บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งแยกโดยอมรรัตน์ ตั้งประสิทธิภาพ (2543) ได้แก่ SS3 และ SS4 แยกจากน้ำทะเล จังหวัดสงขลา, ES16 แยกจากน้ำทะเล (พัทยา) จังหวัดชลบุรี, SH5 แยกจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และ FS3 แยกจากน้ำทิ้งโรงงานปิติซีฟู้ด จังหวัดสงขลา เก็บรักษาเชื้อบน G5 agar มีเกลือ 3% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

G5 medium + NaCl 3% ประกอบด้วย L-glutamic acid 4.0 กรัมต่อลิตร, L-malic acid 3.5 กรัมต่อลิตร, peptone 5.0 กรัมต่อลิตร, yeast extract 5.0 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.12 กรัมต่อลิตร และK_2HPO_4 0.18 กรัมต่อลิตร , NaCl 30 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.0 โดยใช้ 5N NaOH กรณีเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

3. วัตถุดิบ

- น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล (น้ำนึ่งปลาทูน่า) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานสงขลาแคนนิ่งจำกัด ก่อนนำไปใช้นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดตะกอนขนาดใหญ่ กำจัดไขมันโดยนำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 70^0C จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4^0C เป็นระยะเวลา 1 คืน ไขมันจะแยกเป็นชั้นที่ผิวหน้าของตัวอย่าง ทำการตักแยกไขมันออก จากนั้นนำน้ำเสียไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20^0C
- น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปน้ำยางข้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก โรงงานเซาท์แลนด์รับเบอร์จำกัด ก่อนนำไปใช้นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดตะกอนขนาดใหญ่ออกไป จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20^0C

- น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณวาริท หมัดหมาน บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (อายุ 3 เดือน) จังหวัดพัทลุง ก่อนนำไปใช้นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดตะกอนขนาดใหญ่ออกไป จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20^{0}C

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง,ของแข็งทั้งหมด,ซีโอดี, ปริมาณ TKN โดยวิธี Kjedahl method ใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์

อุปกรณ์

- อ่างแก้วขนาด 25x50x20 เซนติเมตร
- เครื่องวัดแสง (Digicon รุ่น LX-50)
- เครื่องเขย่า (Lab-Line รุ่น M 3525-1)
- เครื่องปั๊ม Aquarium Air Pump 2800
- เครื่องวัดพีเอช (Schott รุ่น CG 825)
- เครื่องเขย่าหลอด (Vortex Genie 2)
- เครื่องมือสำหรับกลั่นโปรตีน รุ่น 2200 Kjeltec Auto ของบริษัท Foss Tecator
- ตัวพยุงชนิดต่างๆ ได้แก่ ถ่านหัก, แผ่นใยขัด (สก๊อตไบร์ท), ฟองน้ำ
- เครื่อง spectrophotometer (Jasco รุ่น V-530)
- เครื่อง centrifuge (Eppendorf รุ่น 5403)
- ตู้อบ (hot air oven) (Memmert รุ่น U-200)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Revco รุ่น BOD30)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน (autoclave) (Tomy รุ่น SS 325)

วิธีการวิเคราะห์

1.น้ำหนักเซลล์แห้ง เหวี่ยงแยกเซลล์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ใส่จานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อบจนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ (Noparatnaraporn *et al.,* 1986)

2. ค่าซีโอดี นำตัวอย่าง 20 มิลลิลิตรหรือส่วนของตัวอย่างเจือจางให้ได้ 20 มิลลิลิตร เติมเมอคิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม โพแทสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์มอล) 10 มิลลิลิตร เม็ดแก้ว 3-5 เม็ด และค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริก 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกลั่นด้วยอุปกรณ์ไหลกลับ

ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 นอร์มอล) ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ (APHA, AWWA, and WPCF, 1998)

การคำนวณ ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร) = $\frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1,000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

3.ของแข็งทั้งหมด นำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตรหรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยให้แห้งในอ่างน้ำ อบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนมีน้ำหนักคงที่ (APHA, AWWA, and WPCF, 1998)

4. ปริมาณ TKN (วิธี Kjeldahl method) นำตัวอย่าง 5-10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดย่อย เติมสารเร่งการย่อย 1-2 กรัม, กรดซัลฟิวริก 5-10 มิลลิลิตร จากนั้นย่อยที่อุณหภูมิเริ่มต้นประมาณ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น นำไปกลั่นตัวอย่าง ในเครื่องกลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร ไตเตรทกับ 0.02-0.1 นอร์มอล HCl หรือ H_2SO_4 หักค่า blank ออกเพื่อนำไปคำนวณ (A.O.A.C, 1990)

การคำนวณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) = $\frac{(A-B) \times N \times 14}{W}$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

(กรณีคิดปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) คูณด้วย 6.25)

5. **ประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์** หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ใส่จานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อบจนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ นำตัวพยุงหลังผ่านการตรึงเซลล์มาผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น 2-5 ครั้ง จากนั้นนำตัวพยุงใส่จานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและมีน้ำหนักคงที่นำมาหักลบกับน้ำหนักตัวพยุงก่อนเริ่มทำการทดลอง จากนั้นนำค่าที่ได้มาเทียบเป็นร้อยละในการตรึงกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ข้างต้น (ดัดแปลงจาก Noparatnaraporn *et al.,* 1986)

6. **ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย** เปรียบเทียบค่าร้อยละการลดลงของซีโอดี (ดัดแปลงจาก APHA, AWWA, and WPCF, 1998), ร้อยละการลดลงของไนโตรเจนทั้งหมด (ดัดแปลงจาก A.O.A.C, 1990)

วิธีการวิจัย

1. การคัดเลือกสภาวะในการเลี้ยงและสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เหมาะสมกับน้ำเสียแต่ละแหล่ง

1.1 องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำเสีย 3 แหล่ง

นำตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล, โรงงานแปรรูปน้ำยางข้น และบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ บำบัดขั้นต้นโดยการกรองเพื่อกำจัดอนุภาคขนาดใหญ่ที่แยกได้ และวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสียดังนี้ พีเอช, ค่าซีโอดี, ปริมาณ TKN และปริมาณของแข็งทั้งหมด

1.2 การคัดเลือกสภาวะและสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสีย

1.2.1การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SS3, SS4, SH5, FS3 และ ES16 แต่ละสายพันธุ์จากอาหารวุ้นเอียง G5 ปริมาณ 1 ลูปลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ G5 medium+3% NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) และมีอากาศ-ไร้แสง (บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเหลวให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

1.2.2 การคัดเลือก

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ SS3, SS4, SH5, FS3 และ ES16 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากันหมดปริมาณ 10% (v/v) ถ่ายเชื้อเริ่มต้นลงในตัวอย่างน้ำเสียทั้ง 3 แหล่ง

ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง (บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที) และไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) พีเอช 7 ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3^{0}C) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ120 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าพีเอชและน้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งวิเคราะห์หาค่าซีโอดีทุก 12 ชั่วโมง และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในชั่วโมงที่ 120 คำนวณหาร้อยละการลดลงของค่าซีโอดี, ร้อยละการลดลงของไนโตรเจนทั้งหมดและคำนวณอัตราการเจริญของเชื้อเพื่อคัดเลือกสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการบำบัดน้ำเสียในแต่ละแหล่งน้ำเสีย

2. การคัดเลือกตัวพยุงที่เหมาะสม

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการบำบัดน้ำเสียในแต่ละแหล่งมาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดตามที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ1) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ดังกล่าวในน้ำนึ่งทูน่า, น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปน้ำยางข้น และน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีตัวพยุงบรรจุอยู่ ได้แก่ ถ่านหัก (ทำการบดและกรองผ่านตะแกรงให้มีปริมาตรเท่ากับ 6.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร), แผ่นใยขัด (ขนาด 0.5X0.5X0.5 เซนติเมตร) จำนวน 50 ชิ้น และฟองน้ำ (ขนาด 0.5X0.5X0.5 เซนติเมตร) จำนวน 50 ชิ้น เติมน้ำเสียปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 และถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10%(v/v) ลงใน ฟลาสก์ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3^{0}C) โดยทำการทดลองกับตัวพยุงทีละชนิด และมีชุดทดลองอีกชุดหนึ่งที่ไม่เติมตัวพยุงในน้ำเสีย เพื่อเป็นชุดควบคุม (control) ทดลองเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงนำมาหาค่าพีเอช, คำนวณหาซีโอดี, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ประสิทธิภาพในการตรึง และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในชั่วโมงที่ 120 คัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่ให้ประสิทธิภาพในการตรึงดีที่สุดและเปรียบเทียบกับการบำบัดน้ำเสียของแต่ละชุดทดลองเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียและประสิทธิภาพในการตรึง

3. การบำบัดน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ตรึงรูปและตรึงรูปในระบบเปิด

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ตรึงรูปและตรึงรูปที่คัดเลือกไว้ ในน้ำนึ่งปลาทูน่า, น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปน้ำยางข้น และ น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยใช้ปริมาตรน้ำเสีย 5 ลิตร โดยไม่ต้องทำให้ปราศจากเชื้อ ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 และถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10% (v/v) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอ่างแก้ว (ขนาด 25x50x20 เซนติเมตร) ให้อากาศ 0.37 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) (ผลจากการทดลองเบื้องต้น) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3

องศาเซลเซียส) โดยใช้แผ่นใยขัด (ขนาด 0.5X0.5X0.5 เซนติเมตร) จำนวน 2,500 ชิ้น เป็นตัวพยุง จัดแบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่เติมตัวพยุงและชุดที่ไม่เติมตัวพยุงเพื่อเป็นชุดควบคุม (control) ทำการทดลองภายใต้สภาวะไร้แสง (ทดลองภายในห้องมืด) ในน้ำเสียแต่ละแหล่งน้ำเสีย ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดหาค่า COD, พีเอช, และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำเสียหลังการบำบัด ในชั่วโมงที่ 120 ทำการทดลองเป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำเสียชุดใหม่เข้ามาแทนที่ชุดเดิมโดยเหลือน้ำเสียเดิมไว้ 10% เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น แล้วทดลองต่อไปอีกเป็นเวลา 120 ชั่วโมง รวมทั้งสิ้นเป็นเวลาทั้งหมด 240 ชั่วโมงตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำเสียทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดหาองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียหลังการบำบัด ค่า COD, พีเอช, และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในชั่วโมงที่ 240 ชั่วโมง หาค่าร้อยละการลดลงของซีโอดี, ร้อยละการลดลงของไนโตรเจนทั้งหมด ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียระหว่างชุดทดลองที่เติมตัวพยุงและไม่เติมตัวพยุง