บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่อง GC - FID : Gas Chromatography
- เครื่อง HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- เครื่องเขย่า (Rotary Shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow)
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าแบบละเอียด (Analytic Balance)
- ขวดซีรัม (Serum Bottle)
- แผ่นรองขวดซีรัมชนิดเทฟลอน (Teflon – lined rubber septum)
- ที่ผนึกและเปิดฝาอลูมิเนียม (Aluminium crimp caps)
- อุปกรณ์ป้องกันความปลอดภัย ได้แก่หน้ากาก แว่นตา ถุงมือ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

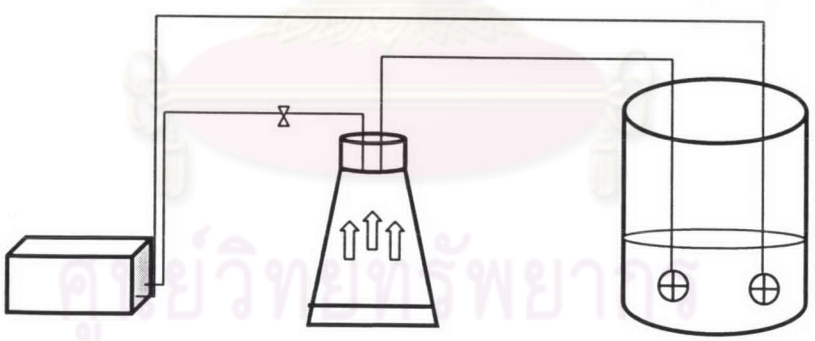
- ไตรคลอโรเอทธิลีน (Trichloroethylene)
- โทลูอีน (Toluene)
- ฟีนอล (Phenol)
- เบนซิลแอลกอฮอล์ (Benzyl alcohol)
- เมอคิวริก คลอไรด์ (Mercuric chloride)
- สารอาหารต่าง ๆ (Nutrients) ตามตารางที่ ก-1

3.2 การดำเนินการทดลอง

การวิจัยในครั้งนี้ดำเนินการที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการและพิษวิทยา สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โดยกำหนดแผนการวิจัยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัยดังนี้

3.2.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถโตบนโทลูอีนได้ (Enrichment of toluene grown culture)

1. นำน้ำใสในถังเติมอากาศของโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยามาใช้เพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนอาหารชนิดโทลูอีนได้ (Toluene grown culture)
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Salts Medium ที่มีส่วนประกอบตามตารางที่ ก-1
3. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM ปริมาณ 900 มิลลิลิตร และเติมน้ำเสียจากถังเติมอากาศของโรงบำบัดน้ำเสียสี่พระยาปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดโหลแก้ว เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยไอระเหยของโทลูอีน (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5) ดังรูปที่ 3.1 เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนอาหารชนิดโทลูอีนได้ (ขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ดังรูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนอาหารชนิดโทลูอีนได้

4. ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยไอระเหยของโทลูอีนจะต้องดูแลรักษาอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้อยู่ในสภาพที่สะอาด โดยทำความสะอาดไม่ให้มีเมือกจุลินทรีย์ (Slime) เกาะติดอยู่ข้างขวดโหลแก้วและหัวเติมอากาศ โดยใช้แปรงขัดที่บริเวณขวดโหลแก้ว

และหัวเติมอากาศ เมื่อสังเกตว่าขวดโหลแก้วและหัวเติมอากาศเริ่มมีเมือกจุลินทรีย์เกาะติดอยู่

3.2.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถโตบนโทลูอีนได้ (เชื้อจุลินทรีย์จากการทดลองขั้นตอนที่ 3.2.1)

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง โดยบรรจุลงในขวดทดสอบจำนวน 11 ขวด ตามสัดส่วนที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.1
2. นำขวดทั้งหมดใส่ลงในเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าจนกระทั่งขวดทดสอบที่ 5 - 11 มีความขุ่นเกิดขึ้น

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบที่บรรจุลงในขวดทดสอบจำนวน 11 ขวด ตามสัดส่วนที่แตกต่างกัน

ชุดที่	BSM (ml)	Toluene (mg/l)	Seed (ml)	$HgCl_2$ (mg/l)	หมายเหตุ
1	10	0	0	0	Media control
2	10	100	0	0	Substrate control
3	10	100	0.1	1	Nonbio control
4	10	0	0.1	0	Seed control
5	10	10	0.1	0	-
6	10	50	0.1	0	-
7	10	100	0.1	0	-
8	10	200	0.1	0	-
9	10	300	0.1	0	-
10	10	400	0.1	0	-
11	10	500	0.1	0	-

3. วัดค่าความขุ่นโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Optical density ที่ 550 nm ; OD_{550}) ของขวดทดสอบทั้งหมด โดยค่า OD_{550} ของขวดทดสอบที่มีความเข้มข้นของโทลูอีนน้อยควรมีค่าน้อยกว่าค่าค่า OD_{550} ของขวดทดสอบที่มีความเข้มข้นของโทลูอีนมาก ตัวอย่างเช่นขวดทดสอบที่ 5 ควรจะมีค่า OD_{550} น้อยกว่าขวดทดสอบที่ 6 เป็นต้น และขวดทดสอบที่ 1 ถึง 4 ซึ่งเป็นขวดควบคุมควรจะวัดค่า OD_{550} ได้ใกล้เคียง 0 แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต

บนอาหารชนิดโทลูอีนได้ จึงจะนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในขวดโหลแก้วตามขั้นตอนการทดลองที่ 3.2.1 มาทำการปั่นเหวี่ยงและเก็บเซลล์เพื่อการใช้งานต่อไป

4. ในกรณีที่ขวดทดสอบยังไม่มีความขุ่นเกิดขึ้น จะดำเนินการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในขวดโหลแก้วต่อไป ทำการทดสอบการเจริญเติบโตตามขั้นตอนที่ 3.2.2 อีกครั้ง จนกระทั่งขวดทดสอบมีความขุ่นเกิดขึ้นและวัดค่า OD_{550} ได้ จึงจะทำการปั่นแยกเพื่อนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้งานต่อไป (ขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ดังรูปที่ 3.2)

3.2.3 การทดลองหาค่ายิลด์โดยซับสเตรตชนิดต่าง ๆ (Growth Yield : Y)

1. ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (BSM) ปริมาณ 50 มล. ลงในขวดซีรัมขนาด 119 มล. ปิดฝาขวดหลวม ๆ ด้วย Teflon – lined rubber septum และครอบด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ โดยเตรียมขวดซีรัมสำหรับทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Triplicate) และขวดซีรัม 1 ขวดที่ฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วย $HgCl_2$ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม
2. นำขวดซีรัมที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
3. ปิดฝาขวดให้แน่นด้วย Aluminium crimp caps และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
4. ฉีดฟีนอลที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดซีรัมหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้ว
5. นำขวดซีรัมที่ฉีดฟีนอลแล้วใส่ลงในเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ตลอด 24 ชั่วโมง ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง
6. ใส่เซลล์จุลินทรีย์ที่เตรียมไว้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2.1 ลงในขวดซีรัม ที่ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก จ.)
7. นำขวดซีรัมใส่ลงในเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตลอดระยะเวลาการทดลอง ระหว่างการทดลองเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เมื่อความดันในขวดซีรัมมีค่าน้อยกว่าความดันบรรยากาศ (เพื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่เติมมากเกินพอที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้)
8. วัดความเข้มข้นฟีนอลในขวดซีรัมด้วยเครื่อง HPLC ตั้งแต่เริ่มใส่เซลล์ เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสม จนกระทั่งปริมาณฟีนอลที่วัดได้มีค่าลดลงจนเท่ากับศูนย์ พร้อมทั้งวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ (OD_{550}) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
9. หลังจากปริมาณฟีนอลหมด ทำการเติมฟีนอลที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เรื่อย ๆ จนกระทั่งวัดค่า OD_{550} ได้เท่ากับ 1

10. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์เจริญเติบโตในขวดซีรัมมาวิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) โดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
11. นำผลการทดลองที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟีนอลที่ลดลงกับเวลาและกราฟ OD_{550} ที่เพิ่มขึ้นกับเวลา (ขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ดังรูปที่ 3.3)
12. นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่ายิลด์ (Yield)
13. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 – 10 โดยเปลี่ยนชนิดของซับสเตรตเป็นโทลูอีนและเบนซิลแอลกอฮอล์ วัดความเข้มข้นโทลูอีนในขวดซีรัมด้วยเครื่อง GC-FID และวัดความเข้มข้นเบนซิลแอลกอฮอล์ในขวดซีรัมด้วยเครื่อง HPLC (ลำดับการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.2)

3.2.4 การทดลองหาค่า TCE Transformation Yield (T_y) โดยใช้โทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน

การทดลองในขั้นนี้แบ่งออกเป็น 5 ชุด ชุดละ 6 ลำดับ ประกอบด้วย การทดลองชุดที่ 1 เป็นการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนโทลูอีนในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน การทดลองชุดที่ 2 เป็นการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตแทนฟีนอลในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน การทดลองชุดที่ 3 เป็นการทดลองใช้โทลูอีนเป็นซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน การทดลองชุดที่ 4 เป็นการทดลองใช้ฟีนอลเป็นซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน ส่วนการทดลองชุดที่ 5 เป็นการทดลองใช้เบนซิลแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรตในการบำบัดไตรคลอโรเอทธิลีน รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.2

