บทที่ 2

วัสดุชีวภาพ เคมีภัณฑ์และวิธีการ

2.1. วัสดุน้ำทิ้งจากโรงงาน

ตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากโรงงานระยองบางกอกรับเบอร์ จำกัด ตั้งอยู่ที่ 20 หมู่ 6 ต.ละหาร อ.ปลวกแดง จ.ระยอง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทดลองกับ น้ำทิ้งจาก 4 แหล่งได้แก่

2.1.1.บ่อพักของน้ำทิ้งที่จากโรงงานผลิตยางแท่ง STR 5L

2.1.2.บ่อพักของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้น 60%

2.1.3.บ่อพักรวมของโรงงาน ระยองบางกอกรับเบอร์ จำกัด

2.1.4.หางน้ำยาง (Skim latex)

จากโรงงานผลิตน้ำยางข้น60% จะได้ส่วนที่เหลือเป็นหางน้ำยางจากนั้นนำไปเติมกรดซัลฟุริกแล้วใช้ไอน้ำช่วยในการจับก้อนเพื่อแยกส่วนเนื้อยางและส่วนที่เป็นน้ำใส ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะใช้ส่วนที่เป็นน้ำใสหรือที่เรียกว่า "ซีรัม" (Skim latex serum) นี้ไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเห็ดนางฟ้าในระดับถุงพลาสติก

2.2. วัสดุเพาะเห็ด

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเห็ดนางฟ้าในงานวิจัยนี้ จะใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยขี้เลื่อยไม้ยางพาราเพียงอย่างเดียว เนื่องจากในเขตภาคตะวันออกจะมีสวนยางเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายที่สูงมากนักในการเตรียมก้อนเชื้อเห็ด และยังได้ขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อนที่มีคุณภาพดีอีกด้วย ซึ่งวัสดุที่ใช้ในการเพาะเห็ดสำหรับงานวิจัยนี้ ได้แก่

2.2.1.ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ผลิตภัณฑ์บริษัทพารารับเบอร์ จ. จันทบุรี

2.2.2.รำละเอียด ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด กรุงเทพมหานคร

2.2.3.เมล็ดข้าวฟ่าง ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด กรุงเทพมหานคร

2.2.4.เชื้อเห็ดนางฟ้า ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด กรุงเทพมหานคร

2.2.5.อุปกรณ์ทำก้อนวัสดุเพาะเห็ด ได้แก่ ถุงพลาสติกขนาด 7" x 11" คอขวดพลาสติก จุกประหยัด สำลี และ หม้อนึ่งแบบไม่ใช้ความดัน

2.2.6.โรงเพาะเห็ดที่ทำด้วยจาก ขนาด 4 เมตร x 7 เมตร x 2.5 เมตร และคลุมด้วยตาข่ายพลาสติก

2.2.7.เครื่องชั่งน้ำหนัก 1 กิโลกรัม

2.2.8.ขวดแม่โขงชนิดแบนขนาด 750 ลบ.ซม.

2.3. วัสดุเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนข้างขวดได้เลย จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ทุกชนิดจะต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐานดังกล่าวข้างต้นด้วย ได้แก่

2.3.1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ของยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา ยกเว้น

Glucoce	ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน
Manitol	ยี่ห้อ Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา
Myo-inositol	ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
Soluble starch	ยี่ห้อ Univer ประเทศออสเตรเลีย

ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้แก่

Arabinose

Bacto Agar

Fructose

Gelatin

Lactose

Moltose

Nitrate broth

Peptone Agar

Phenol Red Broth base

Raffinose

Rhamnose

Simmon Citrate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SIM medium

Triple sugar iron agar broth

Sorbitol

Tryptone Agar

Urea Agar base

Xylose

2.3.2. หลอดทดลองขนาด 5 และ 15 มล.

2.3.3. หลอดดักก๊าซ

2.3.4. จานเลี้ยงเชื้อ

2.4.ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งทางเคมีและกายภาพ

2.4.1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ RADIO METER รุ่น PHM 83 AUTOCAL ประเทศเดนมาร์ค

2.4.2. เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ JENWAY รุ่น 6400 บริษัท LABQUIP ประเทศอังกฤษ

2.4.3. เครื่องปั่นแยก (Large cap refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ FALCON 6/300 รุ่น MSB 300.CR3.K บริษัท LABQUIP ประเทศอังกฤษ

2.4.4. เครื่องชั่งอย่างหยาบ ยี่ห้อ Sartorius รุ่น LC620S บริษัท ไซแอนติฟิก โปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

2.4.5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด ยี่ห้อ METTLER INSTRUMENT AG รุ่น AE200 บริษัท Mettler-Toledo (Thailand)

2.4.6. เครื่องกวน (Jar test) ยี่ห้อ VELP SCIENTIFICA รุ่น FP4 บริษัท อาศรม จำกัด ประเทศไทย

2.4.7. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) ยี่ห้อ CORNING บริษัท ควอลิเทค อินสทรูเมนต์ จำกัด ประเทศไทย

2.4.8. เครื่องมือวัดออกซิเจนในน้ำ ยี่ห้อ ORION รุ่น 830 บริษัท ORION Research,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.4.9. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ประกอบด้วย

2.4.9.1.เครื่องย่อยโปรตีน ยี่ห้อ C.GERHARDI รุ่น TT125

บริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

2.4.9.2 เครื่องดักไอกรด (Turbosog scrubber) ยี่ห้อ C.GERHARDI รุ่น TUR/K บริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

2.4.9.3 เครื่องกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Vapodest30) ยี่ห้อ C.GERHARDI รุ่น VAP30 บริษัทไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

2.4.9.4 เครื่องไตเตรทอัตโนมัติ (Tiroline alpha) ยี่ห้อ C.GERHARDI รุ่น TL10 บริษัทไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

2.4.10. ตู้อบความชื้น (Oven) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น B80 780113 ประเทศเยอรมันตะวันตก

2.4.11. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Heracus รุ่น B5050E ประเทศเยอรมันตะวันตก

2.4.12. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) ยี่ห้อ MARK II รุ่น 25 Manometer บริษัท DWYER INSTRUMENT ,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.4.13.ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HA-3D บริษัท HIRAYAMA Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.4.14. เครื่องวิเคราะห์ Atomic absorption ยี่ห้อ VARIAN รุ่น SpectrAA 300 บริษัท Techtron Pty Limited ประเทศออสเตรเลีย

2.4.15. เครื่องปั่น (Homoginizer) ยี่ห้อ Glas-col รุ่น GKH ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.4.16.เตาเผาอุณหภูมิสูง ยี่ห้อ FURNATROL II รุ่น CP-13310 บริษัทTHERMOLYNE SYBRON CORPORATION ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.4.17.เครื่องปั๊มอากาศ (Air compressor) ยี่ห้อ SWAN รุ่น DR-175 บริษัท Scientific promotion ประเทศไทย

2.4.18. โถทำแห้ง (Desicator)

2.4.19. ถ้วยกระเบื้องทนความร้อน (Porcelain)

2.4.20. นาฬิกาจับเวลา

2.4.21. เครื่องแก้วที่จำเป็นอื่นๆ

2.5. วัสดุเคมีภัณฑ์

2.5.1.วัสดุเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

2.5.1.1. สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ผลิตภัณฑ์บริษัท Fratelli Lamberti ประเทศอิตาลี

2.5.1.2. แอนไอออนิกพอลิเมอร์ ชื่อการค้า Lamfloc7985

ผลิตภัณฑ์บริษัทFratelli Lamberti ประเทศอิตาลี

2.5.1.3. แคทไอออนิกพอลิเมอร์ ชื่อการค้า Zentrifloc95

ผลิตภัณฑ์บริษัท Fratelli Lamberti ประเทศอิตาลี

2.5.1.4. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (เอ. อาร์. เกรด) ยี่ห้อ Merck ประเทศ สหรัฐอเมริกา

2.5.1.5.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (เอ. อาร์. เกรด) ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอแลนด์

2.5.1.6.กรดซัลฟุริก (เอ. อาร์. เกรด) ยี่ห้อ J.T. BAKER Chemicals ประเทศอเมริกา

2.5.2. วัสดุเคมีภัณฑ์ในการเพาะเห็ด

2.5.2.1. แคลเซียมคาร์บอเนต (เชิงพาณิชย์) ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด

2.5.2.2. แคลเซียมซัลเฟต (เชิงพาณิชย์) ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด

2.5.2.3 แมกนีเซียมซัลเฟต (เชิงพาณิชย์) ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด

2.5.2.4. ยูเรีย (เชิงพาณิชย์) ผลิตภัณฑ์บริษัท เห็ดสยาม จำกัด

2.5.3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ใช้เคมีภัณฑ์ระดับคุณภาพวิเคราะห์ (ระบุในภาคผนวก ก.)

2.6. วิธีการ

วิธีการวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

ตอนที่2.6.1 การบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีทางเคมี

2.6.1.1. วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและชีวภาพของน้ำทิ้งทั้ง 3 ประเภท

ศึกษาจากโรงงานระยองบางกอกรับเบอร์ จำกัด อ.ปลวกแดง จ.ระยอง ซึ่งจะศึกษาด้านสมบัติทางเคมีและชีวภาพของน้ำทิ้ง ก่อนและหลังการบำบัดทางเคมี พร้อมทั้งตะกอนที่ได้หลังการบำบัด ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้วิธีการดังแสดงในตารางที่2.1 ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว อยู่ในภาคผนวก ก ยกเว้นค่าpH และอุณหภูมิ

ตารางที่ 2.1 วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทิ้งและตะกอนที่ได้หลังการบำบัด

พารามิเตอร์	วิธีที่ใช้วิเคราะห์ *
pH	pH meter
Temperature	Thermometer
BOD_5	Azide modification method
SS (Suspended solids)	Gravimetric method
Sulphate	Turbidimetric method
Phosphorus , Phosphate	Stannous chloride method
Potassium	Atomic Absorption
Zinc (Zn)	Atomic Absorption
Magnesium (Mg)	Atomic Absorption
Calcium (Ca)	Atomic Absorption
Ferric (Fe)	Atomic Absorption
Lead (Pb)	Atomic Absorption
Total-N	Kjeldahl method
Turbidity	Spectrophotometric method
Transmittance	Spectrophotometric method

อ้างอิงจากหนังสือ Standard Methods for the examination of water and wastewater พิมพ์ครั้งที่18 , ปี1992

2.6.1.2.วิธีที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำทิ้งโดยใช้สารจับก้อน

- น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยางแท่ง STR 5L

วิธีทดลอง

2.6.1.2.1. การทดสอบขั้นต้น มีขึ้นเพื่อหาปริมาณสารเคมีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

2.6.1.2.1.1.ตวงน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยางแท่งปริมาตร 400 ลบ.ซม. ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 ลบ.ซม. แล้วปรับ pH ด้วย สารละลาย$Ca(OH_2)$ 1.0% ให้เป็น 8.0

2.6.1.2.1.2.เติมเฟอร์ริคคลอไรด์ ($FeCl_3$)1.0%(v/v) นำไปกวนโดยใช้เครื่องจาร์เทสต์ใช้อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

2.6.1.2.1.3 จากนั้นเติมแอนไอออนิกพอลิเมอร์ปริมาณ 2.0%(v/v) กวนโดยใช้อัตราเร็วเดิมเป็นเวลา 3 นาที

2.6.1.2.1.4. เมื่อครบเวลาจึงเติมแคทไอออนิกพอลิเมอร์ปริมาณ 2.0%(v/v) แล้วกวนต่ออีกโดยใช้อัตราเร็ว 20 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที สังเกตดูตะกอน ถ้ายังไม่มีตะกอน ให้เพิ่มปริมาณของสารละลายต่างๆ ข้างต้นขึ้นอีกทีละน้อย ทำซ้ำเช่นนี้เรื่อยๆ จนสังเกตเห็นตะกอนชัดเจนขึ้น นำค่าปริมาณสารที่ก่อให้เกิดตะกอนนี้ไปใช้ในการทดลองค่าpH ที่เหมาะสมต่อไป

2.6.1.2.2. **ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม**

2.6.1.2.2.1. ตวงน้ำทิ้งจากโรงยางแท่งปริมาตร 400 ลบ.ซม. ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 ลบ.ซม. จำนวน 7 ใบแล้วปรับค่า pH ด้วยสารละลาย $Ca(OH_2)$ 1.0% ให้อยู่ในช่วง 6-12

2.6.1.2.2.2.ปรับปริมาตรสุดท้ายของน้ำทิ้งให้เท่ากันอีกครั้งหนึ่ง

2.6.1.2.2.3.เติมสารจับก้อนและสารช่วยจับก้อนลงในบีกเกอร์ทุกใบในปริมาณเดียวกับข้อ 2.6.1.2.1.2-2.6.1.2.1.4 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.6.1.2.2.4.นำส่วนใสส่วนบนจากข้อ2.6.1.2.2.3. วัดค่า pH ความขุ่น และ ความใส (Transmitance) เพื่อดูว่าpH ใดที่ให้ค่าความขุ่นหลังการตกตะกอนต่ำสุด พร้อมทั้งสังเกตขนาดของตะกอนและสีของตะกอนที่เกิดขึ้นด้วย โดยจะนำค่าpH ที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

2.6.1.2.3. **ศึกษาปริมาณของสารจับก้อนและสารช่วยจับก้อนที่เหมาะสม**

2.6.1.2.3.1. **สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์**

2.6.1.2.3.1.1 ตวงน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตยางแท่ง ปริมาตร 400 ลบ.ซม. ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 ลบ.ซม. จำนวน 5 ใบ แล้วปรับค่า pH ด้วยสารละลาย $Ca(OH_2)$ 1.0 % ให้ได้ค่าตามข้อ 2.6.1.2.2.3.

2.6.1.2.3.1.2. เติมFerric chlorideในปริมาณต่างๆ กันลงในบีกเกอร์แต่ละใบ นำไปกวนโดยใช้เครื่องจาร์เทสต์ (Jar test) อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

2.6.1.2.3.1.3 จากนั้นเติมแอนไอออนิกพอลิเมอร์และแคทไอออนิกพอลิเมอร์ในปริมาณ 2%(v/v) แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ2.6.1.2.1.3และ2.6.1.2.1.4 ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.6.1.2.3.1.4 นำส่วนใสส่วนบนจากข้อ 2.6.1.2.3.1.3 มาวัดค่า pH ค่าความขุ่น และความใส เพื่อหาปริมาณFerric chlorideที่เหมาะสม พร้อมทั้งสังเกตขนาดของตะกอนและสีของตะกอนที่เกิดขึ้นด้วย

2.6.1.2.3.2 **แอนไอออนิกพอลิเมอร์**

2.6.1.2.3.21. ตวงน้ำทิ้งจากจากโรงงานผลิตยางแท่ง ปริมาตร 400 ลบ.ซม. ลงในบีก-เกอร์ขนาด 600 ลบ.ซม. จำนวน 8 ใบ แล้วปรับค่า pH ด้วยสารละลายCa(OH_2) 1.0% ให้ได้ผลตามข้อ 2.6.1.2.2.3

2.6.1.2.3.2.2. เติมFerric chloride ปริมาณเดียวกับข้อ 2.6.1.2.3.1.4 นำไปกวนโดยใช้เครื่องจาร์เทสต์ ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที

2.6.1.2.3.2.3. จากนั้นเติมแอนไอออนิกพอลิเมอร์ในปริมาณต่างๆ กันลงในบีกเกอร์แต่ละใบ กวนต่อไปโดยใช้ความเร็วเดิม เป็นเวลา 3 นาที

2.6.1.2.3.2.4.เติมแคทไอออนิกพอลิเมอร์ในปริมาณ2%(v/v)กวนต่อโดยเปลี่ยนความเร็วเป็น 20 รอบต่อนาที เป็น เวลา 20 นาที

2.6.1.2.3.2.5. นำส่วนใสจากข้อ2.6.1.2.3.2.4 มาวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1.2.3.1.4. เพื่อหาปริมาณของแอนไอออนิกพอลิเมอร์ที่เหมาะสม

2.6.1.2.3.3. **แคทไอออนิกพอลิเมอร์**

2.6.1.2.3.3.1. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1.2.3.2.1.-2.6.1.2.3.2.3 ในบีกเกอร์ขนาด 600 ลบ.ซม. จำนวน 8 ใบ

2.6.1.2.3.3.2. เติมแคทไอออนิกพอลิเมอร์ในปริมาณต่างๆ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบกวนโดยใช้ความเร็ว 20 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

2.6.1.2.3.3.3. นำส่วนใสจากข้อ 2.6.1.2.3.3.2 มาวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1.2.3.1.4 เพื่อหาปริมาณของแคทไอออนิกพอลิเมอร์ที่เหมาะสม

- **น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้น**

ทำการทดลองเช่นเดียวกับน้ำทิ้งของโรงงานยางแท่งในข้อ 2.6.1.2.1-2.6.1.2.3.

- **น้ำทิ้งจากบ่อพักรวมของโรงงานที่ศึกษา**

ทำการทดลองเช่นเดียวกับน้ำทิ้งของโรงงานยางแท่งในข้อ 2.6.1.2.1-2.6.1.2.3.

ตอนที่ 2.6.2. เป็นการเติมอากาศลงในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นและการจำแนกเชื้อจากน้ำทิ้งของโรงงานยาง ประกอบด้วยการทดลองดังนี้

2.6.2.1. ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศ (Aeration rate) ที่เหมาะสม

นำน้ำทิ้งของโรงงานผลิตน้ำยางข้นไปเติมอากาศ โดยการอัดอากาศเข้าด้านล่าง ในอัตราการให้อากาศ ดังนี้

- ที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำต่อนาที (vvm)
- ที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำต่อนาที (vvm)
- ที่ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำต่อนาที (vvm)

และขณะเดียวกันก็ทำการกวนน้ำที่อยู่ด้านล่างด้วยใบพัดกวน (Homoginizer) ที่ความเร็ว 10 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 ลิตร นำตัวอย่างเหล่านี้ไปวัดค่าบีโอดีและของแข็งแขวนลอยในช่วงเวลาต่างๆ บันทึกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมซึ่งสามารถลดค่าบีโอดีได้มากที่สุดโดยใช้เวลาน้อยที่สุด ซึ่งการวิเคราะห์BODและSS นั้นส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.2.2. การคัดแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งทั้ง 3 ประเภท

<u>วิธีทดลอง</u>

2.6.2.2.1. การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งทั้ง 3 ประเภท

นำตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานทั้ง 3 ประเภท มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:10 1:100 และ 1:1000 จากนั้นกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ประเภท คืออาหารYM(YM Agar) และอาหารNA(NA Agar) (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.1 และ 2.2) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยก ให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนจานเลี้ยงเชื้อ

2.6.2.2.2. การจำแนกสกุลของเชื้อที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมยางต่างๆ มาศึกษาลักษณะการเจริญ(culture characteristics) ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) และสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี (metabolic or biochemical characteristic) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อเป็นแนวทางในการจำแนกทางอนุกรมวิธาน อ้างตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9

2.6.2.2.2.1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้บนอาหารNA และอาหารYM(ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.1 และ 2.2) สังเกตลักษณะโคโลนี และรูปร่างของโคโลนี

- การติดสีแกรม

นำเชื้อที่เจริญบนอาหารNA และอาหารYM เป็นเวลา 18-24 ชม. ย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) บันทึกการย้อมติดสีแกรม

- การย้อมสีเอนโดสปอร์

นำเชื้อที่เจริญบนอาหาร NB และ YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง หยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green) ใช้ไฟลนพอให้เกิดไอ เป็นเวลา 1-2 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างน้ำ และย้อมสีซาฟรานินโอ เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

- การเคลื่อนที่

นำเชื้อแบคทีเรียมาปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (semi-solid medium ภาคผนวก ข. หมายเลข 3.1.4) ถ้าเชื้อเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวได้ จะเห็นสีแดงของไตรฟีนิลเตตระโซเดียมคลอไรด์(Triphenyltetrazoliumchloride)รอบๆ โคโลนีจนทั่วอาหาร แสดงว่าเชื้อมีการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวได้ แต่ถ้าเห็นสีแดงเฉพาะบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

2.6.2.2.2.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

เตรียมเชื้อเพื่อนำไปทดสอบ โดยใช้เชื้อที่มีอายุ 18-24 ชม. ใส่เชื้อลงบนอาหารชนิดต่าง ๆ และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3) ดังต่อไปนี้

- การเจริญบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI)
- กิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส (Catalase activity)
- การใช้ซิเตรท (Citrate utilization)
- การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction)
- การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)
- การรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction)
- การใช้คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate utilization)

- การทดสอบยูรีเอส (Urease test)
- การเจริญที่อุณหภูมิสูง (50°C)

ตอนที่2.6.3. เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำซีรัมที่แยกได้จากหางน้ำยางมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเห็ดนางฟ้าในระดับถุงพลาสติก ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยการทดลอง ดังนี้

2.6.3.1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำซีรัม

2.6.3.1.1. ขั้นตอนการเตรียมน้ำซีรัม

นำหางน้ำยางซึ่งได้จากการปั่นแยกน้ำยางออกของโรงงานผลิตน้ำยางข้น เติมกรดซัลฟุริก 1-1.5% ปริมาตรต่อปริมาตร ต่อจากนั้นทำให้เกิดการจับก้อนโดยใช้ไอน้ำ (steam) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำกับเนื้อยาง โดยการกรอง ผ่านกระดาษกรองชนิดหยาบ แล้วจึงนำส่วนที่เป็นน้ำ ปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วย 6 M NaOH จะได้น้ำซีรัมที่พร้อมจะใช้งานได้ต่อไป

2.6.3.1.2. ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของน้ำซีรัม

นำน้ำซีรัมที่ได้จากข้อ 2.6.3.1.1 นี้ไปทำการหาค่าต่าง ๆ ดังนี้ Total-N P K protien SO_4^{2-} Ca Mg Zn Fe Mn Cu และ Pb (ตามภาคผนวก ก)

2.6.3.2. ศึกษาปริมาณน้ำซีรัมที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดนางฟ้าโดยใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเพียงอย่างเดียว

2.6.3.2.1. การเตรียมหัวเชื้อเห็ดนางฟ้า

- การแยกเชื้อเห็ดนางฟ้าให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA(ภาคผนวก ข หมายเลข1) โดยวิธีฉีกหมวกเห็ดลงมาตามก้านดอกเห็ด และใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเนื้อเยื่อระหว่างหมวกเห็ดและก้านดอก เลี้ยงบนอาหาร PDA ในขวดแก้วแบบแบน ปริมาตร 250 ลบ.ซม. เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ตัดปลายเส้นใย แล้วนำมาเลี้ยงต่ออีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในขวดแก้วแบบแบน และทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อเห็ดที่บริสุทธิ์
- การเตรียมหัวเชื้อเห็ดนางฟ้าในเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อขยายเชื้อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำให้อ่อนตัวประมาณ 1 วัน และต้มให้สุกโดยเมล็ดไม่แตกแล้วเทน้ำทิ้ง จาก

นั้นเทเมล็ดข้าวฟ่างผึ่งลมไว้ในกระด้งพอหมาดๆ และบรรจุขวดแม่โขงชนิดแบนน้ำหนัก 200 กรัม ปิดจุกด้วยสำลี จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแบบใช้ความดันที่ 121° C เป็นเวลา 30 นาที ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งขวดบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างเย็น จากนั้นเขี่ยเชื้อเห็ดที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปลูกลงในเมล็ดข้าวฟ่างด้วยวิธีและสภาวะปลอดเชื้อ

2.6.3.2.2. **การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้าในถุงพลาสติก**

●วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (Randomize Complete Block design , RCB) มีปริมาณน้ำซีรัมต่าง ๆ กัน 6 สภาวะ ทั้งหมดมี 3 ซ้ำ และเปิดดอกซ้ำละ 30 ถุง

●อาหารขี้เลื่อยประกอบด้วย ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเพียงอย่างเดียวและใช้น้ำซีรัมที่มีค่า pH เป็นกลางในปริมาณต่างๆ กัน คือ 0 2 5 10 20 และ 50% ของน้ำที่ผสมในวัสดุเพาะเห็ด ซึ่งปกติจะใช้น้ำ 20 ลิตรต่อขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม โดยละลายน้ำซีรัมปริมาณข้างต้นในน้ำให้เข้ากันดี จากนั้นราดให้เป็นฝอยไปบนขี้เลื่อย แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันดี เมื่อเตรียมวัสดุปลูกในแต่ละสูตรพร้อมแล้ว จึงบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 7 x 11 ตารางนิ้ว ถุงละ 800 กรัม อัดวัสดุเพาะให้แน่น ใส่คอขวดพลาสติก ดึงปากถุงให้แน่นและครอบด้วยฝาพลาสติกอีกครั้งหนึ่ง นำไปนึ่งเพื่อทำลายเชื้อปนเปื้อนในหม้อนึ่งชนิดไม่อัดความดัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จับจากไอน้ำเริ่มพุ่งออกมา ปล่อยให้หม้อนึ่งเย็นลง จึงลำเลียงถุงวัสดุปลูกออก แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นหยอดเชื้อ เห็ดนางฟ้าในเมล็ดข้าวฟ่าง ลงในถุงวัสดุปลูกถุงละ 5 กรัม แล้วนำมาบ่มเชื้อเห็ดในโรงเพาะสภาพที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเส้นใยเจริญเติบโตเต็มถุงวัสดุปลูกจึงเปิดจุกพลาสติกแล้วออกนำไปวางบนชั้นเพาะในโรงเพาะซึ่งทำด้วยจากขนาด 4 ม.x 7 ม.x 2.5 ม.ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์80-90% อุณหภูมิประมาณ25-30°C ด้วยวิธีฉีดน้ำในโรงเพาะ วันละ 3-4 ครั้ง

●ศึกษาปริมาณธาตุอาหารในอาหารขี้เลื่อยที่ประกอบด้วยน้ำซีรั่มปริมาณต่างๆโดยวิเคราะห์ Total-N P K Mg Ca Zn ออร์กานิคคาร์บอน และ ความชื้น

●ศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้าหลังการเปิดถุงเห็ดในโรงเพาะเปิดดอกโดยบันทึก น้ำหนักผลผลิตของเห็ดนางฟ้า ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ RCB ทำการทดลองทั้งหมด 3 Block แต่ละBlock จะมีถุงอาหารขี้เลื่อยที่เติมน้ำซีรัม 0 2 5 10 20 และ 50% รวมเป็น 6 Treatment มี 30ถุงต่อ Block แล้วนำตัวเลขที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA

I19198475

2.6.3.3.ศึกษาว่าปริมาณน้ำซีรัมที่ใช้ทดแทนยูเรียในการเพาะเห็ดนางฟ้าด้วยขี้เลื่อยไม้ยางพาราโดยมีการเติมรำ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมซัลเฟตเท่านั้น

<u>วิธีทดลอง</u>

● การเตรียมวัสดุปลูกเห็ดนางฟ้าในถุงพลาสติก

โดยนำหัวเชื้อเห็ดนางฟ้าในเมล็ดข้าวฟ่าง มาเลี้ยงในวัสดุเพาะดังกล่าวข้างล่างนี้ วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์(CRB) ทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ถุง แต่ละซ้ำประกอบด้วย อาหารขี้เลื่อย ไม้ยางพารา รำและน้ำ อัตราส่วน 100:5:20 โดยน้ำหนัก ผสมกับ0.2%$MgSO_4$ 1.0% $CaCO_3$ และ0.5%$CaSO_4$ โดยน้ำหนักและในแต่ละสภาวะทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 8 สภาวะจะมีปริมาณน้ำซีรัมเป็น 0 2 2.5 3.3 5 10 20 และ 50% ของน้ำที่ผสมในวัสดุเพาะ โดยจะทำการละลายแมกนีเซียมซัลเฟตในน้ำที่มีน้ำซีรัมในปริมาณต่าง ๆ ข้างต้น คนให้เข้ากัน ราดให้เป็นฝอยลงบนขี้เลื่อยซึ่งผสมรำ $CaCO_3$ และ $CaSO_4$ เรียบร้อยแล้ว คลุกเคล้าให้เข้ากันดี จากนั้นจึงบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อน โดยทำการเลี้ยงในสภาวะ เช่นเดียวกับข้อ 2.6.3.2.2 นอกจากนี้ ทำการเตรียมสูตรอาหารเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับสภาวะข้างต้นซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมเช่นเดียวกับข้างต้น เสริมด้วย0.3%ยูเรีย โดยน้ำหนักและวัสดุเพาะพื้นฐานที่ประกอบด้วยขี้เลื่อยไม้ยางพาราและน้ำ

●ศึกษาปริมาณธาตุอาหารในอาหารขี้เลื่อยที่ประกอบด้วยน้ำซีรัมปริมาณต่างๆ โดยวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.6.3.2.2

●ศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้าหลังการเปิดถุงเห็ดในโรงเพาะเปิดดอก โดยบันทึก น้ำหนักผลผลิตสดของเห็ดนางฟ้าซึ่งวางแผนการทดลองแบบ RCB ทำการทดลองทั้งหมด 3 Block แต่ละBlock จะมีถุงอาหารขี้เลื่อยที่มีรำ5%ผสมกับ 0 2 2.5 5 และ 10% สูตรอาหารพื้นฐานและสูตรอาหารปกติ รวมเป็น 8 Treatment มี 30ถุงต่อBlock แล้วนำตัวเลขที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA

2.6.3.4.การศึกษาปริมาณรำที่เหมาะสมหลังการผสมน้ำซีรัมลงในวัสดุเพาะเห็ด

<u>วิธีทดลอง</u>

●การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้าในถุงพลาสติก

โดยนำหัวเชื้อเห็ดนางฟ้าในเมล็ดข้าวฟ่างมาเลี้ยงในวัสดุเพาะที่ประกอบด้วย ขี้เลื่อยไม้ยางพารา เติม 0.2% $MgSO_4$ 1.0% $CaCO_3$ และ 0.5% $CaSO_4$ โดยผสมกับน้ำซีรัมปริมาณ 2.5-3% ของน้ำที่

ผสมในวัสดุเพาะ และเติมรำในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0 1 3 5 และ 7% โดยน้ำหนัก ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ มีทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ถุง โดยละลายแมกนีเซียมซัลเฟตในน้ำที่มีน้ำซีรัมที่มีปริมาณเหมาะสม ราดไปบนขี้เลื่อย ซึ่งผสมรำในปริมาณต่างๆ แคลเซียมคาร์บอเนต และแคลเซียมซัลเฟตเรียบร้อยแล้ว คลุกเคล้าให้เข้ากันต่อจากนั้นจึงทำการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2.6.3.2.2.

● ศึกษาปริมาณธาตุอาหารในอาหารขี้เลื่อยเช่นเดียวกับข้อ 2.6.3.2.2

● วิเคราะห์ปริมาณสังกะสีที่อยู่ในดอกเห็ดนางฟ้าซึ่งเพาะในวัสดุปลูกที่มี 3% ของน้ำซีรัมในน้ำผสมในวัสดุเพาะและสูตรอาหารปกติจำนวน 10 ดอก จากก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 90 ก้อน บันทึกผลการวิเคราะห์

●ศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้าหลังการเปิดถุงเห็ดในโรงเพาะเปิดดอกซึ่งวางแผนการทดลองแบบ RCB ทำการทดลองทั้งหมด 3 Block แต่ละBlock จะมีถุงอาหารขี้เลื่อยที่เติมน้ำซีรัม 3% และเติมรำในปริมาณต่างๆ คือ 0 1 3 5 และ 7% สูตรอาหารพื้นฐาน และสูตรอาหารปกติ รวมเป็น 7 Treatment มี 30ถุงต่อBlock แล้วนำตัวเลขที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย