บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และเคมีของตัวอย่างกากตะกอน

3.1.1 สารเคมี สารเคมีที่ใช้เกรด Analytical Reagent (A.R.)

1. การวิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด (TKN)

Potassium sulfate (K_2SO_4)	(Fisher Chemicals)
Boric acid (H_3BO_3), Sodium hydroxide	(Ajax Finechem, New Zealand)
(NaOH) และ Sulfuric acid (HCl)	
Nitric acid (HNO_3)	(Lab - Scan, Irland)

2. การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสในรูป P_2O_5

Perchloric acid ($HClO_4$)	(Lab - Scan, Irland)
Ammonium molybdate	(Riedel - de Haen, Germany)
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	
Ammonium metavanadate (NH_4VO_3)	(Merck, Germany)
Nitric acid (HNO_3)	(Lab - Scan, Irland)

3. การวิเคราะห์หาโพแทสเซียมในรูป K_2O

Potassium chloride (KCl)	(BDH, England)
Potassium hydroxide (KOH)	(Ajax Finechem, New Zealand)
Perchloric acid ($HClO_4$)	(Lab - Scan, Irland)

4. การวิเคราะห์หาสังกะสี (Zinc, Zn)

Diethylene triamine pentacetic acid	(Ajax Finechem, New Zealand)
(DTPA, $C_{14}H_{23}N_3O_{10}$)	

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) Model 600, Mammert
2. เครื่องวัด ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Model MP220, Toledo, Mettler
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Model TR – 6101, Denver Instrument
4. เครื่องเขย่าสาร (Shaker) Model Unimax 1010, Heidolph, Germany
5. เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (Deionization, DI) Model 185, Milli - Q Plus
6. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
7. เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Digestion Model K – 435, Scrubber Model B - 414 และ Distillation Model B – 324, BUCHI
8. Spectrophotometer รุ่น Spectronic® 20, Genesys™ Spectronic, UK
9. Flame Photometer Model 410, Sherwood-Scientific
10. Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS), Analyst 100, Perkin Elmer

3.1.3 วิธีการทดลอง

3.1.3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างกากตะกอน

ทำการเก็บตัวอย่างกากตะกอนจากบ่อรวมน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมน้ำยางธรรมชาติ จังหวัดปัตตานี 1 แห่ง ตลอดทั้งปีโดยใช้ระยะเวลาในการเก็บ 3 เดือนต่อครั้ง แต่ละครั้งเก็บ 2 บริเวณและแต่ละบริเวณทำการเก็บ 3 ซ้ำ โดยบริเวณที่ 1 เป็นกากตะกอนที่มีการทับถมกันนานจนเกิดเป็นชั้นหนา และเก็บตัวอย่างกากตะกอนตรงกลางบ่อ บริเวณที่ 2 คือกากตะกอนที่เพิ่งออกจากกระบวนการผลิตอยู่ขอบบ่อรวมน้ำเสีย ตัวอย่างกากตะกอนทั้ง 2 บริเวณเก็บลึกลงไป 30 cm จากระดับผิวหน้ากากตะกอน ใช้เสียมด้ามยาวเก็บกากตะกอนลงในขวดพลาสติกที่มีฝาปิด แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4^0C เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง จากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 103^0C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

(a) (b)

รูปที่ 3.1 บ่อรวมน้ำเสียของโรงงานกากตะกอนบริเวณที่ 1 (a), กากตะกอนบริเวณที่ 2 (b)

3.1.3.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของกากตะกอน

วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าปริมาณความชื้น สมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่า pH ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสในรูป P_2O_5 โพแทสเซียมในรูป K_2O และปริมาณสังกะสีในกากตะกอน ตามวิธีการวิเคราะห์ของ AOAC (2000) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ตรวจวัด และวิธีการวิเคราะห์หรือเครื่องมือ

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์/เครื่องมือ
1. Temperature	Thermometer
2. pH	pH Measurement of Organic Soils (AOAC Official Method 994.18, 2000)
3. Moisture Content	Gravimetric Method (AOAC Official Method 985.29, 1995)
4. Total Nitrogen (N)	Kjeldahl Method (AOAC Official Method 955.04, 2000)
5. Phosphorus ในรูป P_2O_5	Spectrophotometry Molybdophosphate Method (AOAC Official Method 958.01, 2000)
6. Potassium ในรูป K_2O	Flame Photometric Method (AOAC Official Method 893.02, 2000)
7. Zinc (Zn)	Atomic Absorption Spectrophotometric Method (AOAC Official Method, 965.09, 2000)

วิธีการวิเคราะห์แต่ละพารามิเตอร์ แสดงในภาคผนวก ข

สำหรับเครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ก่อนการศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมี ต้องนำมาล้างด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วทีโพล์ (บริษัท ท๊อป ทวิน จำกัด) โดยผสมน้ำยา 10 ถึง 20 mL กับน้ำ 4.5 L ผสมให้เข้ากันแล้วนำอุปกรณ์ และเครื่องแก้วลงล้าง แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด สำหรับการวิเคราะห์ธาตุอาหาร โพแทสเซียม และสังกะสี ต้องแช่อุปกรณ์ และเครื่องแก้วใน 10% HNO_3 เป็นเวลา 24 hr สำหรับขวดพลาสติกแช่เป็นเวลา 1 hr ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำปราศจากไอออน และแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 hr เสร็จแล้วจึงคว่ำผึ่งลมให้แห้งหรือนำไปอบจนแห้ง

3.2 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสังกะสี (ในรูป ZnO) ต่อหนอนแดงในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 สารเคมี

- ZnO, A.R. grade, Merck
- HNO_3, A.R. grade, Merck
- น้ำกรอง

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์

- อาหารเลี้ยงหนอนแดง (อาหารปลาบดละเอียด)
- เครื่องแก้ว ประกอบด้วย ขวดวัดปริมาตร, ไปเปต, กระบอกตวง, ขวดแก้ว
- ตู้อบ
- ไมโครไปเปต ขนาด 1000 µL
- เครื่องชั่ง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
- เครื่องให้อากาศ
- FAAS, Analyst 100, Perkin Elmer

3.2.3 ตัวอย่างหนอนแดง

เก็บหนอนแดงมาจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ นำมาเลี้ยงในตู้กระจกสี่เหลี่ยม (30×30×60 cm) ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปิดด้วยตาข่ายไนลอนเพื่อป้องกันตัวเต็มวัยบินออกนอกตู้ จากนั้นย้ายฝักไข่หนอนแดงลงตู้กระจกสี่เหลี่ยมใบใหม่ ซึ่งเติมน้ำกรองและเยื่อกระดาษปั่นเพื่อให้หนอนแดงใช้ในการสร้างปลอกหุ้มตัวในระยะตัวอ่อน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ให้แสงสว่าง 12 hr และมืด 12 hr ให้ออกซิเจนตลอดเวลา อาหารหนอนแดงให้วันเว้นวันจนกระทั่งหนอนแดงออกจากฝักไข่และพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัยสาม ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน จึงจะนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

ก่อนการทดสอบความเป็นพิษของสังกะสี ทำการแยกหนอนแดงที่จะใช้จากตู้กระจกใส่ในภาชนะที่สามารถมองเห็นหนอนแดงได้ชัดเจน เลือกหนอนแดงที่อยู่ในระยะวัยสาม ย้ายลงภาชนะใหม่ให้ปราศจากปลอกที่หุ้มอยู่เพื่อป้องการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสังกะสีเนื่องจากถูกดูดซับและงดให้อาหาร

3.2.4 วิธีการทดลอง

ใช้เครื่องแก้วที่ผ่านการล้างด้วย 10% HNO_3 ในการเตรียมสารละลายสังกะสีตั้งต้น (Zn stock solution) ความเข้มข้น 100 mg/L จาก ZnO โดยใช้น้ำกรองจากห้องปฏิบัติการพิษวิทยา (ค่า pH 6.68) หาค่า Range finding ของความเข้มข้นสังกะสีที่จะใช้ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น โดยเตรียมสารละลายสังกะสีความเข้มข้นในช่วงกว้าง คือ 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mg/L ใช้หนอนแดง 10 ตัวต่อ 1 ความเข้มข้น สังเกตการตายของหนอนแดงในแต่ละความเข้มข้น และเลือกความเข้มข้นที่หนอนแดงมีการตายอยู่ในช่วงเวลา 24-96 hr ซึ่งเป็นระยะเวลาสำหรับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน

จากช่วงความเข้มข้นที่ได้นำมาเลือกความเข้มข้นใหม่จากตาราง logarithmic scale (ดูภาคผนวก ฉ) เพื่อเตรียมเป็นสารละลายสังกะสี (Zn working solution) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษ โดยมีความเข้มข้นเป็น 5.6, 6.5, 7.5, 8.7, 10.0, 13.5 และ15.5 mg/L และใส่ Zn working solution แต่ละความเข้มข้นลงในขวดแก้วปริมาตร 50 mL ขวดละ 10 mL ทิ้งไว้ 24 hr แล้วเททิ้งเพื่อทำการ equilibrate จากนั้นใส่ Zn working solution 10 mL ที่เตรียมขึ้นใหม่ลงในภาชนะเดิมที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ รวมทั้งชุดควบคุม หนอนแดงทั้งหมดใช้ 80 ตัว โดยใส่ลงในขวดแก้วขวดละ 1 ตัว (10 ตัว/1 ความเข้มข้น) ทำการทดลองภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ (25±1^{o}C) และแสงสว่าง (12:12 hr สว่าง และมืด) เริ่มนับเวลาตั้งแต่ใส่หนอนแดง สังเกต และบันทึกจำนวนของหนอนแดงที่เกิดการตายที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 hr นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} และ LT_{50} และตรวจสอบความเข้มข้น Zn working solution ที่เตรียมก่อนทำการทดสอบความเป็นพิษ และหลังการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้ FAAS เพื่อนำค่าเฉลี่ยของสังกะสีที่วัดได้ไปใช้ในการคำนวณค่า LC_{50} และ LT_{50}

รูปที่ 3.2 ชุดการทดลองความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสังกะสี (ในรูป ZnO) ต่อหนอนแดง

3.3 การศึกษาความเป็นไปได้ในการลดปริมาณสังกะสีโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

3.3.1 สารเคมี

- Nutrient agar medium (NA)
- Nutrient broth medium (NB)
- 0.1% Peptone
- Zinc Standard Solution (1,000 mg/L), Spectral grade, BDH

3.3.2 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

- ขวดเก็บตัวอย่างกากตะกอน
- เครื่องแก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ประกอบด้วย ไปเปต, หลอดทดลองพร้อมฝาปิด, ขวดรูปชมพู่
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ
- เครื่องเขย่า, Infors AG CH-4103 Bottmingen, Theera Trading
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- ชุดเครื่องกรองจุลินทรีย์พร้อมกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ตู้บ่มเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ชุดกรอง Millipore filter (0.45 μm)
- FAAS รุ่น Analyst 100, Perkin Elmer
- Spectrophotometer รุ่น Spectronic® 20, Genesys™ Spectronic

3.3.3 วิธีการทดลอง

3.3.3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างกากตะกอน

เก็บตัวอย่างกากตะกอนจากบ่อรวมน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมน้ำยางธรรมชาติ จังหวัดปัตตานี 1 แห่ง โดยเก็บเฉพาะบริเวณที่ 1 ลึกลงไป 30 cm จากระดับผิวหน้ากากตะกอน และเก็บลงในขวดแก้วขนาด 500 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.3.3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างกากตะกอน

1. การแยก Pure culture ด้วยวิธี pour plate (ดัดแปลงจากนงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

เจือจางตัวอย่างกากตะกอนให้มีระดับความเจือจาง 1:10, $1:10^2$ จนถึง $1:10^6$ โดยการชั่งตัวอย่างกากตะกอน 1 g ใส่ในขวดรูปชมพู่และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 10 mL นำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นไปเปตน้ำตัวอย่างจำนวน 1 mL ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 9 mL เขย่าสารละลายผสมให้เข้ากัน ตัวอย่างน้ำในหลอดที่ 1 จะมีความเจือจางเป็น 1:10 ไปเปตน้ำจากหลอดที่ 1 จำนวน 1 mL ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 9 mL ในหลอดที่ 2 ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตัวอย่างน้ำในหลอดที่ 2 จะมีความเจือจางเป็น 1:100 ทำเช่นเดียวกันสำหรับหลอดที่ 3 – 6 ตามลำดับ จนมีความเจือจางเป็น $1:10^3$ จนถึง$1:10^6$ ตามลำดับ ไปเปต Bacterial specimen จากแต่ละหลอดที่มีความเจือจาง $1:10^3$–$1:10^6$ จำนวน 1 mL ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสังกะสี ซึ่งอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนจานอาหารเบาๆ ทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ รอให้วุ้นแข็งตัว แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่ 37°C หลังจากเพาะเชื้อไว้ 18-24 hr แบคทีเรียจะสร้างโคโลนี กระจายอยู่ทั้งบนผิวและในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงเป็น Pure culture ในอาหารวุ้นเอียงที่เติมสังกะสีเข้มข้น 10 และ 20 mg/L เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วันจากนั้นทำการแยกแบบ streak plate ต่อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. การแยก Pure culture ด้วยวิธี streak plate

นำ Pure culture ที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธี Pour plate มาเติม 0.1% Peptone ปริมาตร 5 mL ใช้ Loop เขี่ยเชื้อให้หลุดจากอาหารวุ้นเอียงเทจุลินทรีย์ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวที่เติมสังกะสี ปริมาตร 100 mL ปิดด้วยจุกสำลี นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที (200 rpm) เป็นเวลา 72-96 hr แยกเชื้อจากอาหารเหลวด้วยการใช้เข็มเขี่ยถ่ายเชื้อมาป้ายไว้ที่มุมหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการ Streak plate แบบ cross streak เพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากเพาะเชื้อประมาณ 18-24 hr นำจุลินทรีย์จากโคโลนีเดี่ยว ไปเพาะเลี้ยงเป็น Pure culture ลงในอาหารวุ้นเอียงที่เติมสังกะสีเข้มข้น 10 และ 20 mg/L เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน จน

เชื้อเจริญดี เชื้อที่ได้นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการลดสังกะสีด้วยจุลินทรีย์

3.3.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ และสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมสังกะสีไปย้อมสีแบบแกรม (รายละเอียดในภาคผนวก จ) บันทึกภาพและนำไปศึกษาอัตราการเจริญโตบโต

3.3.3.5 ศึกษาอัตราการเจริญโตบโตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาถ่ายกล้าเชื้อ 5% ลงในอาหารสูตร NB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างมาวัดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ Spectrophotometer ทุก 4 hr โดยวัดค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm นำค่าที่วัดได้มาพลอตกราฟเพื่อดูเวลาที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

3.3.3.6 ทดสอบการลดปริมาณสังกะสีโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ (ดัดแปลงจากจิติพร, 2547)

เตรียมอาหารสูตร NB ปริมาตร 100 mL ซึ่งเติมสารละลายสังกะสีให้มีความเข้มข้นเป็น 10 mg/L, 20 mg/L และขวดควบคุมซึ่งไม่เติมสังกะสี ทำการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (Starter) โดยเท 0.1% Peptone 5 mL ลงในอาหารวุ้นเอียงที่มีเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกไว้ จากนั้นใช้ Loop เขี่ยเชื้อให้หลุดจากอาหารวุ้นเอียง เทจุลินทรีย์ลงในขวดอาหารสูตร NB ที่เตรียมไว้ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ให้จุลินทรีย์กระจายในอาหารทั่วกัน จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ 5% ลงในขวดที่มีอาหารสูตร NB ปริมาตร 250 mL โดยหนึ่งกล้าเชื้อทำ 6 ซ้ำ แบ่งเป็นอาหารสูตร NB ที่เติมสังกะสีเข้มข้น 10 mg/L จำนวน 2 ซ้ำ 20 mg/L จำนวน 2 ซ้ำ และอาหารสูตร NB ที่ไม่มีการเติมสังกะสีอีก 2 ซ้ำ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 hr เป็นเวลา 96 hr โดยไปเปตตัวอย่างปริมาตร 15 mL ของอาหารสูตร NB ทุกขวดมาวัดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ Spectrophotometer และเซ็นตริฟิวซ์เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนใส ส่วนใสที่ได้นำไปกรองด้วย Millipore filter (0.45 μm) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของสังกะสีที่เหลืออยู่โดยใช้ FAAS

3.4 การทดสอบความเป็นพิษของสังกะสีจากกากตะกอนต่อหนอนแดงก่อนและหลังการลดปริมาณสังกะสีโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ทำการเตรียมสารละลายสังกะสีจากกากตะกอนก่อนการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยนำกากตะกอนมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 ^{0}C ชั่งกากตะกอนที่อบแห้ง 5 g เติมน้ำกลั่น 50 mL ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 hr กรองเพื่อแยกกากตะกอนออกและเก็บน้ำที่ได้สำหรับใช้เป็น Zn stock solution ของการทดสอบความเป็นพิษก่อนการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยส่วนหนึ่งนำไปย่อยด้วยกรดไนตริก และวิเคราะห์ปริมาณของสังกะสีที่ปล่อยออกมาจากกากตะกอนโดย FAAS

การเตรียมสารละลายสังกะสีจากกากตะกอนหลังการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยนำสารละลายสังกะสีจากกากตะกอนก่อนการลดด้วยจุลินทรีย์ มาเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ และนำไปเขย่าเป็นเวลา 72 hr จากนั้นกรองแบบ Millipore filter เพื่อแยกเชื้อออกและเก็บน้ำที่ได้สำหรับใช้เป็น Zn stock solution ของการทดสอบความเป็นพิษหลังการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยส่วนหนึ่งนำไปย่อยด้วยกรดไนตริกและวิเคราะห์ปริมาณของสังกะสีที่เหลืออยู่โดย FAAS

การเตรียมสารละลายสังกะสี (Zn working solution) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษก่อนและหลังการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยเจือจาง Zn stock solution ของกากตะกอนก่อน และหลังการลดด้วยจุลินทรีย์ให้ได้ความเข้มข้น 5.6, 6.5, 7.5, 8.7, 10.0, 13.5 และ 15.5 mg/L (pH 7.15) ตามระบบ logarithmic scale ใส่ Zn working solution แต่ละความเข้มข้นลงในขวดแก้วปริมาตร 50 mL ขวดละ 10 mL ทิ้งไว้ 24 hr แล้วเททิ้งเพื่อทำการ equilibrate จากนั้นใส่ Zn working solution 10 mL ที่เตรียมขึ้นใหม่ลงในภาชนะเดิมที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ รวมทั้งชุดควบคุม

ใช้หนอนแดง 80 ตัว สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสังกะสีจากกากตะกอนก่อนการลดด้วยจุลินทรีย์ และอีก 80 ตัว สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสังกะสีจากกากตะกอนหลังการลดด้วยจุลินทรีย์ โดยใส่หนอนแดงลงในขวดแก้ว ขวดละ 1 ตัว (10 ตัว / 1 ความเข้มข้น) ทำการทดลองภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ (25±1^{o}C) และแสงสว่าง (12:12 hr สว่าง และมืด) เริ่มนับเวลาตั้งแต่ใส่หนอนแดง สังเกต และบันทึกจำนวนของหนอนแดงที่เกิดการตายที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 hr นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LT_{50} และตรวจสอบความเข้มข้นของ Zn working solution ที่เตรียมก่อนและหลังการทดสอบความเป็นพิษ โดยใช้ FAAS เพื่อนำค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วัดได้ไปใช้ในการคำนวณค่า LC_{50} และ LT_{50}

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- วิเคราะห์หาค่า LC_{50} และ LT_{50} โดยโปรแกรม Probit Analysis (Litchfield and Wilcoxon, 1949)
- วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยโปรแกรม Probit Analysis (Litchfield and Wilcoxon, 1949)
- เขียนกราฟ Toxicity curve โดย โปรแกรม OriginPro 7.0

รูปที่ 3.3 ชุดทดลองความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสังกะสีจากกากตะกอนก่อนและหลังการลดสังกะสีด้วยจุลินทรีย์ไอโซเลต C