

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการทดลอง

##### 3.1 การเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 *Thiobacillus ferrooxidans* (ATCC 19859) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 9K medium (DMS, 1993) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

สารละลาย A

แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.4	กรัม
โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย B

ไอรอนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เนื่องจาก ไอรอนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตเมื่อถูกความร้อนจะถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นการเตรียมสารละลาย B เตรียมโดยการนึ่งฆ่าเชื่อน้ำกลั่นก่อนแล้วจึงนำไอรอนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตมาผสมแล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน

สารละลาย A และ สารละลาย B จะเก็บแยกกัน เมื่อจะใช้จะผสม สารละลาย A 4 ส่วนกับสารละลาย B 1 ส่วน ปรับพีเอชเป็น 2.8 ด้วยกรดซัลฟิวริก 1 นอร์มัล

การเลี้ยง *T. ferrooxidans* เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 10 มิลลิลิตรต่อปริมาณสารอาหาร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อแบคทีเรียจะเจริญเติบโตเต็มที่ (แสดงดังรูปที่ 1 ในภาคผนวก ก) จึงนำไปใช้ต่อไป

3.1.2 *Thiobacillus thiooxidans* (ATCC 8085) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว *Thiobacillus thiooxidans* medium (DSM, 1993) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

### ส่วนประกอบ A

แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0.1	กรัม
โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3.0	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.14	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 4.2 ด้วยกรดซัลฟิวริก 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### ส่วนประกอบ B

ผงซัลเฟอร์ (sulfur powdered) 10.0 กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 112 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อจะใช้ *Thiobacillus thiooxidans* medium จะเติม ส่วนประกอบ B ลงไปบนผิวหน้าของ ส่วนประกอบ A

การเลี้ยง *T. thiooxidans* เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณแบคทีเรีย 10 มิลลิลิตรต่อปริมาณสารอาหาร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ (แสดงดังรูปที่ 1 ในภาคผนวก ก) จึงนำไปใช้ต่อไป

### 3.2 การเตรียมกากตะกอนโลหะหนัก

กากตะกอนโลหะที่ใช้ในการทดลอง เป็นกากตะกอนที่ได้จากลานตากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียทางเคมีของโรงงานอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการชุบเคลือบนิเกิล (แสดงดังรูปที่ 2 ในภาคผนวก ก) กากตะกอนโลหะหนักดังกล่าว จะนำมาทำให้แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และบดละเอียด แล้วนำไปผ่านตะแกรงแยกขนาดเบอร์ 100 ให้กากตะกอนโลหะหนักมีขนาด 100 ไมครอน

### 3.3 การวิเคราะห์พีเอชเริ่มต้นของกากตะกอนโลหะหนัก (Menon และ Dave, 1993)

การวิเคราะห์พีเอชเริ่มต้นของกากตะกอนโลหะหนัก ทำได้โดยนำกากตะกอนโลหะหนัก ผสมกับน้ำกลั่นพีเอชประมาณ 7.0 ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้ววัดพีเอช ของแต่ละความเข้มข้นด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์รุ่น METTLER DELTA 340 จากนั้นนำค่าพีเอชที่วัดได้คำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) โดยใช้สมการ

$$\text{pH} = -\log \{ \text{H}^+ \}$$

จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนและค่าการเจือจาง (dilution) ของกากตะกอนโลหะหนักในน้ำกลั่น ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ จากกราฟจะได้ค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่ค่าการเจือจางเท่ากับ 0 นำค่านี้นำมาคำนวณเป็นค่าพีเอชเริ่มต้นของกากตะกอนโลหะหนัก โดยใช้สมการที่กล่าวไปข้างต้น

### 3.4 การหาปริมาณนิกเกิลที่อยู่ในกากตะกอนโลหะหนัก (ASTM, 1989)

#### 3.4.1 การย่อยกากตะกอนโลหะหนัก

3.4.1.1 ชั่งกากตะกอนโลหะหนักใส่ในบีกเกอร์ ทำให้ขึ้นโดยเติมน้ำปริมาณเล็กน้อย เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)(น้ำ 1 ส่วน ต่อกรดไฮโดรคลอริก 1 ส่วน) 25 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ต้มให้เดือด

3.4.1.2 เติมสารละลายกรดไนตริก (HNO<sub>3</sub>)(น้ำ 1 ส่วน ต่อกรดไนตริก 1 ส่วน) 5 มิลลิลิตร ต้มต่อไป 10 นาที

3.4.1.3 เติมกรดไฮโดรฟลูออริก (HF) 3 มิลลิลิตร ต้มต่อไป 10 นาที

3.4.1.4 ชะนวน้ำบีกเกอร์ด้วยน้ำ เติมกรดเปอร์คลอริก (HClO<sub>4</sub>) 5 มิลลิลิตร ระเหยซ้ำๆ ให้เกิดควันของกรดเปอร์คลอริก 2-3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

3.4.1.5 เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร เพื่อละลายเกลือที่เกิดขึ้น กรองสารละลายและล้างตะกอนบนกระดาษกรองด้วยน้ำอุ่น เก็บสารละลายและน้ำล้างตะกอนที่กระดาษกรองไว้ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.1.6 นำตะกอนที่เหลือค้างบนกระดาษกรองไปย่อยต่อโดยเติมกรดไฮโดรฟลูออริก 3 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 หยด และกรดไนตริกจำนวนเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากัน ระเหยให้เกิดควันของกรดซัลฟิวริก ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำ 2-3 มิลลิลิตร เพื่อละลายเกลือที่เกิดขึ้น นำสารละลายที่ได้มากรอง นำไปรวมกับสารละลายในขวดวัดปริมาตร ถ้ามีตะกอนเหลือค้างบนกระดาษกรอง ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 6 จนไม่มีตะกอนเหลือ

3.4.1.7 ปรับปริมาตรสารละลายในขวดวัดปริมาตร ให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.4.2 นำสารละลายที่ได้จากการย่อยกากตะกอนโลหะหนักไปวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิล โดยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ (atomic adsorption spectrometer) รุ่น GBC 932/933 AA และคำนวณร้อยละของปริมาณนิกเกิลในกากตะกอนโลหะหนัก ได้จาก

$$\text{ปริมาณนิกเกิล} = A / 100B$$

โดย A คือ ปริมาณนิกเกิลในสารละลาย (พีพีเอ็ม)

B คือ น้ำหนักกากตะกอนโลหะหนักที่นำมาย่อย (กรัม)

### 3.5 ศึกษาการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนักโดยวิธีทางเคมี

นำกากตะกอนโลหะหนักปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟิวริกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นแตกต่างกันดังต่อไปนี้ 0.00, 0.05, 0.10 และ 0.50 โมลาร์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลาย โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ และวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

### 3.6 ศึกษาผลของชนิดแบคทีเรียต่อการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนัก

นำสารอาหารใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากตะกอนโลหะหนัก 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* และเชื้อผสมระหว่าง *T. ferrooxidans* และ *T. thiooxidans* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก ทำชุดควบคุม โดยไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย เป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และปริมาณเฟอร์ริสอออนด้วยวิธีโอฟิลแนนโทเรชั่น (แสดงการทดลองดังรูปที่ 3 ในภาคผนวก ก)

### 3.7 ศึกษาผลของช่วงเวลาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนัก

นำสารอาหาร 9K medium ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากตะกอนโลหะหนัก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมกับ *T. ferrooxidans* อายุ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 2.80 ด้วยกรดซัลฟิวริก ทำชุดควบคุม โดยไม่เติม *T. ferrooxidans* เป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการทดลองดังกล่าวเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *T. ferrooxidans* ในอาหาร 9K medium 100 มิลลิลิตร จนเชื้อมีอายุ 18 ชั่วโมง แล้วจึงเติมกากตะกอนโลหะหนักลงไป ในระหว่างการทดลองจะเก็บ

ตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และวิเคราะห์ปริมาณเฟอร์รัสไอออนด้วยวิธีโอฟีลแนทโรลีน ทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนเชื้อแบคทีเรียเป็น *T. thiooxidans* อายุ 5 วัน เก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ และวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง

### 3.8 ศึกษาปริมาณเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) ต่อการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนัก โดย *T. ferrooxidans*

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 9K medium ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว มีปริมาณเหล็กเฟอร์รัสแตกต่างกัน ได้แก่ 0.25, 0.50 และ 0.75 กรัมต่อลิตร เต็มกากตะกอนโลหะหนัก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมกับ *T. ferrooxidans* อายุ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 2.80 ด้วยกรดซัลฟิวริก ทำชุดควบคุม โดยไม่เติม *T. ferrooxidans* เป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และวิเคราะห์ปริมาณเฟอร์รัสไอออนด้วยวิธีโอฟีลแนทโรลีน

### 3.9 ศึกษาผลของการปรับสภาพเชื้อ *T. ferrooxidans* ต่อการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนัก

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 9K medium ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากตะกอนโลหะหนัก 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และเชื้อ *T. ferrooxidans* อายุ 18 ชั่วโมง ปรับพีเอชให้เหมาะสม ด้วยกรดซัลฟิวริก เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ เชื้อ *T. ferrooxidans* ที่ได้รับการปรับสภาพให้ทนต่อกากตะกอนโลหะหนัก ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ วัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง และปริมาณเฟอร์รัสไอออนด้วยวิธีโอฟีลแนทโรลีน (การทดลองแสดงดังรูปที่ 4 ในภาคผนวก ก)

### 3.10 ศึกษาผลของปริมาณกากตะกอนโลหะหนักต่อการสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนักโดย *T. ferrooxidans*

นำอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *T. ferrooxidans* ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกากตะกอนโลหะหนักปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ 200, 400, 800 มิลลิลิตรต่อลิตร 1, 5, 8 กรัมต่อลิตร พร้อมกับ *T. ferrooxidans* อายุ 18 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 2.80 ด้วยกรดซัลฟิวริก ทำชุดควบคุม โดยไม่เติม *T. ferrooxidans* เป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงในเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทดลองจะเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกรีดออกมากในสารละลายโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์ วัดปริมาณเฟอร์รัสไอออนโดยวิธีโอฟีลแนทโรลีน และวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง (แสดงการทดลองดังรูปที่ 5 ในภาคผนวก ก)

### 3.11 การสกัดนิกเกิลออกจากกากตะกอนโลหะหนักโดย *T. ferrooxidans* ในระบบถังปฏิกรณ์แบบที่ละเท

ใช้ถังปฏิกรณ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ขนาดปริมาตร 9 ลิตร ให้อากาศอย่างเพียงพอด้วยเครื่องให้อากาศ (air pump) การทดลองใช้อาหาร 9K medium จำนวน 7 ลิตร โดยใช้ถังปฏิกรณ์จำนวน 2 ใบ มีปริมาณกากตะกอนโลหะหนัก 800 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมเชื้อ *T. ferrooxidans* 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้อากาศอย่างเพียงพอ ทดลองที่อุณหภูมิห้อง ทดลองเป็นเวลา 14 วัน ทุก ๆ วัน จะวัดค่าพีเอช รีดออกซิโพเทนเชียล อุณหภูมิ ปริมาณเฟอร์รัสไอออน และปริมาณนิกเกิลละลาย (การทดลองแสดงดังรูปที่ 6 ในภาคผนวก ก)