บทที่ 4

แผนการดำเนินการงานวิจัย

แผนการวิจัย

การทดลองทั้งหมด จัดทำขึ้นที่ห้องปฏิบัติการ ของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการทดลองสกัดสังกะสีออกจากแร่สังกะสีซัลไฟด์ (ZnS) ซึ่งได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยถังปฏิกรณ์แบบทีละเท (Batch reactor) โดยใช้ **Thiobacillus ferrooxidans** 2 ชุด ชุดที่ 1 ใช้ตัวแปรเป็น ความเข้มข้นของสังกะสีซัลไฟด์ 5 ค่า ได้แก่ 200, 400 มิลลิกรัม/ลิตร, 1, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ใช้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 การทดลองชุดที่ 2 ใช้ตัวแปรเป็น pH 6 ค่า ได้แก่ 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 โดยใช้ความเข้มข้นตะกอน ที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด จากการทดลองชุดที่ 1 และจะทำการทดลองโดยใช้ **Thiobacillus ferrooxidans** ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ 2 ชุด เช่นกัน การทดลองจะกระทำทีละ 1 ชุดต่อเนื่องกันเป็นเวลาประมาณ 3 เดือน

ชนิดตัวแปรอิสระที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ แบคทีเรีย,pH และปริมาณของสังกะสีซัลไฟด์

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถังปฏิกรณ์ (Reactor)

ถังปฏิกรณ์จะทำจากพลาสติกอะครีลิกหรือแก้วขนาด 25 x 25 x 30 เซ็นติเมตร ซึ่งให้ปริมาณความจุมากกว่า 15 ลิตร

2. เครื่องเติมอากาศ

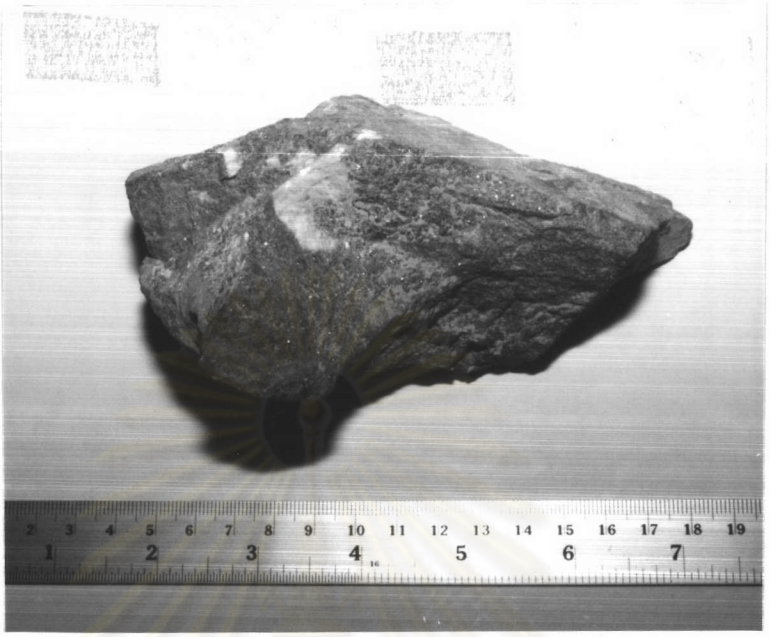
เครื่องเติมอากาศที่ใช้เป็น Air Blower ซึ่งใช้ลมแรงพอที่จะทำให้เกิดการ mixing อย่างทั่วถึงภายในถังปฏิกรณ์ ส่วนหัวเติมอากาศ ใช้แบบที่ใช้ในตู้เลี้ยงปลาทั่วไป

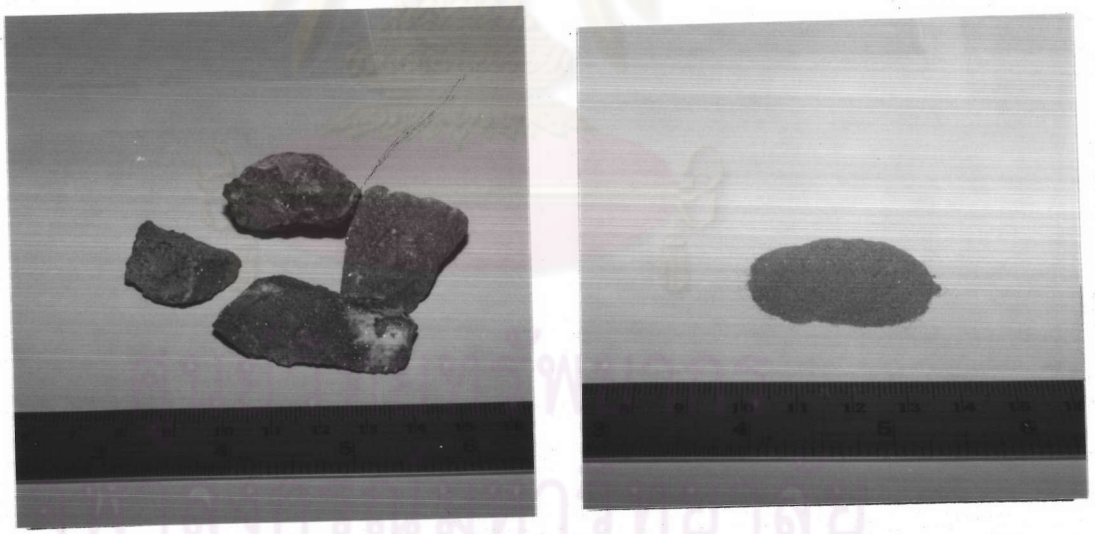
สังกะสีซัลไฟด์ (ZnS) ที่ใช้ในการทดลอง

สังกะสีซัลไฟด์ที่ใช้เป็นแร่สังกะสีซัลไฟด์ ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติของจังหวัดตาก ดังรูปที่ 4.1 โดยความอนุเคราะห์จาก บริษัท ผาแดง อินดัสตรี จำกัด (มหาชน) แร่ที่ใช้ในการทดลองจะผ่านการบดและคัดขนาดให้ได้ขนาดอยู่ในช่วง 80-100 Mesh ดังรูปที่ 4.2 โดยศูนย์เทคโนโลยีอนุภาคไทย คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 200, 400 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เตรียมโดยใช้แร่ผสมน้ำให้ได้ 15 ลิตร แล้วใส่ลงในถังปฏิกรณ์

รูปที่ 4.1 แสดงแร่สังกะสีซัลไฟด์ จากบริษัท ผาแดง อินดัสตรี จำกัด (มหาชน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.2 แสดงขนาดต่าง ๆของแร่สังกะสีซัลไฟด์ ที่ผ่านการบด เพื่อได้ขนาดเป็น 80/100 เมช

ขั้นตอนการวิจัย

1. การเพาะเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ **Thiobacillus ferrooxidans** ATCC 19859 ทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ต่อสารอาหาร 50 มิลลิลิตร และเติมอากาศ โดยต่อสายยางเข้ากับปิเปตต์ แล้วเสียบปิเปตต์ ลงในขวดที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ (ซึ่งจะสังเกตได้จากสีของสารอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอำพัน หรือ แดงน้ำตาล และมีคราบสนิมเกาะที่ข้างขวด) จึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจะทำการเปลี่ยนสารอาหารทุก ๆ 14 วัน

2. การเตรียมเชื้อเพื่อนำไปทำการไลโอฟิไลซ์

ขั้นตอนเหมือนการเพาะเชื้อแบคทีเรีย เพียงแต่นำเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนไปใช้ หลอด amploule 1 หลอด จะใช้ปริมาตรตะกอนประมาณ 0.1 - 0.2 มิลลิลิตร

