บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ในการวิจัย

สารเคมี

1. beef extract (Himedia, India)
2. pepton (Himedia, India)
3. yeast extract (Himedia, India)
4. glucose (Ajax Finechem, Australia)
5. sucrose (Ajax Finechem, Australia)
6. maltose (Ajax Finechem, Australia)
7. starch (Ajax Finechem, Australia)
8. lactose (Ajax Finechem, Australia)
9. NH_4Cl (Ajax Finechem, Australia)
10. วุ้น (agar)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, Australia)
12. ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) (Ajax Finechem, Australia)
13. เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_2$) (Ajax Finechem, Australia)
14. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Ajax Finechem, Australia)
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)
17. ยูเรีย (Urea)
18. โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) (APS, Australia)
19. ซัลฟูริกแอซิด (H_2SO_4) (Ajax Finechem, Australia)
20. น้ำตาล (Sugar) (Mitphol,Thailand)

เครื่องมือ

1. incubator	บริษัท Binder
2. laminar air flow	บริษัท Eis Flufrance
3. spectrophotometer	บริษัท Genesys
4. spectrophotometer	บริษัท HACH รุ่น DR/2500
5. autoclave	บริษัท Hirayama
6. autoclave	บริษัท Sturdy รุ่น SA-300VL
7. hot air oven	บริษัท Binder
8. pH meter	บริษัท Sartorius
9. fume hood	บริษัท Pro Lab รุ่น 2000
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง	บริษัท Sanyo รุ่น Harrier 18/80
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง	บริษัท Hettich รุ่น EBA 12R
12. microwave	บริษัท National
13. deep freezer (-80 °C)	บริษัท Sanyo
14. กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus
15. เครื่องชั่งสาร	

อุปกรณ์อื่นๆ

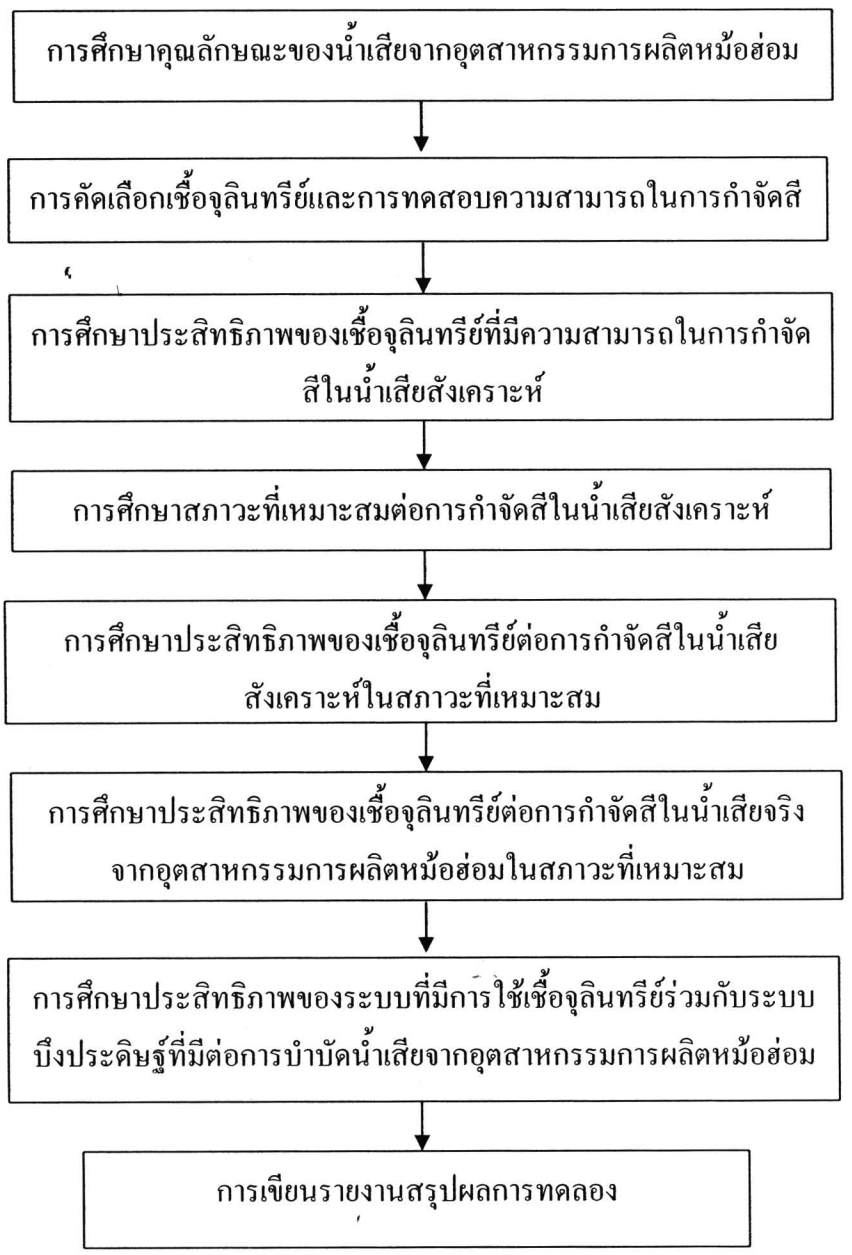
1. หลอดทดลอง (test tube)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. บิกเกอร์ (beaker)
4. จานเพาะเชื้อ (plate)
5. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
6. กระบอกตวง (cylinder)
7. ขวดปรับปริมาตร
8. ปิเปต (Pipette)
9. ไมโครปิเปต (Micropipette)
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

11. บิวเรต

12. หลอดวิเคราะห์ซีโอดี

แนวทางการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อมโดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยแสดงดังภาพ 9



ภาพ 9 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

จากแผนภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัยสามารถอธิบายขั้นตอนในการวิจัยโดยละเอียดได้ดังนี้

1. การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อม

1.1 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการฟอกย้อม

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากขั้นตอนการฟอกย้อมใส่ในขวดเพื่อนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสียที่ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยนำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1.1.1 วิเคราะห์ค่าเอฟซีโอดีโดยวิธี Closed Reflux

1.1.2 วิเคราะห์ค่าบีโอดีโดยวิธี Azide Modification

1.1.3 วิเคราะห์ค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter

1.1.4 วิเคราะห์ค่าความเข้มสีโดยสแกนหาค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) สูงสุดของสีโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 นาโนเมตร

1.2 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเสียรวมในถังพักน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถังพักน้ำเสียรวมใส่ในขวดเพื่อนำมาวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสียที่ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยนำมาวิเคราะห์หาค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.1

2. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อม

2.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการฟอกย้อม น้ำจากถังพักน้ำเสียรวม และดินบริเวณอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อม โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่มีสีย้อมสิ่งทอสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนีและทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อ และนำไปลาก (streak) บนผิวอาหารแข็ง ไม่ให้เส้นทับกันกับรอยลากแรก ๆ จะให้การเจริญที่ติดต่อกัน รอยลากท้าย ๆ จะทำให้เซลล์ แต่ละเซลล์จะเจริญขึ้นเป็นโคโลนีที่แยกกัน จากนั้นเก็บเป็นเชื้อทดสอบในอาหารแข็งวุ้นเอียง

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการกำจัดสีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีสีอะโซเป็นองค์ประกอบ

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรากฏวงใส จากข้อ 2.1 เขี่ยลงในอาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ไปวัดค่าการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 แล้วนำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเติมในปริมาตรร้อยละ 5 ต่อสารละลายน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มสี 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยเก็บผลทุก 2 วัน จากนั้นแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) วิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดสีย้อมสิ่งทอสังเคราะห์ โดยนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 563 นาโนเมตร

2.3 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสูตร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารไปขีดลงบนอาหารแข็งสูตร NA นำไปบ่มที่สภาวะเดิมอีกครั้ง ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย้อมสีเชื้อจุลินทรีย์แบบแกรม (Gram's staining)

การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

เลี้ยงเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสูตร NB เป็นเวลานาน 18 – 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง จากนั้นสกัด genomic DNA จากตะกอนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยชุดสกัด Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan) เพิ่มปริมาณยีน16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ 1 คู่ คือ 27F และ 1522R ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA แล้วทำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอล ต่อมาทำการหาลำดับเบสของ PCR product ที่บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค sequencing (บริษัท First Base Laboratories, Malaysia) และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งจะทำให้ทราบจีนัสและสปีชีส์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้

2.4 การทดสอบความเข้มข้นของสีที่เหมาะสมในการกำจัดสีอะโซในน้ำเสียสังเคราะห์

การทดสอบจะใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสีไดเร็กท์ซึ่งเป็นสีอะโซที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้นต่างกันคือ 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องสาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน บันทึกผลทุก 2 วัน โดยวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดสีของเชื้อเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีสังเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 563 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อมของเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่

2.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

1) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถกำจัดสีได้สูงสุดมาเขี่ยลงในอาหารเหลวสูตร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ไปวัดค่าการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 แล้วนำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเติมในปริมาตรร้อยละ 5 ต่อสารละลายน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ glucose, sucrose, maltose, starch และ lactose ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน

2) เมื่อครบกำหนดเวลาในแต่ละช่วง ให้นำน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 1) มาวิเคราะห์ด้วยการนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 563 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละการกำจัดสีของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละช่วงเวลา

2.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 แต่จะใช้แหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งคาร์บอนได้แก่ beef extract, peptone, yeast extract และ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5

2.5.3 การวิเคราะห์รีเกรสชันสำหรับแผนการทดลองแบบ Central Composite Design แบบหุ่นกำลังสอง

โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ต่อประสิทธิภาพการกำจัดสี โดยปัจจัยที่ทดสอบจะประกอบด้วยความเข้มข้นที่ต่างกันขององค์ประกอบของอาหารเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดสีในอาหารที่มีความเข้มข้นต่างกัน

2.5.4 พีเอชที่เหมาะสม

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการกำจัดสีสูงสุด และควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

2.5.5 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการกำจัดสีสูงสุด โดยควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการกำจัดสีสูงสุด และใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 0, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการกำจัดสีในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสม

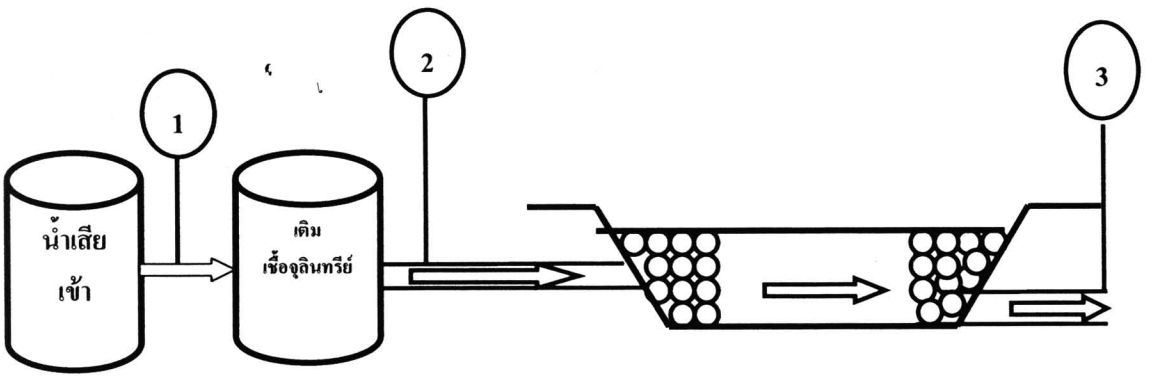
นำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์มาเติมในปริมาตรที่ทำให้เกิดการกำจัดสีสูงสุดต่อสารละลายสีน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิเมตร ที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอช และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการกำจัดสีสูงสุด หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.2 เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา

2.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการกำจัดสีในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อมในสภาวะที่เหมาะสม

นำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อมมาใช้แทนน้ำเสียสีสังเคราะห์ โดยใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิเมตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมลงไป จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ร้อยละการกำจัดสี และเอฟซีโอดี ทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการใช้ระบบที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบบึงประดิษฐ์ที่มีต่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตหม้อฮ่อม

หลังจากน้ำเสียผ่านการบำบัดด้วยระบบแบบกะแล้วจะนำน้ำเสียผ่านต่อไปยังระบบบึงประดิษฐ์แบบน้ำไหลใต้ผิวดินในแนวนอนเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการใช้ระบบที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบบึงประดิษฐ์ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียก่อนเติมเชื้อจุลินทรีย์ หลังเติมเชื้อจุลินทรีย์ และหลังจากน้ำเสียออกจากระบบบึงประดิษฐ์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดสี ซีโอดี บีโอดี พีเอช ของแข็งแขวนลอยและของแข็งทั้งหมดโดยจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียแต่ละจุดแสดงดังภาพ 10



ระบบแบบกะ **บึงประดิษฐ์แบบน้ำไหลใต้ผิวดินในแนวนอน**

ภาพ 10 จุดเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

จุดที่ 1 คือ น้ำเสียก่อนเติมเชื้อจุลินทรีย์

จุดที่ 2 คือ น้ำเสียหลังเติมเชื้อจุลินทรีย์

จุดที่ 3 คือ น้ำเสียหลังผ่านบึงประดิษฐ์