บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ Lipase activity และการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส

ส่วนที่ 3 ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการการยึดติดของไบโอฟิล์ม กับพื้นผิววัสดุตัวกลาง

ส่วนที่ 4 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมัน และน้ำมัน ในน้ำเสียครัวเรือน

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. **อุปกรณ์สำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัย**

1.1 ชุดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ เช่น ห่วงเขี่ยเชื้อ จานเพาะเชื้อ เป็นต้น

1.2 ชุดอุปกรณ์สำหรับย้อมสีแกรม เช่น แผ่นสไลด์ กระดาษซับสีสำหรับย้อมแกรม ตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

1.3 ชุดเครื่องแก้วสำหรับทดลอง เช่น ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวง แท่งแก้วเกลี่ย (Spreader) ขวดสีชา ขวดบีโอดี บิวเรต เป็นต้น

1.4 ชุดสกัดไขมันซอกฮ์เลต

1.5 ทิมเบิล

1.6 กระดาษกรองเบอร์ 40 (Whatman)

1.7 ไมโครปิเปต และ ปิเปต

1.8 ถ้วยกรองบุคเนอร์

1.9 คอลัมน์แก้ว (Glass columns) ขนาด 6×30 เซนติเมตร

1.10 ตะแกรงร่อน (sieve) ขนาด 1, 2 มิลลิเมตร

1.11 เม็ดทรายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

2. เครื่องมือสำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX50)

2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius MC1)

2.3 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius AC 210S)

2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 26 Plus)

2.5 เครื่อง Vortex (Vortex-genic2)

2.6 หม้อนึ่งความดันไอ (Sturdy SA-300VL)

2.7 ตู้แยกเชื้อ (IDFASTER Bio72)

2.8 ตู้อบ HOT air oven (Memmert)

2.9 ตู้บ่มเชื้อพร้อมเครื่องเขย่าแบบหมุนวน (Innova 4340)

2.10 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (MPC 227)

2.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Pharmacia, Novaspec II,Sweden)

2.12 เครื่องปั่นแยกควบคุมอุณหภูมิ (Beckman,Avanti TM 30 Centrifuge,United States)

2.13 เครื่องเติมอากาศ (Flow air supply)

2.14 เครื่องดูดสูญญากาศ

2.15 Peristatic pump (Stenner 85M3)

2.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Pharmacia LKB รุ่น Novaspace II

2.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Heto รุ่น 11DT-1

2.18 เครื่องกวนผสม (Homogenizer)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารเคมี

1.1 H_2SO_4

1.2 Phenol red

1.3 $CaCl_2$

1.4 Para-nitrophenyl palmitate

1.5 Isopropanol

1.6 Triton X-100

1.7 Gum Arabic

1.8 Trichlorotrifluoroethane (Hexans)

1.9 Na_2SO_4

1.10 50mM Tris-HCl buffer, pH8

1.11 Sterile distilled water

1.12 Phosphate buffer pH7.2

1.13 Tributyrin

1.14 Peptone

1.15 Yeas extract

1.16 Agar

1.17 $MnSO_4.4H_2O$

1.18 NaN_3

1.19 NaOH

1.20 NaI

1.21 $Na_2S_2O_3.5H_2O$

1.22 $KH(IO_3)_2$

1.23 Diatomaceous Silica

1.24 น้ำมันพืช

1.25 น้ำแป้ง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Mineral salt medium (MSM)

2.2 Tributyrin agar medium

2.3 Chromogenic plates

2.4 Nutrient broth (NB) ยี่ห้อ Merck

2.5 Nutrient agar (NA) ยี่ห้อ Merck

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (กฤษฎา บุญชัย, 2552)

1. *Bacillus subtilis* TP8
2. *Pseudomonas fluorescens* G7
3. เชื้อผสมระหว่าง *Bacillus subtilis* TP8 กับ *Pseudomonas fluorescens* G7

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**

1.1 วิธี Tributyrin agar medium: ทดสอบขั้นต้น (Chappe, et al., 1994)

1.1.1 ทำการเตรียม Tributyrin agar ซึ่งประกอบด้วย peptone 5 กรัม yeas extract 3 กรัม tributyrin 10 มิลลิลิตร agar 15 กรัม dist H_2O 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7

1.1.2 เขี่ยโคโลนีเชื้อและขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar

1.1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

1.1.4 การแปลผล หากบริเวณรอบๆเชื้อเกิด clear zone แสดงว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.2 วิธี Chromogenic plates: ทดสอบขั้นยืนยัน (Singh, R., et al., 2006)

1.2.1 ทำการเตรียม chromogenic plate ซึ่งประกอบด้วย 0.01% phenol red, 1% lipidic substrate (tributyrin), 10mM $CaCl_2$, 2% agar แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4

1.2.3 ทำการเขี่ยเชื้อและขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร chromogenic plate

1.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2.5 การแปลผล หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2. **การวิเคราะห์** Lipase activity (Ertugrul, S., et al., 2007) **และการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง**

2.1 เอนไซม์ไลเปสที่ต้องการศึกษาคือเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นมาแล้วปล่อยออกมาข้างนอกเซลล์ หรือที่เรียกกว่า extracellular enzyme ดังนั้นวิธีการเตรียม extracellular enzyme คือ

2.1.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรียนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

2.1.2 นำไปบ่มในเครื่อง shaker incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.3 หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสข้างบนหรือส่วน supernatant ซึ่งมี extracellular enzyme ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

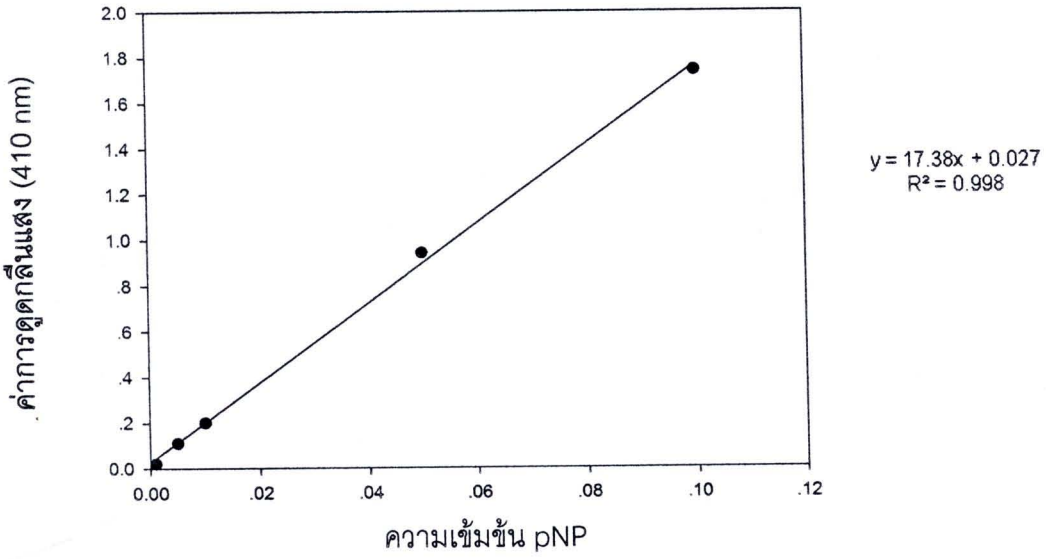
2.2 การทดสอบ lipase activity จะใช้วิธีการพื้นฐานของ colorimetric estimation คือการย่อยสลายสารประกอบแล้วได้สารที่มีสีออกมา โดยเอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลาย *p*NPP (para-nitrophenyl palmitate) ให้ได้เป็น *p*NP (para-nitrophenol) ออกมา ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ *p*NPP เป็นสารตั้งต้น โดย

2.2.1 ทำการเตรียมสารละลายตั้งต้นโดยผสมสารละลาย A (30 มิลลิกรัม ของ *p*NPP ใน isopropanol 10 มิลลิลิตร) เข้ากับสารละลาย B (ละลาย 0.1 กรัม ของ gum Arabic และ 0.4 มิลลิลิตร ของ Triton X-100 ใน 90 มิลลิลิตร ของ 50 mM Tris- HCl buffer, pH8)

2.2.2 ผสมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 9 มิลลิลิตร กับ extracellular enzyme 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer เป็นเวลา 15 นาที

2.2.4 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาพ 9 โดยกำหนด 1 unit ของ enzyme activity คือ ปริมาณของเอนไซม์ ที่ทำให้มีการปล่อย *p*NP ออกมา 1 μmol ในเวลา 1 นาที



ภาพ 9 แสดงกราฟมาตรฐาน lipase activity ที่ความเข้มข้น pNP 0.001 – 0.1 µmol

2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Fat Oil and Grease (FOG) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์, 2551) โดย

2.3.1 ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีน้ำมันพืช 2.0 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

2.3.3 หลังจากนั้นทำการปรับ pH ตัวอย่างน้ำที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ให้น้อยกว่า 2 ด้วยกรดเกลือเข้มข้นในอัตราประมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำตัวอย่าง 1 ลิตร จากนั้นกรองตัวอย่างน้ำผ่านบนกระดาษกรองที่มีแผ่นกรองดูดซับน้ำมันอยู่

2.3.4 ใช้คีมคีบกระดาษกรองนำไปใส่ในทิมเบิล ใช้สำลีชุบเฮกเซนเช็ดไขมันที่ติดถ้วยบุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีใส่ในทิมเบิลด้วย นำทิมเบิลไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่เม็ดแก้วให้เต็มทิมเบิล

2.3.5 โดยชั่งน้ำหนักขวดที่ใช้สกัดซึ่งได้ทำให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส) สมมุติเท่ากับ A กรัม

2.3.6 หลังจากนั้นใส่เฮกเซนลงในขวดสกัด 200 มิลลิลิตร นำทิมเบิลใส่ในชุดซอกฮ์เลต ทำการสกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายด้วยอัตรา 20 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.3.7 กลั่นเฮกเซนจากขวดสกัดในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสออกจนแห้ง ปล่อยขวดสกัดให้เย็นในโถทำแห้ง 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก สมมุติเท่ากับ B กรัม นำค่าที่ได้ไปคำนวณ ดังสมการนี้

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (มก./ลิตร)} = \frac{(B-A) \times 10^6}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำตัวอย่าง (EL-Masry, et al., 2004) จากสูตร

$$\text{Efficiency\% of Fat oil and grease removal} = \frac{\text{Initial FOG level in the raw water} - \text{Final FOG level after treatment} \times 100}{\text{Initial FOG in the raw water}}$$

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในระบบ Sand Biofilm Columns ด้วยวิธีการวิเคราะห์ FOG (El-Masry, et al., 2004) โดย

2.4.1 นำน้ำเสียสังเคราะห์ น้ำมันและไขมันใส่ใน Glass columns ที่มีไบโอฟิล์มบรรจุอยู่ โดยแบ่งเป็น 3 ชุดทดสอบ คือ (1) ไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. subtilis* TP8 (2) ไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. fluorescens* G7 (3) ไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งจากข้อ (1) และข้อ (2)

2.4.2 แล้วกำหนดอัตราการไหลของน้ำเสีย เท่ากับ 30, 50 และ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

2.4.3 นำน้ำเสียที่ได้จากการบำบัดแล้วเป็นเวลา 120 ชั่วโมง มาทำการวัดค่า FOG ที่เหลือหลังจากการย่อยสลายไขมัน โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย จากสูตร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

$$\text{Efficiency\% of Fat oil and grease removal} = \frac{\text{Initial FOG level in the raw water} - \text{Final FOG level after treatment} \times 100}{\text{Initial FOG in the raw water}}$$

3. **ทดสอบการสกัดไบโอฟิล์ม และเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการยึดติดของไบโอฟิล์มกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง** (ดัดแปลงจาก El-Masry, et al., 2004)

3.1 Development of the Biofilm system

ในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้พื้นผิววัสดุตัวกลาง (Surface area) สำหรับทำไบโอฟิล์มคือ เม็ดทรายเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยึดติดของไบโอฟิล์มกับ พื้นผิววัสดุตัวกลาง โดยมีวิธีการคือ

3.1.1 ทำให้พื้นผิววัสดุตัวกลางเหล่านี้ปราศจากเชื้อโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที

3.1.2 นำไปใส่ในคอลัมน์แก้วที่ล้างด้วย sterile distilled water โดยใส่พื้นผิววัสดุ ตัวกลาง 80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรความจุทั้งหมดของคอลัมน์แก้ว ขนาด 6×30 เซนติเมตร

3.1.3 หลังจากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง ใน NB มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน NB 200 มิลลิลิตร ของแต่ละเชื้อที่ทำการทดสอบ เติมลงไปในคอลัมน์แก้ว

3.1.4 ทำการเชื่อมต่อคอลัมน์แก้ว กับ เครื่องเติมอากาศ (Flow air supply) หลังจาก ที่ inoculate เชื้อไปแล้ว ตั้งไว้ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.5 หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อแขวนลอย ในตัวอย่างของเหลวในคอลัมน์ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจาง spread plate ลงบนอาหาร NA แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญ

3.2 การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation)

นำวัสดุตัวกลางที่เกิดการฟอร์มตัวของไบโอฟิล์ม 10 กรัม มาทำการแยกแบคทีเรียออกจากพื้นผิววัสดุตัวกลาง ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ

3.2.1 นำวัสดุตัวกลาง ใส่ลงใน Phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเพื่อแยกแบคทีเรียออกจากพื้นผิวยึดติด หลังจากนั้นนำ suspension มาทำการเจือจาง spread plate ลงบนอาหาร NA

3.2.2 นำพื้นผิววัสดุตัวกลาง ในขั้นตอนที่ 3.2.1 ใส่ลงไปใน 10 มิลลิลิตรของ Phosphate buffer pH 7.2 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ suspension มาทำการเจือจาง spread plate ลงบนอาหาร NA

3.2.3 นำพื้นผิววัสดุตัวกลาง ในขั้นตอนที่ 3.2.2 ใส่ลงไปใน 10 มิลลิลิตรของ Phosphate buffer pH 7.2 ทำการ Vortex เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ suspension มาทำการเจือจาง spread plate ลงบนอาหาร NA

3.2.4 นำ NA plate ทั้ง 3 ขั้นตอน ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนี และ คำนวณค่า CFU/ml

4. การวิเคราะห์ คุณสมบัติของน้ำเสีย

4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเสียในบ่อดักไขมันเพื่อตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จะใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบจ้วง (Grab sampling) ซึ่งปกติการเก็บตัวอย่างแบบจ้วงนี้จะเลือกจุดเก็บตรงกลางของบ่อพักน้ำเสีย (กรมควบคุมมลพิษ, 2553)

4.1.1 เตรียมน้ำแข็งใส่กล่องเก็บรักษาตัวอย่าง

4.1.2 เขียนรายละเอียดฉลากข้างขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

4.1.3 กำหนดจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 1 จุดๆ ละ 2 ขวดๆ ละ 300 มิลลิลิตร

4.1.4 ก่อนเก็บตัวอย่างต้องใช้ตัวอย่างน้ำกลั้วขวดตัวอย่างก่อน 2-3 ครั้ง

4.1.4 ตรวจวัดค่า pH และอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำทันที ณ จุดเก็บตัวอย่าง

4.1.5 เก็บขวดตัวอย่างในกล่องรักษาความเย็น

4.1.6 นำตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ไปทำการตรวจวิเคราะห์ค่า BOD, FOG ทันที

4.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเสีย โดยใช้เครื่องมือวัดอัตโนมัติ (Multi-probe)

4.3 วิเคราะห์ FOG โดยวิธีสกัดด้วยซอกฮ์เลต

4.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำ 1 ลิตร (หรือปริมาณน้อยกว่า) แล้วปรับ pH ให้น้อยกว่า 2 ด้วย กรดเกลือเข้มข้นในอัตราประมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำตัวอย่าง 1 ลิตร

4.3.2 เตรียมแผ่นกรองดูดซับน้ำมันโดยวางกระดาษกรองในกรวยบุคเนอร์ แล้วเทสาร แขวนลอย Diatomaceous silica เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ลงไป ใช้เครื่องดูดสูญญากาศดูดน้ำออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 ลิตร ดูดน้ำออกจนแห้ง

4.3.3 กรองตัวอย่างน้ำที่เตรียมจากข้อ 4.3.1 ผ่านบนกระดาษกรองที่มีแผ่นกรองดูดซับน้ำมันจากข้อ 4.3.2 แล้วดูดน้ำออกจนแห้ง

4.3.4 ใช้คีมคีบกระดาษกรองนำไปใส่ในทิมเบิล ใช้สำลีชุบเฮกเซนเช็ดไขมันที่ติดถ้วย บุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีใส่ในทิมเบิลด้วย

4.3.5 นำทิมเบิลไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่เม็ดแก้วให้ เต็มทิมเบิล

4.3.6 ชั่งน้ำหนักขวดที่ใช้สกัด ซึ่งได้ทำให้แห้งและมีน้ำหนักคงที่ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส) สมมุติเท่ากับ A กรัม ใส่เฮกเซนลงในขวดสกัด 200 มิลลิลิตร

4.3.7 นำทิมเบลใส่ในชุดซอกฮ์เลต ทำการสกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ด้วยอัตรา 20 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยนับจากเริ่มสกัดรอบแรก

4.3.8 กลั่นเฮกเซนจากขวดสกัดในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ออกจนแห้ง

4.3.9 ปล่อยขวดสกัดให้เย็นในโถทำแห้งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก สมมุติเท่ากับ B กรัม

4.3.10 นำไปคำนวณ ดังสมการนี้

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (มก./ล.)} = \frac{(B-A)\times 10^{6}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

4.4 การวิเคราะห์ BOD

4.4.1 นำตัวอย่างน้ำมาเติมออกซิเจนละลายให้อิ่มตัว โดยใช้ปั๊มอากาศประมาณ 10 นาที

4.4.2 ใช้สายยางดูดน้ำตัวอย่างลงในขวด BOD 3 ขวด ให้เต็มโดยให้ปลายสายยางอยู่ก้น ขวดปิดจุกให้สนิทอย่าให้มีฟองอากาศ

4.4.3 นำขวดหนึ่งมาหาค่าดีโอทันที โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1) เก็บตัวอย่างน้ำด้วยขวดบีโอดีให้เต็ม 2 ขวดปิดจุก เทน้ำที่ฝาทิ้ง

2) เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลด์-ไอโอได-เอไซด์ 2 มิลลิลิตร ขณะเติมสารเคมีให้ปลายหลอดจมอยู่ใต้ผิวน้ำ

3) ปิดจุกขวด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในขวด ผสมสารเคมีให้เข้ากันโดยคว่ำ ขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง

4) ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 5 นาที เปิดจุกแล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้างคอขวด

5) ปิดจุกแล้วคว่ำขวดขึ้นลงจบตะกอนละลายหมด

6) ตวงน้ำจากขวด BOD มา 203 มิลลิลิตร แล้วเทลงในขวดรูปชมพู่

7) เติมน้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีน้ำเงิน แล้วไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 N จนกระทั่งได้สารละลายไม่มีสี

8) นำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{ออกซิเจนละลาย (มก./ล.)} = \frac{\text{ปริมาณโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเทรท} \times 200}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

4.4.4 อีก 2 ขวดนำไปเพาะเชื้อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.4.5 หลังจากครบ 5 วันแล้วนำมาหาค่า DO ที่เหลือ (DO_5) ตามขั้นตอนที่ 3 – 8 ในข้อ 4.4.3

4.4.6 นำค่าที่ได้มาคำนวณจากสูตร

$$\text{BOD (มก./ล.)} = DO_0 - DO_5$$

เมื่อ DO_0 = ค่า DO ที่หาได้ในวันแรก

DO_5 = ค่า DO ที่หาได้เมื่อครบ 5 วัน

5. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย ไขมัน และน้ำมัน ในน้ำเสียครัวเรือน

5.1 นำน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน ที่วัดค่า Fat Oil and Grease, BOD, มาก่อนแล้วใส่ในคอลัมน์แก้ว ที่มีไบโอฟิล์มบรรจุอยู่ โดยแบ่งเป็น 3 ชุดทดสอบ คือ (1) ไบโอฟิล์มของเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (2) ไบโอฟิล์มของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (3) ไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งจากข้อ (1) และข้อ (2)

5.2 แล้วกำหนดอัตราการไหลของน้ำเสีย เท่ากับ 30, 50 และ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (El-Masry, et al., 2004)

5.3 นำน้ำเสียที่ได้จากการบำบัดแล้วมาทำการวัดค่า Fat Oil and Grease, BOD, ที่เหลือหลังจากการย่อยสลายไขมัน โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย จากสูตร

$$\text{Efficiency\% of Fat oil and grease removal} = \frac{\text{Initial FOG level in the raw water} - \text{Final FOG level after treatment} \times 100}{\text{Initial FOG in the raw water}}$$

$$\text{Efficiency\% of } BOD_5 \text{ removal} = \frac{\text{Initial } BOD_5 \text{ of the raw water} - \text{Final } BOD_5 \text{ after treatment} \times 100}{\text{Initial } BOD_5 \text{ of the raw wate}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลของการวิจัย

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบบพรรณนา (Descriptive statistics) ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative) จะถูกนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ทางสถิติในแต่ละกลุ่ม และคำนวณหาความแตกต่าง (t-test) ระหว่างตัวแปรในแต่ละกลุ่ม ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ ซึ่งมีลำดับขั้นตอนการวิจัยทั้งหมดแสดงดังภาพ 10

Bacillus subtilis (TP8) + *Pseudomonas fluorescens* (G7)

↓

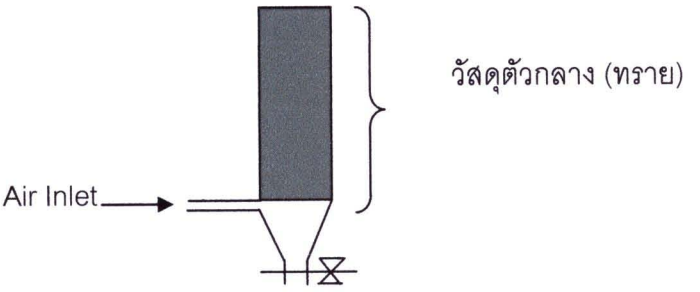
ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส

↓

วิเคราะห์ Lipase activity และ
ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส

↓

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิววัสดุตัวกลางใน Glass columns



↓

ทดสอบประสิทธิภาพการยึดติดของไบโอฟิล์มกับพื้นผิววัสดุตัวกลาง

↓

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี,ไขมันและน้ำมัน,
BOD ในน้ำเสียครัวเรือนก่อนบำบัด

↓

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส
ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในน้ำเสียครัวเรือน

↓

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี, ไขมันและน้ำมัน, BOD
ในน้ำเสียครัวเรือนที่ผ่านการบำบัดแล้ว

ภาพ 10 แสดงลำดับขั้นตอนของงานวิจัย