3. การไลโอฟิไลซ์ เชื้อ **Thiobacillus ferrooxidans**

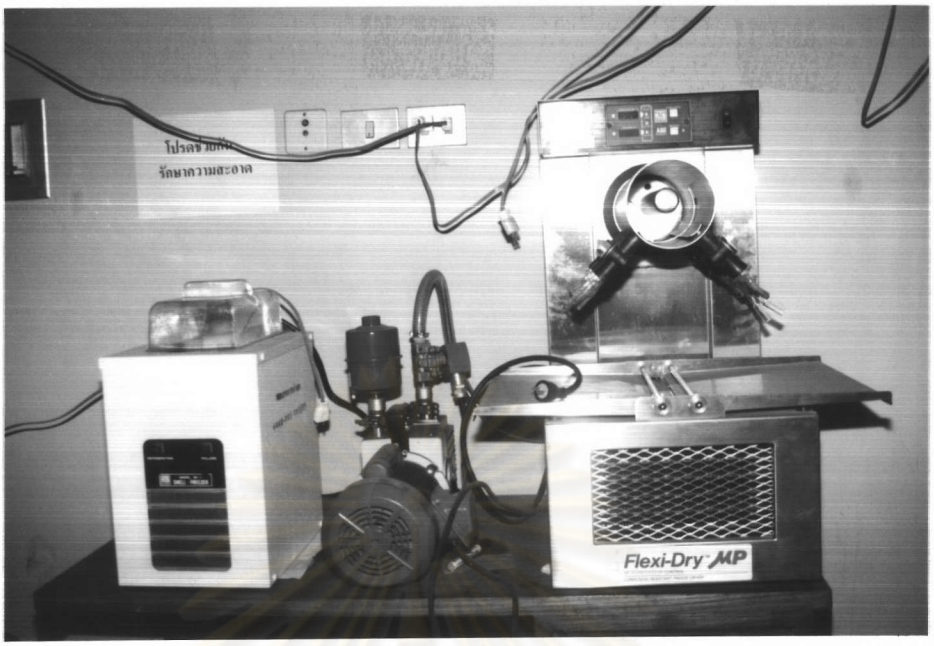
การไลโอฟิไลซ์ทำโดยใช้เครื่อง Flexi-Dry MODEL SF-1 ดังรูปที่ 4.3 ของคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตามทฤษฎีที่ได้กล่าวถึงในบทที่ 3 โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1. การเตรียมหลอด ampoules

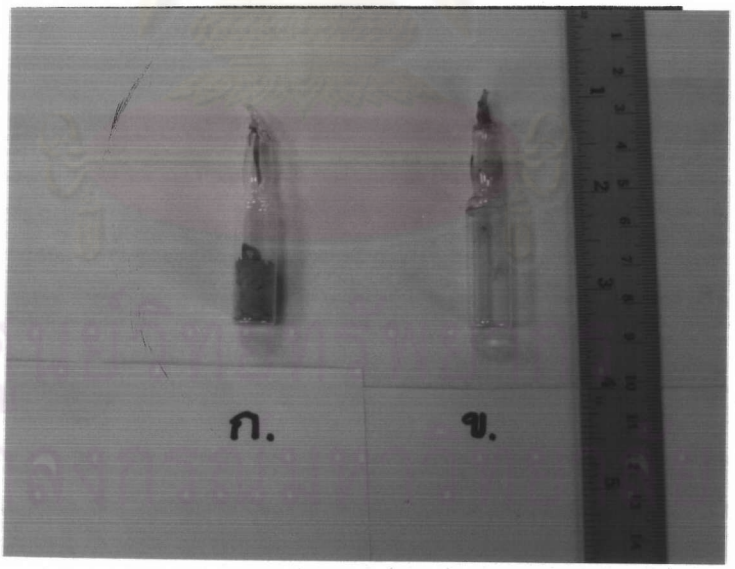
ล้างหลอด ampoulesโดยการแช่ในกรดไฮโดรคลอริก 2% เป็นเวลา 1 คืน แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ใช้สำลีปั้นเป็นก้อนอุดที่ปากหลอด ampoules แล้วนำไปทำการสเตอริไลซ์ที่อุณหภูมิ 126 ^{0}c เป็นเวลา 20 นาที

3.2. การบรรจุแบคทีเรียและ medium ในหลอด ampoules

ใช้ pasteur pipette ดูดสารละลายและ medium ประมาณ 0.1-0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงที่กันหลอด amploules พยายามไม่ให้สารละลายเปื้อนด้านข้างและส่วนบนของหลอด ampoules เนื่องจากต้องมีการลนไฟปากหลอดเพื่อทำการปิด ในการทดลองนี้จะใช้ medium เป็น Skim milk และ Sucrose 12 % เมื่อทำการไลโอฟิไลซ์แล้ว หลอด amploules จะมีลักษณะดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 แสดงเครื่องไลโอฟิไลซ์ ของคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ



รูปที่ 4.4 แสดงหลอด ampoule ที่บรรจุ Thiobacillus ferrooxidans ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ ด้วย Skim milk (ก) และ Sucrose (ข)

3.3. การไลโอฟิไลซ์

นำหลอด amploules ที่บรรจุแบคทีเรียแล้วไปทำการ freeze ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปทำการใส่ที่เครื่อง Flexi-Dry MODEL SF-1 เพื่อทำการไลโอ ฟิไลซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.4. การปิดปากหลอด (sealing)

การปิดปากหลอดกระทำในตู้สูญญากาศ โดยใช้เปลวไฟในการหลอมปากหลอด เพื่อให้แก้วละลายและหลอมมารวมกัน เสร็จแล้วจึงนำหลอด amploules ไปเก็บรักษาตามอุณหภูมิที่กำหนด

4. การทดสอบเชื้อที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์

เชื้อ **Thiobacillus ferrooxidans** ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ ใช้ medium 2 ชนิด ชนิดละ 40 หลอด (amploules) คือ Skim milk และ Sucrose 12 % จะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชนิดละ 20 หลอด และ 0 องศาเซลเซียส ชนิดละ 20 หลอด เช่นกัน ทุก ๆเดือนจะทำการทดสอบ โดยจะนำเชื้อ **Thiobacillus ferrooxidans** จาก medium ชนิดละ 1หลอด มาเลี้ยงในอาหาร 200 มิลลิลิตร แล้วเติมอากาศโดยวิธีเดียวกับการเพาะเชื้อ เพื่อศึกษาระยะเวลาเก็บที่นาน ที่สุด และเลือกเชื้อที่แข็งแรงที่สุด ไปทำการปรับสภาพเชื้อให้มีความเคยชินกับน้ำเสียสังเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

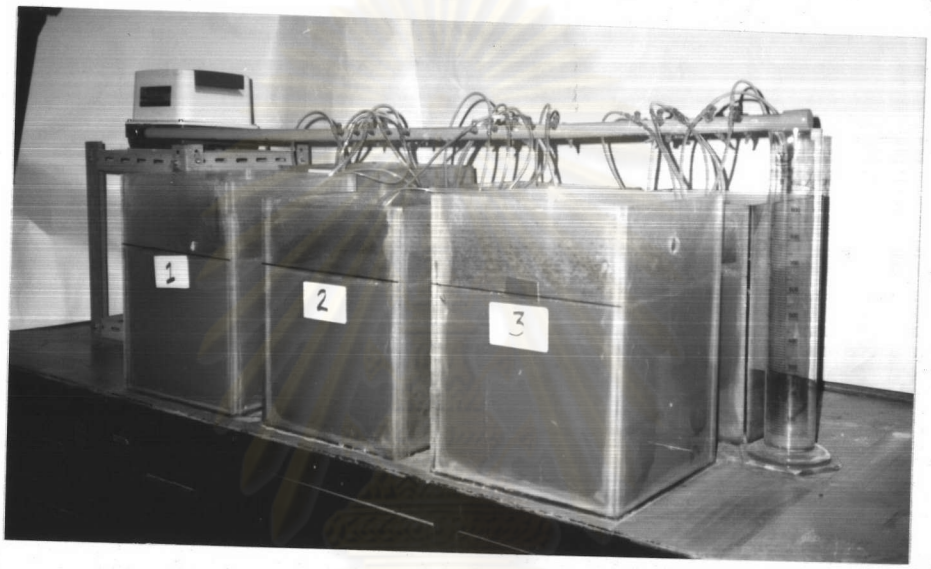
5. การปรับสภาพเชื้อให้มีความเคยชินกับน้ำเสียสังเคราะห์

จะทำในขวดแก้ว ขนาด1 ลิตร โดยใช้ตะกอน ZnS สังเคราะห์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2-5 มิลลิลิตร เติมในสารอาหาร 600 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เท่ากับ 4 จึงเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป 12 มิลลิลิตร เลี้ยงจนสังเกตว่า สีของอาหารเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองอำพันหรือแดงน้ำตาล จึงเติม $FeSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ผสมกับ 2-5 มิลลิลิตรของ ZnS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 15 มิลลิลิตร ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 เดือน และในช่วงนี้ต้องมีการเติมอากาศอย่างเพียงพอ

6. การปฏิบัติการแบบทีละเท

การทดลองชุดที่ 1 จะใช้ถังปฏิกิริยาขนาด 25 x 25 x 30 เซ็นติเมตร จำนวน 6 ใบ แต่ละใบจะควบคุมปริมาตรให้อยู่ที่ 15 ลิตร ดังรูปที่ 4.5 โดยความเข้มข้นของตะกอน ZnS ในถัง คือ 200, 400 มิลลิกรัม/ลิตร, 1, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่วนในถังใบสุดท้ายจะใช้

ความเข้มข้นของตะกอน เป็น 400 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อเป็นถังควบคุมในถังปฏิกริยาแต่ละใบจะเติม $FeSO_4.7H_2O$ 15 กรัม และปรับ pH ด้วย กรดซัลฟิวริก 1 N ให้ถังแต่ละใบมี pH เป็น 4 เท่ากัน เติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการ ไลโอฟิไลซ์ ซึ่งผ่านการปรับสภาพแล้ว ลงไปถังละ 300 มิลลิลิตร ยกเว้นถังควบคุมใบสุดท้าย แล้วจึงเติมอากาศและ Mixing อย่างทั่วถึงด้วย Air Blower และทุกๆวัน เวลาประมาณ 16.00 น. จะเก็บตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ จากนั้นจึงเติม $FeSO_4.7H_2O$ ลงไป 1 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ทุกใบ



รูปที่ 4.5 แสดงถึง Model ที่ใช้ในการวิจัย

เมื่อเสร็จการทดลองชุดนี้แล้วก็จะทำการทดลองชุดต่อไป โดยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ เป็นเชื้อที่ไม่ผ่านการไลโอฟิไลซ์แทน (การทดองชุดที่ 3)

การทดลองชุดที่ 2 จะใช้ถังปฏิกริยาเดิม จำนวน 6 ใบ แต่ละใบควบคุม pHโดยใช้ H_2SO_4 เป็น 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นตะกอน ที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด จากการทดลองชุดที่ 1 เท่ากันทุกถังปฏิกริยา เติม $FeSO_4.7H_2O$ 15 กรัม เติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ซึ่งผ่านการปรับสภาพแล้ว ลงไปถังละ 300 มิลลิลิตร เท่ากันทุกถังปฏิกริยา แล้วจึงเติมอากาศ และ Mixing อย่างทั่วถึง ด้วย Air Blower

เมื่อเสร็จการทดลองชุดนี้แล้วก็จะทำการทดลองชุดต่อไป โดยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ เป็นเชื้อที่ไม่ผ่านการไลโอฟิไลซ์แทน (การทดองชุดที่ 4)

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์

ค่า parameter ที่ต้องเก็บเพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบ ได้แก่

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ต้องเก็บเพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบ

พารามิเตอร์	การเก็บตัวอย่าง	การวิเคราะห์ผล
pH	ทุกวัน	pH Meter
ORP	ทุกวัน	ORP Meter
MLVSS	ทุก 2 วัน	American Standard Method
ความเข้มข้นของโลหะหนักละลาย	ทุกวัน	Atomic Absorption Spectrometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย