

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การทำการวิจัยครั้งนี้ดำเนินการในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา การทดลองดำเนินการ โดยใช้ขวดน้ำเกลือขนาด 1,000 mL และถังปฏิริยาขนาด 3,000 mL มีการควบคุมสภาวะการเจริญของสาหร่ายให้คงที่ แต่แปรผันความเป็นกรด-เบส ความเข้มข้นของสาหร่าย และความเข้มข้นของของแข็งละลายน้ำจาก Na_2SO_4 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองคือ *Chroococcus turgidus*, *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp.

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ชันวาทสาหร่ายที่ติดตั้งหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ และมอเตอร์ดูดอากาศ
2. ขวดน้ำเกลือขนาด 1000 mL
3. ถังปฏิริยาขนาด 3,000 mL
4. บีกเกอร์
5. ขวดปรับปริมาตร
6. อุปกรณ์ให้อากาศ
7. กระบอกตวง
8. ปิเปต
9. บิวเรต
10. หมอนั่งความดัน
11. ตู้อบ
12. เครื่องระเหยด้วยไอน้ำ
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง
14. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
15. pH meter โต๊ะ ยี่ห้อ EUTECH รุ่น CyberScan pH 510
16. เครื่องวัดความเข้มแสง
17. เครื่อง Ion Chromatography ยี่ห้อ DIONEX รุ่น LC 20 Chromatography Enclosure
18. กระดาษกรอง GF/C

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. NaNO_3
2. K_2HPO_4
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_{10}$
6. Ferric Ammonium Citrate
7. EDTA
8. Na_2CO_3
9. H_3BO_3
10. $\text{MnC}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
11. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
12. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
13. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
14. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
15. H_2SO_4
16. NaOH
17. Na_2SO_4 anhydrous

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการลดของแข็งละลายน้ำด้วยสาหร่าย เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้ปริมาณตามต้องการ จากนั้นนำสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมซักล้าง ซึ่งการดำเนินการทดลองแสดงเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเตรียมอาหาร (Media) และ สารละลาย

การเตรียมอาหารสูตร BG-11 เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงสาหร่ายโดยมีวิธีการเตรียมโดยใช้สารเคมี ดังตารางที่ 3-1 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3-1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11

สารเคมี	Stock Solution (g/L H ₂ O)	ปริมาณที่ใช้ (L ⁻¹)
Citric acid	6	1 ml
Ferric ammonium citrate	6	1 ml
NaNO ₃	-	1.5 ml
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40	1 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	1 ml
Na ₂ CO ₃	20	1 ml
MgNa ₂ EDTA·H ₂ O	1	1 ml
Trace metal solution	-	1 ml

ตารางที่ 3-2 ธาตุอาหารรองที่ใช้ในอาหารสูตร BG-11

สารเคมี	Stock Solution (g/L H ₂ O)	ปริมาณที่ใช้ (L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	-	2.860 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	1.810 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.220 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	79	1 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0.391 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4	1 ml

เมื่อเตรียมเสร็จนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. คุณสมบัติน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง แสดงดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 คุณลักษณะของน้ำทิ้งอุตสาหกรรมจากอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง

ส่วนประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง	ปริมาณ
pH	8.34
TDS	6,400 mg/l
Na ₂	2,774.56 mg/l
SO ₄ ⁻²	608.18 mg/l

3. สภาพที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่นำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้มี คือ *Chroococcus turgidus* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) สาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ซึ่งสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดเป็นสาหร่ายน้ำจืด ทำการทดลองภายใน อุณหภูมิห้อง 29 °C ความเข้มแสง 4000 Lux เวลาให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน

4. การเตรียมสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง

ก่อนการนำสาหร่ายไปใช้ในการทดลอง มีการทดลองเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาการเจริญของสาหร่ายในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายเจริญและแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว และเซลล์มีความแข็งแรงที่สุด การศึกษาทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

4.1 เลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 100 mg (dry weight)/L ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3,000 mL

4.2 วางถังถังปฏิกรณ์บนชั้นวางสาหร่ายที่มีความเข้มแสงเท่ากับ 4,000 Lux ให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 29 °C เดิมอากาศตลอด 24 ชั่วโมง

4.3 ตรวจสอบการเจริญของสาหร่ายโดย การวัดปริมาณน้ำหนักรวบรวม ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 20 วัน

4.4 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา กับ ปริมาณน้ำหนักรวบรวม

เมื่อทำการศึกษาการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด พบว่าสาหร่ายมีการเจริญระยะเอกซ์โพเนนเชียลในวันที่ 4-12 นับตั้งแต่เริ่มเลี้ยงสาหร่าย จึงได้เลือกการเจริญของสาหร่ายใน

ช่วงเวลาดังกล่าวมาทำการทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นจาก Stock culture ประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L

4.4.1 สาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. มีการเตรียมดังนี้

4.4.1.1 เตรียมชั้นวางสาหร่ายที่มีมีความเข้มแสงเท่ากับ 4,000 Lux มีการกำหนดให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 29 °C

4.4.1.2 ใส่อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 50 mL

4.4.1.3 เชื้อเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. จากหลอดเพาะเลี้ยงลงในขวดรูปชมพู่

4.4.1.4 เชื้อแล้วปิดด้วยสำลีนำไปวางบนชั้นสาหร่าย แล้วเขย่า 3 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 1 นาที รอกจนสาหร่ายปรากฏสีเขียวทั่วขวดรูปชมพู่ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์

4.4.1.5 ย้ายสาหร่ายจากขวดรูปชมพู่มาเพาะเลี้ยงในขวดเกลียวที่เติมอาหารประมาณ 750 มิลลิลิตร และเพิ่มการเติมอากาศตลอด 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของสาหร่ายและขยายพันธุ์เพิ่มจนได้ปริมาณสาหร่ายตามต้องการ (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) แล้วจึงนำสาหร่ายมาใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.2 สำหรับสาหร่าย *C. turgidus* มีการเตรียมดังนี้

4.4.2.1 เติมน้ำอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 ลงในขวดรูปชมพู่ (ความจุ 250 mL) ปริมาตร 90 mL

4.4.2.2 นำ *C. turgidus* ปริมาตร 10 mL ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยสำลี แล้วนำไปวางบนชั้นวางสาหร่าย ทำการเขย่าขวดรูปชมพู่ 3 ครั้ง/วัน ครั้งละ 1 นาที

4.4.2.3 หลังจากระยะเวลาผ่านไปประมาณ 1 สัปดาห์ ย้ายสาหร่ายจากขวดรูปชมพู่มาเพาะเลี้ยงลงในขวดน้ำเกลียว (ความจุ 1000 mL) ที่มีอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 700 mL ผสมกับสาหร่ายจากขวดรูปชมพู่ 100 mL ปิดด้วยสำลี แล้วนำไปวางบนชั้นวางสาหร่าย เติมน้ำอากาศตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 29 °C โดยให้แสงสว่างเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน มีความเข้มแสง 4000 Lux

4.4.2.4 ตรวจสอบการเจริญของสาหร่ายและขยายพันธุ์จนได้ปริมาณสาหร่ายตามต้องการ (ความเข้มข้น ประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) แล้วจึงนำสาหร่ายมาใช้ในการทดลองต่อไป

4.5 การศึกษา pH ที่เหมาะสมและผลกระทบของของแข็งทั้งหมดละลายน้ำ (Total Dissolved Solids, TDS) จากการเติมสาร Na_2SO_4 ต่อการกำจัด TDS ด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *C. turgidus*

4.5.1 นำอาหารสูตร BG-11 มาปรับ pH จำนวน 4 ระดับ คือ 3, 5, 7 และ 9 ด้วย NaOH และ H_2SO_4 ที่มีความเข้มข้น 1 N

4.5.2 ปรับอาหารสูตร BG-11 ให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ TDS โดยเติมสาร Na_2SO_4 จำนวน 4 ความเข้มข้น คือ 400, 600, 800, และ 1000 mg/L (จาก stock solution 100,000 mg/L Na_2SO_4 anhydrous)

4.5.3 นำอาหารสูตร BG-11 ที่ปรับ pH และความเข้มข้นของ Na_2SO_4 ปริมาตร 720 mL ผสมกับสาหร่ายจาก Stock culture ปริมาตร 80 mL (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) ในขวดน้ำเกลือขนาด 1,000 mL

4.5.4 นำขวดน้ำเกลือทั้งหมดไปวางไว้บนชั้นวางสาหร่าย เติมอากาศตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 29°C ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 4000 Lux โดยใช้อาหารเลี้ยงสาหร่าย (ไม่มีการเติมสาหร่าย) เป็นชุดควบคุม

4.5.5 การทดลองมีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 72 ชั่วโมง จำนวน 30 mL เป็นเวลาทั้งหมด 288 ชั่วโมง ตัวอย่างถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย pH และ TDS และไอออนประจุบวก ประจุลบ

4.5.6 ทำซ้ำสำหรับสาหร่ายแต่ละชนิด

4.6. การศึกษาปริมาณของสาหร่ายที่เหมาะสมสำหรับการกำจัด TDS ด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *C. turgidus*

4.6.1 กำหนด pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายจากการทดลองที่ 4 มาปรับเป็น pH เริ่มต้นของอาหารสูตร BG-11

4.6.2 ปรับอาหารสูตร BG-11 ให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ TDS โดยเติมสาร Na_2SO_4 จำนวน 4 ความเข้มข้น คือ 400, 600, 800, และ 1000 mg/L (จาก stock solution 100,000 mg/L Na_2SO_4 anhydrous)

4.6.3 นำอาหารสูตร BG-11 ที่ปรับ pH และความเข้มข้นของ Na_2SO_4 มาผสมกับสาหร่าย (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) ในขวดน้ำเกลือในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

อาหารสูตร BG-11 : สาหร่าย เท่ากับ 720 : 80 mL

อาหารสูตร BG-11 : สาหร่าย เท่ากับ 640 : 160 mL

อาหารสูตร BG-11 : สาหร่าย เท่ากับ 560 : 240 mL

อาหารสูตร BG-11 : สาหร่าย เท่ากับ 480 : 320 mL

4.6.4 นำไปวางบนชั้นวางสาหร่ายที่ความเข้มแสง 4000 Lux เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อวันที่อุณหภูมิ 29°C พร้อมเติมอากาศ 24 ชั่วโมง

4.6.5 การทดลองมีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 72 ชั่วโมง จำนวน 30 mL เป็นเวลาทั้งหมด 288 ชั่วโมง ตัวอย่างถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรวมของสาหร่าย, pH, TDS และไอออนประจุบวก ประจุลบ

4.7. การศึกษาผลกระทบของ TDS ต่อการเจริญของสาหร่ายในน้ำทิ้งอุตสาหกรรม

4.7.1 นำน้ำทิ้งที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 มาผสมน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water, DI) และสาหร่าย *Chlorella* sp. (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) และ *Scenedesmus* sp. (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg (dry weight)/L) ในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

น้ำทิ้ง : น้ำ DI : สาหร่าย เท่ากับ 800 : 0 : 100 mL

น้ำทิ้ง : น้ำ DI : สาหร่าย เท่ากับ 700 : 100 : 100 mL

น้ำทิ้ง : น้ำ DI : สาหร่าย เท่ากับ 600 : 200 : 100 mL

น้ำทิ้ง : น้ำ DI : สาหร่าย เท่ากับ 500 : 300 : 100 mL

4.7.2 ทำการเพาะเลี้ยงในขวดน้ำเกลือปริมาตร 1000 mL

4.7.3 การทดลองมีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 72 ชั่วโมง จำนวน 30 mL เป็นเวลาทั้งหมด 288 ชั่วโมง ตัวอย่างถูกนำไปตรวจวิเคราะห์น้ำหนักรวมของสาหร่าย, pH และ TDS

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ตรวจวิเคราะห์ไอออน ด้วยเครื่อง Ion Chromatography ยี่ห้อ DIONEX รุ่น LC 20 Chromatography Enclosure

2. ตรวจวัด pH ด้วยเครื่อง pH Meter แบบตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Eutech รุ่น CyberScan pH 510

3. ตรวจวัด TDS ด้วยเครื่องตรวจวัดค่า TDS แบบพกพา ยี่ห้อ EUTECH รุ่น EcoScan TDS 6+ และวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (APHA, 1995)

4. วัดอัตราการเจริญของสาหร่าย (น้ำหนักรวม) ด้วยวิธีการ TSS (APHA, 1995)