

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวัดพีเอช (pH – meter)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
4. แกนโลหะสำหรับเจาะ (cork borer)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น UNICAM UV – 500)
6. จานเพาะเชื้อ
7. ฟลาสก์ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
8. ไมโครปิเปต (Micropipet)
9. หลอดทดลองและหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก
10. ชุดวิเคราะห์ปริมาณ COD
11. ชุดวิเคราะห์ปริมาณ BOD
12. ชุดวิเคราะห์ปริมาณทีเอส
13. ชุดวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์
14. ชุดวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล
15. ชุดวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์
16. ชุดวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract agar (MEA)
2. Mineral medium (MM)
3. Plate count agar (PCA)
4. Nutrient agar (NA)

5. Nutrient broth (NB)
6. Potato dextrose broth (PDB)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ COD และ BOD
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์
3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาคาร์บอนไดออกไซด์
4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารประกอบฟีนอล
5. Cyclohexamide
6. Chloramphenicol
7. 5 – aminosalicylic acid
8. สารเคมีสำหรับเครื่อง HPLC

ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาการบำบัด

น้ำเสียจากบริษัท โมเดอร์น ไคสตัฟท์ แอนด์ พิกเมนทส์ จำกัด ซึ่งเป็นโรงงานที่ผลิตสีย้อมสำหรับจำหน่าย โดยใช้ตัวอย่างน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตสีย้อมจากบ่อพักน้ำเสียของโรงงาน โดยทำการเก็บน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสียที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการบำบัดต่าง ๆ

ตัวอย่างน้ำเสียและตะกอนน้ำเสียที่ใช้เป็นแหล่งคัดแยกจุลินทรีย์ น้ำเสียและตะกอนของน้ำเสียที่ใช้สำหรับคัดแยกจุลินทรีย์จะเก็บจากน้ำเสียและตะกอนของน้ำเสียในบ่อรวมน้ำเสียของบริษัท โมเดอร์น ไคสตัฟท์ แอนด์ พิกเมนทส์ จำกัด ซึ่งจะทำการเก็บน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการบำบัดใด ๆ เลย และทำการเก็บตะกอนของน้ำเสียจากบ่อเดียวกัน โดยทำการเก็บตะกอนภายใต้บ่อรวมน้ำเสีย

ตัวอย่างสีย้อมสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา

ได้แก่ สีย้อมสังเคราะห์ที่ผลิตโดยบริษัท โมเดอร์น ไคสตัฟท์ แอนด์ พิกเมนทส์ จำกัด จำนวน 22 ชนิด ซึ่งแบ่งสีย้อมที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. สีแอซิด (acid dyes) แบ่งเป็น 14 ชนิด ได้แก่
 - 1.1 A3c (สีน้ำตาลแดง)
 - 1.2 A3n (สีเลือดหมู)

- 1.3 A54 (สีม่วง)
- 1.4 A100 (สีเหลืองทอง)
- 1.5 A210 (สีส้มเข้ม)
- 1.6 L9b (สีเขียว)
- 1.7 L9c (สีเขียว)
- 1.8 L11 (สีเหลืองทอง)
- 1.9 L49 (สีน้ำตาล)
- 1.10 L7Y (สีแดง)
- 1.11 L52 (สีม่วง)
- 1.12 L78 (สีแดง)
- 1.13 L61 (สีเขียว)
- 1.14 L13 (สีแดง)
- 2. สีไดเรกต์ (direct dyes) แบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่
 - 2.1 D12 (สีเหลือง)
 - 2.2 D33 (สีบานเย็น)
 - 2.3 D100 (สีส้มเข้ม)
 - 2.4 D200 (สีส้มเข้ม)
- 3. สีรีแอคทีฟ (reactive dyes) แบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่
 - 3.1 R51 (สีน้ำเงิน)
 - 3.2 R81 (สีน้ำเงินเข้ม)
 - 3.3 R106 (สีเหลืองทอง)
 - 3.4 R300 (สีบานเย็น)

หมายเหตุ : 1. สีย้อมทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีโครงสร้างประกอบด้วยพันธะ $-N=N-$ จึงจัดเป็นสีย้อมประเภทสีอะโซ (บริษัท ไมเคอร์น ไดสตัฟท์ แอนด์ พิกเมนทส์ จำกัด)

2. ไม่ทราบโครงสร้างของสีย้อมแต่ละชนิด เนื่องจากเป็นความลับทางด้านการค้า

วิธีการทดลอง

การศึกษาคุณลักษณะทางเคมี กายภาพ และคุณลักษณะทางชีวภาพของน้ำเสียจากโรงงานผลิตสีย้อม

ทำการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสียตัวอย่าง ได้แก่ ค่าซีโอดี, บีโอดี, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, พีเอช, ปริมาณแก๊สไฮโดรเจนคลอไรด์ สีของน้ำเสียกับตัวอย่างแต่ละตัวอย่างดังนี้

1. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) (Dean, 1990)

- 1.1 ล้างหลอดทดลองที่ใช้สำหรับย่อยสลายตัวอย่างน้ำเสียและฝาจากด้วยกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์
- 1.2 เติมน้ำเสียตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
- 1.3 เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 6 มิลลิลิตร
- 1.4 ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเกรดเจเนต 14 มิลลิลิตร ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นของตัวอย่างน้ำ
- 1.5 ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง
- 1.6 นำไปรีฟลักซ์ในเตาอบ โดยใช้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 1.7 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปิดฝาจุกออกแล้วใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวน
- 1.8 เติมเฟอร์โรซีนอินดิเคเตอร์ 0.05 - 0.1 มิลลิลิตร
- 1.9 ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง
- 1.10 การคำนวณ ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) =
$$\frac{[(A-B) \times M \times 8000]}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตแบบลงค์

B คือ ปริมาตรของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำเสีย

M คือ โมลาริตีของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

2. บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) (Dean, 1990)

- 2.1 นำตัวอย่างน้ำเสียมาปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 20 องศาเซลเซียส
- 2.2 เติมอากาศในน้ำเสียให้มีออกซิเจนละลายจนอิ่มตัว

2.3 รินตัวอย่างน้ำเสียใส่ขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท และให้น้ำไหลที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนที่ละลายโดยใช้เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO meter) อีกสองขวดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงนำมาหาค่าออกซิเจนที่ละลายโดยใช้เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

2.4 การคำนวณ ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $D_1 - D_2$

เมื่อ D_1 คือ ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันแรก

D_2 คือ ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันที่ 5

3. ทีเอส (Total solid, TS) (คู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2532)

3.1 เตรียมจานระเหย โดยจานที่ใช้จะต้องสะอาด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 - 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง

3.2 รินตัวอย่างน้ำเสีย 50 หรือ 100 มิลลิลิตร ลงในจานระเหย และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 - 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

3.3 ชั่งน้ำหนักจานระเหยและของแห้ง

3.4 การคำนวณ ทีเอส (มิลลิกรัมต่อลิตร) =
$$\frac{[\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (B-A)} \times 1000]}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง}}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักแห้งของจานระเหย

B คือ น้ำหนักแห้งของจานระเหยและของแห้ง

4. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดพีเอชของน้ำเสียตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (คู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2532) หาโดยวิธีไทเทรตด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเทรต

5.1 นำตัวอย่างน้ำเสียมากรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1

5.2 เติมน้ำซิงค์ซัลเฟต 50 มิลลิกรัม ในน้ำตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดซัลไฟด์ จากนั้นเติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ 2 หยด คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

5.3 เติมน้ำแวนดอลยอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 3 มิลลิลิตร ในตัวอย่างน้ำจากข้อ 5.2 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

5.4 ปรับพีเอชของน้ำตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 7 - 10

5.5 เติมน้ำละลายโพแทสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์ 1 มิลลิลิตร ไทเทรตกับ

สารละลายซิลเวอร์ไนเตรด เมื่อถึงจุดยุติจะเกิดตะกอนสีขาวของซิลเวอร์โครเมต ในสารละลายสีเหลือง บันทึกปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดที่ใช้

5.6 ทำแบบลงคโดยใช้น้ำกลั่น แทนตัวอย่างน้ำเสีย

5.7 การคำนวณ คลอไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) =
$$\frac{[(A-B) \times 1000 \times 2.5]}{\text{ปริมาตรน้ำเสียตัวอย่าง}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดที่ใช้ไทเทรตกับน้ำเสีย

ตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดที่ใช้ไทเทรตกับแบบลงค

6. ความเข้มข้น (คู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2532) วัดความเข้มข้นของน้ำเสียโดยใช้วิธีเทียบกับ Platinum Cobalt Standard

6.1 นำน้ำเสียตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกของแข็งที่แขวนลอย

6.2 นำส่วนของเหลวมาใส่ในหลอดเนสเลอ (Nestler tube)

6.3 ทำการเปรียบเทียบสีกับสารละลายสีมาตรฐานที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ข)

6.4 การคำนวณ หน่วยสี = $(A \times 50) / V$

เมื่อ A คือ ค่าที่อ่านได้จากการเทียบสี

B คือ ปริมาตรของน้ำเสียตัวอย่างที่นำมาเจือจาง

7. หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count) ในน้ำเสียโดยวิธี dilution pour plate (Dean, 1990) ดังนี้

7.1 นำตัวอย่างน้ำเสียมาทำการเจือจางด้วย ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม

7.2 ใช้ปิเปต 1 มิลลิลิตร ตูดตัวอย่างน้ำเสียความเจือจางที่เหมาะสม ใส่ในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ

7.3 เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 12 - 15 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างน้ำเสียอยู่ ผสมให้เข้ากัน

7.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

7.5 นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และคำนวณค่า colony forming unit (CFU) ต่อ มิลลิลิตร

8. หาปริมาณราทั้งหมด (Total Mold Count) ในน้ำเสียโดยวิธี dilution pour plate (Dean, 1990) ดังนี้

8.1 นำตัวอย่างน้ำเสียมาทำการเจือจาง จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม

8.2 ให้ปิเปต 1 มิลลิลิตร ดูตัวอย่างน้ำเสียความเข้มข้นที่เหมาะสม ใส่ในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ

8.3 เติมหาสารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่ผสม chloramphenicol 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างน้ำเสียอยู่ ผสมให้เข้ากัน

8.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 – 72 ชั่วโมง

8.5 นับจำนวนของราทั้งหมด และคำนวณค่า colony forming unit (CFU) ต่อ มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ทุกการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

การเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสีย้อมโดยวิธี enrichment

1. ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย โดยวิธีการถ่ายเชื้อเป็นลำดับ ดังนี้ เติมตะกอนน้ำเสียจากบ่อกักน้ำเสียโรงงานผลิตสีย้อม 10 กรัม ในน้ำเสีย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำ ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

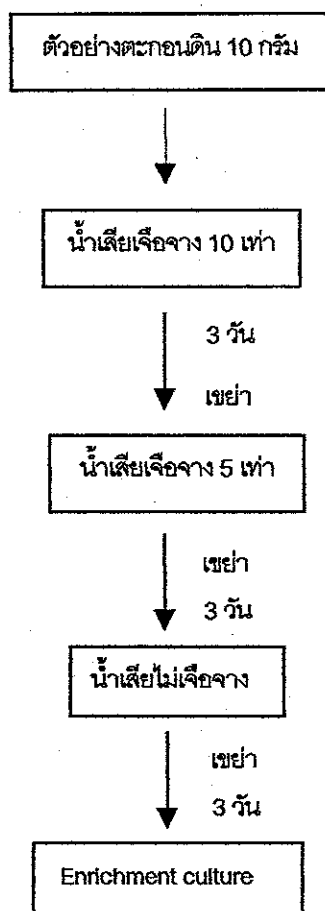
3. ถ่ายตัวอย่างน้ำเสียจากข้อ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำเสีย ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่เจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำ และบ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 3 วัน

4. ถ่ายตัวอย่างน้ำเสียจากข้อ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำเสียที่ไม่เจือจาง และนำไปบ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 3 วัน

5. บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยสังเกตการจางลงของสีน้ำเสียตามวิธีในภาคผนวก ข

หมายเหตุ : ทำชุดควบคุมควบคู่ไปด้วยโดยไม่เติมตะกอนดินในน้ำเสีย และบ่มที่สภาวะเดียวกัน วัดค่าพีเอช ซีโอดี บีโอดี และความเข้มข้นของน้ำเสียตามวิธีในข้อ 1

สำหรับขั้นตอนในการถ่ายเชื้อเป็นลำดับเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย สรุปได้ดังแผนภูมิในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการถ่ายเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย

การนับจำนวนและการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียที่เพิ่มจำนวนได้

1. จำนวนและชนิดของแบคทีเรีย

1.1 นับจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียหลังการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 โดยวิธี dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมโซเดียมคลอไรด์ 50 กรัมต่อลิตร และผสม cyclohexamide 0.1 กรัมต่อลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ และคำนวณค่า colony forming unit ต่อตัวอย่างน้ำเสีย 1 มิลลิลิตร

2. จำนวนและชนิดของเชื้อรา

2.1 นับจำนวนแบคทีเรียในน้ำเสียหลังการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 โดยวิธี dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสมโซเดียมคลอไรด์ 50 กรัมต่อลิตร และผสมยาปฏิชีวนะ chloramphenicol 0.2 กรัมต่อลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ และคำนวณค่า colony forming unit ต่อตัวอย่างน้ำเสีย 1 มิลลิลิตร

การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางสารอาหารต่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตสีย้อม โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

1. การเตรียมหัวเชื้อของจุลินทรีย์

1.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อเป็นลำดับลงในน้ำเสียที่ไม่ได้เจือจางในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

1.2 บ่มเพาะในสภาวะที่มีการเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ผลของการให้อากาศ

2.1 เติมหหัวเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำเสียปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ทำการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ชุดที่ 2 ทำการเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ชุดที่ 3 ทำการเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และหลังจากนั้นเลี้ยงต่อในสภาวะไม่เขย่าเป็นเวลา 8 วัน

ชุดที่ 4 ทำการเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และจากนั้นเลี้ยงต่อในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน

2.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียในแต่ละชุดโดยวัดความเข้มสีทุกวัน และหาอัตราการลดลงของสี (% decolourization) ของน้ำเสีย

2.3 เมื่อครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช ซีไอดี และบีไอดี ของน้ำเสีย

2.4 เปรียบเทียบผล และเลือกสภาวะการบ่มที่ทำให้หัวเชื้อจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3. ผลของปริมาณหัวเชื้อ

3.1 เติมหหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในน้ำเสียให้มีความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

3.2 นำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม (ที่ได้จากข้อ 2)

3.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยวัดความเข้มข้นของน้ำเสียและหาอัตราการลดลงของสีของน้ำเสียทุกวัน

3.4 เมื่อครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช บีโอดี และซีโอดี ของน้ำเสีย

3.5 เปรียบเทียบผล และเลือกอัตราการเติมหหัวเชื้อที่ทำให้จุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด

4. ผลของค่าพีเอชของน้ำเสีย

4.1 เติมหหัวเชื้อที่เตรียมได้ในอัตราส่วนที่ได้จากข้อ 3 ลงในน้ำเสียที่ปรับพีเอชเป็น 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

4.2 นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 2)

4.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยวัดค่าพีเอช และวัดความเข้มข้นของน้ำเสียและหาอัตราการลดลงของสีของน้ำเสียทุกวัน

4.4 เมื่อครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช บีโอดี และซีโอดี ของน้ำเสีย

4.5 เปรียบเทียบผล และเลือกค่าพีเอชที่ทำให้จุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด

5. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

5.1 เติมหหัวเชื้ออัตราส่วนที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 3) ลงในน้ำเสียที่ปรับปริมาณของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เป็น 5, 6, 7 และ 8 เปอร์เซ็นต์

5.2 นำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 2)

5.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยวัดความเข้มข้นของน้ำเสียและหาอัตราการลดลงของสีของน้ำเสียทุกวัน

5.4 เมื่อครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช บีโอดี และซีโอดี ของน้ำเสีย

5.5 เปรียบเทียบผล และเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้จุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด

6. ผลของการเติมแหล่งคาร์บอน

- 6.1 เติมห้วเชื้ออัตราส่วนที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 3) ลงในน้ำเสียที่เติมกลูโคส ซูโครส หรือกากน้ำตาล ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร
- 6.2 นำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 2)
- 6.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยวัดความเข้มข้นของน้ำเสียและหาอัตราการลดลงของสีของน้ำเสียทุกวัน
- 6.4 เมื่อบ่มครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช บีโอดี และซีโอดี ของน้ำเสีย
- 6.5 เปรียบเทียบผล และเลือกแหล่งคาร์บอนที่ทำให้จุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด

7. ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจน

- 7.1 เติมห้วเชื้ออัตราส่วนที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 3) ลงในน้ำเสียที่เติมยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร
- 7.2 นำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 2)
- 7.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำเสียโดยวัดความเข้มข้นของน้ำเสียและหาอัตราการลดลงของสีของน้ำเสียทุกวัน
- 7.4 เมื่อบ่มครบ 9 วัน วัดค่าพีเอช บีโอดี และซีโอดี ของน้ำเสีย
- 7.5 เปรียบเทียบผล และเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้จุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียได้ดีที่สุด

หมายเหตุ : 1. ทุกชุดการทดลองจะเตรียมชุดควบคุมที่เป็น killed cells ซึ่งได้จากการนำหัวเชื้อไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และชุดที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ทำการเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน ควบคุมไปด้วย

2. ทำการทดลอง 3 ชุด และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

การศึกษาการย่อยสลายสีย้อมอุตสาหกรรมกลุ่มอะโซ โดยจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย

สีย้อมอุตสาหกรรมที่เลือกทดสอบมีจำนวนทั้งสิ้น 22 ชนิด โดยแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ สีย้อมอะซิด, สีย้อมรีแอคทีฟ และสีย้อมไดเรกต์ โดยสีย้อมทั้งหมดผลิตจากโรงงานผลิตสีย้อมที่เป็นแหล่งของการวิจัยนี้

1. การเตรียมสารละลายสีย้อม

1.1 เตรียมสารละลายสีย้อมแต่ละชนิดความเข้มข้น 0.1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยชั่งผงสีย้อมน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้สีย้อมละลายได้สมบูรณ์

1.2 นำสารละลายสีย้อมที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 และ Whatman No.1 ตามลำดับ และกรองด้วยแผ่นเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตรอีกครั้งหนึ่ง

1.3 เก็บสารละลายสีในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยอย่าให้ถูกแสงแดด

2. การหาค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีย้อม

2.1 นำสารละลายสีย้อมแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น ระหว่าง 200 – 800 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.2 บันทึกค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีย้อมแต่ละชนิด

3. การทดสอบการย่อยสลายสีย้อมโดยจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย

3.1 เตรียมฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายสีย้อมแต่ละชนิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.2 เติมห้วเชื้อจุลินทรีย์ลงในสารละลายสีย้อม นำไปบ่มเป็นเวลา 9 วัน ที่สภาวะที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 2) สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของสีย้อม

3.3 นำสารละลายสีย้อมจากข้อ 3.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร

3.4 บันทึกผลค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารละลายสีย้อมในวันที่ 0 และวันที่ 9

3.5 หาอัตราการลดลงของสีแต่ละชนิด (% decolourization)

หมายเหตุ : 1. ทำการทดลองชุดควบคุมโดยเติมน้ำกลั่นแทนหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็น killed cells ควบคู่ไปด้วย

2. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

การศึกษาสารประกอบและผลิตภัณฑ์บางชนิดที่เกิดจากการย่อยสลายสีย้อมกลุ่มอะโซ โดยจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย

ในการศึกษานี้จะทำการวิเคราะห์หาสารประกอบต่าง ๆ ที่คาดว่าจะเกิดจากการย่อยสลายสีย้อมอุตสาหกรรมที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสีย้อมกลุ่มอะโซ โดยหลังจากการเจริญของจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย ซึ่งได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟีนอล โดยเลือกทำการวิเคราะห์ในสีย้อมประเภทละ 2 ชนิดที่ถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสีย ดังนี้

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Box, 1983)

1.1 ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์บำบัดน้ำเสียในสารละลายสีย้อมแต่ละชนิดตามขั้นตอน

ในการศึกษาการย่อยสลายสีย้อมกลุ่มอะโซ

1.2 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

เก็บส่วนใส

1.3 เติมสารละลาย Na_2CO_3 (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.4 เติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ resorcinol เป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

หมายเหตุ : ทำการทดลองชุด blank ควบคู่ไปด้วย โดยเติมหัวเชื้อในน้ำกลั่นแทนสารละลายสีย้อมและตรวจวัดสารประกอบฟีนอลเช่นเดียวกัน