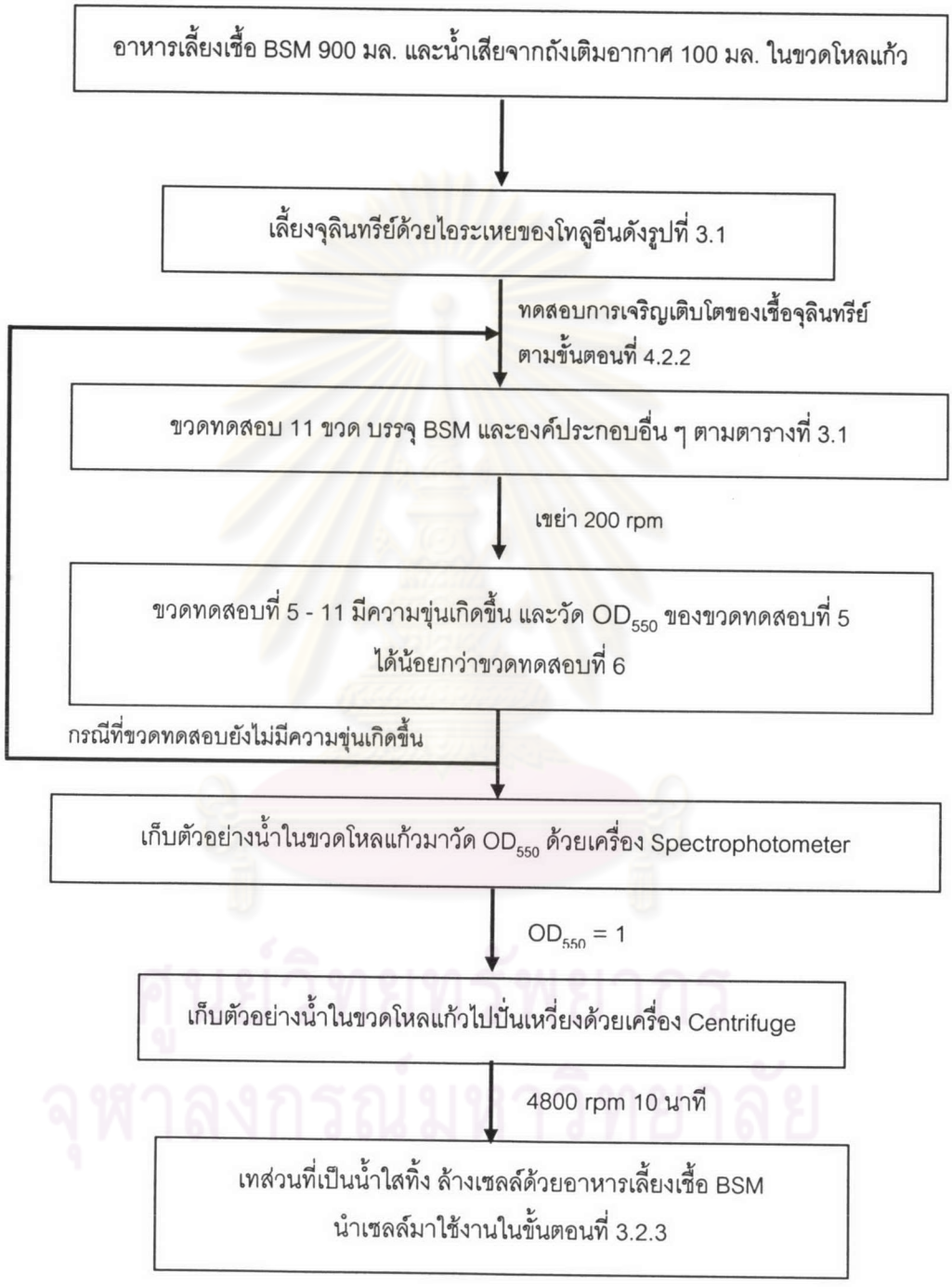
สำหรับการทดลองชุดที่ 1 ดำเนินการตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. เตรียมขวดซีรัมที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ และขวดซีรัม 1 ขวดที่ฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วย $HgCl_2$ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2.3
2. ฉีดไตรคลอโรเอทธิลีนที่ความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และฉีดโทลูอีนที่ความเข้มข้นประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดซีรัม (ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีนและโทลูอีนที่เลือกใช้ได้มาจากการคำนวณผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b)

3. นำขวดซีรัมที่ฉีดไตรคลอโรเอทธิลีนและโทลูอีนแล้วใส่ลงในเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาทีตลอด 24 ชั่วโมง ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง
4. ใส่เซลล์จุลินทรีย์ที่เตรียมไว้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2.1 ลงในขวดซีรัม ที่ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ที่เลือกใช้ได้มาจากการคำนวณผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b)
5. นำขวดซีรัมใส่ลงในเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องตลอดระยะเวลาการทดลอง ระหว่างการทดลองเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เมื่อความดันในขวดซีรัมมีค่าน้อยกว่าความดันบรรยากาศ (เพื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่เติมมากเกินพอที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้)
6. วัดปริมาณไตรคลอโรเอทธิลีนและโทลูอีนในขวดซีรัมด้วยเครื่อง GC-FID ตั้งแต่เริ่มใส่เซลล์ เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสม จนกระทั่งปริมาณไตรคลอโรเอทธิลีนที่วัดได้มีค่าคงที่
7. นำผลการทดลองที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโทลูอีนที่ลดลงกับเวลา กราฟมวลเซลล์ที่เพิ่มขึ้นกับเวลา และกราฟปริมาณไตรคลอโรเอทธิลีนที่ถูกย่อยสลายกับเวลา และนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า T_y เป็นอันเสร็จสิ้นการทดลองในลำดับที่ 1
8. สำหรับการทดลองในลำดับที่ 2 ทำการทดลองต่อโดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 – 7 และนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในลำดับที่ 1 มาใช้ต่อ (ใช้เซลล์จุลินทรีย์ต่อเนื่องกันตลอดการทดลอง)โดยกำหนดสภาวะเริ่มต้นให้เหมือนเดิม โดยทำการเติมอากาศเพื่อไล่ไตรคลอโรเอทธิลีนที่เหลืออยู่ในขวดซีรัมออก ถ่ายเซลล์จุลินทรีย์ส่วนเกินออกโดยคำนวณจากค่ายิลด์ที่ได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2.3 และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM แทน สำหรับความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนและโทลูอีนที่ใช้ในการทดลองครั้งต่อไปกำหนดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่าเดิม (ขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ดังรูปที่ 3.4)
9. สำหรับการทดลองในลำดับที่ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 – 7 โดยนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองลำดับที่ 2 มาใช้ต่อ แต่เปลี่ยนชนิดของซับสเตรตที่ฉีดลงในขวดซีรัมจากโทลูอีนเป็นเบนซิลแอลกอฮอล์แล้วทำการทดลองตามขั้นตอนข้างต้นต่ออีก 3 ครั้ง (ลำดับที่ 3 - 5)
10. สำหรับการทดลองในลำดับที่ 6 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 – 7 โดยนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองลำดับที่ 5 มาใช้ต่อ แต่เปลี่ยนชนิดของซับสเตรตที่ฉีดลงในขวดซีรัมจากเบนซิลแอลกอฮอล์กลับมาเป็นโทลูอีน

