บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตะกอนเร่ง

- ขวดเก็บตัวอย่าง

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีน

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- ขวดซีรัม
- butyl rubber stopper
- aluminium crimp
- กระบอกฉีดยา
- เข็มฉีดยา
- eppendorf tube

3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์

- UV/VIS Spectrophotometer

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) และโซเดียมคลอไรด์

- เตาอบ
- หลอดทดลองที่ทำด้วยบอโรซิลิเกตพร้อมฝาที่บุด้วย Teflon
- บิวเรต

5. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอสเอส (Suspended Solids, SS) และทีดีเอส (Total Dissolved Solids, TDS)

- เตาอบ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ปั๊มดูดอากาศ
- กรวยบุคเนอร์

- กระดาษกรอง GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร
- ถ้วยระเหย

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์

- สารละลายกรดซัลฟานิลิก
- สารละลายแนพทิลลามีน ไฮโดรคลอไรด์
- สารละลายโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 2 โมล/ลบ.ดม.
- สารละลายสต๊อกไนไตรท์
- สารละลายอีดีทีเอ

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท

- สารละลายโซเดียมคลอไรด์
- สารละลายสต๊อกไนเตรท
- สารละลายกรดซัลฟิวริก
- สารละลายบรูซีน - กรดซัลฟานิลิก

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี

- สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต
- กรดซัลฟิวริกรีเอเจนต์
- เฟอโรอิน อินดิเคเตอร์
- สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

4. สารเคมีสำหรับวิเคราห์หาปริมาณโซเดียมคลอไรด์

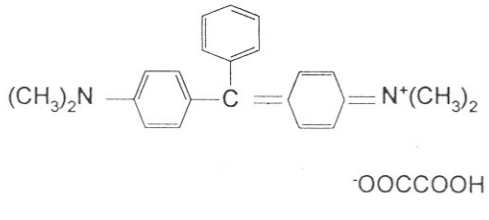
- สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท
- สารละลายโพแทสเซียมโครเมต อินดิเคเตอร์

5. สีย้อมสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา

- สีมาลาไคน์กรีน (Malachite green) (C.I. 42000) ยี่ห้อ Ajax

สูตรโมเลกุล $C_{25}H_{26}N_2O_4$

สูตรโครงสร้าง



วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตะกอนเร่ง เก็บตัวอย่างตะกอนเร่งโดยใช้กระป๋องน้ำตักจากบ่อเติมอากาศแบบคลองวนเวียนของบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงบำบัดน้ำเสียแสนสุขใต้ จ.ชลบุรี

2. การ Acclimated ตะกอนเร่ง โดยก่อนที่จะนำจุลินทรีย์ผสมจากตะกอนเร่งมาใช้ในการย่อยสลายสีย้อม ทำการเลี้ยงเชื้อให้คุ้นเคยกับแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในแต่ละสภาวะที่จะทำการศึกษาคือ

2.1 สภาวะแอโรบิก เติมแหล่งคาร์บอนชนิดที่มี Aromatic ring ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสีโดยเติมโซเดียมเบนโซเอทให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ โดยเติมทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน

2.2 สภาวะแอโนบิกดีไนตริฟิเคชั่น ทำเหมือนข้อ 2.1 และเติมแหล่งไนโตรเจนโดยเติมโพแทสเซียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ โดยเติมทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน

2.3 สภาวะดีไนตริฟิเคชั่น ในสภาวะนี้ต้องทำให้ตะกอนเร่งอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมแหล่งคาร์บอนชนิดที่มี Aromatic ring โดยเติมโซเดียมเบนโซเอทให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และเติมโพแทสเซียมไนเตรทให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ โดยเติมทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน

2.4 สภาวะเมททาโนจีนิก ในสภาวะนี้ต้องทำให้ตะกอนเร่งอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมแหล่งคาร์บอนชนิดที่มี Aromatic ring โดยเติมโซเดียมเบนโซเอทให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตให้มีความเข้มข้นในตะกอนเร่งเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ โดยเติมทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน

หมายเหตุ วัดค่า pH ของตะกอนเร่งทั้งก่อนและหลังการ Acclimated

3. วิเคราะห์หาปริมาณสลัดจ์ (Sludge Volume Index) วิเคราะห์หาปริมาณสลัดจ์หลังจาก Acclimated ตะกอนเร่งเป็นเวลา 1 เดือน วิเคราะห์ในทุกสภาวะตามวิธีของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535)

4. เตรียมสารละลายสีมาลาไคน์กรีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

5. การศึกษาการย่อยสลายสีย้อมโดยใช้จุลินทรีย์ผสมจากตะกอนเร่ง

5.1 ศึกษาการย่อยสลายสีอะโซภายใต้สภาวะแอโรบิก โดยนำขวดซีรัมขนาด 100 มล. มา 7 ขวด แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ

5.1.1 ชุดไร้เชื้อ 2 ขวด เติมตะกอนเร่ง 44 มล. และปิดฝาขวดด้วย butyl rubber stopper และ aluminum crimp นำไปฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง 3 วันติดต่อกันหลังจากนั้นเติมสารละลายสีมาลาไคน์กรีนลงไป 5 มล. และโซเดียมคลอไรด์ 7% ปริมาตร 1 มล.

5.1.2 ชุดควบคุม 2 ขวด เติมตะกอนเร่ง 44 มล. และโซเดียมคลอไรด์ 7% ปริมาตร 1 มล. และปิดฝาขวดด้วย butyl rubber stopper และ aluminum crimp (ไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อและไม่ต้องเติมสารละลายสีมาลาไคน์กรีน)

5 .1.3 ชุดทดลอง 3 ขวด เติมตะกอนเร่ง 44 มล. และโซเดียมคลอไรด์ 7% ปริมาตร 1 มล. และเติมสารละลายสีมาลาไคน์กรีนลงไป 5 มล. และปิดฝาขวดด้วย butyl rubber stopper และ aluminum crimp

เมื่อเตรียมชุดทดสอบเรียบร้อยแล้ว ทำให้ช่องว่างส่วนบน (headspace) ในขวดซีรัมมีความดันภายในเท่ากับศูนย์ด้วยเข็มฉีดยา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีย้อม และเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันแรกของการทดลอง (day 0) เพื่อศึกษาการย่อยสลายสีย้อมของจุลินทรีย์ผสมในช่วงเวลาต่าง ๆ

5.2 ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมภายใต้สภาวะแอโรบิกดีไนตริฟิเคชั่น เตรียมชุดทดสอบเหมือนกับสภาวะแอโรบิก แต่เปลี่ยนจากเติมโซเดียมคลอไรด์ 7% เป็นเติมโพแทสเซียมไนเตรท 250 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มล. แทน และนำตัวอย่างมาทดสอบหาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์

5.3 ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมภายใต้สภาวะดีไนตริฟิเคชั่น เตรียมชุดทดสอบเหมือนกับสภาวะแอโรบิกดีไนตริฟิเคชั่น และทำให้ตะกอนเร่งอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 20 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีย้อมและเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันแรกของการทดลอง (day 0) มาทดสอบหาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์เพื่อศึกษาการย่อยสลายสีย้อมของจุลินทรีย์ผสมในช่วงเวลาต่าง ๆ

5.4 ศึกษาการย่อยสลายสีย้อมภายใต้สภาวะเมททาโนจีนิก เตรียมชุดทดสอบเหมือนกับสภาวะดีไนตริฟิเคชั่น แต่เปลี่ยนจากเติมโพแทสเซียมไนเตรท 700 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มล. เป็นเติมไบคาร์บอเนต 700 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มล.แทน และไม่ต้องหาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์

6. การติดตามผลการทดลองหลังจากศึกษาการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีนในขวดซีรัม

6.1 บันทึกสีและลักษณะตะกอนของสลัดจ์

6.2 ถ่ายรูปเพื่อบันทึกสีมาลาไคน์กรีนที่เปลี่ยนแปลงไป

6.3 การวัดปริมาณแก๊ส จะใช้หลอดฉีดยาที่เป็นแก้ว โดยนำกระบอกสูบมาหล่อด้วยน้ำเพื่อลดแรงเสียดทานระหว่างกระบอกสูบกับกระบอกฉีด หลังจากนั้นนำหลอดฉีดยาแก้วไปวัดแก๊ส ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นกระบอกสูบจะถูกดันขึ้นเกิดช่องว่างภายในหลอดฉีดยา แล้วอ่านค่าปริมาณแก๊สที่เกิด

6.4 การเก็บตัวอย่าง ในการเก็บตัวอย่างจะใช้เข็มฉีดยาเก็บตัวอย่างออกมาประมาณ 1.5 มล. ใส่ลงใน eppendorf tube แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ

6.5 การวิเคราะห์ผล วิเคราะห์ผลจากตัวอย่างเพื่อหาปริมาณไนเตรท, ไนไตรท์และนำตัวอย่างมา scan หาค่าแอบซอพแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 320-900 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 616.9 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารคงเหลือ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในวันที่ต้องการทราบ}}{\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในวันเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

7. การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ที่อยู่ในสารตัวอย่าง

7.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท ได้ทำการประยุกต์วิธีการทดลองของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือทำการเจือจางตัวอย่างให้เป็น 40 เท่า โดยการ

7.1.1 ดูดตัวอย่างจริง 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 7% ปริมาตร 1,950 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดในหลอดทดลองเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร

7.1.2 นำไปทำให้เย็นโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง

7.1.3 เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 2,000 ไมโครลิตร

7.1.4 นำไปแช่ต่อในอ่างน้ำแข็งอีกครั้งจนเกิดสีแล้วนำไปวัดค่าทรานสมิทแตนท์ (%T) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร จะได้เป็นค่าแบลงค์ของแต่ละตัวอย่าง

7.1.5 นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง เติมสารละลายบรูซีน- กรดซัลฟานิลิก 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.1.6 นำไปแช่ในเครื่องอังไอน้ำที่มีอุณหภูมิคงที่ไม่ต่ำกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้อุณหภูมิลดลงจนเท่าอุณหภูมิห้องจึงนำไปวัดค่าทรานสมิทแตนท์

7.1.7 นำค่าที่ได้ไปหักกับค่าแบลงค์ที่วัดได้ครั้งแรกของแต่ละตัวอย่าง นำค่าทรานสมิทแตนท์ (%T) ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ ได้ทำการประยุกต์วิธีการทดลองของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือทำการเจือจางตัวอย่างให้เป็น 50 เท่า โดยการ

7.2.1 ดูดตัวอย่างจริง 48 ไมโครลิตร เจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 7% ปริมาตร 2,352 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดในหลอดทดลองเท่ากับ 2,400 ไมโครลิตร

7.2.2 เติมสารละลายอีดีทีเอ 16 ไมโครลิตร และกรดซัลฟานิลิก 16 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 3-10 นาที

7.2.3 จากนั้นนำมาเติมน้ำยาแนฟทิลลามินไฮโดรคลอไรด์ 16 ไมโครลิตร และโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ 16 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที จะเกิดสีม่วงแดง

7.2.4 นำไปวัดค่าทรานสมิทแตนท์ (%T) ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

8. เปรียบเทียบผลการศึกษาการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีนโดยตะกอนเร่งภายใต้สภาวะทั้ง 4 สภาวะ ในการศึกษาการย่อยสลายช่วงแรกจะเปรียบเทียบการลดลงของสีมาลาไคน์กรีนโดยตะกอนเร่งภายใต้สภาวะทั้ง 4 สภาวะ จากการสังเกตด้วยตาเปล่าจากขวดซีรัมว่าสีมาลาไคน์กรีนมีความเข้มลดลงหรือไม่ หลังจากสังเกตความเข้มของสีแล้วจะทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกผลการทดลองเก็บไว้ หลังจากเก็บรวบรวมผลการศึกษาได้ช่วงเวลาหนึ่ง นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบความเข้มของสีมาลาไคน์กรีนดังนี้

8.1 เปรียบเทียบสีมาลาไคน์กรีนระหว่างชุดไร้เชื้อและชุดทดลองในแต่ละสภาวะ

8.2 เปรียบเทียบสีมาลาไคน์กรีนชุดทดลองของทุกสภาวะ

8.3 นำตัวอย่างมา scan เพื่อหาค่าแอบซอพแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 320 – 900 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 616.9 นาโนเมตร

8.4 จากผลการทดลองข้อ 8.1 ถึง 8.3 เลือกสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถลดปริมาณสีมาลาไคน์กรีนได้มากที่สุดและใช้เวลาสั้นที่สุด

9. จากข้อ 8 เมื่อเลือกสภาวะที่ดีที่สุดแล้ว 1 สภาวะ เมื่อเลือกสภาวะที่ดีที่สุดได้ 1 สภาวะแล้ว ทำการทดลองซ้ำอีกหนึ่งครั้งตั้งแต่ข้อ 5-7 แต่ทำการศึกษา 7 วัน และทำการวิเคราะห์ผลการย่อยสลายเพิ่มเติมดังนี้

9.1 นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้

ยี่ห้อเครื่อง : Hewlett Packard Series 1100

Detector : UV 254 นาโนเมตร

Column : XDB-C18 4.6 × 150 mm 5 – Micron

Mobile phase : Methanol : H_2O (Acetic acid 0.02 %)

Flow rate : 0.3 มล./นาที

Injection Volume: 20 ไมโครลิตร

Runtime : 22 นาที

การวิเคราะห์ตัวอย่างใช้วิธี gradient elution โดยเริ่มต้นที่ 0% Methanol: 100% H_2O (Acetic acid 0.02%) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที เครื่องจะมีการทำงานแบบ gradient เป็น 20% Methanol: 80% H_2O (Acetic acid 0.02%)

9.2 นำตัวอย่างจากขวดซีรัมมาวิเคราะห์ค่าแอบซอพแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 616.9 นาโนเมตร, ค่าซีโอดี, เอสเอส, ทีดีเอส และโซเดียมคลอไรด์

10. การวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี, เอสเอส, ทีดีเอสและโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในสารตัวอย่าง

10.1 การวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี ได้ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (close reflux)

10.2 การวิเคราห์ปริมาณเอสเอสและทีดีเอส ได้ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535)

10.3 การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ได้ทำการประยุกต์วิธีการทดลองของธงชัย พรรณสวัสดิ์ และอุษา วิเศษสุมน (2535) โดยวิธีซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

10.3.1 ดูดตัวอย่างน้ำ 1 มล.

10.3.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์ 10 ไมโครลิตร ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรตที่จุดยุติจะเกิดตะกอนสีอิฐของซิลเวอร์โครเมตในสารละลายสีเหลือง

10.3.3 ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนตัวอย่างน้ำ

การคำนวณ

มก./ลบ.คม. โซเดียมคลอไรด์ = (A-B) x 1000 x 1.65

เมื่อ A = ลบ.ซม. ของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่างน้ำ

B = ลบ.ซม. ของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์

11. จากข้อ 9 นำส่วนใสที่มีสีมาย่อยสลายต่อภายใต้ 3 สภาวะ (ขั้นที่ 2) โดยนำส่วนใสที่มีสีจากข้อ 9 มาย่อยสลายต่อภายใต้ 3 สภาวะที่ไม่ได้เลือก โดยใช้อัตราส่วน 1:3 คือ น้ำส่วนใสที่มีสีจากข้อ 9 จำนวน 1 ส่วนต่อตะกอนเร่ง 3 ส่วน ซึ่งทำการย่อยสลายเหมือนข้อ 5 เป็นเวลา 7 วัน และทำการวิเคราะห์ผลการย่อยสลายเหมือนข้อ 9 และ 10

12. จากผล HPLC ทำการแปลผลเพื่อศึกษาการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีน

12.1 สังเกตจากพีคที่เกิดขึ้นของสารตัวอย่างตั้งแต่วันที่เริ่มต้นการทดลองจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง สังเกตว่าขนาดของพีคเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ทั้งในชุดไร้เชื้อและชุดทดลอง เพื่อศึกษาการย่อยสลายของสีมาลาไคน์กรีนว่าเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์หรือเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี

12.2 สังเกตจากพีคที่เกิดขึ้นของสารตัวอย่างเทียบกับเวลาการเกิดพีคมาตรฐานของสีมาลาไคน์กรีน สังเกตว่ามีพีคของสารตัวอย่างที่เวลาเดียวกันกับมาตรฐานสีเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ เช่น พีคมีขนาดความกว้างและความสูงเปลี่ยนไป หรือเกิดพีคที่เวลาใหม่เกิดขึ้นที่ต่างจากวันที่เริ่มต้นการทดลอง เพื่อศึกษาการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีนโดยจุลินทรีย์

12.3 ในขั้นที่ 2 ทำการเปรียบเทียบผลของ HPLC ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ทั้ง 3 สภาวะ เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมสามารถย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีนที่ยังคงเหลือจากสภาวะแรก

12.4 เปรียบเทียบผลของ HPLC ของชุดทดลองในแต่ละสภาวะในขั้นที่ 2 เพื่อศึกษากลไกการย่อยสลายสีมาลาไคน์กรีนว่าในสภาวะต่าง ๆ มีกลไกการทำงานแตกต่างกันหรือไม่