บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมไคติน/ไคโตซาน

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก (Comercial grade) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยอาซาฮี เคมีภัณฑ์ จำกัด
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยน้ำหนัก (Comercial grade) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยอาซาฮี เคมีภัณฑ์ จำกัด
3. แก๊สไนโตรเจน (N_2 gas) ความเข้มข้นร้อยละ 99.5: PRAXAIR

3.1.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โลหะหนัก

1. สารละลายมาตรฐานนิกเกิล (AR grade): MERCK
2. สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (AR grade): MERCK
3. สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) (AR grade): UNIVAR

3.1.3 อื่นๆ

1. โครเมียมไตรออกไซด์ (CrO_3) (AR grade): UNIVAR
2. นิกเกิล (Ni) (AR grade) (min. purity 99.8%): Riedel-deHaen
3. ตะกั่วไนเตรต ($Pb(NO_3)_2$) (AR grade): MERCK
4. ไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (Diphenylcarbazide solution) (AR grade): Carlo erba
5. กรดแอซีติก (CH_3COOH) ความเข้มข้นร้อยละ 100 โดยน้ำหนัก (AR grade): BDH
6. กรดไนทริก (HNO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 69โดยน้ำหนัก (AR grade): MERCK
7. กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 96 โดยน้ำหนัก (AR grade): Carlo erba
8. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 32 โดยน้ำหนัก (AR grade): Fluka
9. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) (AR grade): Ajax chemicals
10. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (min. purity >99.0%) (AR grade): Fluka

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ไอโอดีน (I_2) (AR grade) (min. purity > 99.5%): Fluka
12. โปแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) (AR grade) (min. purity >99.9%): Aldrich
13. โปแทสเซียมไอโอเดต (KIO_3) (AR grade): MERCK

3.1.4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient broth)
2. ผงวุ้น (Agar)
3. น้ำเกลือ (Normal saline) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมไคติน/ไคโตซาน

1. ตู้อบ (Hot air oven): BINDER รุ่น ED115
2. แผ่นความร้อนพร้อมเครื่องกวนระบบแม่เหล็กหมุน (Hot plate and Magnetic stirrer): PNP รุ่น HS-2
3. ชุดเครื่องกวนชนิดปรับความเร็วรอบ และใบกวนเทปลอน: IKLABOR TECHNIK รุ่น RW 20n
4. เครื่องให้ความร้อน (Heating mentle): FALC รุ่น MF-1000
5. ชุดปฏิกรณ์เคมีแบบ 5 คอ (Reactor) ขนาด 2000 มิลลิลิตร
6. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ช่วงอุณหภูมิ 0-100 และ 0-200 องศาเซลเซียส
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath): Scientific Promotion รุ่น Dh30-110
8. เครื่องชั่ง (Analytical balance): METTLER TOLEDO รุ่น PB 3002-S
9. โถดูดความชื้น (Desicator): SANPLATEC รุ่น C-3W No.0031
10. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump): Welch รุ่น 8890
11. ชุดกรองสุญญากาศ (Suction flask และ Buchner funnel): Edwards รุ่น RV3
12. ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 20 และ 24 mesh

3.2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการหาสภาวะการดูดซับโลหะหนัก

1. Atomic Absorption Spectrophotometer/Flame type (AAS/Flame type): Shimadzu รุ่น AA-6800
2. UV/VIS Spectrophotometer: Jasco รุ่น V-530
3. อุปกรณ์จาร์เทส (Jar test): VELP รุ่น JLT 6
4. เครื่องวัดพีเอช (pH meter): HANNA instruments รุ่น pH 211

3.2.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการศึกษาตะกอนไคโตซาน

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM): Jeol JSM 6400
2. เครื่อง Energy Dispersive X-ray analysis (EDX): Jeol JSM 6400
3. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): Nicolet รุ่น Magna-IR 750

3.2.4 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการศึกษาเรื่องจุลินทรีย์

1. เครื่องเขย่า (Shaker): Newbrunswick Scientific รุ่น Inova-2100
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator): Memmert รุ่น UE 200
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larmina flow): Labservice Limited
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge): Beckman รุ่น J2-21
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter): Scientific Industries รุ่น G 560E
6. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave): Hirayama Manufacturing รุ่น HA-36

3.3 วิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การเตรียมเกล็ดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และการวิเคราะห์สมบัติของเกล็ดไคโตซาน

ส่วนที่ 2 การศึกษาความสามารถของเกล็ดไคโตซานในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียอุตสาหกรรมและศึกษากลไกการกำจัด

ส่วนที่ 3 การศึกษาอัตราการลดลงของโลหะหนัก การคัดเลือก และพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในตะกอนไคโตซาน

3.3.1 การเตรียมเกล็ดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

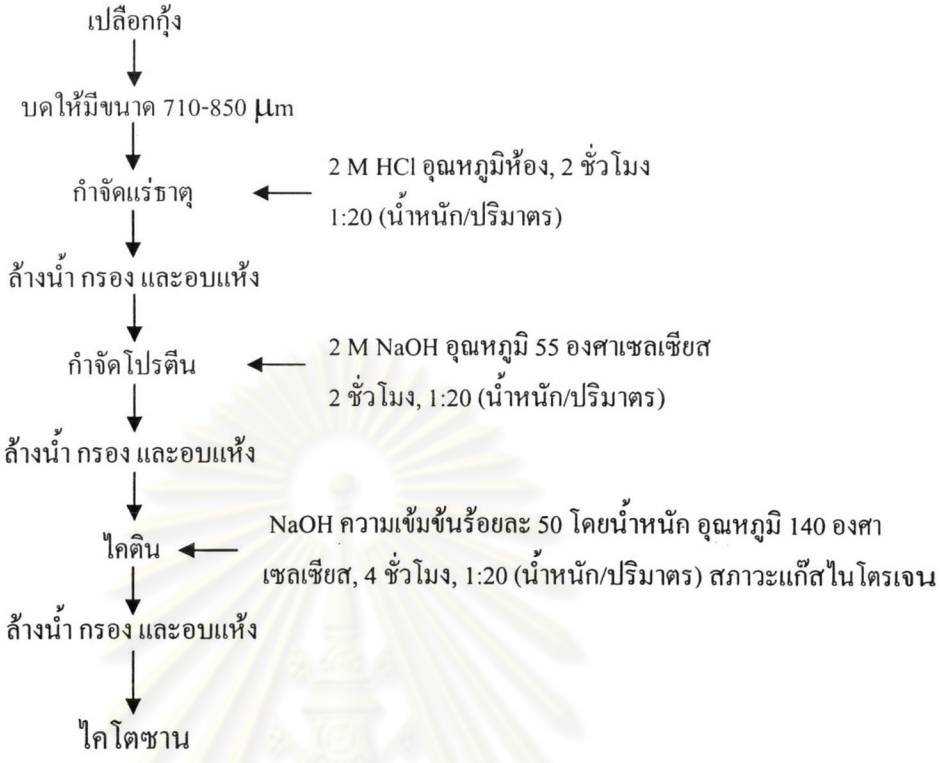
วิธีการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งในงานวิจัยนี้ ใช้สภาวะตามการศึกษาของ เยาวภา (2534) มีขั้นตอนประกอบด้วยการเตรียมไคติน โดยแบ่งออกเป็นการกำจัดโปรตีน การกำจัดแร่ธาตุ และการเตรียมไคโตซานโดยการกำจัดหมู่แอซีทิล แสดงดังรูปที่ 3.1 ดังนี้

1. เปลือกกุ้ง ล้างน้ำให้สะอาดโดยแยกเอาส่วนเนื้อ ไขมัน และอื่นๆออก หลังจากนั้นนำไปอบแห้ง และบดให้มีขนาด 710-850 ไมโครเมตร (20-24 mesh)

