

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 การวิเคราะห์หาค่าซีโอดี สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--|--------------------------------|
| Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Sulfuric acid (H_2SO_4) | (Mallinckrodt Baker, Thailand) |
| Mercury (II) sulfate ($HgSO_4$) | (BDH, England) |
| Silver sulphate (Ag_2SO_4) | (BDH, England) |
| Ammoniumiron (II) sulfate (NH_4) ₂ SO ₄ ·FeSO ₄ ·6H ₂ O | (Ajax finechem, New Zealand) |

3.1.2 การวิเคราะห์หาที่เคเอ็นไนโตรเจน สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Potassium sulfate (K_2SO_4) | (Fisher chemicals, England) |
| Boric acid (H_3BO_3) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Sodium hydroxide (NaOH) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Sulfuric acid (H_2SO_4) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Nitric acid (HNO_3) | (LAB - SCAN, Ireland) |

3.1.3 การวิเคราะห์ไนเตรท สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--|--------------------------------|
| Hydrous potassium nitrate (KNO_3) | (BDH, England) |
| Brucine Sulfate ($(\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Sulfanilic Acid ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$) | (BDH, England) |
| Hydrochloric acid (HCl) | (Merck KGaA, Germany) |
| Sulfuric acid (H_2SO_4) | (Mallinckrodt Baker, Thailand) |
| Sodium chloride (NaCl) | (Merck KGaA, Germany) |

3.1.4 การวิเคราะห์หาแอมโมเนีย สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--|------------------------------|
| Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) | (Merck KGaA, Germany) |
| Ethyl alcohol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) | (Merck KGaA, Germany) |
| Sodium nitroprusside ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | (Merck KGaA, Germany) |
| Sodium dichloroisocyanurate ($\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3$) | (Merck KGaA, Germany) |
| Potassium dichloroisocyanurate ($\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{KO}_3$) | (Merck KGaA, Germany) |
| Sodium hydroxide (NaOH) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Sodium chloride (NaCl) | (Merck KGaA, Germany) |
| Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) | (Ajax finechem, New Zealand) |

3.1.5 การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสทั้งหมด สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--|-----------------------------|
| Perchloric acid (HClO ₄) | (LAB - SCAN, Ireland) |
| Ammonium molybdate (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | (Riedel - de Haen, Germany) |
| Ammonium metavanadate (NH ₄ VO ₃) | (Merck, Germany) |
| Nitric acid (HNO ₃) | (LAB - SCAN, Ireland) |

3.1.6 การวิเคราะห์หาโพแทสเซียมในรูป K₂O สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Potassium chloride (KCl) | (BDH, England) |
| Potassium hydroxide (KOH) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Perchloric acid (HClO ₄) | (LAB - SCAN, Ireland) |

3.1.7 การวิเคราะห์หาแมกนีเซียม สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|---|------------------------------|
| Strontium chloride (SrCl ₂ ·6H ₂ O) | (Ajax finechem, New Zealand) |
|---|------------------------------|

3.1.8 การวิเคราะห์หาซัลเฟต สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

| | |
|--|------------------------------|
| Glycerol(C ₃ H ₅ (OH) ₃) | (Ajax finechem, New Zealand) |
| Hydrochloric acid (HCl) | (Merck KGaA, Germany) |
| Isopropyl alcohol (C ₃ H ₈ O) | (Merck KGaA, Germany) |
| Sodium chloride (NaCl) | (Merck KGaA, Germany) |

3.2 วิธีดำเนินการ

ศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีและทางกายของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นในจังหวัด นครศรีธรรมราช ปัตตานี พัทลุง และสงขลา เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งมาเลี้ยง คลอเรลลา โดยทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารเบื้องต้นในน้ำ ทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น รวมทั้งศึกษาสัดส่วนน้ำทิ้งเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของคลอ

เรลตาโดยศึกษาประเมินการเพิ่มจำนวนคลอเรลตาจากการเพิ่มของปริมาณคลอโรฟิลล์ และการกำจัดธาตุอาหารของคลอเรลตา เพื่อนำค่าดังกล่าวที่ได้ไปศึกษาระบบกึ่งต่อเนื่องสำหรับการเพาะเลี้ยงคลอเรลตา

3.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้น

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นจาก 4 โรงงาน ในจังหวัดในจังหวัด นครศรีธรรมราช ปัตตานี พัทลุง และสงขลา โรงงานในจังหวัดนครศรีธรรมราช ปัตตานี และพัทลุง ทำการเก็บตัวอย่างโรงงานละ 3 ครั้ง ส่วนโรงงานในจังหวัดสงขลาเก็บหนึ่งครั้ง โดยทำการศึกษา ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึงมกราคม พ.ศ. 2551 น้ำทิ้งที่เก็บจากโรงงานในจังหวัด นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา เป็นน้ำทิ้งที่เก็บจากบ่อดักยาง ซึ่งน้ำจะมาจากกระบวนการปั่น ยาง และกระบวนการจับหางน้ำยาง ส่วนปัตตานีเป็นน้ำทิ้งที่เก็บจากบ่อจับหางน้ำยาง เมื่อได้ ตัวอย่างน้ำแล้ว ทำการเก็บรักษาตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งใส่ขวด พลาสติก แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง

3.2.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น

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

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ทางเคมีและทางกายภาพบางประการและวิธีการวิเคราะห์ในน้ำทิ้ง

| พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา | วิธีการวิเคราะห์ |
|--------------------------|--|
| ความเป็นกรด-ด่าง | Electrometric Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-H B, 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) |
| ค่าซีไอดี | Close Reflux Titrimetric Method (AOAC Official Method No. 973.46, 2000) |

3.2.3 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารในน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น

ทำการศึกษาตามหลักการวิเคราะห์น้ำทิ้ง ของ APHA, AWWA & WEF (1998) และ AOAC (2000) ซึ่งวิเคราะห์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้น โดยศึกษาข้อมูลพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 พารามิเตอร์ธาตุอาหารและวิธีการวิเคราะห์ ในน้ำทิ้ง

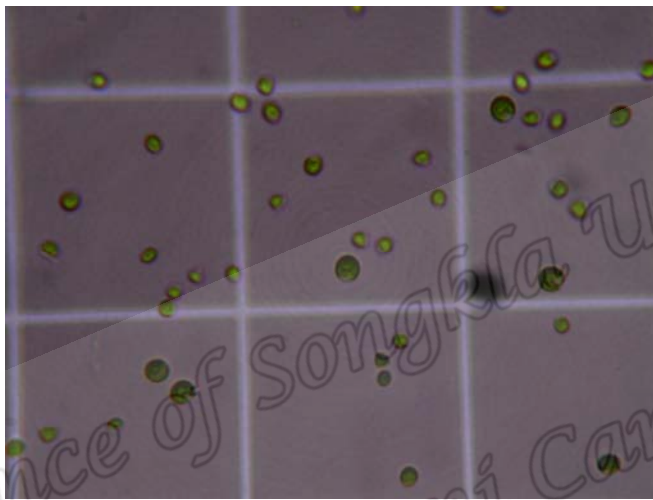
| พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา | วิธีการวิเคราะห์ |
|--------------------------|--|
| ฟอสฟอรัสทั้งหมด | Spectrophotometer Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-PE, 1998) |
| ไนโตรเจนในรูป ที เค เอ็น | Kjeldahl Method (AOAC Official Method No. 955.04, 2000) |
| แอมโมเนีย | Distillation Method (APHA, AWWA & WEF, 1995) |
| ไนเตรท | Brucine Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500-NO ₃ -E, 1998) |
| โพแทสเซียม | Atomic Absorption Spectrophotometric Method (AOAC Official Method No. 965.09, 2000) |
| ซัลเฟต | Turbidimetric Method (APHA, AWWA & WEF No. 4500 -SO ₄ -E , 1998) |
| แมกนีเซียม | Atomic Absorption Spectrophotometer Method (AOAC official Method, 951.11, 2000) |

สำหรับการเตรียมเครื่องแก้วเพื่อการศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมี เตรียมโดยล้างอุปกรณ์และเครื่องแก้วด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วที่โพล (บริษัท ท็อป ทวิน จำกัด) แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด สำหรับการวิเคราะห์ธาตุอาหารโพแทสเซียม และ สังกะสี นำอุปกรณ์และเครื่องแก้วแช่ในกรดไนตริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับขวดพลาสติกแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำปราศจากไอออนและแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วจึงคว่ำผึ่งลมให้แห้งหรือนำไปอบจนแห้ง

3.2.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงคลอเรลลาจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น

3.2.4.1 การเตรียมเชื้อคลอเรลลา

เก็บเชื้อคลอเรลลาจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นในจังหวัด นครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นคลอเรลลาที่เติบโตในน้ำจืด นำมาขยายเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยการ ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นที่สัดส่วนร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปล่อยให้คลอเรลลาเจริญเติบโต ประมาณ 3 วัน แล้วจึงทำการขยายเชื้ออีกครั้ง ทำการขยายเชื้อประมาณ 4-5 ครั้งจะทำให้เชื้อคลอ เรลลาที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 คลอเรลลาที่ทำการขยายเชื้อแล้วประมาณ 4 ครั้ง

3.2.4.2 ศึกษาสัดส่วนน้ำทิ้งเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคลอเรลลา

- 1) เจือจางน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น ให้อยู่ในช่วงสัดส่วนน้ำทิ้งร้อยละ 0 – 17.5 โดยปริมาตร ในโหลแก้วขนาด 8 ลิตร สัดส่วนละ 3 ซ้ำ
- 2) เติมน้ำคลอเรลลาในโหลแก้วแต่ละโหล ให้มีความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- 3) ทำการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร (Aslan and Kapdan, 1994 อ้างโดย Becker, 2006), ความเป็น กรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้า ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- 4) วิเคราะห์ข้อมูลและหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบสัดส่วนการเจือจางของน้ำทิ้งที่ เหมาะสม

3.2.4.3 ศึกษาการลดลงของธาตุอาหาร

1) เจือจางน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น ให้มีสัดส่วนน้ำทิ้งเท่ากับร้อยละ 5.0, 7.0 และ 10.5 โดยปริมาตร ในตู้กระจกขนาด $30 \times 60 \times 30$ ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรที่เพาะเลี้ยง 50 ลิตร สัดส่วนละ 3 ชั่วโมง

2) เติมเชื้อคลอเรลลาในตู้กระจกแต่ละตู้ ให้มีความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3) ทำการตรวจวัดความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา ปริมาณซีโอดี ปริมาณ ที เค เอ็น ในโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด และพารามิเตอร์พื้นฐาน ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4) นำผลที่ได้ไปประเมินความสามารถในการบำบัดธาตุอาหารภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง และผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรม

3.2.4.4 ศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวคลอเรลลาแบบต่อเนื่อง

1) เจือจางน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำยางข้น ให้มีสัดส่วนน้ำทิ้งเท่ากับร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร ในตู้กระจกขนาด $30 \times 60 \times 30$ ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรที่เพาะเลี้ยง 50 ลิตร จำนวน 3 ชั่วโมง

2) เติมเชื้อคลอเรลลาในตู้กระจกแต่ละตู้ ให้มีความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3) การเพาะเลี้ยงจะครบรอบที่ 1 ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตคลอเรลลา โดยเหลือผลผลิตบางส่วนเพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น และเติมสารอาหาร (น้ำทิ้ง) ลงไปอีกครั้งที่สัดส่วนน้ำทิ้งร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร เพื่อทำการเลี้ยงในรอบที่ 2 และ 3 ต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงจนครบเวลา 216 ชั่วโมง (3 รอบ)

4) ทำการตรวจวัดความหนาแน่นเซลล์คลอเรลลา และพารามิเตอร์ของน้ำเลี้ยง ดังนี้ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นกรดค่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าซีโอดี เมื่อเริ่มต้น และเมื่อครบ 72 ชั่วโมง ของแต่ละรอบ

5) นำผลที่ได้ไปประเมินความสามารถของการผลิตคลอเรลลา การกำจัดธาตุอาหารแต่ละรอบ และสร้างแบบจำลองการเพาะเลี้ยงคลอเรลลาคด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้น ในระบบกึ่งต่อเนื่อง

3.2.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นำเสนอข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย และค่าความแปรปรวน

Prince of Songkla University
Pattani Campus