บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก มีประชากรและกลุ่มตัวอย่าง คือ สาหร่ายขนาดเล็ก และตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดโดยระบบบำบัดน้ำเสียขั้นที่ 2 แล้ว แต่ยังคงมีปริมาณสารอาหาร (ไนโตรเจน/ฟอสฟอรัส) สูง โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1.1 สาหร่ายขนาดเล็ก

ใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *Spirulina* sp. สายพันธุ์ TISTR 8222 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งมีคุณสมบัติดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของสาหร่ายขนาดเล็ก *Spirulina* sp. สายพันธุ์ TISTR 8222

TISTR Number	8222
Organism Name	*Spirulina* sp.
Type Strain	-
Original No.	-
History	-
Source	Pond, Bangkok,Thailand
Applications	-
Temperature	26°C
Medium	Zarrouk medium

3.1.2 ตัวอย่างน้ำเสีย

ใช้ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ที่ผ่านการบำบัดโดยระบบบำบัดน้ำเสียขั้นที่ 2 แล้ว แต่ยังคงมีปริมาณสารอาหาร (ไนโตรเจน/ฟอสฟอรัส) สูง

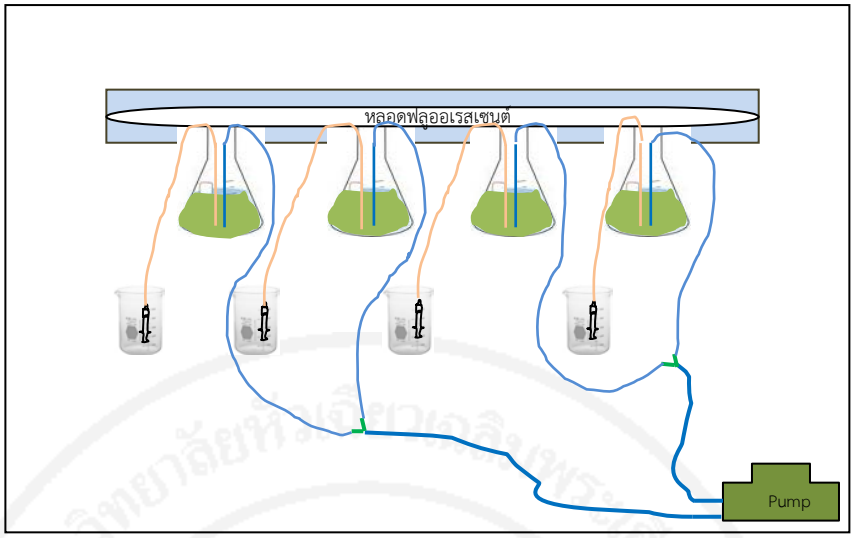
3.2 เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูล

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

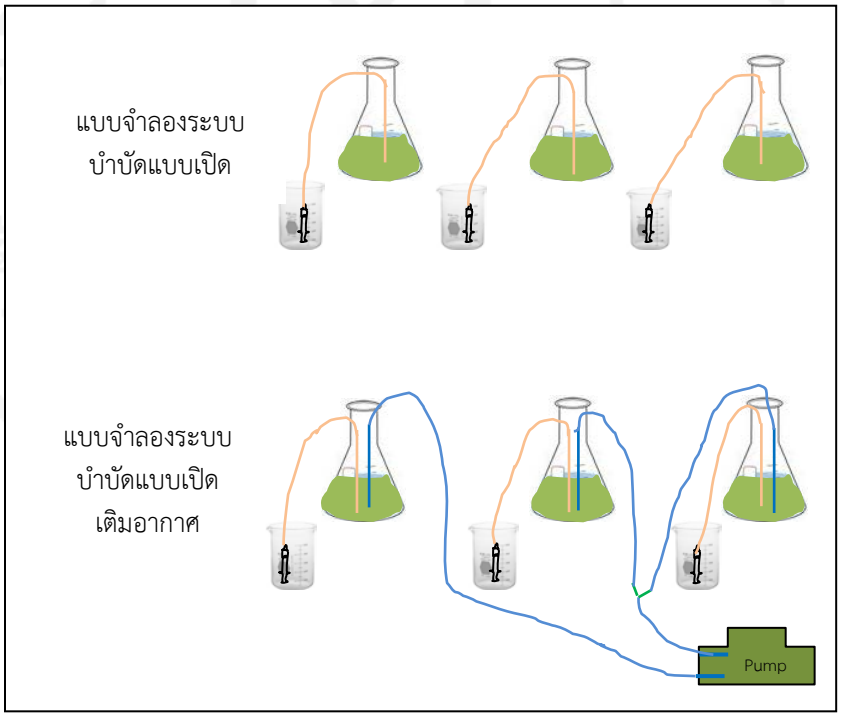
1) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ประกอบด้วย ขวดดูแรน หลอดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) และปั๊มเติมอากาศ (ภาพที่ 8)

2) แบบจำลองการบำบัดน้ำเสียโดยสาหร่ายขนาดเล็ก ประกอบด้วย แบบจำลองระบบบำบัดแบบเปิด และแบบจำลองระบบบำบัดแบบเปิดเติมอากาศ (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 8 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก



ภาพที่ 9 แบบจำลองการบำบัดน้ำเสียโดยสาหร่ายขนาดเล็ก



3) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS) และของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (VSS) ประกอบด้วย ตู้อบ เตาเผา เครื่องชั่ง กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 ซม. ชุดกรอง Membrane filter funnel และเครื่องดูดสุญญากาศ

4) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทีเคเอ็น (TKN) ประกอบด้วย ขวดเจลดาลห์ ขนาด 800 มล. ชุดเครื่องมือสำหรับการย่อยสลาย และชุดเครื่องมือสำหรับทำการกลั่นแอมโมเนีย

5) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ซีโอดี (COD) ประกอบด้วย หลอดย่อยขนาด 16 x 150 มม. มีฝาสลักเกลียว เตาอบ บิวเรต และขวดรูปกรวย

6) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) ประกอบด้วย เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และชุดเครื่องแก้วที่ล้างด้วยกรด

7) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ได้แก่ พีเอชมิเตอร์

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าทีเคเอ็น (TKN) ได้แก่

1.1) สารละลายปรอทซัลเฟต

1.2) น้ำยาสำหรับย่อยสลาย

1.3) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต

1.4) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์

(รายละเอียดการเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังภาคผนวก ก)

2) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าซีโอดี (COD) ได้แก่

2.1) สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

2.2) กรดซัลฟุริกและซิลเวอร์ซัลเฟต

2.3) สารละลายมาตรฐานเฟรัสแอมโมเนียม ซัลเฟต 0.05 นอร์มัล

2.4) สารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์

(รายละเอียดการเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังภาคผนวก ก)

3) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) ได้แก่

3.1) ฟีนอล์ฟธาลีนอินดิเคเตอร์

3.2) สารละลายกรด HCl 1 + 1

3.3) ถ่านกัมมันต์

3.4) สารละลายแวนนาเดต-โมลิบเดต

(รายละเอียดการเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังภาคผนวก ก)

3.2.3 พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้ (ตารางที่ 3) ประกอบด้วย

1) พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก มี 5 พารามิเตอร์ ได้แก่ ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ค่าของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย ค่าทีเคเอ็น ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าความเป็นกรดด่าง

2) พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก มี 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ ค่าซีโอดี ค่าทีเคเอ็น ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าความเป็นกรดด่าง

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์	ผลผลิตชีวมวล ส่วนที่เป็นของแข็ง	ผลผลิตชีวมวล ส่วนที่เป็นของเหลว	ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย	วิธีวิเคราะห์*
ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (TSS)	√			ทำให้แห้งที่ 103-105 °C
ของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (VSS)	√			เผาที่ 550 °C
ทีเคเอ็น (TKN)	√	√	√	วิธี Kjeldahl
ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP)		√	√	กรดแวนนาโดโมลิบโดฟอสฟอริค
ซีโอดี (COD)		√	√	รีฟลักซ์แบบปิด
ความเป็นกรดด่าง (pH)		√	√	Electrometric method

*รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ข

3.2.4 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

ใช้สูตรอาหารซาร์รุค (Zarrouk Medium) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก และเพิ่มการแปรผันปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของค่าซีโอดี โดยการเติมกลูโคสในปริมาณต่าง ๆ 3 รูปแบบ ได้แก่ การเติมกลูโคสปริมาณต่ำ (120 mg/L) ปริมาณปานกลาง (220 mg/L) และปริมาณสูง (320 mg/L) โดยมีรายละเอียดการเตรียมสูตรอาหาร ดังต่อไปนี้

1) การเตรียมสูตรอาหารซาร์รุค (Zarrouk Medium)

1.1) สารละลาย stock มีส่วนประกอบ 8 ชนิด คือ

1.1.1) $NaHCO_3$ 16.8 g

1.1.2) K_2HPO_4 0.5 g

1.1.3) $NaNO_3$ 2.5 g

1.1.4) K_2SO_4 1.0 g

1.1.5) NaCl 1.0 g

1.1.6) $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 g

1.1.6) $CaCl_2.2H_2O$ 0.04 g

1.1.8) $FeSO_4$ stock

1.2) สารละลาย A5 ประกอบด้วยสาร 5 ชนิด คือ

1.2.1) H_3BO_3 2.85 g

1.2.2) $MnCl_2.4H_2O$ 1.81 g

1.2.3) $ZnSO_4.7H_2O$ 0.22 g

1.2.4) $CuSO_4.5H_2O$ 0.08 g

1.2.5) MoO_3 0.015 g

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันใน Volumetric flask (ที่มีน้ำกลั่นอยู่เล็กน้อย) แล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ครบ 1 L

1.3) สารละลาย B6 ประกอบด้วยสาร 6 ชนิด คือ

1.3.1) NH_4VO_3 230.0 μg

1.3.2) $K_2Cr_2(SO_4)_4.24\ H_2O$ 960.0 μg

1.3.3) $NiSO_4.7H_2O$ 478.5 μg

1.3.4) $Na_2WO_4.2H_2O$ 179.4 μg

1.3.5) $Ti_2(SO_4)_3$ 400.0 μg

1.3.6) $Co(NO_3)_2.6H_2O$ 439.8 μg

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันใน Volumetric flask (ที่มีน้ำกลั่นอยู่เล็กน้อย) แล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ครบ 1 L

ผสมสารละลายทั้ง 3 ข้อ เข้าด้วยกันใน Volumetric flask (ที่มีน้ำกลั่นอยู่เล็กน้อย) ดังนี้

ละลายสารในข้อ 1 ทุกชนิดด้วยน้ำกลั่น + $FeSO_4$ stock 5 ml

ดูดสารละลาย stock A5 1 ml

ดูดสารละลาย stock B6 1 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 L (ปรับค่า pH ให้ได้ 10 $\pm$ 0.5)

2) การเตรียมปริมาณสารอินทรีย์ในรูปของค่าซีโอดี 3 รูปแบบ ดังนี้

2.1) สูตรอาหารซาร์รุค + ซีโอดี 120 mg/L

2.2) สูตรอาหารซาร์รุค + ซีโอดี 220 mg/L

2.3) สูตรอาหารซาร์รุค + ซีโอดี 320 mg/L

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 เก็บข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ

1) ข้อมูลปริมาณผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

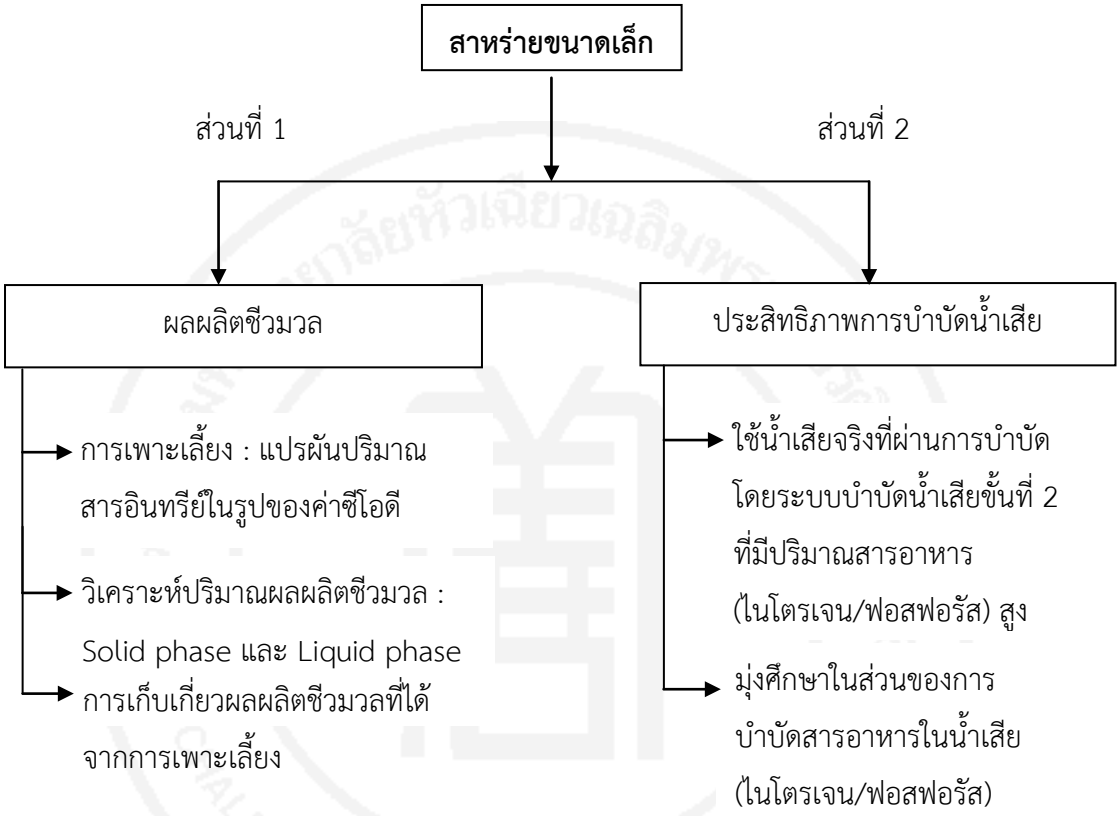
2) ข้อมูลประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็กที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน (แผนภูมิที่ 2) ดังนี้

1) ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก

2) ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก

แผนภูมิที่ 2 วิธีการศึกษา



3.3.2 รูปแบบชุดทดลอง

รูปแบบชุดทดลองเพื่อศึกษาปริมาณผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก มีดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 ชุดทดลองเพื่อศึกษาปริมาณผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก มี 4 รูปแบบ (ภาพที่ 10) โดยในทุกรูปแบบใช้อาหารสูตรซาร์รุคในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันที่การเติมสารอินทรีย์ (กลูโคส) ในรูปของซีโอดี โดยเริ่มต้นที่ปริมาณซีโอดีต่ำที่สุด คือ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งกำหนดโดยใช้ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (ซีโอดี ไม่เกิน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 220 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชุดทดลองที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

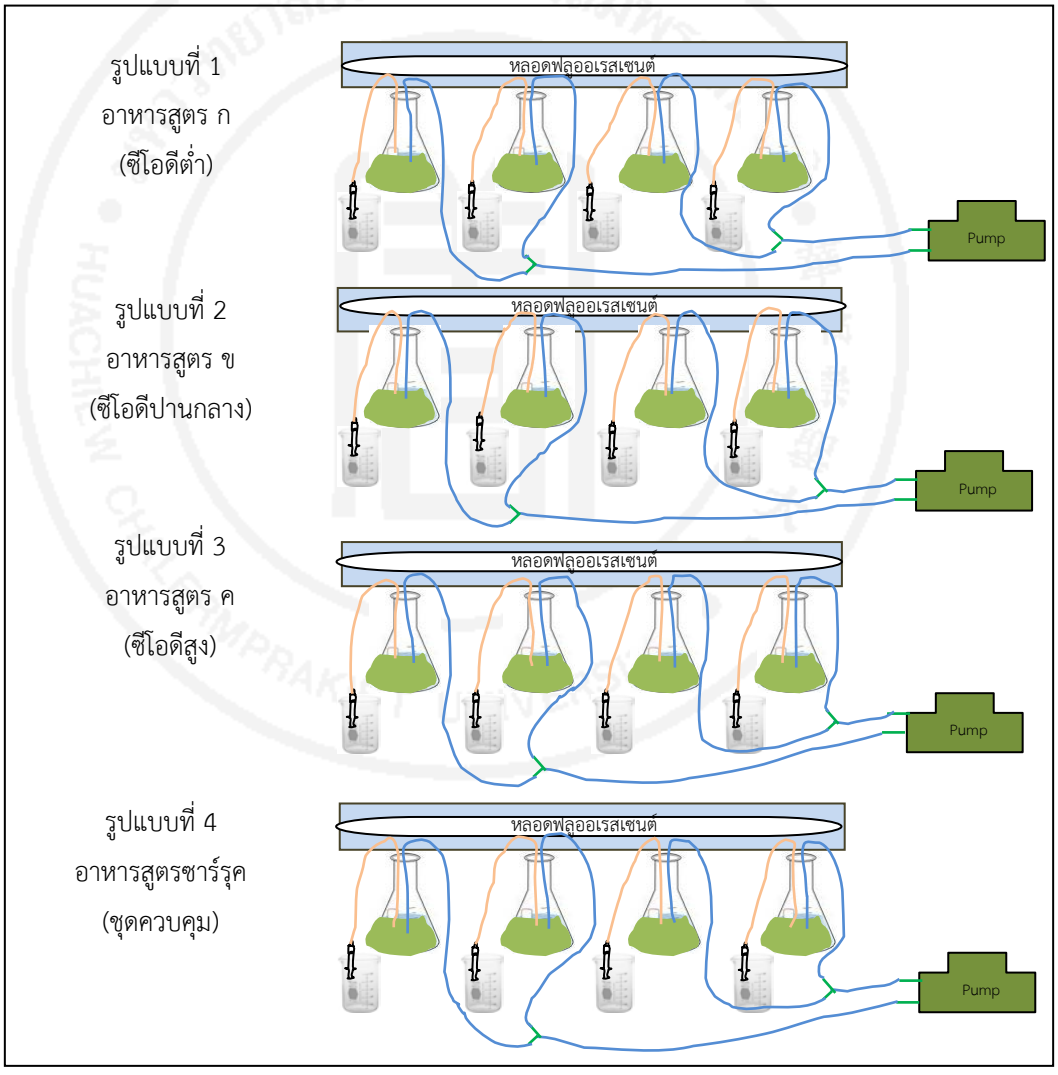
1.1) ชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กด้วยอาหารสูตร ก (ซีโอดีต่ำ; 120 มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.2) ชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กด้วยอาหารสูตร ข (ซีโอดีปานกลาง; 220 มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.3) ชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กด้วยอาหารสูตร ค (ซีโอดีสูง; 320 มิลลิกรัมต่อลิตร)

1.4) ชุดควบคุมที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กด้วยอาหารสูตรซาร์รุค

ภาพที่ 10 ชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก



โดยมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มผลผลิตชีวมวล (กระบวนการสังเคราะห์แสง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก ดังนี้

(1) อุณหภูมิ

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้อุณหภูมิห้อง (28±2°C) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

(2) แสง

ใช้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ควบคู่ไปกับแสงจากธรรมชาติ โดยมีค่าความเข้มของแสงประมาณ 3,620 – 3,980 ลักซ์

ส่วนที่ 2 ชุดทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก มี 4 รูปแบบ (ภาพที่ 11) ดังนี้

2.1) ชุดทดลองแบบเปิดเติมอากาศที่มีการเพิ่มแสงประดิษฐ์ (T1 : Light + Aeration)

2.2) ชุดทดลองแบบเปิดที่มีการเพิ่มแสงประดิษฐ์ (T2 : Light + No Aeration)

2.3) ชุดทดลองแบบเปิดเติมอากาศที่ใช้แสงธรรมชาติ (T3 : No Light + Aeration)

2.4) ชุดทดลองแบบเปิดที่ใช้แสงธรรมชาติ (T4 : No Light + No Aeration)

