บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเรื่องนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ซึ่งมีสถานที่ในการศึกษาและเก็บข้อมูล รวมทั้งขั้นตอนและวิธีการ ตามลำดับดังนี้

การเลือกพื้นที่ศึกษา ได้แก่ ตึกดองร่างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

สถานที่ในการศึกษา ได้แก่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เป็นส่วนใหญ่ และการเก็บข้อมูลในพื้นที่ศึกษา

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1.1 ชุดอุปกรณสำหรับเลี้ยงเชื้อ จานเพาะเชื้อ ขวดรูปชมพู่ ห่วงเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ และตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

1.2 ชุดอุปกรณ์สำหรับย้อมแกรม แผ่นสไลด์ กระดาษซับ และสีย้อมแกรม

1.3 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ ขวดปรับปริมาตร ปิเปตปรับปริมาตรหลอดทดลอง เก็บตัวอย่างขวดสีชา และชุดไตเตรต

1.4 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตกตะกอน(SVI) กระบอกตวง กระดาษกรอง กรวยกรอง และกระจกนาฬิกา

1.5 ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี ขวดกลมก้นแบนชนิดที่มีปากแบบกราวจอยท์ด้านในขนาด 24/40 ชุดไตเตรต เม็ดแก้ว

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

2.1 หม้อนึ่งความดันไอ

2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2 กล้องจุลทรรศน์

2.3 Micrometer

2.4 เครื่อง centrifuge

2.5 เครื่อง spectrophotometer

2.6 เครื่อง pH meter

2.7 เครื่อง lamina air flow

2.8 ตู้อบ hot air oven

2.9 เครื่อง water bath

2.10 เครื่อง shaker

2.11 ตู้เย็น -80 °C

2.12 ถังบำบัด Sequencing Batch Reactor

2.13 เตาไฟฟ้าชนิด 6 หลุม

2.14 เครื่องควบแน่นซึ่งมีแจ็คเก็ตขนาด 300 มิลลิลิตร มีกราวจอยท์ด้านนอกขนาด 24/40

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารเคมี

1.1 Acetyl acetone

1.2 1M Na_2SO_3

1.3 1M NaOH

1.4 1N HCl

1.5 0.1M NaOH

1.6 Thymolphthalein indicator

1.7 Phenolphthalein indicator

1.8 1N H_2SO_4

1.9 3% H_2O_2

1.10 0.5% Tetramethyl paraphenylen diamine hydrochloride

1.11 Kovic's reagent

1.12 สารละลายทดสอบ Nitrate reduction Test

1.13 0.25N Potassium dichromate standart solution

1.14 Sulfuric reagent

1.15 Feroin indicator

1.16 0.1N Ferrus ammonium sulfate standart solution

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 YM medium Agar

2.2 Formaldehyde enrichment medium I (FMI) Agar

2.3 Formaldehyde enrichment medium II (FMII) Agar

2.4 Tryptic Soy Agar (TSA)

2.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

2.6 Nutrient agar (NA)

2.7 Motility test medium

2.8 Tryptone Broth

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติ

1.1 เก็บตัวอย่างจาก 4 แหล่งตัวอย่างที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถใช้ฟอร์มาลดีไฮด์อาศัยอยู่ คือ น้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่ น้ำในบ่อพักน้ำเสียอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ ดินบริเวณรอบบ่อพักน้ำเสียจากอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ และตะกอนจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ มาทำการเจือจางตัวอย่างครั้งละ 10 เท่า ด้วยสารละลาย 0.1% peptone water โดยใช้หลอดทดลองจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5} เท่า

1.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างเจือจาง ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2},10^{-3},10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ใช้เทคนิค spread plate ลงบนอาหารแข็ง Formaldehyde enrichment medium I และ YM medium ที่มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ 150 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.3 เลือกโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารที่มีลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องที่ต่างกัน ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้อาหาร TSA

1.4 เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร TSB+15% glycerol และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่สูงที่สุด

2.1 นำเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้ในข้อที่ 1 มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง Formaldehyde enrichment medium I และ YM medium ที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 450 600 750 900 1,050 1,200 1,350 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เทคนิค streak plate บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.2 เลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณที่สูง เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่ดีที่สุด

3.1 เตรียมน้ำเสียให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมธาตุอาหารเพิ่มเติมลงไปตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium II

3.2 นำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนบนอาหาร TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารแข็งไปทำเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอย (Microbial cells suspension) ในสารละลาย 0.1% peptone water

3.3 เติมเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยที่เตรียมได้ลงในน้ำเสียที่เตรียมไว้ให้มีค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

3.4 นำไปเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 0 12 24 และ 36 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ โดยใช้การวัดการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยเครื่อง Spectrophotometer ตามหลักการของ Hantzsch reaction (Nash, 1953) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อโดยการนำความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละช่วงเวลาหารด้วยความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นคูณหนึ่งร้อย และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อและกราฟแสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์

3.5 เลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอัตราการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่ดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นต่อไป

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยการทดลองแบบครั้งคราว (Batch)

4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

4.1.1 นำเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เลี้ยงบนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.1.2 เก็บเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งเพื่อทำเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยโดยใช้ 0.1% peptone water ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ให้มีค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5.0

4.2 การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.2.1 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบ โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตรและปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้ได้ค่าพีเอชแตกต่างกัน ดังนี้ คือ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0

4.2.2 เติมเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 4.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium II ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับ 0.5) และมีชุดทดลองควบคุม (Control) การสลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจเกิดขึ้นจากการเขย่าให้อากาศและจากเชื้อประจำถิ่นภายในน้ำเสียในแต่ละค่าพีเอชซึ่ง จะบรรจุน้ำเสียเพียงอย่างเดียว

4.2.3 เขย่าให้อากาศภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยควบคุมให้มีอัตราเร็วในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบ/นาที

4.2.4 เก็บตัวอย่าง ทุกๆ 0 1 3 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 15 มิลลิลิตร เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อ นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อและกราฟแสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์

4.3 การศึกษาอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.3.1 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบ โดยปรับเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร และปรับค่าพีเอชในน้ำเสีย ด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2

4.3.2 เติมเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 4.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียจากการดองร่างอาจารย์ใหญ่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium II ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.3.3 เขย่าให้อากาศภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยควบคุมให้มีอัตราเร็วในการเขย่าแตกต่างกันดังนี้ คือ 100 150 200 และ 250 รอบ/นาที โดย จะมีชุดทดลองควบคุมการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจเกิดขึ้นจากการเขย่าให้อากาศและจากเชื้อประจำถิ่นภายในน้ำเสียซึ่งบรรจุน้ำเสียเพียงอย่างเดียวในแต่ละอัตราเร็วที่ใช้ทดสอบ

4.3.4 เก็บตัวอย่าง ทุกๆ 0 1 3 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 15 มิลลิลิตร เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อ นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อและกราฟแสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์ เลือกค่าอัตราเร็วในการเขย่าที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีที่สุด โดยการเปรียบเทียบจากความสามารถในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อในแต่ละสภาวะ

4.4 การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.4.1 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบ โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน ให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องครั้งละ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ตั้งแต่ 500 ไปจนถึง 4,500 มิลลิกรัม/ลิตร **ปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2**

4.4.2 เติมเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยที่เตรียมในข้อ 4.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียจากการดองร่างอาจารย์ใหญ่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium II ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.4.3 เขย่าให้อากาศภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยควบคุมให้มีอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.3 โดยในแต่ละความเข้มข้น จะมีชุดทดลองควบคุมการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจเกิดขึ้นจากการเขย่าให้อากาศและจากเชื้อประจำถิ่นภายในน้ำเสียซึ่งบรรจุน้ำเสียเพียงอย่างเดียว

4.4.4 เก็บตัวอย่าง ทุกๆ 0 1 3 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 15 มิลลิลิตร เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อ นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อและกราฟแสดงประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์ เลือกค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญและย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีที่สุด โดยการเปรียบเทียบจากความสามารถในการเจริญและการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อในแต่ละสภาวะ

5. การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

5.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่อัตราเร็วในการเขย่า 250 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.2 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบ โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เริ่มต้นในน้ำเสียอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.4 และปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2

5.3 ปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อาทิ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และบัฟเฟอร์ ที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium I ให้มีสารอาหารที่เติมในอัตราส่วนของ C:N:P เท่ากับ 100:5:1 โดยคำนวณค่า C จากค่าความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ซึ่งได้จากศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.4

5.4 คำนวณปรับเปลี่ยนปริมาณโพแทสเซียมบัฟเฟอร์ให้เหมาะสม ในสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium I ให้มีความเข้มข้นที่สัมพันธ์กันกับปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในระบบ เพื่อให้มีความสามารถในการคงค่าพีเอชที่จะเปลี่ยนแปลงไปจากการเกิดการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียของจุลินทรีย์ไว้ดังค่าที่ได้จากการทดสอบค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.2

5.5 เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมลงไปในอัตราส่วน 10% ของปริมาตรน้ำเสียที่ใช้ในการทดสอบ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเสียจากการดองร่างอาจารย์ใหญ่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium I ที่ทำการปรับเปลี่ยนและไม่ได้ปรับเปลี่ยนเพื่อเปรียบเทียบกัน

5.6 เขย่าให้อากาศภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยควบคุมให้มีอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาอัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.3 โดยทั้ง 2 สูตรอาหารจะมีชุดทดลองควบคุมการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจเกิดขึ้นเองจากการเขย่าให้อากาศและจากเชื้อประจำถิ่นภายในน้ำเสียซึ่งบรรจุน้ำเสียเพียงอย่างเดียว

5.7 เก็บตัวอย่าง ทุกๆ 0 1 3 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 15 มิลลิลิตร เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อและกราฟแสดงการลดลงของฟอร์มาลดีไฮด์ในระบบ

6. การศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ในระบบบำบัดแบบเอสบีอาร์

6.1 การศึกษาระยะเวลากักเก็บ (Hydraulic retention time) ที่เหมาะสมในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ในระบบบำบัดแบบเอสบีอาร์แบบครั้งคราว (Batch test)

6.1.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.1.2 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบใส่ลงในถัง Equalization Tank โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.4 และปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1

N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2

6.1.3 นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมใส่ลงในถังบำบัดเอสบีอาร์ในอัตราส่วน 10% ของปริมาตรน้ำเสียที่ใช้ในการทดสอบ (มีค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.5) พร้อมเติมสารอาหารลงไปตามสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 5

6.1.4 เดินระบบ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง ทุกๆ 0 6 12 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ พร้อมกับวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ และตรวจวิเคราะห์หาค่าซีโอดีในน้ำตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน APHA (1998) รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพการตกตะกอนของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ

6.1.5 นอกจากนี้เพื่อศึกษาความสามารถในการตรึงสารหนู (As) ของจุลินทรีย์ที่ใช้บำบัด ซึ่งพบการปนเปื้อนอยู่ในน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่ จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการบำบัดปริมาตร 1 ลิตร และนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ในระบบออกโดยใช้เครื่องcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ก่อนส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารหนู ในน้ำตัวอย่างโดยใช้วิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GFAAS) ณ สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 3 (พิษณุโลก)

6.1.6 เลือกระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากช่วงเวลาที่ระบบมีปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบต่ำและมีการเจริญของเชื้อที่ดี

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ในระบบบำบัดเอสบีอาร์แบบต่อเนื่อง (Fed-batch test)

6.2.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.2.2 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบใส่ลงในถัง Equalization Tank โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.4 และปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2

6.2.3 นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมใส่ลงในถังบำบัดเอสบีอาร์พร้อมเติมสารอาหารลงไปตามสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 5 ปริมาตร 6 ลิตร (มีค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นที่ 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.5)

6.2.4 ทำการการเดินระบบอย่างต่อเนื่องจำนวน 2 รอบการบำบัด โดยแต่ละรอบจะมีขั้นตอนและเวลาดังนี้ คือ สูบน้ำเข้า 5 นาที บำบัดตามระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.1 ตกตะกอน 45 นาทีและปล่อยน้ำทิ้ง 15 นาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดการเจริญของจุลินทรีย์ วิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือ ทดสอบประสิทธิภาพการตกตะกอนของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบและปริมาณซีโอดีในน้ำตัวอย่าง

6.3 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ในระบบบำบัดแบบเอสบีอาร์ร่วมกับตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลพุทธชินราช

6.3.1 ปรับสภาพตะกอนจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลพุทธชินราช โดยการเติมฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 37-40% ลงไปในถังที่บรรจุตะกอนจุลินทรีย์จากโรงพยาบาลพุทธชินราช โดยจะค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการดองร่างอาจารย์ใหญ่ขึ้นตามลำดับจากความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร จนใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นแรกเริ่มที่เข้าสู่ระบบบำบัดจริง ซึ่งจะใช้เวลาในการปรับสภาพ 10 วัน โดยการเพิ่มระดับความเข้มข้นในแต่ละครั้งจะทิ้งระยะห่างในการเติมฟอร์มาลดีไฮด์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6.3.2 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยโดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่อัตราเร็วในการเขย่า 150 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.3.3 เตรียมน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับการทดสอบใส่ลงในถัง Equalization Tank โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.4 และปรับค่าพีเอชในน้ำเสียด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 4.2

6.3.4 นำเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยที่เตรียมใส่ลงในถังบำบัดเอสบีอาร์ปริมาตร 6 ลิตร และตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลพุทธชินราชที่ผ่านการปรับสภาพปริมาตร 14 ลิตร พร้อมทั้งเติมสารอาหารลงไปตามสูตรอาหาร Formaldehyde enrichment medium I ที่ได้จากการศึกษาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในข้อ 5

6.3.5 เดินระบบตามระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 6.1 เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์คงเหลือในระบบ ทดสอบประสิทธิภาพการตกตะกอนของตะกอนจุลินทรีย์ในระบบและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดีในน้ำตัวอย่าง