปของสารที่ละลายน้ำและตะกอนแขวนลอย

5) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณคุณภาพมวลไนโตรเจนและซีโอดี

3.3.11 ศึกษาการประเมินต้นทุนการผลิตและความคุ้มค่าของผลการตอบแทน

ประเมินต้นทุนการผลิต และความคุ้มค่าของผลการตอบแทนในการนำน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นมาเพาะเลี้ยงคลอเรลลาและไรแดง โดยคิดคำนวณจากต้นทุนการขนส่งน้ำทิ้ง ราคาต้นทุนค่าแรงงานและค่าไฟฟ้า (บาทต่อกิโลกรัม) รายได้จากการขายไรแดง (บาท) และผลตอบแทน (บาท) ซึ่งใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม Microsoft Excel ประมวลผลข้อมูลในเชิงคณิตศาสตร์

3.3.12 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์แตกต่างของข้อมูลกลุ่มด้วย (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ (t-test) นำเสนอข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย และค่าความแปรปรวน

Prince of Songkla University
Pattani Campus