2. กำจัดแร่ธาตุ (Demineralization) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อปริมาณกรด (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 1:20 ล้างน้ำจนเป็นกลาง กรอง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง

3. กำจัดโปรตีน (Deproteinization) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อปริมาณด่าง (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 1:20 ล้างน้ำจนเป็นกลาง กรอง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ ไคติน

4. กำจัดหมู่แอซีทิล (Deacetylation) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 140 ± 10 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนปริมาณไคตินต่อปริมาณด่างเป็น 1:20 ล้างน้ำจนเป็นกลาง กรอง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ ไคโตซาน



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

3.3.2. การวิเคราะห์สมบัติของเกล็ดไคโตซาน

1. ระดับการกำจัดหมู่แอซีทิล (Degree of deacetylation) วิเคราะห์โดยวิธี Colloidal titration (Amino residue analysis) (Hayes, 1988) ดังแสดงในภาคผนวก ง

2. ความหนืด (Viscosity) ของสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 ในกรดแอซีติกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer: spindle No.1 ความเร็ว 105 รอบ/นาที: วิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

3. น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) โดยใช้เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC): วิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

4. ค่าการดูดซับไอโอดีน (Iodine number) วิเคราะห์โดยวิธี Tritration (ASTM, 1994) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.3.3 การศึกษาความสามารถของไคโตซานในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียอุตสาหกรรมด้วยเครื่องจาร์เทส (Jar-test)

1. ทดสอบสภาวะในการกำจัดโลหะหนัก ได้แก่ ปริมาณเกล็ดไคโตซาน พีเอชของน้ำเสียอุตสาหกรรม อัตราเร็วของการกวน และเวลาที่ใช้ในการกวน โดยใช้การสำรวจเอกสาร หรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังตารางที่ 3.1 และทดลองบำบัดกับน้ำเสียอุตสาหกรรม วิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของโลหะหนักแต่ละชนิด เพื่อระบุค่าอัตราเร็วและเวลาในการกวนที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 3.1 สภาวะในการกำจัดโลหะหนัก

พารามิเตอร์	สภาวะ*				
	1	2	3	4	5
1. อัตราส่วนปริมาณน้ำเสียอุตสาหกรรม : เกล็ดไคโตซาน (ปริมาตร/น้ำหนัก)	50:1	1000:1	1000:1	300:1	235:1
2. พีเอช	6	6	4	5	5.5
3. อัตราเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	150	150	150	400	กวน 120 รอบต่อนาที/1 นาที กวน 40 รอบต่อนาที/30 นาที ทิ้งให้ตกตะกอน 24 ชั่วโมง
4. เวลาในการกวน (ชั่วโมง)	12	24	24	2.40	

หมายเหตุ * สภาวะที่ 1 จาก Bassi et al. (1999)
สภาวะที่ 2-3 จาก Aung (1997)
สภาวะที่ 4 จาก Schumhl et al. (2001)
สภาวะที่ 5 จาก เกษม (2543)

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในรูปของพีเอชและปริมาณเกล็ดไคโตซานด้วยเครื่องจาร์เทสที่อัตราเร็วและเวลาในการกวนจากสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 1

2.1 หาพีเอชที่เหมาะสมในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียอุตสาหกรรม

- นำน้ำเสียอุตสาหกรรม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์
- ปรับพีเอชของน้ำให้เป็น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5

- เติมเกล็ดไคโตซานปริมาณ 4 กรัมลงในบีกเกอร์แต่ละใบ
- กวนด้วยเครื่องจาร์เทสตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 1
- วัดปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในน้ำอุตสาหกรรม
- คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของโลหะหนักแต่ละชนิด

2.2 หาปริมาณเกล็ดไคโตซานที่เหมาะสมในการกำจัดโลหะหนักในน้ำเสียอุตสาหกรรม

- นำน้ำเสียอุตสาหกรรม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์
- ปรับพีเอชให้ได้ค่าตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 2.1
- เติมเกล็ดไคโตซานปริมาณ 3.3, 5 และ10 กรัมลงในบีกเกอร์แต่ละใบ
- กวนด้วยเครื่องจาร์เทสตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 1
- วัดปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในน้ำเสียอุตสาหกรรม
- คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดโลหะหนักเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของโลหะหนักแต่ละชนิด

3. วิเคราะห์ค่าความสกปรกของน้ำเสียอุตสาหกรรมในรูป COD หลังการบำบัดด้วยเกล็ดไคโตซานตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 ด้วยวิธีวิเคราะห์ ดังแสดงในภาคผนวก ข

4. ศึกษาการเสริมฤทธิ์ (Synergism) และ การหักล้างฤทธิ์ (Antagonism) ของโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่ว โดยเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์โลหะชนิดเดียวจากสารละลาย CrO_3, Ni หรือ $Pb(NO_3)_2$ และน้ำเสียสังเคราะห์โลหะผสมให้ครอบคลุมกับปริมาณที่มีอยู่จริงในน้ำเสียอุตสาหกรรม

5. ศึกษาสมบัติการมีรูพรุนของไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) และวิเคราะห์ธาตุในไคโตซานด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray analysis (EDX): วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. วิเคราะห์ตะกอนไคโตซานด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรสโคป (Fourier Transform Infared Spectroscope: FTIR): ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่กับเวลาที่ใช้ในการกวน เพื่อหาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 มาทำการทดลอง และวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในน้ำเสียอุตสาหกรรม ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งทำการทดลองทั้งในสภาวะของน้ำเสียอุตสาหกรรม น้ำเสียสังเคราะห์โลหะชนิดเดียว และน้ำเสียสังเคราะห์โลหะผสม

3.3.4 ศึกษากลไกการกำจัดโลหะหนัก

1. วิเคราะห์ระบบการดูดซับโลหะหนัก โดยอาศัยพื้นฐานทางคณิตศาสตร์ เพื่อศึกษารูปแบบสมการการดูดซับของ Langmuir และ Freundlich ดังนี้

- นำน้ำเสียสังเคราะห์โครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) ความเข้มข้น 1×10^{3}-10×10^{3} มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์
- นำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 ในหัวข้อ 3.3.3 มาทำการทดลอง
- วัดปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในน้ำเสียสังเคราะห์
- ทำซ้ำโดยเปลี่ยนชนิดของน้ำเสียเป็นน้ำเสียสังเคราะห์นิกเกิลและตะกั่ว และน้ำเสียสังเคราะห์ผสม

3.3.5 การศึกษาอัตราการลดลงของโลหะหนัก การคัดเลือก และพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในตะกอนไคโตซาน

1. บ่มตะกอนไคโตซานที่ได้จากผลการทดลองที่ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในตะกอนไคโตซานทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยย่อยตะกอนไคโตซานปริมาณ 5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยสภาวะนี้ไม่ทำให้เกิดการแตกของผนังเซลล์จุลินทรีย์ (ธีรวิทย์, 2541) เมื่อกรอง และนำสารละลายส่วนใสวัดปริมาณโลหะหนัก เพื่อคำนวณหาการลดลงของปริมาณโลหะหนักโดยเซลล์จุลินทรีย์กับเวลาที่ใช้ในการบ่ม โดยปริมาณโลหะหนักในเซลล์จุลินทรีย์ = ปริมาณโลหะหนักในตะกอนเริ่มต้น – ปริมาณโลหะหนักที่เหลืออยู่ในสารละลายกรด

2. คัดเลือก และพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในตะกอนไคโตซาน ดังนี้

- เก็บตะกอนไคโตซานที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- เกลี่ยเชื้อ (Spread plate) บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Nutrient Agar: NA) และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มีโครเมียม (เฮกซะเวเลนซ์) นิกเกิล และตะกั่วอยู่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิเดียวกับตะกอนที่เก็บมา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- นับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแข็งทุกชนิด

- คัดเลือก และพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย