บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ขวดรูปชมพู่ (Erleneyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.2 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.1.3 ขวดสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.4 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.5 ตู้สำรองน้ำ (ขนาด 28×45×28.5 เซนติเมตร)

3.1.6 ปั๊มน้ำแบบเปียก

3.1.7 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Sanyo/MLS-3780)

3.1.8 เครื่องชั่งและเครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 แหน่ง (Balances and analytical balances)

3.1.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Incubator)

3.1.10 ตู้ถ่ายเชื้อ (Microbiological safetycabinets) (BIOHAZRO/BH2436)

3.1.11 ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.12 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Microscopes) (OLYMPUS/CH30)

3.1.13 กล้องดิจิตอล ยี่ห้อ Brica

3.1.14 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover glass)

3.1.15 COD block heater

3.1.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.17 Micropipette ยี่ห้อ SOCOREX ขนาด 1-10 มิลลิลิตร

3.1.18 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.19 เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า

3.1.20 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.1.21 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

3.1.22 วัสดุตัวกลางพลาสติก (Bioball)

3.1.23 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (DRB 2004/Hach)

3.1.24 เส้นใยพลาสติกสำหรับกรองตะกอน

3.2 สารเคมี

3.2.1 Alkali-iodide-azide

3.2.2 $Na_2S_2O_3$ (0.025N)

3.2.3 $MnSO_4$

3.2.4 0.1 N NaOH

3.2.5 Conc. H_2SO_4

3.2.6 0.1 N HCl

3.2.7 น้ำแป้ง

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient Agar (NA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาคุณภาพน้ำและปริมาณจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำผิวดิน

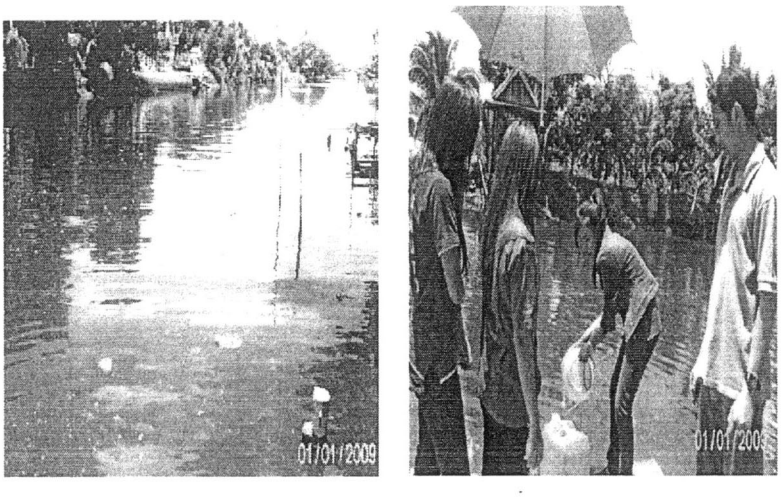
3.4.1.1 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของแหล่งน้ำผิวดิน

เก็บตัวอย่างน้ำผิวดินบริเวณ หน้าวัดหว่านบุญ ที่ระดับความลึก 1 เมตร ปริมาตร 80 ลิตร เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง 4 ชุด จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าดังต่อไปนี้

- ค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ด้วย pH meter
- อุณหภูมิ (Temperature)
- ค่าดีโอ (Dissolved Oxygen)
- ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำตัวอย่าง ด้วยวิธี Close reflux
- ค่าบีโอดี (Biological Oxygen Demand) ด้วยวิธี ไทเตรท

3.4.1.2 ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำผิวดิน

นำตัวอย่างน้ำผิวดิน ปริมาตร 10 ml ในน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-1} - 10^{-8}) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจาง ปริมาตร 1 ml ลงในภาชนะเลี้ยงเชื้อจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) ทับลงบนตัวอย่าง (Pour plate) ความเจือจางละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร รายงานผลเป็น CFU/ml



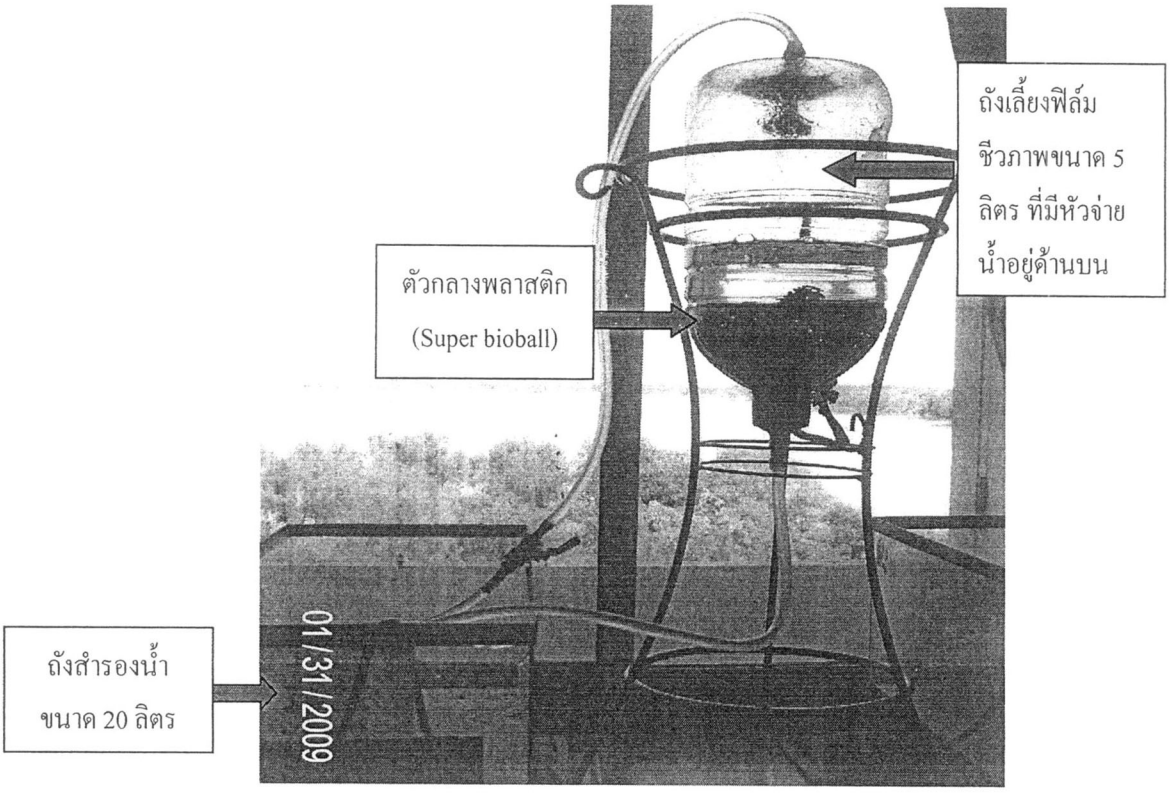
ภาพที่ 3 แหล่งน้ำผิวดิน บริเวณหน้าวัดหว่านบุญ ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

3.4.2 การศึกษาการสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบบำบัด

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 การใช้วัสดุตัวกลางร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (Media + Effective Micoorganism) และชุดการทดลองที่ 2 การใช้เฉพาะวัสดุตัวกลาง (Media)

3.4.2.1 การเตรียมระบบบำบัด

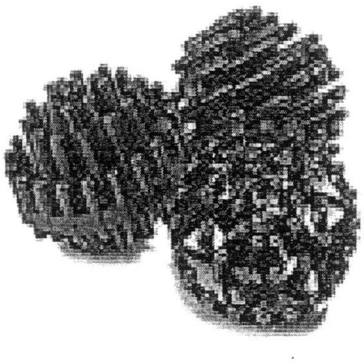
ใช้ถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร (ปริมาตรการทำงาน 2.5 ลิตร) สำหรับบรรจุวัสดุตัวกลางพลาสติก โดยมีหัวจ่ายน้ำอยู่ด้านบน เพื่อโปรยน้ำผิวดินที่ทำการบำบัดให้ไหลผ่านวัสดุตัวกลางและเกิดการยึดเกาะของฟิล์มชีวภาพ จากนั้นน้ำที่ไหลผ่านตัวกลางจะไหลลงสู่ถังสำรองน้ำขนาด 20 ลิตร แล้วทำการวนน้ำกลับเข้าสู่ถังเลี้ยงฟิล์มชีวภาพโดยปั๊มน้ำแบบเปียก (Submerged Pump) โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 250 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 4 ระบบบำบัดน้ำผิวดินระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) ที่ใช้ในการทดลอง

3.4.2.2 การเตรียมวัสดุตัวกลาง

- Super bioball เป็นวัสดุตัวกลางทำจากพลาสติก มีลักษณะเป็นทรงกลม มีรูพรุนทั่วทั้งลูกมีลักษณะผิวขรุขระ หยาบ และมีพื้นที่สำหรับจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะ



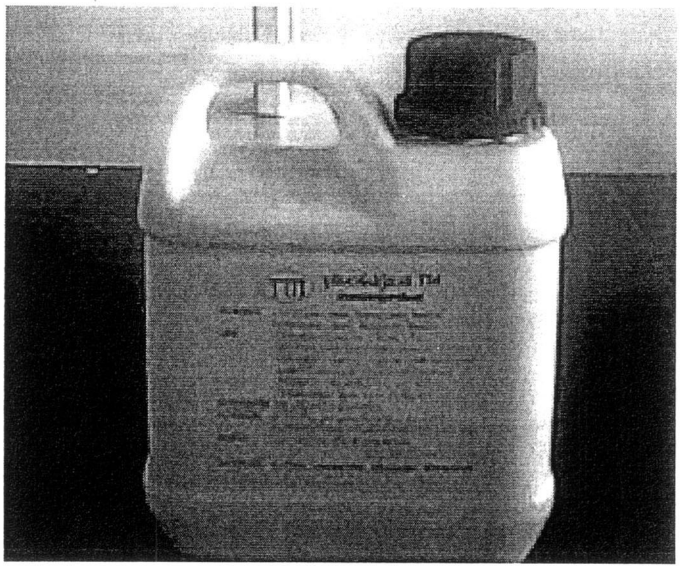
ภาพที่ 5 วัสดุตัวกลางพลาสติก (Super bioball) ที่ใช้ในการทดลอง

ที่มา : p- wholesale.com

3.4.2.3 การเตรียมน้ำหมักจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (Effective Microorganism) เป็นน้ำหมักที่ได้จากการหมักเศษพืช เศษอาหาร หรือแม้แต่โปรตีนจากสัตว์ผสมเข้าด้วยกัน ในตัวสารหมักจะประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยโปรตีนเพื่อกำจัดกลิ่นให้กับแหล่งน้ำและเสริมสร้างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำ จุลินทรีย์ในแหล่งน้ำจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ดำรงชีพโดยไม่ใช้ออกซิเจนและสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้เพื่อสร้างความสมดุลให้กับแหล่งน้ำ

น้ำสกัดชีวภาพต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. อินทรีย์คาร์บอน (Organism carbon) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนัก
2. ต้องไม่เจือปนด้วยปุ๋ยเคมี
3. ระดับการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity) ต้องไม่เกิน 10 dS/m.
4. ต้องปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ สัตว์ เป็นต้น



ภาพที่ 6 น้ำหมักจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการทดลอง

3.4.2.4 ศึกษาการสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบ

ดำเนินการเริ่มต้นระบบ โดยนำตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำผิวดินที่เก็บในข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในระบบบำบัดของชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ระบบละ 20 ลิตร จากนั้นทำการเปิดปั๊มน้ำแบบเปียกเพื่อให้น้ำไหลผ่านวัสดุตัวกลาง และทำศึกษาการสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถยึดเกาะบนวัสดุตัวกลางโดยวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างวัสดุตัวกลางครั้งละ 1 ชิ้น ใส่ลงฟลาสก์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร และทำการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการเขย่ามาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 10^{-1} - 10^{-8} จากนั้นนำน้ำกลั่นแต่ละความเจือจางมาทำการ Pour plate ในอาหาร Nutrient agar ความเจือจางละ 2 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร รายงานผลเป็น Colony Forming Units/ml. บันทึกผลลักษณะโคโลนีที่เจริญบน NA และนำมาย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำผิวดินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งทำการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำของชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำผิวดินของทั้ง 2 ระบบ โดยการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งจากวัสดุตัวกลางและน้ำในระบบจะทำการตรวจทุก 3 วัน ตั้งแต่เริ่มต้นระบบ เป็นเวลา 27 วัน

3.4.2.5 ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำผิวดิน

ใช้ตู้สำรองน้ำขนาด 20 ลิตร 1 ชุด (ขนาดเท่ากับที่ใช้ในชุดการทดลองที่ 1 และ 2) กำหนดให้เป็น ชุดการทดลองที่ 3 ตัวอย่างน้ำผิวดินที่เติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (Effective Microorganism) แต่ไม่มีการใช้วัสดุตัวกลาง และใช้ตู้สำรองน้ำขนาด 20 ลิตร 1 ชุด สำหรับใช้เป็นระบบบำบัดชุดที่ 4 ซึ่งเป็นชุดควบคุม คือ ตัวอย่างน้ำผิวดินที่ไม่มีการใช้วัสดุตัวกลางและไม่เติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ หลังการเติมตัวอย่างน้ำผิวดินทำการเก็บตัวอย่างน้ำในระบบของชุดการทดลองที่ 3 และชุดที่ 4 มาตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำผิวดินของทั้ง 2 ระบบ โดยการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งจากน้ำในระบบจะทำการตรวจทุก 3 วัน ตั้งแต่เริ่มต้นระบบ เป็นเวลา 27 วัน

3.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์โดยฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้น

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผิวดินจากระบบบำบัดทั้ง 4 ชุด นำมาตรวจวัดสมบัติทางเคมีบางประการของน้ำผิวดิน ทุก 3 วัน ตั้งแต่วันที่เริ่มต้นระบบ ถึงวันที่ 27 ของการทดลอง เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำผิวดิน ซึ่งได้แก่การตรวจวัดค่าดังต่อไปนี้

- ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธี Close reflux

- ค่าบีโอดี (Biological Oxygen Demand) ด้วยวิธีการน้ำขวดบีโอดีทั้งขวดใสและขวดสีดำเก็บน้ำตัวอย่างขวดใสใช้วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำของวันแรกที่เก็บน้ำตัวอย่าง ส่วนขวดสีดำใช้วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน