บทที่ 3
วิธีการดำเนินการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยทดลอง (Experimental Research) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยใช้พืชบัวหลวงและกกราชินี โดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยดังต่อไปนี้

3.1 สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

บริเวณทำการทดลองในแปลงทดลอง Remediation Laboratory ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ

3.2 ระยะเวลาทำการศึกษาวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 12 เดือน ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ 2553 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2554

3.3 วัสดุในการทดลอง และการเตรียมพืชทดลอง

3.3.1 พืชทดลอง

1 บัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth **)**

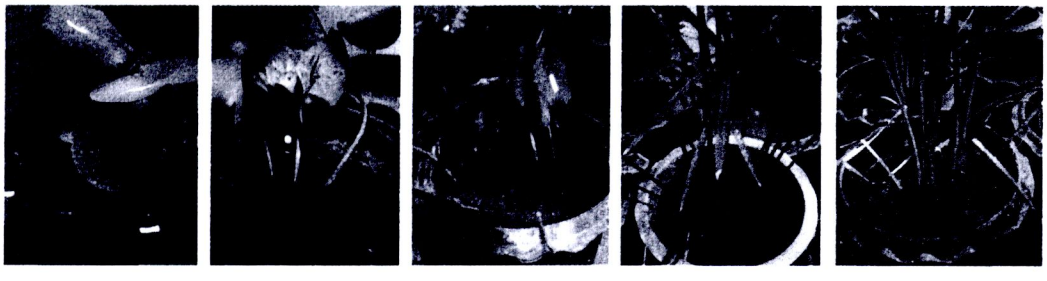
2 บัวสี *(Nymphaea* sp *)*

3 บัวสาย *(Nymphaea pubescens* Willd)

4 กกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.)

5 ธูปฤาษี (*Typha angustifolla* L.)

โดยนำพืชที่มีอายุ 3 เดือนที่ปลูกในกระถางจากการเพาะชำ มาจากสวนบัวศรีไพร อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี



บัวหลวง บัวสี บัวสาย กกราชินี ธูปฤาษี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3.2 การเตรียมพืชทดลอง

การเตรียมพืชในการทดลองมีดังนี้

1. นำพืชน้ำอายุ 3 เดือนมาเลี้ยงในกระถางทดลองขนาดความจุ 5 ลิตร ทำการปรับสภาพพืชและทิ้งไว้ในแปลงทดลอง 1 อาทิตย์

2. ย้ายพืชน้ำออกจากกระถาง และล้างเอาดินที่ติดมาจากต้นพืชและรากออกด้วยน้ำประปา ชั่งน้ำหนักพืชสด 400 กรัม และดินเหนียว 500 กรัม ทำการปรับสภาพพืชก่อนทดลองอีก 1 อาทิตย์ในกระถางทดลองความจุ 5 ลิตร

3.3.3 ดิน

ดินที่ใช้ในการทดลอง เป็นดินเหนียวที่ใช้สำหรับการปลูกบัว นำมาจากสวนบัวศรีไพร อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี

รูปที่ 3.1 ดินเหนียว

3.3.4 น้ำเสียชุมชน

น้ำเสียชุมชนที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียชุมชนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการบำบัดมาก่อน ซึ่งนำมาจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งครุ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร ที่ใช้วิธีการบำบัดน้ำเสียแบบกระบวนแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ (Activated sludge) ร่วมกับการใช้สารเคมี ($FeCl_3$) ในการตกตะกอนของสารอนินทรียฟอสฟอรัส การเก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในข้อ 3.4 นั้นใช้วิธีแบบจั้วงตัก (Grab or Catch Sample) ในการศึกษาได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียในวันที่ 1 กุมภาพันธ์, 10 พฤษภาคม, 15 และ26 กรกฎาคม, 16 สิงหาคม, 6 กันยายน, 11 และ 25 ตุลาคม และ 15 พฤศจิกายน 2553

3.4 การทดลอง

การบำบัดฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำเสียชุมชนโดยใช้พืชได้ทำการศึกษา 1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียชุมชนเขตทุ่งครุ 2. การศึกษาดูดใช้ฟอสฟอรัสของพืชน้ำ 5 ชนิดคือ บัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth) บัวสี *(Nymphaea* sp*)* บัวสาย *(Nymphaea pubescens* Willd) กกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.) ธูปฤาษี (*Typha angustifolla* L.) พืชที่มีความสามารถในการบำบัดฟอสฟอรัสได้สูงที่สุดจะถูกนำมาศึกษาในกระถางทดลองขนาดใหญ่ (pilot scale wetland) ขนาดความจุ 50 ลิตร ศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยวิธีการใช้พืช (Phytoremediation process) และระบบการบำบัดน้ำเสียร่วมกับการใช้สารเคมี(Activated sludge + Chemical process) ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งครุ และศึกษาการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้บำบัดน้ำเสียชุมชน 3. ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างพืช ดิน และจุลินทรีย์ในระบบการทดลอง และศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในที่ใช้ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งอาหารในน้ำเสียชุมชน ดิน รากบัวหลวง และรากกกราชินี โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) และ DNA Amplification

3.4.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และเคมีของน้ำเสียชุมชนเขตทุ่งครุ

น้ำเสียที่เก็บตัวอย่างมาดังรายละเอียดในข้อ 3.3.4 นำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีดังนี้คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl Method ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมด โดยวิธี Ascorbic acid method ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (TDS) โดยใช้เครื่อง DAIKAWA 1 Stage Vacuum Pump model vp-50 L และค่าความสกปรกของน้ำเสียในรูป ค่าซีโอดี (chemical Oxygen Demand) โดยชุดวิเคราะห์ซีโอดี (HACH DRB 200, Spectrophotometer model DR/2500) ค่าบีโอดี (Biochemical oxygen demand) และความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH Meter Mettler Toledo model 744 (AWWA, 1998)

3.4.2 การศึกษาความสามารถในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยพืชน้ำ

3.4.2.1 การเปรียบเทียบความสามารถในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยพืชน้ำ

การศึกษาความสามารถในการดูดใช้ฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนเลือกใช้พืชน้ำ 5 ชนิด คือบัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth) บัวสี *(Nymphaea* sp*)* บัวสาย *(Nymphaea pubescens* Willd) กกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.) และธูปฤาษี (*Typha angustifolla* L.) เนื่องจากพืชน้ำทั้ง 5 ชนิดนี้สามารถ

เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำชุมชนจึงนำมาทำการทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำเสียชุมชน

(ก) การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 7 กระถางทดลอง และแต่ละกระถางทดลองมี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยการทดลองดังต่อไปนี้

กระถางทดลองที่ 1 น้ำเสียชุมชน (control)

กระถางทดลองที่ 2 น้ำเสียชุมชน + ดิน (control)

กระถางทดลองที่ 3 น้ำเสียชุมชน + ดิน + บัวหลวง

กระถางทดลองที่ 4 น้ำเสียชุมชน + ดิน + บัวสี

กระถางทดลองที่ 5 น้ำเสียชุมชน + ดิน + บัวสาย

กระถางทดลองที่ 6 น้ำเสียชุมชน + ดิน + กกราชินี

กระถางทดลองที่ 7 น้ำเสียชุมชน + ดิน + ธูปฤาษี

(ข) วิธีการทดลอง

เริ่มจากการนำพืชน้ำอายุ 3 เดือน ทำการปรับสภาพพืช 1 อาทิตย์ หลังจากนั้นทำการย้ายพืชน้ำพร้อมดินลงกระถางทดลองความจุ 5 ลิตร อัตราส่วนของน้ำหนักพืชสด 400 กรัม ดิน 500 กรัม และน้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร ใส่กระถางทดลองขนาดความจุ 5 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำวันเริ่มต้น และหลังจากนั้นทุก 3 วันมาเพื่อทำการวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่ากรด-เบส พืชที่มีความสามารถในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนได้สูงที่สุดจะถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาในข้อ 3.4.2.2 ต่อไป

3.4.2.2 การศึกษาความสามารถในการบำบัดฟอสฟอรัสของบัวหลวง และกกราชินี

พืชที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้คือ บัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth) และกกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.) เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดมีความสามารถในการบำบัดสารประกอบฟอสฟอรัสในน้ำเสียได้ดีดังตารางผลการทดลองที่ 4.4.2

(ก) แผนการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดสารประกอบฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยใช้บัวหลวงและกกราชินี ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 4 กระถางทดลอง และแต่ละกระถางทดลองมี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยกระถางทดลองดังต่อไปนี้

กระถางทดลองที่ 1 น้ำเสียชุมชน (control)

กระถางทดลองที่ 2 น้ำเสียชุมชน + ดิน (control)

กระถางทดลองที่ 3 น้ำเสียชุมชน + ดิน + บัวหลวง

กระถางทดลองที่ 4 น้ำเสียชุมชน + ดิน + กกราชินี

(ข) วิธีการทดลอง

นำพืชบัวหลวงและกกราชินี อายุ 3 เดือน น้ำหนักพืชสด 4,000 กรัม ดิน 5,000 กรัม และน้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร มาทำการปรับสภาพพืชเป็นเวลา 1 อาทิตย์ ในกระถางทดลองขนาดความจุ 5 ลิตร จากนั้นย้ายพืชและดินลงในกระถางทดลองขนาดความจุ 50 ลิตร เพื่อปรับสภาพพืชก่อนทดลองอีก 1 อาทิตย์ เมื่อเริ่มทำการทดลอง เติมน้ำเสียชุมชนปริมาตร 40 ลิตร ลงไปในกระถางทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในวันแรกและหลังจากนั้นทุก 3 วันเพื่อนำมาวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟตทั้งหมด (AWWA, 1998) วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสียชุมชนก่อนและหลังการบำบัดได้แก่ ค่าฟอสเฟตทั้งหมด(TP) ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl Method ซีโอดี (chemical Oxygen Demand) บีโอดี (Biochemical oxygen demand) และค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติน้ำเสียของ AWWA, 1998 (ตารางที่ 3.1) ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายของฟอสฟอรัส ประยุกต์ตามวิธีของ Nilratnisakorn S. (2009) และเปรียบเทียบผลของกระบวนการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยวิธีการใช้พืช (Phytoremediation process) กับระบบการบำบัดน้ำเสียที่ใช้ในปัจจุบัน (Activated sludge + Chemical process) ของโรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งครุ นอกจากนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างของพืชทั้ง

สองชนิดคือ บัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth) และกกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.) ในกระถางทดลองและกระถางควบคุมที่ปลูกในน้ำเสียชุมชนเป็นระยะเวลา 75 วัน มาวัดการสะสมของคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ในต้นพืชและการเจริญเติบโตของพืช โดยการชั่งน้ำหนักสดของพืชทั้งสองชนิด

3.4.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างพืช ดิน และกลุ่มจุลินทรีย์ในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยใช้บัวหลวงและกกราชินี

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างพืช ดิน และกลุ่มจุลินทรีย์ในการบำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชนโดยใช้บัวหลวงและกกราชินี ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 7 กระถางทดลอง และแต่ละกระถางทดลองมี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยกระถางทดลองดังต่อไปนี้

กระถางทดลองที่ 1 น้ำเสียชุมชน (control) 4,000 มิลลิลิตร
กระถางทดลองที่ 2 น้ำเสียชุมชนผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร
กระถางทดลองที่ 3 น้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร+ ดิน(control) 500 กรัม
กระถางทดลองที่ 4 น้ำเสียชุมชนผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร+ ดินผ่านการฆ่าเชื้อ 12.5 กรัม
กระถางทดลองที่ 5 น้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร + บัวหลวง 400 กรัม
กระถางทดลองที่ 6 น้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร + ดิน 500 กรัม + บัวหลวง 400 กรัม
กระถางทดลองที่ 7 น้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร + กกราชินี 400 กรัม
กระถางทดลองที่ 8 น้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร + ดิน 500 กรัม+ กกราชินี400 กรัม

วิธีการทดลองเหมือนการทดลองในข้อ 3.4.2.2 คือ พืช 400 กรัม ดิน 500 กรัม และน้ำเสียชุมชน 4,000 มิลลิลิตร แต่จะใช้อัตราส่วนของน้ำเสียชุมชนและดินที่น้อยกว่าในกระถางทดลองที่ 2 โดยนำน้ำเสียชุมชน 100 มิลลิลิตร และกระถางทดลองที่ 4 นำดินใส่กระถางทดลอง 12.5 กรัม ใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดัน (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที นำออกจากหม้อนึ่งความดันทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมน้ำเสียชุมชนลงไป 100 มิลลิลิตรลงไปในกระถางทดลองที่ 4 ซึ่งจะเป็นการดูดซับฟอสฟอรัสของดินที่ไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยคิดคำนวณดังนี้

- เปอร์เซ็นต์จุลินทรีย์ที่บำบัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชน คำนวณโดยนำเปอร์เซ็นต์น้ำเสียชุมชนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile domestic wastewater) นำมาลบกับเปอร์เซ็นต์จุลินทรีย์ของน้ำที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตามสมการ (3.1)

% Microorganisms in Domestic wastewater = (% Domestic wastewater) - (% Domestic wastewater (sterile))

(3.1)

- เปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสฟอรัสในดิน คำนวณโดยนำเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสฟอรัสในดินและการดูดซับฟอสฟอรัสในน้ำเสียชุมชน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile soli and sterile domestic wastewater) ตามสมการ (3.2)

% Phosphorus adsorption by soil = (% Soli(sterile) + % Domestic wastewater (sterile))

(3.2)

- เปอร์เซ็นต์จุลินทรีย์ที่บำบัดฟอสฟอรัสในดิน คำนวณโดยนำเปอร์เซ็นต์ของดินรวมกับน้ำเสียชุมชน มาลบกับเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟอสฟอรัสในดิน ตามสมการ (3.3)

% Microorganisms in soil = (% Soli + % Domestic wastewater) - (% Phosphorus adsorption by soil)

(3.3)

- เปอร์เซ็นต์การบำบัดฟอสฟอรัสในพืช คำนวณโดยนำเปอร์เซ็นต์ของพืชที่ปลูกร่วมกับดินและน้ำเสียชุมชน มาหักลบกับเปอร์เซ็นต์ของดินร่วมกับน้ำเสียชุมชน (control) ตามสมการ (3.4)

% Phosphorus uptake by plant = (% Plant + Soil + Domestic wastewater) – (% Soli +Domestic wastewater)

(3.4)

จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนการบำบัดฟอสฟอรัสของพืช ดิน และกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย

3.4.4 การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งอาหารในน้ำเสียชุมชน

การศึกษาส่วนนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 4 กระถางทดลอง และแต่ละกระถางทดลองมี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยกระถางทดลองดังต่อไปนี้

กระถางทดลองที่ 1 น้ำเสียชุมชน (control)

กระถางทดลองที่ 2 น้ำเสียชุมชน + ดิน(control)

กระถางทดลองที่ 3 น้ำเสียชุมชน + ดิน + บัวหลวง

กระถางทดลองที่ 4 น้ำเสียชุมชน + ดิน + กกราชินี

ในการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งอาหารในน้ำเสียชุมชนนี้ วิธีการศึกษาเหมือนการทดลองที่ 3.4.2.1 ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ฟอสฟอรัสใน 2 ช่วงคือ วันแรกและวันสุดท้าย(วันที่ 5) ของการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนกระถางทดลองละ 2,000 มิลลิลิตร ดินกระถางทดลองละ 20 กรัม รากบัวหลวง และรากกกราชินีกระถางทดลองละ 100 กรัม มาทำการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการใช้ฟอสฟอรัสในระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้พืชในการบำบัด โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และ DNA Amplification ตามวิธีของ Muyzer และคณะ (1993) Ovreas และคณะ (1993) และ Zhou และคณะ(1996) วิธีการศึกษาในส่วนนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการดำเนินการศึกษาจาก ดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ คุณนิมารดี บุญอาพัทธิ์เจริญ และคุณสุมนา กุลละวณิชย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ และเคมีของน้ำเสียชุมชน

ตารางที่ 3.1 วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติน้ำเสีย

ลักษณะสมบัติน้ำเสีย	วิธีวิเคราะห์[1]
COD	Open Reflex Method
BOD_5	Dilution Method
TDS	Total Dissolved Solids Dried at 105 ^0C
TKN	Macro Kjeldahl Method
TP	Digestion / Colorimetric Method by Ascorbic Acid Method
pH	pH Meter Mettler Toledo model 744

หมายเหตุ [1]: Standard method for the examination of water and wastewater. 20th edition. By AWWA, WEF and APHA. 1998, American Public Health Association, Washington, DC, USA.

3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในพืช

- การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนในพืชทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Nanarro (1993) โดยการนำตัวอย่างพืชที่แห้ง (dry weight) ชั่งประมาณ 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งในเตาเผาจนเย็นหรือปล่อยให้เย็นในโถทำแห้ง ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังจากการเผา จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Organic Matter และเปอร์เซ็นต์ Carbon content ตามสมการ (3.5) และ (3.6)

$$\% \text{ Organic Matter} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างพืชที่หายไป}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างพืชก่อนเผา}} \times 100 \quad \text{———} \quad (3.5)$$

$$\% \text{ Carbon content} = \frac{\% \text{ Organic Matter}}{1.8} \quad \text{———— (3.6)}$$

(1.8 คือค่าความถ่วงจำเพาะของคาร์บอน)

- การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในพืชโดยวิธี Total Kjeldahl Nitrogen Analyze ตามวิธีของ A.O.A.C (1980) โดยการชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 0.2 กรัม เติม Kjeldahl tab ลงไป 1 เม็ด แล้วเติม Conc. H_2SO_4 6.7 มิลลิลิตร ทำการ heat ใน Digestion block ที่อุณหภูมิ 385 องศาเซลเซียส ที่มีเครื่องดูดไอกรดประมาณ 45-60 นาที (สังเกตตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนใส) ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ Total Kjeldahl Nitrogen แล้วนำไปไตเตรทสารที่กลั่นได้ด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.026 N H_2SO_4 จนได้สีม่วงอ่อนเป็นจุดยุติ ทำ Blank ควบคู่กับตัวอย่างทุกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนตามสมการ (3.7)

$$\% \text{ Total Kjeldahl Nitrogen} = \frac{(A-B)\times N\times 0.014\times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)}} \quad \text{———— (3.7)}$$

โดย A = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N = Normality ของกรดมาตรฐาน

- การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (1989) โดยนำตัวอย่างพืช 1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl Flask เติม Conc. HNo_3 5 มิลลิลิตร และ Conc. HSo_4 1 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างจนกระทั่งได้สารละลายใสไม่มีสีทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และหยดฟีนอล์ทาลีน 3 หยด แล้วค่อยๆเติม 6 N NaOH จนได้สีชมพูอ่อน เทลงขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง 35 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสตามสมการ (3.8)

$$\% \text{ Total Phosphorus} = \frac{\text{mg phosphorus (จากกราฟ)} \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่างพืช (มิลลิกรัม)}} \quad \text{———— (3.8)}$$

3.5.3 การวิเคราะห์น้ำหนักสดของบัวหลวงและกกราชินี

การวิเคราะห์น้ำหนักสดของพืชก่อนและหลังการทดลองเพื่อศึกษาว่าพืชมีการเจริญเติบโตมากน้อยอย่างไร เปรียบเทียบพืชสองชนิดคือบัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaerth) และกกราชินี *(Cyperus alternifolius* L.) และเปรียบเทียบในกระถางทดลอง (treatment) กับกระถางควบคุม (control) ของพืชทั้งสองชนิด โดยการนำพืชมาชั่งน้ำหนักสดหลังสิ้นสุดการทดลองแล้วนำมาลบกันน้ำหนักสดเริ่มต้นก่อนการทดลองของพืชทั้งสองชนิดตามสมการ (3.9) และค่า Relative growth rate (3.10)

Plant weight (g) = After treatment fresh weight (g) - Before treatment fresh weight (g) —(3.9)

$$\text{Relative growth rate (g fresh plant tissue}^{-1}\text{ day}^{-1}) = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T2 - T1} \quad \text{—(3.10)}$$

โดย W1 = น้ำหนักสดของพืชเริ่มต้น (g fresh plant tissue)

W2 = น้ำหนักสดของพืชสุดท้าย (g fresh plant tissue)

T1 = ระยะเวลาเริ่มต้น (day)

T2 = ระยะเวลาสุดท้าย (day)

3.5.4 การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ โดยเทคนิค PCR-DGGE

การศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งอาหาร โดยได้ทำการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำเสียชุมชน ดิน รากบัวหลวง และรากกกราชินีใน 2 ช่วงคือ วันแรก (day0) และวันสุดท้ายของการทดลอง (day5) วิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์โดยเทคนิค Polymerase chain reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) โดย ดร.สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ คุณนิมารดี บุญอาพัทธิ์เจริญ และคุณสุมนา กุลละวณิชย์ นักวิจัยศูนย์ความเป็นเลิศเฉพาะทางด้านการจัดการและใช้ประโยชน์จากของเสีย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.5.4.1 การสกัด genomic DNA

วิธีที่ใช้ในการสกัด DNA จากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประยุกต์จากวิธีการสกัด DNA จากดินของ Zhou และคณะ, 1996 โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 10 – 15 g ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml

- เติม 13.5 ml ของ lysis buffet (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100mM sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl, and 1% CTAB) เติม 100 µl ของ lysozyme (20 mg/ml) และ 100 µl ของ protinase K (10 mg/ml) จากนั้นนำหลอดไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 - 60 นาที

- จากนั้นเติม 1.5 ml ของ 20% SDS และนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 2 ช.ม. โดยทุกๆ 20 นาที จะต้องทำการพลิกหลอดกลับไปกลับมา

- นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml หลอดใหม่

- จากนั้นเติม chloroform และ isoamyl alcohol ในสัดส่วน 24:1 v/v เขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใสชั้นของเหลว (ชั้นบนสุด) ใส่หลอดใหม่

- ทำการตกตะกอน DNA ด้วย 0.6 volume ของ isopropanal ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ช.ม. หรือตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

- จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที สุดท้ายทำการละลายตะกอน DNA ที่ได้ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 300 µl ถ้าสารละลาย DNA ที่ได้มีสีน้ำตาลให้ทำการเพิ่มความบริสุทธิ์ DNA ก่อน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป หรือเก็บ genomic DNA ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 °ซ

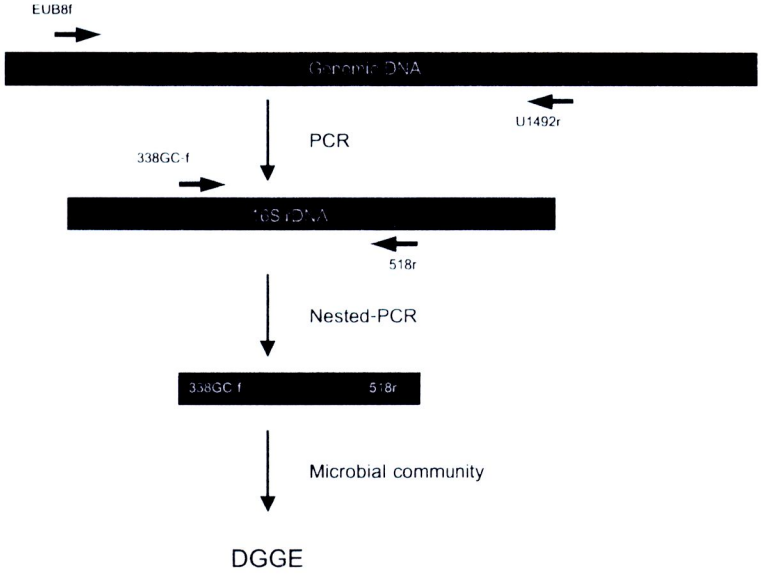
3.5.4.2 PCR amplification

นำ genomic DNA ของจุลินทรีย์ที่สกัดได้ไปทำการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR (รูปที่ 3.2) โดยใช้ universal DNA primers ที่มีความจำเพาะกับ 16S rDNA ของ *Eubacteria* EUB8f และ U1492r จากนั้นนำ 16S rDNA PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ในครั้งแรกมาใช้เป็น DNA template เพื่อทำการ PCR อีกครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA ที่ตำแหน่งที่มีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (variable region) โดยใช้ primer 338GC-f และ 518-r ที่มีความจำเพาะกับ 16S rDNA ของ *Eubacterial* (V3 region) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของ primer แต่ละคู่แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2. PCR primers และ PCR condition

Nested PCR	No. of cycles	PCR conditions					
		Denaturation		Annealing		Elongation	
		°C	min	°C	min	°C	min
First PCR round							
Primer: EUB8F/U1492r	25	95	0.50	55	0.30	72	2.00
Second PCR round							
Primer: 338-GC-F/518r	30	95	0.50	60	0.30	72	0.50

โดยก่อนที่จะเริ่มการ run ของแต่ละ cycle จะทำการ denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาทีก่อน และเมื่อ run ครบตามจำนวน cycle แล้วก็จะทำการ final elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที

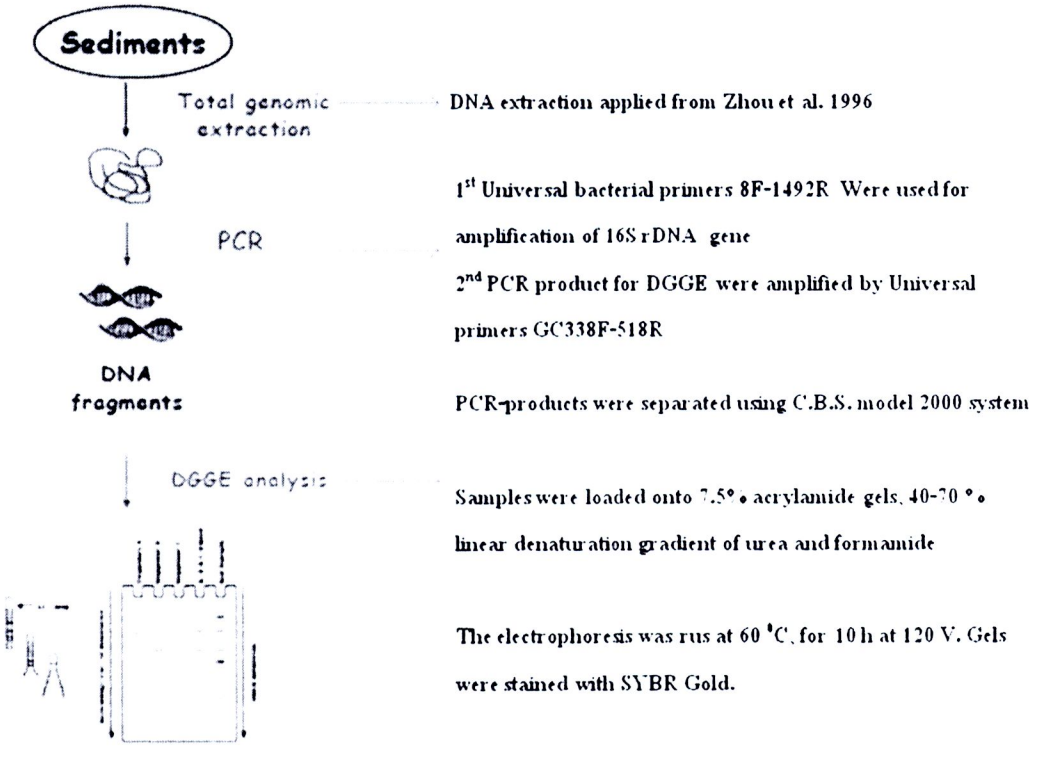


รูปที่ 3.2 แสดง Primers ที่ใช้ในการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ โดยเทคนิค PCR-DGGE

3.5.4.3 DGGE

จากนั้นนำเอา 16S rDNA PCR product ที่ได้ไปแยกด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer, 1993) โดยทำการแยก 16S rDNA PCR products ที่ได้บน 7.5% acrylamide gel (40-70% denaturant gradients) ใน 0.5X TAE ที่ 100V เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วดู DNA pattern ภายใต้แสง UV จากนั้นทำการตัดเอา DNA band แล้วไป

แยกเอา DNA ออกจาก gel ด้วยการแช่ในน้ำ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนอีกครั้งด้วย primer คู่เดิมแต่ไม่มี GC-clamp แล้วนำ PCR product ที่ได้ไป ตรวจหาลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยการทำ DNA sequencing ต่อไป ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ 16S rDNA ที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกแยกชนิดของจุลินทรีย์ต่อไป หลังจากได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละชิ้น 16S rDNA แล้วนั้น ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST Search (Altschul, 1997) และจากนั้นทำการศึกษา phylogenetic analysis โดยใช้วิธีการ distant matrix method (Jukes, 1969) และ neighbor-joining analysis สำหรับแสดงแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)



รูปที่ 3.2 Microbial poputation dynamic by PCR-DGGE

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS Version 11 นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของพารามิเตอร์ในแต่ละการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95