

### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย

##### สถานที่ทำการศึกษา

1 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เป็นสถานที่ติดตามปริมาณซาลโมเนลลา และศึกษาถึงปริมาณจุลินทรีย์ดินซึ่งได้แก่ รา แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท พร้อมทั้งเป็นสถานที่ศึกษาปริมาณการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้บริเวณในเรือนกระจกเพื่อเป็นสถานที่สำหรับวางกระถางดิน

3 สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เป็นสถานที่วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก เพอร์เซ็นต์คาร์บอน และเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

##### วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. petridish plate
3. erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 ml.
4. ปิเปตขนาด 1 ml. , 5 ml., 10 ml.
5. เครื่องเขย่าหลอด votexgenie 2
6. ตู้ autoclave (autostream sterilizer) ของ Kokusun model H-88L4
7. ตู้ oven ของ memmert
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก sartorius รุ่น L2200 p
9. เครื่องวัด pH Corning model 240
10. กระบอกตวง ขนาด 25 , 100 ml.
11. บิวเรต ขนาด 50 ml.

12. บีกเกอร์ขนาด 250 , 500 ml.
13. กระจกชนิดน้ำกลั่น
14. ขวดโหลพร้อมฝาปิด
15. ถ้วยพลาสติก
16. Lamina flow hood "ISSCO" Model BV-124
17. เครื่องชั่งน้ำหนัก Sartorius รุ่น L2200 P
18. เครื่องชั่งน้ำหนัก Sartorius รุ่น A200S
19. pH meter Corning Model 240
20. Kjeltec Machine ของ Recator รุ่น 1002
21. Shaking Machine ของ Edmund Buhler
22. Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ของ Perkin Elmer

## การดำเนินการวิจัย

### 1 การวางแผนการทดลอง

1) ศึกษาและติดตามจำนวนซาลโมเนลลา จากกากตะกอนที่ผ่านการรีดแล้วของโรงงานบำบัดน้ำเสียชุมชนห้วยขวาง รวมทั้งตรวจหาปริมาณซาลโมเนลลาในน้ำทิ้งก่อนการบำบัด และในน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว จนมีจำนวนซาลโมเนลลาต่ำกว่าจำนวนที่ก่อให้เกิดโรค ( $10^5$  เซล)

2) นำกากตะกอนจาก 1) มาศึกษาถึงอิทธิพลของโลหะหนักในกากตะกอนต่อกิจกรรมจุลินทรีย์ดิน โดยวางแผนการทดลองแบบ  $2 \times 4$  factorial incomplete randomized design ในการทดลองใช้ดินจากสองแหล่งคือ ดินในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และดินในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดชลบุรี ที่อัตราเติมกากตะกอน 4 อัตรา คือ 20 40 60 และ 80 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ ทำ 3 ซ้ำ (replication) หน่วยการทดลองทั้งหมดในดิน 1 ชนิดใน 1 ซ้ำ คือ 11 หน่วยทดลอง ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ซึ่งใช้ดิน 2 ชนิด ทำ 3 ซ้ำ จึงมีหน่วยการทดลองทั้งสิ้น 66 หน่วยการทดลอง

3) กำหนดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา และติดตามผลประมาณ 16 สัปดาห์

### 2 ขั้นตอนการทดลอง

ก. การศึกษาและติดตามปริมาณซาลโมเนลลา

โดยการศึกษาปริมาณซาลโมเนลลา จะทำการศึกษาจากกากตะกอนบำบัดน้ำเสียชุมชนน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่การบำบัด และน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว

### 1) การเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมกากตะกอน : นำกากตะกอนที่ผ่านการรีดน้ำแล้ว จากโรงงานบำบัดน้ำเสียชุมชนห้วยขวาง ประมาณ 20 กิโลกรัม
2. เตรียมน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่การบำบัด และเตรียมน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว ประมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว

### 2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดของการเตรียมอาหาร ดังภาคผนวกที่ ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหาปริมาณซาลโมเนลลา ด้วยวิธี MPN Technique มีดังนี้

1. Tetrathionate broth เป็นอาหารเหลวที่ใช้เพื่อเพิ่ม จำนวนซาลโมเนลลาในหลอดทดลอง MPN
2. Brilliant green agar (BGA) เป็นอาหารแข็งเพื่อแยกเชื้อซาลโมเนลลา ซึ่งจะแสดงลักษณะโคโลนีที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยขอบโคโลนีค่อนข้างกลมและมีสีชมพูอ่อนค่อนข้างใส **ดังภาพที่ 5 ในภาคผนวกที่ ค**
3. Xylose lysine desoxycholate agar (XLD) เป็นอาหารแข็ง เพื่อแยกเชื้อซาลโมเนลลา ซึ่งจะแสดงลักษณะโคโลนีที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยขอบโคโลนีค่อนข้างกลมและขอบมีสีชมพูใสบริเวณตรงกลางมีสีดำ **ดังภาพที่ 6 ในภาคผนวกที่ ค**
4. Triple sugar iron agar (TSI) เป็นอาหารแข็งที่ใส่ในหลอดที่มีลักษณะลาดเอียง ซึ่งจะแสดงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อซาลโมเนลลา โดยอาจสร้างก๊าซหรือไม่สร้างและอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำที่ก้นหลอด บริเวณอาหารที่ลาดเอียงมีสีแดง **ดังภาพที่ 7 ในภาคผนวกที่ ค**
5. lysine iron agar (LIA) เป็นอาหารแข็งที่ใส่ในหลอดที่มีลักษณะลาดเอียง ซึ่งจะแสดงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อซาลโมเนลลาโดยไม่มีฟองก๊าซและอาหารมีสีดำที่ก้นหลอด บริเวณอาหารที่ลาดเอียงมีสีม่วง **ดังภาพที่ 8 ในภาคผนวกที่ ค**

### 3) วิธีการศึกษา

การศึกษาหาปริมาณเชื้อซาลโมเนลลาได้แยกการศึกษาเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. นำกากตะกอนจากโรงงานบำบัดน้ำเสียเคหะชุมชนห้วยขวางไปผึ่งแดด และทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อตรวจหาปริมาณซาลโมเนลลา เพื่อช และ ความชื้น โดยติดตามพารามิเตอร์เหล่านี้ จนถึงจุดที่ปริมาณของซาลโมเนลลาต่ำกว่าจำนวนที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ ( $10^5$  เซล)

2 นำน้ำทิ้งก่อนเข้าสู่การบำบัด และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้วจากโรงงานบำบัด  
น้ำเสียเคหะชุมชนห้วยขวางมาตรวจหาปริมาณซัลโมเนลลา

การศึกษาปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาด้วย MPN Technique โดยนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ใน  
หลอด MPN จำนวน 15 หลอดซึ่งบรรจุด้วย tetrathionate broth เพื่อเพิ่มปริมาณซัลโมเนลลา แล้วแยก  
เชื้อบริสุทธิ์ซัลโมเนลลาบนอาหาร XLD และ BGA จากนั้นนำโคโลนีที่ให้ลักษณะเหมือนซัลโมเนลลา  
ไปทดสอบทางชีวเคมีโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSI และ LIA และตรวจมอพบว่า MPN หลอดใดที่ให้ผล  
บวกเพื่อเปิดตาราง MPN

ข. การศึกษาอิทธิพลของโลหะหนักจากกากตะกอนบำบัดน้ำเสียชุมชนต่อกิจกรรมจุลินทรีย์  
ดิน

### 1) การเตรียมสิ่งทดลอง

#### - การเตรียมดิน

เตรียมดินทดลอง 2 ประเภทคือดินเหนียวและดินร่วน ซึ่งมีความแตกต่างทางลักษณะ  
โครงสร้างของดินชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ โดยนำดิน  
เหนียวจากพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และดินร่วนจากพื้นที่การเกษตรจังหวัด  
ชลบุรี ประมาณแหล่งละ 200 กิโลกรัมผึ่งแห้งในที่ร่มบดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรง  
ซึ่งมีขนาดช่อง 2 มิลลิเมตร

#### - การเตรียมปุ๋ยเคมี

เตรียมปุ๋ยเคมี ซึ่งมีสูตร 15-15-15 ของเครื่องหมายการค้าปุ๋ยไข่มุกตราเรือใบ  
ประมาณ 1 กิโลกรัม

#### - การเตรียมกากตะกอน

เตรียมกากตะกอนที่ผ่านการลดปริมาณซัลโมเนลลาด้วยการผึ่งในที่กลางแจ้งและมี  
แดดจัดประมาณ 3 กิโลกรัม บดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาดช่อง 2  
มิลลิเมตร

#### - การเตรียมสารละลายโลหะหนักในรูปเกลือคลอไรด์

เตรียมสารละลายโลหะหนักในรูปของเกลือคลอไรด์ ซึ่งได้แก่ โลหะหนัก 7 ชนิด คือ  
Cd Cu Fe Mn Ni Pb และ Zn ดังตารางที่ ข4 ทั้งนี้การเตรียมสิ่งทดลองโดยละเอียด  
แสดงในภาคผนวกที่ ข

### 2) วิธีการทดลอง

1. นำดินทดลองที่ได้เตรียมไว้คลุกเคล้า กับสิ่งทดลองซึ่งได้แก่ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ กาก  
ตะกอน และสารละลายโลหะหนักตามแผนการทดลองใน ตารางที่ ข6 (พร้อมทั้งติด

เครื่องหมายเลขสัญลักษณ์) ทั้งนี้ 1 หน่วยทดลองจะใช้ดิน 3 กิโลกรัม แล้วนำแต่ละหน่วยทดลองไปวางในตำแหน่งตามรูปที่ ข1

2.รดน้ำโดยควบคุมความชื้นให้อยู่ในระดับความจุความชื้นสนาม (วิธีคำนวณอธิบายไว้ในภาคผนวกที่ ข) จนถึงสิ้นสุดการทดลอง 16 สัปดาห์ โดยทุกหน่วยทดลองในงานวิจัยนี้ให้ปฏิบัติดังนี้ คือ

- สุ่มตัวอย่างทันทีจากทุกหน่วยทดลอง และที่สิ้นสุดการทดลอง 16 สัปดาห์ เพื่อการวิเคราะห์ C:N ปริมาณโลหะหนัก (Cd Cu Fe Mn Ni Pb และ Zn)
- สุ่มตัวอย่างทันทีจากทุกหน่วยทดลอง และสุ่มตัวอย่างครั้งต่อไปอีกทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการดำเนินการทดลองที่ 16 สัปดาห์ เพื่อการวิเคราะห์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พีเอช และปริมาณจุลินทรีย์ดิน (แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท)

นำดินตัวอย่างซึ่งเก็บที่ระยะเวลาทดลองต่างๆ ผึ่งแห้งในที่ร่ม แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์

#### เปอร์เซ็นต์คาร์บอน

นำดินที่ผ่านการร่อนแล้วย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแล้วเติม  $K_2Cr_2O_7$  ทิเตรตด้วย  $FeSO_4$  และนำผลไปคำนวณ

#### เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

นำดินที่ผ่านการร่อนใส่ catalyst และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ย่อยที่อุณหภูมิสูง นำสารละลายใส่เติมน้ำกลั่นแล้วกลั่น ในเครื่อง Microjdahl จับด้วยกรดบอริกแล้วติเตรตกับ  $H_2SO_4$

#### ปริมาณโลหะหนัก

นำดินที่ผ่านการร่อนแล้วสกัดด้วย 0.005 M DTPA แล้ววิเคราะห์โลหะหนัก 7 ชนิด (Cd Cu Fe Mn Ni Pb และZn) ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

#### ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

นำดินทดลองที่เก็บทุก 2 สัปดาห์ใส่ในถ้วยแล้วแขวนในโหล โดยใช้ NaOH เป็นตัวจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บ่มดิน 96 ชั่วโมง จึงนำไปติเตรตด้วยกรดไฮโดรคลอริก

#### ปริมาณจุลินทรีย์ดิน

นำดินทดลองที่เก็บทุก 2 สัปดาห์ ทำการเจือจางแล้วเลี้ยงบนอาหาร Nutreint agar Streptomycin Rose Bengal agar และ Na Caseinate agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท

ซึ่งรายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์อธิบายไว้ใน ภาคผนวกที่ ข

ตารางที่ 3.1 วิธีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

การติดตามปริมาณซัลโฟนาไมด์ในกากตะกอน บำบัดน้ำเสียชุมชน น้ำทิ้งก่อนเข้าสู่การบำบัดและน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว	
พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
1. ปริมาณซัลโฟนาไมด์ 2. พีเอช ( กากตะกอน ต่อ น้ำ = 1 ต่อ.10 ) 3. ความชื้น	Multiple Tube Enrichment Technique pH meter อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในกากตะกอนบำบัดน้ำเสียชุมชนต่อกิจกรรมจุลินทรีย์ดิน	
1. เปอร์เซ็นต์คาร์บอน 2. เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน 3. ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์	Walkley Black Method Micro Kjeldahl Method Respiration Technique
4. การนับจำนวนจุลินทรีย์ - แบคทีเรีย - รา  - แอคติโนมัยซีท	Total plate count - Nutrient agar - Streptomycin Rose Bengal agar - Na Caseinate agar
5. ปริมาณโลหะหนัก - แคดเมียม - ทองแดง - เหล็ก - มังกานีส - นิเกิล - ตะกั่ว - สังกะสี	Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) โดยสกัดด้วย 0.005 M DTPA " " " " " "
6. พีเอช ( ดิน ต่อ น้ำ = 1 ต่อ 5 )	pH Meter
7. เปอร์เซ็นต์เคลย์	Hydrometer
8. เปอร์เซ็นต์ซิลท์	"
9. เปอร์เซ็นต์แซนด์	"

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance เพื่อหา F-value และใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) สำหรับเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างข้อมูล ณ ระดับความเชื่อมั่น 95 %