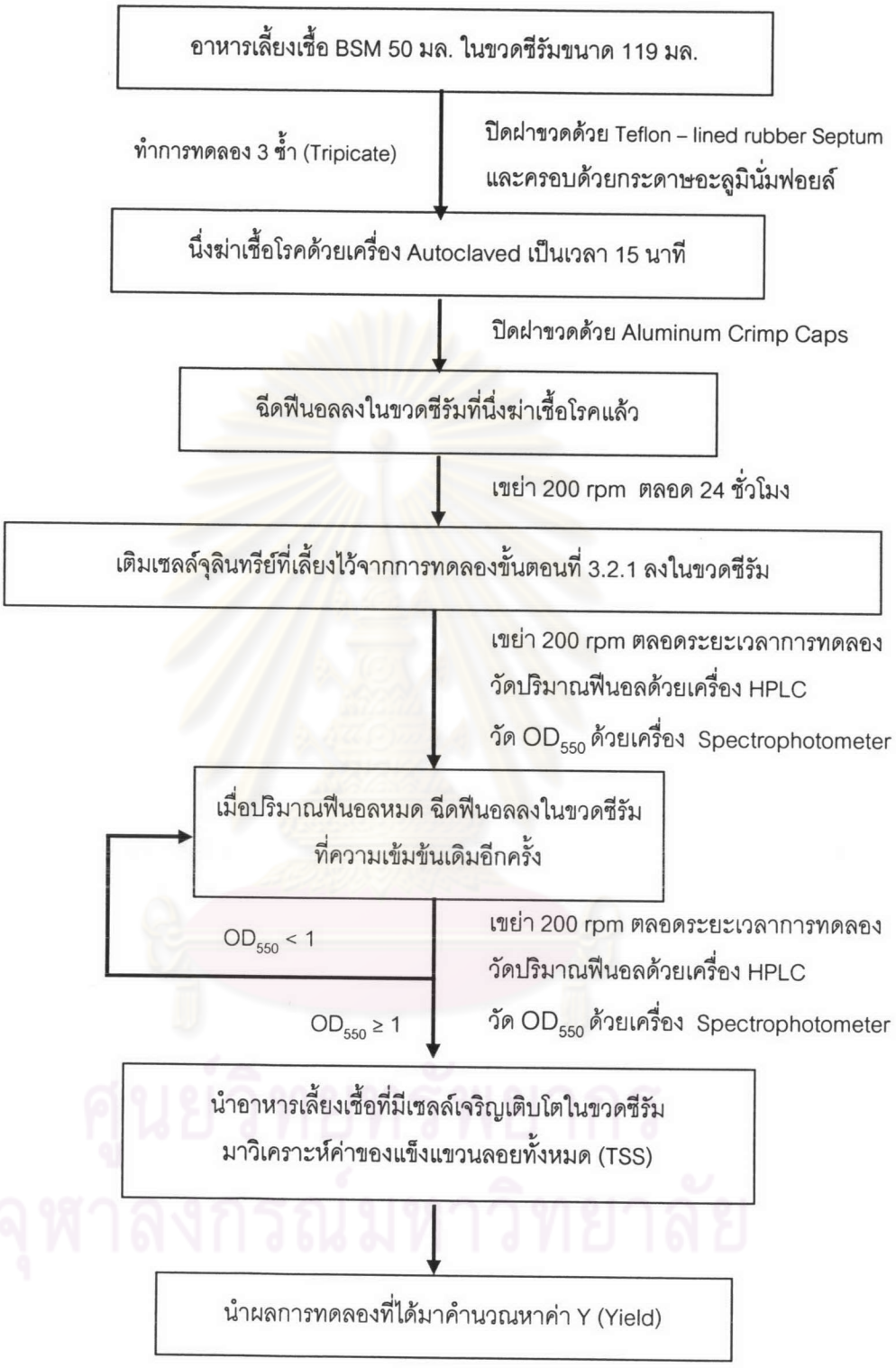
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ดำเนินการเปลี่ยนซับสเตรตในการทดลองสำหรับชุดการทดลองที่ 2 – 5 ตามตารางที่ 3.2



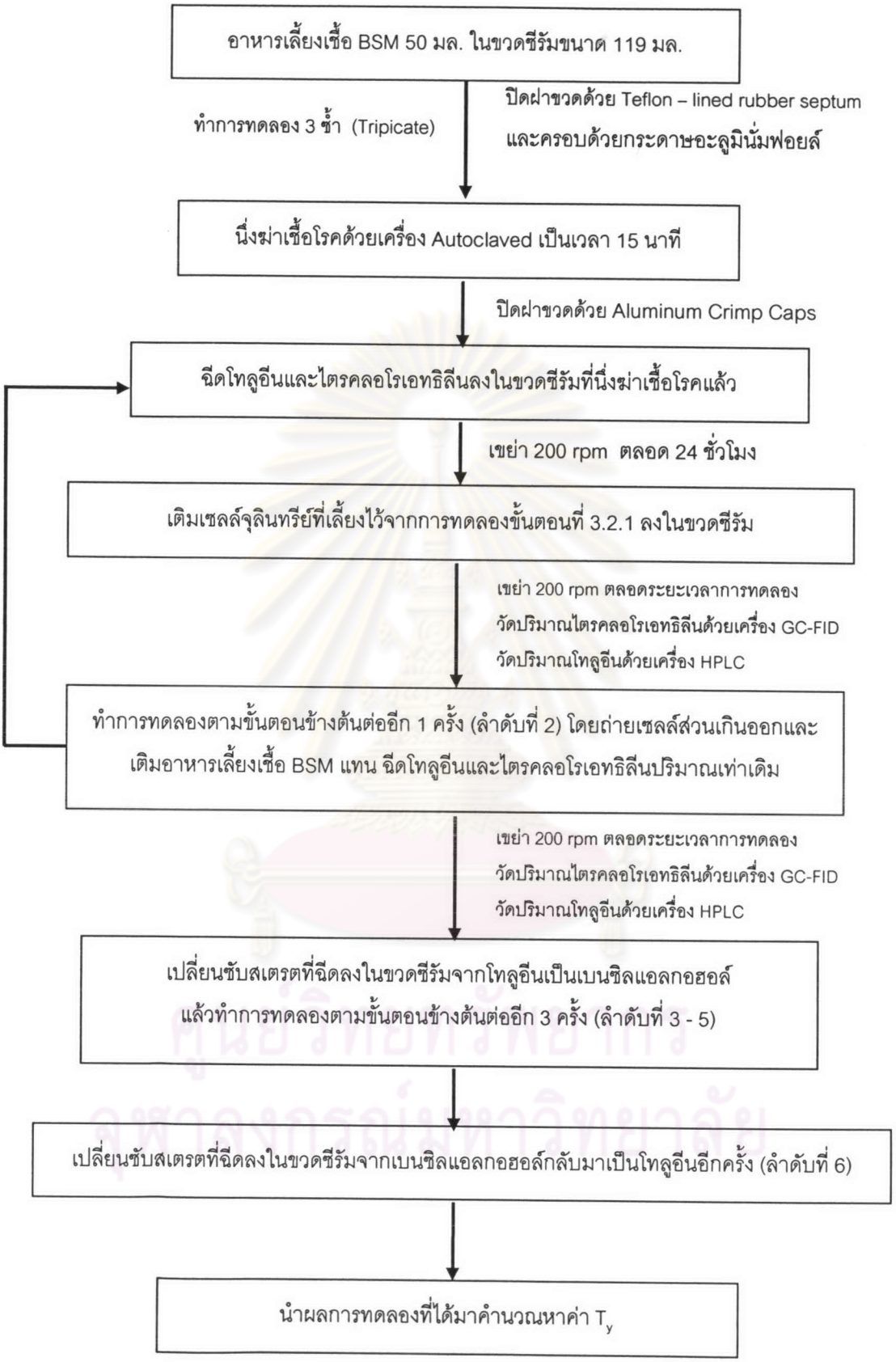
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถโตบนอาหารชนิดโทลูอีนจนกระทั่งการเก็บเซลล์จุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้งาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการทดลองหาค่ายิลด์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ฟีนอลเป็นซับเสตรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการทดลองหาค่า TCE Transformation Yield สำหรับการทดลองชุดที่ 1

