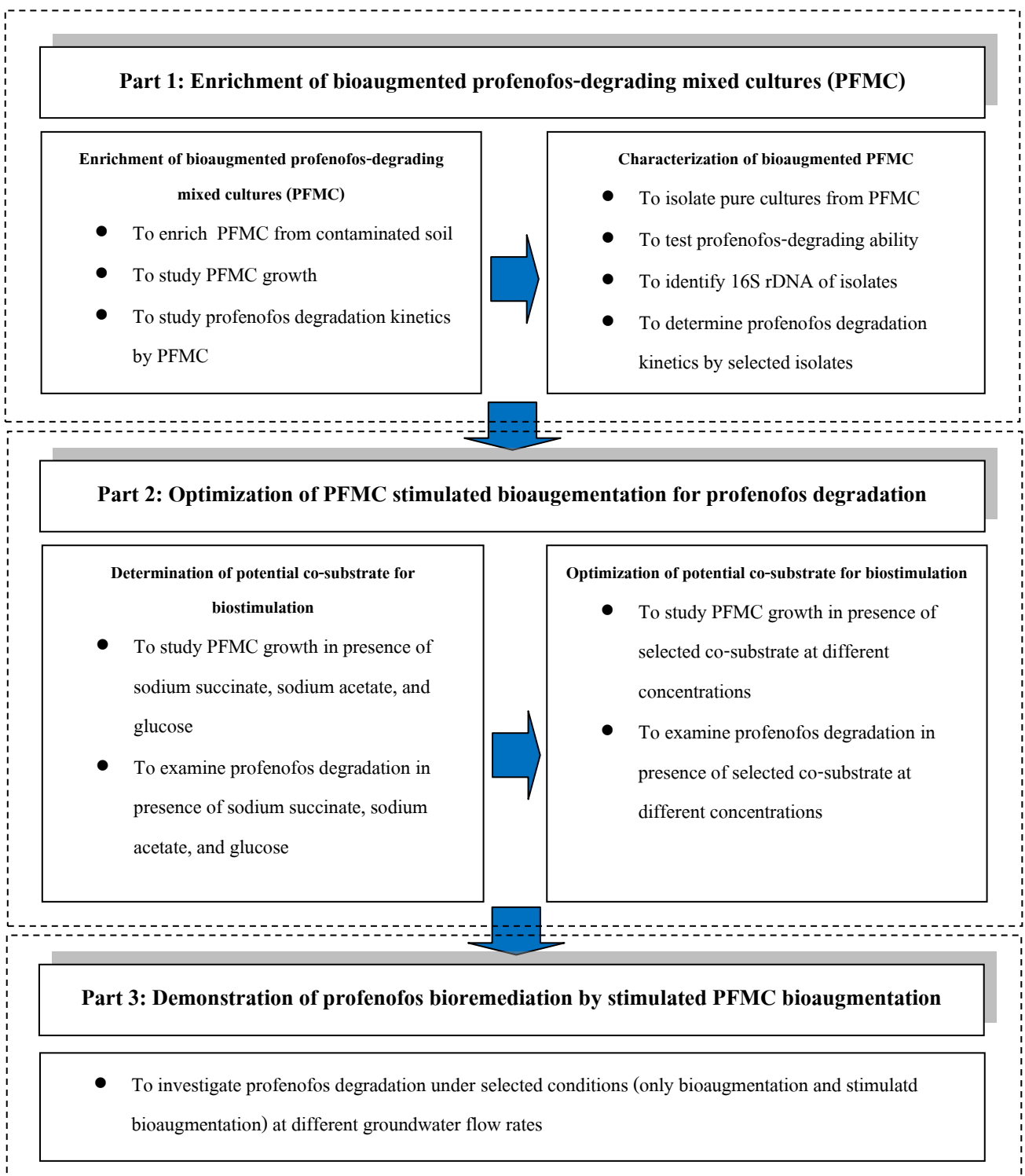


บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กรอบการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ดังกรอบแนวคิดของงานวิจัยที่แสดงในภาพที่ 3.1 ในส่วนแรกเป็นการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสเพื่อใช้ในการเติมเซลล์ (bioaugmentation) จากนั้นจึงนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากส่วนที่หนึ่งมาศึกษาการย่อยสลายสารโพธิ์โนฟอสภายใต้สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) แล้วจึงสาธิตการใช้จุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสในน้ำใต้ดิน



ภาพที่ 3.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยศึกษาทดลองที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และภาคชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีการเก็บข้อมูลและตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริก ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี การดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ

1. การศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง โดยขั้นตอนนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลทฤษฎี งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีต
2. การออกแบบการทดลอง ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนและออกแบบการทดลอง โดยมุ่งเน้นให้ออกแบบให้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของการศึกษาทั้งหมด และมีชุดเปรียบเทียบเพื่อสามารถบ่งชี้ความเชื่อมั่นของผลการศึกษาได้
3. การทดลองและการอภิปรายผล ขั้นตอนนี้เป็นการทดลองตามแผนการที่วางไว้ และวิเคราะห์ผลการศึกษา คำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์
4. สรุปผลการศึกษา ขั้นตอนนี้เป็นการสรุปผลการศึกษาทั้งหมด และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาต่อไปในอนาคต
5. การเผยแพร่ผลงานและการประยุกต์ใช้ในอนาคต ผลการศึกษานี้จะได้นำเสนอให้ชุมชน นอกจากนี้ผลการศึกษาจะยังได้รับการเผยแพร่ในวงการวิชาการผ่านการประชุมวิชาการหรือบทความวิจัยในวารสารวิชาการได้ต่อไป

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักตามกรอบการวิจัย อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง มีรายละเอียด ดังนี้

1. เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง
2. เครื่องวัดค่าพีเอช
3. ตู้อบ
4. เครื่องเขย่า
5. ชุดอุปกรณ์สำหรับวัดค่าซีไอดี
6. ชุดอุปกรณ์สำหรับวัดค่าของแข็ง
7. ชุดอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ
8. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography)
9. เครื่องสเปกโตรเมทรี (spectrometer)
10. ชุดคอลัมน์และอุปกรณ์สำหรับการสาธิตการฟื้นฟูพื้นที่
11. ถังปฏิกรณ์ สารเคมี และวัสดุที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ
12. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าซีไอดี
13. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าของแข็ง
14. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์สารโพรพิโนฟอส ซึ่งประกอบด้วย สารมาตรฐาน วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัดสาร วัสดุ สารเคมีและแก๊สสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

15. สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอ ชุดเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์ และชุดตรวจระบุโครงสร้างดีเอ็นเอ

3.2.1 วิธีการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์สำหรับการเติมเซลล์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสของจุลินทรีย์ที่ถูกเติม

ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากดินที่มีการปนเปื้อนสารโพรฟิโนฟอส แล้วศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสของกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว (ครอบคลุมจุลณพศาสตร์การเจริญเติบโตและการย่อยสลายของสาร) แล้วจากนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เพื่อระบุลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ ในแต่ละขั้นตอนย่อยมีวิธีการดังนี้

3.2.1.1 การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอส

- การเก็บและเตรียมตัวอย่างดิน ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพริกในพื้นที่ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นเตรียมตัวอย่างดินโดยเริ่มต้นจากการซังดินที่ผ่านการคัดแยกหินและเศษใบไม้แล้วจำนวน 500 กรัม จากนั้นร่อนดินผ่านตะแกรง (รูพรุน 0.5 มิลลิเมตร) แล้วจึงเก็บแช่ตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยก อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็ม ชนิดเหลว (Minimal Salt Medium; MSM) เป็นอาหารที่ใช้ในการคัดแยกและปรับสภาพเพื่อให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความคงตัว (stable mixed cultures) สูตรอาหารประกอบด้วย NaHPO_4 5.8 กรัม KH_2PO_4 3.0 กรัม NaCl 0.5 กรัม NH_4Cl 1 กรัม และ MgSO_4 0.25 กรัม ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที รอให้เย็นจึงเติมสารโพรฟิโนฟอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรน 0.20 ไมครเมตร ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดแข็งมีสูตรเช่นเดียวกับชนิดเหลว แต่มีผงวุ้น (bacto agar) เป็นส่วนผสมร้อยละ 2 (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)
- การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอส การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสจากตัวอย่างดิน เป็นการคัดแยกโดยเทคนิคการขยายเชื้อ (culture enrichment technique) โดยใช้ตัวอย่าง

ดินที่ปนเปื้อนสารกำจัดแมลงจากแปลงเพาะปลูกพริก จำนวน 20 กรัม เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลวมีส่วนประกอบของโพรฟิโนฟอส เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสารละลายน้ำได้สูงสุด ใช้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หุ้มชุดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อป้องกันการย่อยสลายเนื่องจากแสง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิโดยประมาณในบรรยากาศของไทย โดยใช้ตู้อบแบบเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากชุดทดลองเดิมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเต็มร้อยละ 5 โดยปริมาตร นำมาเพาะเลี้ยงในที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 14 วัน และถ่ายเชื้อที่สภาวะเดิมซ้ำ 5 ครั้ง จนกว่าจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสปราศจากดิน (soil free solution) ซึ่งคาดว่าจะมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพที่มีสารกำจัดแมลงโพรฟิโนฟอสได้และมีความคงตัว (stable mixed culture) (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ในอัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพรฟิโนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้อบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง 2 วันต่อครั้ง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารโพรฟิโนฟอสคงเหลือ
- การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอส การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟิโนฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสาร
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมตรีหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพรฟิโนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีการมาตรฐานของ US (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก)

3.2.1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรฟีนฟอส

- การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีนฟอส การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีนฟอสจากกลุ่มจุลินทรีย์โดยเทคนิคการเขี่ยเชื้อ (streak plate technique) จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นจึงนำไประบุสายพันธุ์
- การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ เริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ จากนั้นเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) จากนั้นจึงนำไประบุโครงสร้างดีเอ็นเอ (sequence) สุดท้ายจึงนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอซึ่งอยู่ใน GenBank เพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ก)
- การระบุความสามารถการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพรฟีนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตูบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองวันสุดท้าย เพื่อนำมาวิเคราะห์หาสารโพรฟีนฟอสเปรียบเทียบกับวันแรก โดยจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดสารโพรฟีนฟอสได้จะได้นำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป
- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพรฟีนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตูบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง 2 วันต่อครั้ง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารโพรฟีนฟอสคงเหลือ
- การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรฟีนฟอส การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรฟีนฟอสได้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสาร

- การศึกษาการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารคลอร์ไพริฟอสและไดโครโทฟอส (สารกำจัดศัตรูพืชออร์แกนโนฟอสฟอรัสชนิดอื่นที่พบการใช้และการปนเปื้อนร่วมกับสารโพธิโนฟอส) เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตูบ์มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และสารคงเหลือ
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทรีหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพธิโนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก)

3.2.2 วิธีการศึกษาการกระตุ้นการย่อยสลายสารโพธิโนฟอสโดยใช้กระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

ในขั้นตอนนี้แยกภาระงานออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วมได้ โดยในการศึกษาครอบคลุมผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายสาร แล้วคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสมที่สุดในขั้นตอนต่อมาจึงศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพธิโนฟอสในการเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม ในแต่ละขั้นตอนย่อยมีวิธีการดังนี้

3.2.2.1 การศึกษาหาสารอาหารร่วมที่ส่งเสริมกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายโดยใช้สารอาหารร่วมแตกต่างกัน เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพธิโนฟอสเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสารอาหารร่วมแตกต่างกัน ซึ่งได้แก่ โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซัคซิเนต และกลูโคส ที่มีความเข้มข้นของคาร์บอน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตูบ์มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ สารโพธิโนฟอสคงเหลือและค่าซีไอดี (บ่งชี้การใช้สารอาหารร่วม)

- การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอีกหนึ่งเท่า (doubling time) ผลการศึกษาในขั้นตอนนี้จะได้ใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสารอาหารร่วมที่เหมาะสม เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป
- วิธีการวิเคราะห์ การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทรีหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพรพีโนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีโอดีวิเคราะห์เฉพาะซีโอดีละลาย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก)

3.2.2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารร่วมและสารโพรพีโนฟอสในกระบวนการเมตาโบลิซึมร่วม

- การศึกษาลักษณะการย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสที่ความเข้มข้นของสารและสารอาหารร่วมแตกต่างกัน เริ่มต้นโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ใช้อัตราส่วนร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอสเอ็มชนิดเหลว ที่มีส่วนผสมของสารโพรพีโนฟอสเข้มข้น 0 5 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสารอาหารร่วมที่มีความเข้มข้นของคาร์บอน 50 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองเป็นเวลาต่อเนื่อง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ สารโพรพีโนฟอสคงเหลือ และค่าซีโอดี (บ่งชี้การใช้สารอาหารร่วม)
- การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและจลนพลศาสตร์การย่อยสลายสารโพรพีโนฟอส การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารโพรพีโนฟอสได้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป และนำข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate)

- **วิธีการวิเคราะห์** การวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ใช้เครื่องสเปกโตรเมทรีหรือการนับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ส่วนการวิเคราะห์สารโพธิ์โนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีโอดีวิเคราะห์เฉพาะซีโอดีละลาย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก)

3.2.3 วิธีการสาธิตการฟื้นฟูน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพธิ์โนฟอสตามหลักการเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

ในขั้นตอนนี้เป็นการสาธิตการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน ที่มีอัตราการซึมผ่าน (infiltration rate) แตกต่างกัน คือ 25 50 และ 100 เซนติเมตรต่อวัน (อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทดลองตามแนวทางของงานวิจัยในอดีต (Siripattanakul et al., 2009) การศึกษาเติมจุลินทรีย์และสารอาหารร่วมโดยอ้างอิงจากผลในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยในการศึกษาครอบคลุมการย่อยสลายสารและวิถีของการย่อยสลาย โดยในขั้นตอนนี้จะได้ศึกษาทั้งเปรียบเทียบ 1) การเติมเซลล์ 2) การเติมเซลล์ที่ถูกกระตุ้น และ 3) ชุดควบคุม (ไม่ได้ทั้งเซลล์และสารอาหารร่วม) ณ อัตราการไหลของน้ำใต้ดินต่าง ๆ

