10. วิธีการทดลอง

10.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสีย

10.1.1 ตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อ

โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากโรงงานแปรรูปน้ำยางพารา ทั้งจากบ่อที่ให้อากาศและจากบ่อที่ไม่เติมอากาศ ในบ่อที่ไม่เติมให้เลือกน้ำเสียส่วนที่มีลักษณะเป็นสีแดง ซึ่งอาจเป็นการมีเชื้ออยู่มาก (bloom) ของเชื้อกลุ่ม purple non-sulfur bacteria (*Rhodospirillaceae*) โดยเก็บตัวอย่างใส่ขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique)

10.1.2 การแยกเชื้อจากน้ำเสีย

ถ่ายตัวอย่าง 1 loopful ในกรณีที่น้ำตัวอย่างมีสีชมพูหรือแดงที่แสดงถึงการมีเชื้อกลุ่มเป้าหมายอยู่มาก หรือ 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร G-5 broth ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 150x15 มิลลิเมตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดทับด้วย liquid paraffin ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หนาประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อให้เป็นสภาพไร้อากาศ ส่องด้วยไฟ 100 วัตต์ (หลอดทังสเตน) โดยวางห่างประมาณครึ่งฟุตความเข้มแสงประมาณ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิจะอยู่ระหว่าง 30 – 35 องศาเซลเซียส ขึ้นกับอุณหภูมิห้อง บ่มเป็นเวลา 5 – 10 วัน จะเห็น culture มีลักษณะสีชมพูแดงถึงน้ำตาลและสีเขียว แต่เลือกนำมาเฉพาะกลุ่มที่มีสี ชมพู ส้ม แดง และน้ำตาล เพราะเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เป็นกลุ่มเป้าหมายในการทดลอง (purple non-sulfur bacteria)

10.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีขีดเป็นเส้นฟันปลา (streak) บนอาหารแข็ง G-5 medium แล้วนำไปบ่มไว้ในanaerobic jar ส่องด้วยไฟ 100 วัตต์ เป็นเวลา 5 วันขึ้นไป อาจต้องทำการ re-streak 2 – 3 ครั้ง จึงจะได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) เมื่อเห็นโคโลนีเดี่ยวให้เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีแดง ส้ม ชมพู หรือสีน้ำตาลเก็บ stock culture ใน G-5 medium โดยวิธี stab แล้วบ่มในสภาพ มีแสง-ไร้อากาศ เมื่อเห็นเชื้อเจริญประมาณ 24 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ไม่เกิน 48 ชั่วโมง เขี่ยมาย้อมสีแกรมดูเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ จะได้เชื้อที่ติดสีแกรมลบ จดลักษณะทางสัณฐานวิทยาเอาไว้และเก็บเชื้อไว้ในอาหาร G-5 ที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียสเพื่อไว้ทำการศึกษาต่อไป ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 1 เดือน

10.3 การเตรียมกล้าเชื้อและน้ำเสีย

10.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ เตรียมโดยนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากการทดลองมาเลี้ยงในอาหาร G-5 broth ที่บรรจุอยู่จนเกือบเต็มในหลอดฝาเกลียวขนาด 150x20 มิลลิลิตร (เพื่อให้อยู่ในสภาวะมีอากาศน้อย) แล้วนำเชื้อไปบ่มโดยส่องด้วยหลอดไฟทังสเตน 100 วัตต์ ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง (เชื้อเจริญทำให้อาหารมีสีเช่นส้มแดงตามชนิดของเชื้อ) เตรียมกล้าเชื้อโดยนำเชื้อที่เตรียมได้มาวัดค่า OD ที่ 660 nm ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อเป็น blank ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ 0.5 โดยใช้น้ำกลั่น เพื่อให้มีความเท่าเทียบกันของปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

10.3.2 การเตรียมน้ำเสียสำหรับวิเคราะห์คุณภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสง การเตรียมน้ำเสียนั้นแบ่งเป็น 2 ชุด คือ

10.3.2.1 น้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมโดยนำน้ำเสียที่เก็บมาเพื่อวิเคราะห์มาหมุนเหวี่ยงที่ 6000 rpm นาน 15 นาทีบรรจุในภาชนะที่ต้องการศึกษา นำไปใช้ในการทดสอบคุณภาพเชื้อต่อไป

10.3.2.2 น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 10.3.2.1 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. 4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้

10.4.1 การคัดเลือกขั้นต้นเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียปราศจากเชื้อของทั้ง 2 แหล่ง โดยใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 10.3.1 ในปริมาณ 10% ของปริมาณน้ำเสียที่ใช้ทดสอบในหลอดแก้ว เลี้ยงภายใต้สภาวะ Microaerobic-light เป็นเวลา 96 ชม นำไปวัดการเจริญที่ OD 660 nm โดยเกณฑ์การคัดเลือกคือมีการเจริญมากกว่า 0.5

10.4.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียของทั้ง 2 แหล่งภายใต้สภาวะเดิมเป็นเวลา 72 ชม แต่ทดลอง 4 รูปแบบคือ

ก. น้ำเสียปราศจากเชื้อ เป็นการเลี้ยงในสภาพเชื้อบริสุทธิ์

ข. เหมือน ก. แต่เติม Yeast extract 0.1% (w/v)

ค. น้ำเสียดิบมีเชื้อตามธรรมชาติรวมอยู่ด้วย

ง. เหมือน ค. แต่เติม Yeast extract 0.1% (w/v)

10.5 การเทียบเคียงเชื้อในกลุ่ม purple non-sulfur bacteria ในระดับสกุลของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ใช้เชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมงนำมาทดสอบในอาหารเหลว sulfide medium บ่มในสภาพไร้อากาศมีแสง ถ้าเชื้อไม่สามารถเจริญในอาหารชนิดนี้ หมายความว่า ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ (S^-) เป็น photosynthetic electron donor จัดว่าเป็น purple non-sulfur bacteria ในการเทียบเคียงให้เทียบเคียงเชื้อตามคู่มือ Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology volume ที่ 3 เนื่องจากเชื้อที่เทียบเคียงไม่สามารถใช้ซัลไฟด์ (S^-) ได้ และมีรูปร่างเป็น แท่งสั้น ติดสีแกรมลบ จากนั้นศึกษาลักษณะดังนี้คือ

- การใช้ Thiosulfate เป็น photosynthetic electron donor

- การใช้ Nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ที่ 0.134 0.15 และ 0.20% อิงเกณฑ์สูตรอาหารที่ใช้

- การใช้ Ammonium เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ที่ 0.134 0.15 และ 0.20% อิงเกณฑ์สูตรอาหารที่ใช้

- ความต้องการวิตามินในการเจริญ (Biotin, Nicotinic acid, P-aminobenzoic acid และ Thiamine hydrochloride)

ทดสอบภายใต้ Anaerobic light และส่วนประกอบของอาหารอยู่ในภาคผนวก

10.6 การปรับสภาวะของน้ำเสียเพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้

10.6.1 การหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในแต่ละแหล่ง (ศึกษาทั้ง 2 แหล่ง) ซึ่งวิธีการเตรียมน้ำเสียและกล้าเชื้อเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว และเลี้ยงในสภาวะ Microaerobic-light และสำหรับในการทดลองนี้และครั้งต่อๆไปใช้หลอดไฟ 60 วัตต์แทน 100 วัตต์ ทำให้ค่าความเข้มของแสงเท่ากับ 3000 ลักซ์ และอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 30-32 องศาเซลเซียส (ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสภาวะดังกล่าวเชื้อเจริญได้ดีที่สุดและ

เป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาพในบ่อบำบัดน้ำเสีย จึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวในการศึกษา) ในการทดลองนี้ได้เติม $NaNO_3$ หรือ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.10 0.134 และ 0.50% โดยชุดควบคุมไม่มีการเติม จากนั้นได้ทดลองต่อเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ $NaNO_3$ ในน้ำเสียจากหูแร่ และ $(NH_4)_2SO_4$ในน้ำเสียจากยางงาม โดยเติมความเข้มข้นที่ 0 0.50 0.75 และ 1.00%

10.6.2 การหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งวิตามิน ผลจากความต้องการของเชื้อในการใช้วิตามินจากข้อ 10.5 ในอาหารสังเคราะห์นำมาวางแผนการทดลองในข้อนี้ และสำหรับวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 10.6.1 โดยในการทดลองได้เติมวิตามินความเข้มข้นตามที่ระบุในภาคผนวก และทดลองดังนี้

- น้ำเสียปราศจากเชื้อเท่านั้นไม่เติมวิตามิน
- เติมทั้ง 4 ชนิด
- เติม 3 ชนิด โดยไม่เติม Biotin
- เติม 3 ชนิด โดยไม่เติม Nicotinic acid
- เติม 3 ชนิด โดยไม่เติม P-aminobenzoic acid
- เติม 3 ชนิด โดยไม่เติม Thiamine hydrochloride

จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของ Biotin สำหรับน้ำเสียจากหูแร่ โดยผันแปรความเข้มข้นดังนี้ 0 0.01 0.015 และ 0.02 mg/L และ น้ำเสียจากยางงาม ผันแปรความเข้มข้นของ Nicotinic acid ดังนี้ 0 1.0 1.5 และ 2.0 mg/L

10.7 การเจริญและการบำบัดน้ำเสียของเชื้อที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียที่ปรับสภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในหลอดแก้วขนาด 150 x 20 มม. ของน้ำเสียจากแต่ละแหล่งที่มีการปรับสภาพโดยการเติมแหล่งไนโตรเจน และวิตามินที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 10.6 ภายใต้สภาพ Microaerobic-light ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ (ความเข้มแสงที่เหมาะสมจากการทดลองเบื้องต้นข้อมูลไม่ได้นำเสนอ) และอุณหภูมิ 30 องศาตลอดการทดลองโดยการควบคุมอุณหภูมิใช้วิธีการวางหลอดแก้วทดลองในอ่างน้ำพลาสติกที่มีน้ำหมุนเวียนในระดับอ่อนๆอยู่ตลอดเวลา ที่เลือกใช้สภาพการทดลองดังกล่าวเพราะว่าใกล้เคียงกับสภาพในบ่อบำบัด (ข้อมูลการติดตามส่วนนี้ไม่ได้นำเสนอ) และมีรูปแบบการทดลองดังนี้

- น้ำเสียที่ปรับสภาพปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุม
- น้ำเสียที่ปรับสภาพปราศจากเชื้อเติมเชื้อที่คัดเลือกได้ (เชื้อบริสุทธ์)
- น้ำเสียที่ปรับสภาพ (เชื้อตามธรรมชาติ)
- น้ำเสียที่ปรับสภาพ เติมเชื้อที่คัดเลือกได้ (เชื้อผสม)

ติดตามการเจริญโดยวัดค่า OD 660 nm โดยใช้ Spectrophotometer และวัดค่าพีเอชโดยใช้ pH meter และสำหรับที่ 96 ชม ซึ่งสิ้นสุดการเลี้ยงวิเคราะห์ค่า BOD และ COD โดยนำไปแยกเซลล์แบคทีเรียออกโดยปั่นที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำส่วนที่เป็นน้ำ

ไปวิเคราะห์ BOD โดยใช้วิธี Azide modification method และ COD โดยใช้วิธี Dichromate reflux method ตาม APHA, AWWA and WPCF, (1998)[8] ส่วนของเซลล์นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ตามวิธีของ AOAC (AOAC, 1990)

ในการทดลองแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ แล้วนำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ย