3.3.3 ขั้นตอนการจำลองชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

ส่วนที่ 1 การจำลองชุดทดลองสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2) ดำเนินการเพาะเลี้ยง โดยใส่สาหร่ายขนาดเล็กปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L ที่บรรจุอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ ตามรูปแบบการทดลองเรียบร้อยแล้ว

3) เติมอากาศเป็นช่วงๆ ละ 30 นาที จำนวน 3 รอบ/วัน

4) เก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณผลผลิตชีวมวลที่เพิ่มขึ้น 2-3 ครั้ง/สัปดาห์

ส่วนที่ 2 การจำลองชุดทดลองสำหรับการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก มีขั้นตอนดังนี้

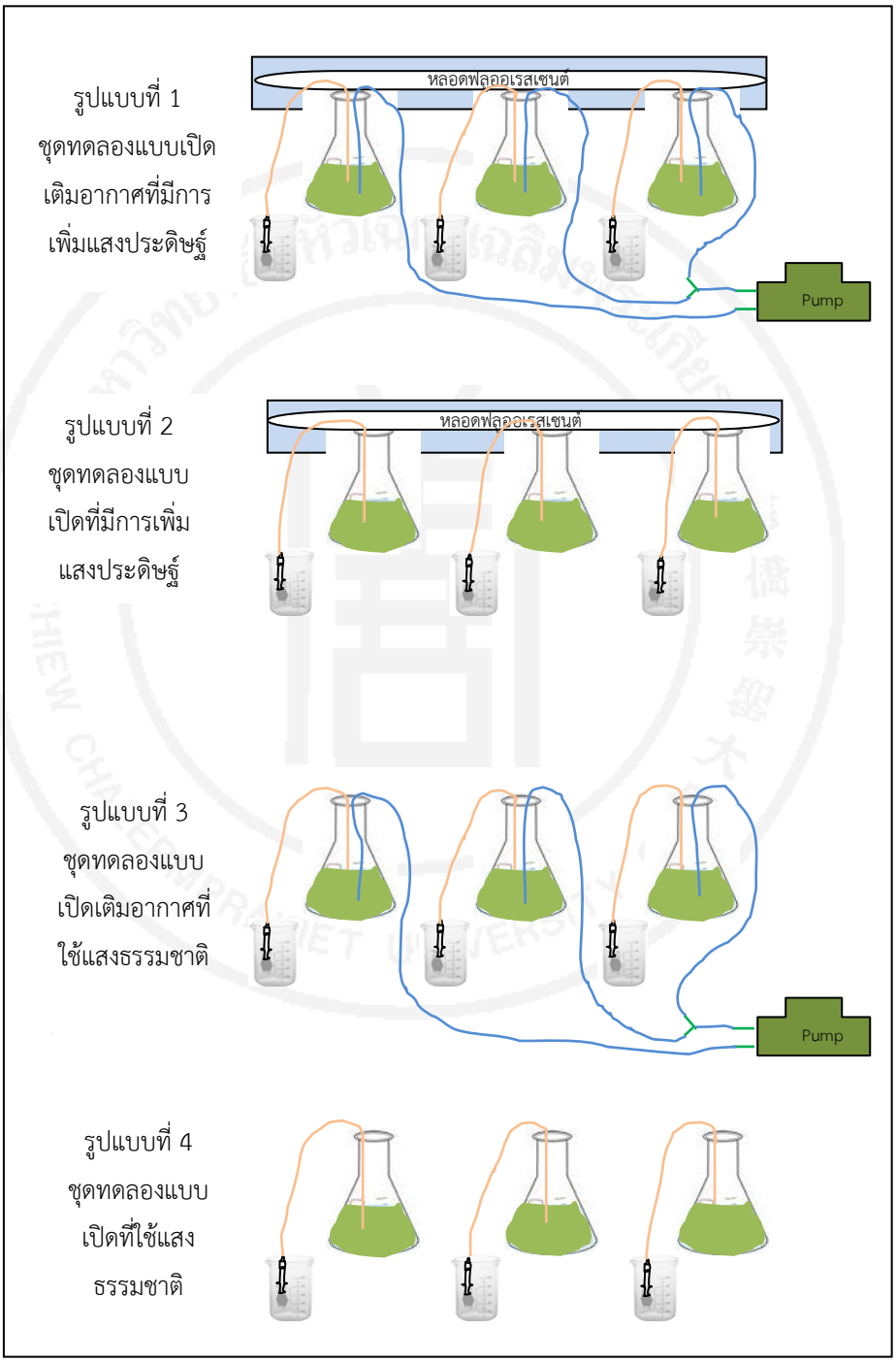
1) เตรียมน้ำเสีย 2 ส่วนๆ หนึ่งนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อีกส่วนหนึ่งไม่ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

2) เติมน้ำเสียทั้ง 2 ส่วนลงในแบบจำลองระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 4 รูปแบบ และชุดควบคุมทั้ง 4 รูปแบบ โดยใช้ขวดรูปชมพู่ ขนาด 1 L แล้วเติมชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในการศึกษาส่วนที่ 1 ปริมาณขวดละ 10 มิลลิลิตร ลงในแบบจำลองระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 4 รูปแบบ

3) เติมอากาศลงในแบบจำลองระบบบำบัดแบบเปิดเติมอากาศ (ชุดทดลองที่ 1 และ 3) เป็นระยะเวลาประมาณ 30 นาที จำนวน 3 รอบ/วัน และเพิ่มแสงประดิษฐ์(ชุดทดลองที่ 1 และ 2) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนแบบจำลองระบบบำบัดแบบเปิด ไม่ต้องทำการเติมอากาศและไม่ต้องเพิ่มแสงประดิษฐ์ (ชุดทดลองที่ 4)

4) เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากระบบบำบัดทุกรูปแบบ 2-3 ครั้ง/สัปดาห์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลักษณะน้ำทิ้ง และคำนวณประสิทธิภาพของระบบ

ภาพที่ 11 ชุดทดลองสำหรับการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็ก



3.3.4 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

ส่วนที่ 1 การเก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตชีวมวลที่เพิ่มขึ้น มีขั้นตอนดังนี้

1) เก็บตัวอย่างจากชุดทดลอง โดยใช้กระบอกฉีดยาสำหรับเก็บตัวอย่าง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวจากในขวดรูปชมพู่ลงในขวดเก็บตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร

2) นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการกรอง เพื่อแยกส่วนที่เป็นอนุภาค (Solid phase) ออกจากส่วนของเหลว (Liquid phase) โดยใช้กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 ซม.

3) นำตัวอย่างทั้งสองส่วนไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้

ส่วนที่ 2 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากการบำบัดโดยแบบจำลองระบบบำบัดแบบเปิด ระบบบำบัดแบบเปิดเติมอากาศ และชุดควบคุม ดำเนินการเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงในการศึกษาส่วนที่ 1

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ลำดับ	กิจกรรม	พ.ศ. 2556							พ.ศ. 2557												พ.ศ. 2558			
		มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1	ทบทวนแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง/การเพิ่มผลผลิตชีวมวล และการบำบัดน้ำเสียโดยสาหร่ายขนาดเล็ก	■	■	■																				
2	เสนอขออนุมัติหัวข้อวิทยานิพนธ์และจัดทำเค้าโครงวิทยานิพนธ์	■	■	■	■																			
3	เตรียมการวางแผนเกี่ยวกับอุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง วิธีเตรียมอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก และสารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ				■	■	■																	
4	สอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และแก้ไขตามข้อเสนอแนะของคณะกรรมการสอบฯ						■	■																
5	เสนอขอจริยธรรมการวิจัย						■	■																

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	กิจกรรม	พ.ศ. 2556							พ.ศ. 2557												พ.ศ. 2558			
		มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
6	ดำเนินการทดลองตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้																							
7	เก็บและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง																							
8	สรุปข้อมูล และจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์																							
9	ส่งบทความวิจัยตีพิมพ์ สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์																							

3.6 ข้อจำกัดของการวิจัย

ข้อมูลปริมาณผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายขนาดเล็กที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นข้อมูลจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ผ่านการบำบัดด้วยระบบบำบัดขั้นที่สองแล้ว

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學