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การเตรียมทราย การเตรียมคอลัมน์ และการทดลองสาธิตการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- **การเตรียมทราย** การทดลองนี้ใช้ทรายซิลิกาควอตซ์ เริ่มต้นจากการล้างทรายและร่อนผ่านตะแกรง โดยทรายมีขนาด 0.25 ถึง 0.45 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการอบฆ่าเชื้อจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน (Siripattanakul et al., 2009)
- **การเตรียมแบบจำลองคอลัมน์** คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.2 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร ทำจากแก้ว (ซึ่งบรรจุทรายเต็มคอลัมน์) ที่ฆ่าเชื้อด้วยการล้างด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) ความเข้มข้นร้อยละ 70 คอลัมน์ต่อประกอบกับปั๊มสูบน้ำตัวอย่างที่ปนเปื้อนเข้าสู่คอลัมน์ดังภาพที่ 3.2 ในลักษณะไหลขึ้น (up-flow)
- **การทดลองสาธิตการกำจัดสารโพธิ์โนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน** การทดลองเริ่มต้นจากทดสอบการไหลของน้ำและสารโพธิ์โนฟอสซึ่งเรียกว่า การทดสอบเทสเซอร์ (tracer test) การทดสอบเทสเซอร์กระทำโดยการนำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ ใส่ลงในถังเก็บน้ำ จากนั้นปั๊มสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ เข้าสู่คอลัมน์ให้ไหลผ่านคอลัมน์จนเต็ม แล้วเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในถังเป็น 0.05 โมลาร์ เก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์ตั้งแต่

เริ่มเพิ่มความเข้มข้นจนสารละลายในถังหมด นำตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านคอลัมน์ไปวัดค่าการนำไฟฟ้า เพื่อศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านคอลัมน์ จากนั้นทดสอบการไหลของโพรพิโนฟอสในลักษณะเดียวกันเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของสารผ่านคอลัมน์

สำหรับการทดลองสาธิตการกำจัดสารโพรพิโนฟอสในแบบจำลองน้ำใต้ดิน เตรียมคอลัมน์ 3 คอลัมน์ ซึ่งได้แก่ 1) คอลัมน์ที่เติมเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 5 โดยปริมาตรผสมกับทรายก่อนบรรจุลงในคอลัมน์ 2) คอลัมน์ที่เติมเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 5 เช่นเดียวกับคอลัมน์แรก และ 3) ชุดควบคุม (ไม่ได้ทั้งเซลล์และสารอาหารร่วม) จากนั้นใช้ปั๊มสูบน้ำใต้ดินที่ปนเปื้อนสารโพรพิโนฟอสสังเคราะห์เข้าสู่คอลัมน์ (โดยในคอลัมน์ที่ 2 มีการเติมสารอาหารร่วมด้วย) โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 30 90 และ 180 มิลลิลิตรต่อวัน การทดลองวิเคราะห์ค่าซีไอดีและสารโพรพิโนฟอสคงเหลือต่อเนื่อง เป็นปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรช่องว่าง (pore volume)

- **วิธีการวิเคราะห์** การวิเคราะห์สารโพรพิโนฟอสคงเหลือใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีการมาตรฐานของ US EPA การวิเคราะห์ค่าซีไอดีวิเคราะห์เฉพาะซีไอดีละลาย (soluble COD) ตามวิธีการมาตรฐาน (วิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก)

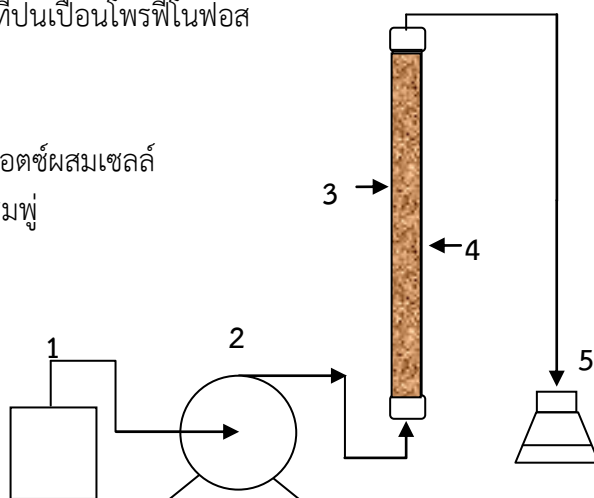
1 = ถังใส่น้ำที่ปนเปื้อนโพรพิลีนฟอส

2 = ปั๊ม

3 = คอลัมน์

4 = ทารายควอดซ์ผสมเซลล์

5 = ขวดรูปชมพู่



ภาพที่ 3.2 แบบจำลองคอลัมน์