ตารางที่ 3.2 ลำดับซับสเตรตที่ใช้ในการทดลอง

การทดลอง	การทดลองชุดที่	ลำดับที่ 1	ลำดับที่ 2	ลำดับที่ 3	ลำดับที่ 4	ลำดับที่ 5	ลำดับที่ 6
หาค่า T_y	ชุดที่ 1 (3.2.3)	โทลูอีน	โทลูอีน	เบนซิลแอลกอฮอล์	เบนซิลแอลกอฮอล์	เบนซิลแอลกอฮอล์	โทลูอีน
	ชุดที่ 2 (3.2.3)	ฟีนอล	ฟีนอล	เบนซิลแอลกอฮอล์	เบนซิลแอลกอฮอล์	เบนซิลแอลกอฮอล์	ฟีนอล
	ชุดที่ 3 (3.2.3)	←	←	←	โทลูอีน	→	→
	ชุดที่ 4 (3.2.3)	←	←	←	ฟีนอล	→	→
	ชุดที่ 5 (3.2.3)	←	←	←	เบนซิลแอลกอฮอล์	→	→
หาค่ายิลด์ (Yield)	ชุดที่ 6 (3.2.4)	ฟีนอล	-	-	-	-	-
	ชุดที่ 7 (3.2.4)	โทลูอีน	-	-	-	-	-
	ชุดที่ 8 (3.2.4)	เบนซิลแอลกอฮอล์	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : การทดลองชุดที่ 1 - 8 ประกอบด้วยขวดซีรัม 3 ขวด สำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) และขวดซีรัม 1 ขวด ที่ฆ่าเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเมอคิวริก-คลอไรด์ ($HgCl_2$) เพื่อเป็นชุดควบคุม (control)

: การทดลองชุดที่ 1 – 5 ของทุก ๆ ลำดับใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีนประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองชุดที่ 1 – 5 ของทุก ๆ ลำดับใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของโทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองชุดที่ 1 – 5 ของทุก ๆ ลำดับใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

: การทดลองชุดที่ 5 – 8 ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของโทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2.5 การศึกษาการร่วมย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์

การใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b ซึ่งพัฒนาโดย Peter Reichert : Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG) Switzerland ในการทำนายพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เช่น S_g, S_c และ X ค่าที่ต้องสมมุติใช้ในแบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b คือ K_g, K_{sg}, K_c, K_{sc}, Y และ T_c โดยค่าต่าง ๆ เหล่านี้ตรวจสอบได้จากตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของงานวิจัยที่ผ่านมาตามที่ได้อ้างอิงในท้ายตารางที่ 3.3 สมการที่ใช้ในการทำนายพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่

สมการ Michaelis – Menton kinetics

$$-r_c = \frac{k_c X S_c}{K_{sc} + S_c} \qquad (2.1)$$

ความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีน และโทลูอีนในสภาวะที่เป็นของเหลว สามารถคำนวณได้จากความเข้มข้นในสภาวะที่เป็นก๊าซ และสมการ Herry's law ในสภาวะสมดุลมวล ดังนี้

$$H_{cc} = \frac{C_g}{C_{aq}} \qquad (3.1)$$

จะได้สมการสำหรับมวลของไตรคลอโรเอทธิลีนและโทลูอีน

$$r_c = \frac{dM_c}{dt} = (V_l + V_g \cdot H_{cc}) \frac{dC_{aq}}{dt} \qquad (3.2)$$

และสมการสำหรับมวลของฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์

$$r_c = \frac{dM_c}{dt} = V_l \cdot \frac{dC_{aq}}{dt} \qquad (3.3)$$

โดยที่ H_{cc} = Herry's law constant

C_g = Gas phase interest compound concentration (mg / l)

C_{aq} = Aqueous interest compound concentration (mg / l)

V_l = Liquid volume (l)

V_g = Headspace volume (l)

M_c = The interest compound mass (mg cells)

t = Time (day)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมการสำหรับการย่อยสลายโทลูอีน ฟีนอลและเบนซิลแอลกอฮอล์ (Growth substrate)

$$-r_g = \frac{Xk_gS_g}{K_{sg}\left(1+S_c/K_{isc}\right)+S_g} \qquad (2.2)$$

สมการสำหรับการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน (Cometabolic substrate)

$$-r_c = \frac{Xk_cS_c}{K_{sc}\left(1+S_g/K_{isg}\right)+S_c} \qquad (2.3)$$

สมการอัตราการเติบโตเซลล์

$$r_x = Yr_g - \frac{1}{T_c}r_c - bX \qquad (2.4)$$

ตารางที่ 3.3 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในแบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b

พารามิเตอร์	หน่วย	โทลูอีน	ฟีนอล	เบนซิลแอลกอฮอล์
S_g	mg/l	40	40	40
S_c	mg/l	1	1	1
X	mg/l	3	3	3
k_g	mg-Substrate/mg-Cells/d	9.29 (a)	31.5 (b)	1.06 (c)
K_{sg}	mg/l	1.15 (a)	0.8 (b)	5.29 (c)
K_{isg}	mg/l	1.15 (a)	0.8 (b)	5.29 (c)
k_c	mg-TCE/mg-Cells/d	0.94 (a)	1.5 (b)	0.084 (c)
K_{sc}	mg/l	0.79 (a)	0.39 (b)	0.33 (c)
K_{isc}	mg/l	0.79 (a)	0.39 (b)	0.33 (c)
T_c	mg-TCE/mg-Cells	0.035 (d)	0.031 (e)	0.03 (c)
Y	mg-Cells/mg-Substrate	0.62 (d)	0.55 (e)	0.53 (c)
b	1/d	0.1 (f)	0.1 (f)	0.1 (f)

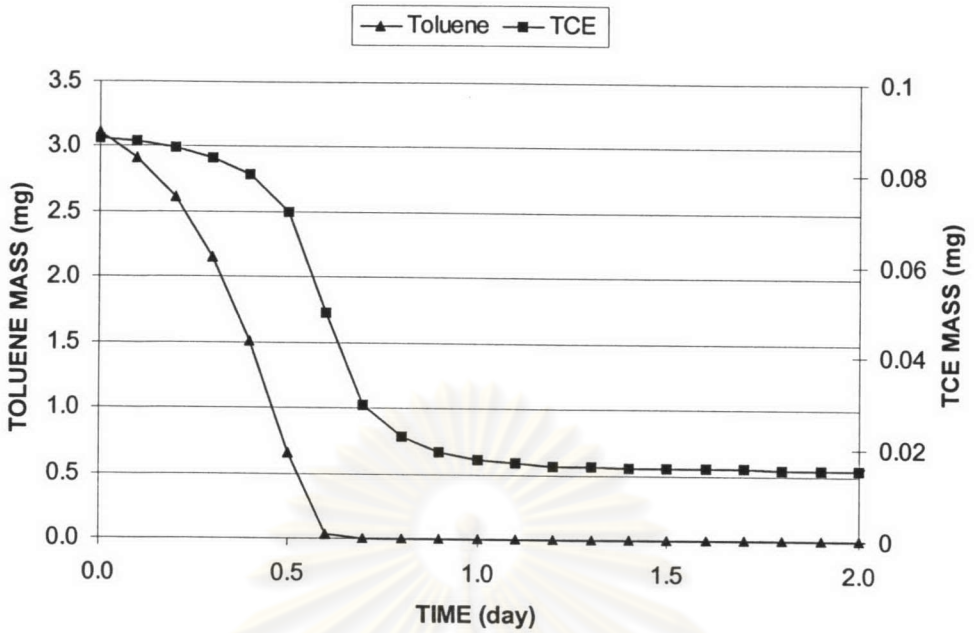
a. Landa et al. (1994) ; b. Folsom & Pritchard (1990) ; c. Tejasen (2003) ; d. Kelly et al. (2000)

e. Chang & Alvarez-Cohen (1995b) ; f. Metcalf & Eddy (2003)

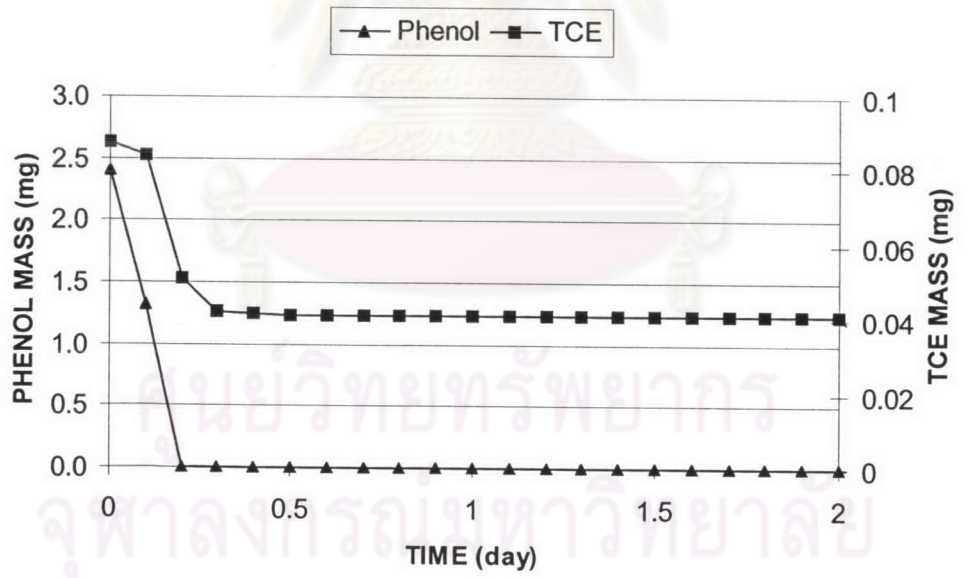
งานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองโดยกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโร-เอทธิลีนที่สูงพอที่จะทำให้เกิดอัตราปฏิกิริยาการร่วมย่อยสลายของไตรคลอโรเอทธิลีนที่สูง (Maximum rate) โดยที่ไม่มีปฏิกิริยาการยับยั้งเข้ามาเกี่ยวข้อง (Competitive inhibition effect) จากการศึกษาของ Tejasen (2003) พบว่าความเข้มข้นของไตรคลอโรเอทธิลีนที่มากกว่า 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการยับยั้ง (Competitive inhibition effect) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีนประมาณ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อเลือกความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีนที่ใช้ในการทดลองได้แล้ว จึงนำค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีน (S_c) และค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ K_g, K_{sg}, K_c, K_{sc}, Y และ T_c ที่ตรวจสอบได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา ป้อนเข้าสู่แบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b เพื่อหาค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของซับสเตรตชนิดต่าง ๆ ซึ่งกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่ทำให้มวลของไตรคลอโรเอทธิลีนถูกย่อยสลายเหลือประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 และกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่ทำให้มวลของไตรคลอโรเอทธิลีนถูกย่อยสลายเหลือประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งค่าเหล่านี้มีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ ถ้าป้อนความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตมากเกินไปจะทำให้ให้มวลของไตรคลอโร-เอทธิลีนถูกย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 30 ถึง 40 และถ้าป้อนความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตน้อยเกินไปจะทำให้มวลของไตรคลอโรเอทธิลีนถูกย่อยสลายน้อยกว่าร้อยละ 30 ถึง 40 และถ้าป้อนความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์น้อยเกินไป มวลของไตรคลอโรเอทธิลีนจะถูกย่อยสลายเหลือประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 ภายในเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้การทดลองใช้เวลานาน และถ้าป้อนความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์มากเกินไป มวลของไตรคลอโรเอทธิลีนจะถูกย่อยสลายเหลือประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 ภายในเวลาน้อยกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนเกิดเร็วเกินไปทำให้วัดค่าการลดลงของไตรคลอโรเอทธิลีนไม่ทัน เมื่อลองป้อนข้อมูลค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตและเซลล์จุลินทรีย์หลาย ๆ ค่า พบว่าค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของซับสเตรตทั้ง 3 ชนิดคือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของเซลล์จุลินทรีย์ คือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรคลอโรเอทธิลีนประมาณ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโทลูอีน ฟีนอล และเบนซิลแอลกอฮอล์ประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3.3

การใช้แบบจำลอง AQUASIM2.1b ทำนายค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ค่าพารามิเตอร์จากตารางที่ 3.3 สามารถนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างมวลของซับสเตรตที่ลดลงกับมวลของไตรคลอโรเอทธิลีนที่ลดลงที่เวลาหนึ่ง ๆ ได้ดังรูปที่ 3.5 ถึงรูปที่ 3.7

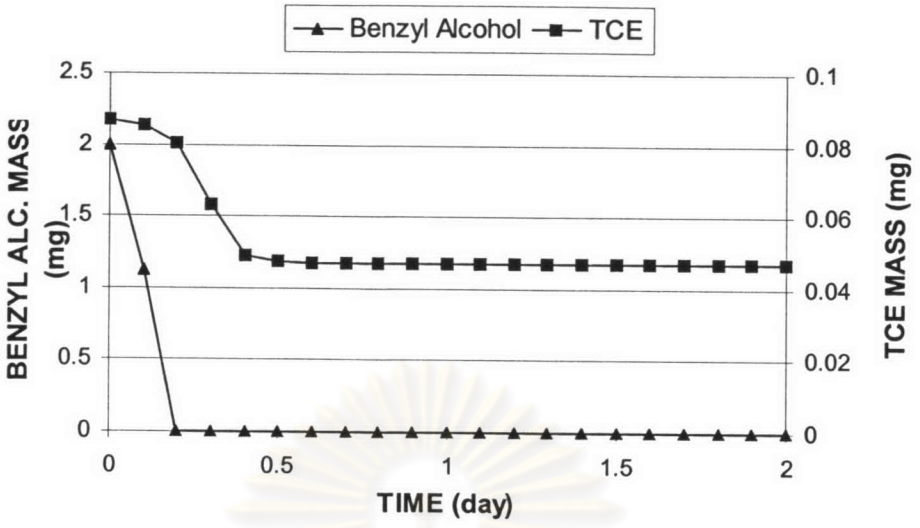


รูปที่ 3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลโทลูอีนที่ลดลงกับมวลไตรคลอโรเอทธิลีนที่ลดลงที่เวลาหนึ่ง ๆ จากการประมาณโดยโปรแกรม AQUASIM2.1b



รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลฟีนอลที่ลดลงกับมวลไตรคลอโรเอทธิลีนที่ลดลงที่เวลาหนึ่ง ๆ จากการประมาณโดยโปรแกรม AQUASIM2.1b

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างมวลเบนซิลแอลกอฮอล์ที่ลดลงกับมวลไตรคลอโรเอทธิลีนที่ลดลงที่เวลาหนึ่ง ๆ จากการประมาณโดยโปรแกรม AQUASIM2.1b

การศึกษาการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีนโดยใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์หรือผลการทดลองคร่าว ๆ ได้ นั่นคือความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของเซลล์ (X) ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของไตรคลอโรเอทธิลีน (S_c) และความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของซับสเตรตต่าง ๆ (S_g) รวมทั้งระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายไตรคลอโรเอทธิลีน (t) ซึ่งสามารถนำค่าเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการทดลองได้ และเมื่อทำการทดลองแล้วก็สามารถใช้แบบจำลองคอมพิวเตอร์ AQUASIM2.1b ตรวจสอบข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริงกับแบบจำลองโดยกระบวนการทางทฤษฎี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

พารามิเตอร์	วิธีที่ใช้วิเคราะห์	เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์
Trichloroethylene , Toluene	EPA Method number 1671A Volatile Organic Compound by GC-FID	GC-FID
Phenols , Benzyl Alcohol	EPA Method number 0532 Phenol compounds in DW by SPE & HPLC/UV	HPLC
Total Suspend Solids (TSS)	Standard Method - 2540D Total Suspend Solids Dried at 103 – 105 ^{o}c	-
Optical Density (OD_{550})	-	Spectrophotometer

หมายเหตุ ; OD_{550} คือค่าการดูดกลืนแสดงที่วัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Optical density ที่ 550 nm ; OD_{550})

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย