บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมไคติน ไคโตซาน

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก (Commercial grade) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยอาซาฮีเคมีภัณฑ์ จำกัด
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยน้ำหนัก (Commercial grade) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยอาซาฮีเคมีภัณฑ์ จำกัด
3. แก๊สไนโตรเจน (N_2 gas) ความเข้มข้นร้อยละ 99.5: PRAXAIR

3.1.2 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ชุดปฏิกรณ์เคมีแบบ 5 คอ (Reactor) ขนาด 2,000 มิลลิลิตร
6. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ช่วงอุณหภูมิ 0-100 และ 0-200 ^{o}C
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath): Scientific Promotion รุ่น Dh30-110
8. เครื่องชั่ง (Analytical balance): METTLER TOLEDO รุ่น PB 3002-S
9. โถดูดความชื้น (Desiccators): 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
13. เครื่องแก้วอื่นๆในห้องปฏิบัติการ

3.2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการหาสภาวะการบำบัดสีย้อม

1. UV/VIS Spectrophotometer: Jasco รุ่น V-530
2. อุปกรณ์จาร์เทส (Jar test): VELP รุ่น JLT 6
3. เครื่องวัดพีเอช (pH meter): HANNA instruments รุ่น pH 211
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge): ALC รุ่น PM-180R

3.2.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการศึกษาเรื่องจุลินทรีย์

1. เครื่องเขย่า (Shaker): Newbrunswick Scientific รุ่น Inova-2100
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator): Memmert รุ่น UE 200
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larmina flow): Labservice Limited

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเกล็ดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

วิธีการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งในงานวิจัยนี้ ใช้สภาวะตามการศึกษาของเยาวภา (2534) มีขั้นตอนประกอบด้วยการเตรียมไคติน โดยแบ่งออกเป็นการกำจัดโปรตีน การกำจัดแร่ธาตุ และการเตรียมไคโตซานโดยการกำจัดหมู่แอซีทิล แสดงดังรูปที่ 3.1 ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 ^{o}C จนแห้ง

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

4. กำจัดหมู่แอซีทิล (Deacetylation) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 140 ± 10 ^{o}C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนปริมาณไคตินต่อปริมาณด่างเป็น 1:20 ล้างน้ำจนเป็นกลาง กรอง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C 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 ข และเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR): วิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

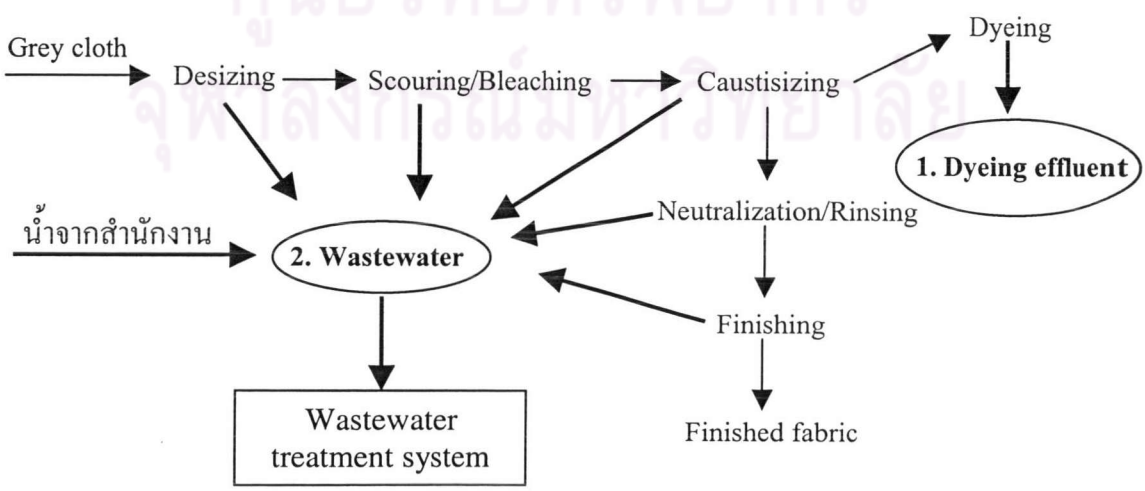
2. ความหนืด (Viscosity) ของสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 ในกรดแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer: spindle No.1 ความเร็ว 105 รอบต่อนาที: วิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

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

3.3.3 การเตรียมตัวอย่างวัดค่าการดูดกลืนแสง

1. เตรียมสารละลายสีย้อมประเภทสีแอซิด สีไดเร็กต์ และสีรีแอกทีฟ ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. เตรียมตัวอย่างน้ำคือ น้ำหลังการย้อมและน้ำเสียรวม ซึ่งเก็บมาจากโรงงานฟอกย้อม 3 แห่ง (บริษัทเอเชียไฟเบอร์ จำกัด บริษัทศิลปเสนีพาณิชย์ จำกัด และหสน.ธนไพศาล จุดที่เก็บน้ำแสดงดังรูปที่ 3.2) นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 3.2 จุดเก็บน้ำของโรงงานฟอกย้อมกรณีศึกษา

3.3.4 การหาค่าการดูดกลืนแสง

การเกิดสีของสีย้อม เนื่องมาจากการดูดกลืนแสงบางแถบสีของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า โดยทั่วไปจึงมักอ้างอิงที่ค่าความยาวคลื่นซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ในความเป็นจริงสีย้อมไม่ได้ดูดกลืนแสงเพียงที่ค่าความยาวคลื่นเดียว แต่กลับดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นข้างๆ ค่าความยาวคลื่นซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ทำให้ได้กราฟการดูดกลืนแสงเป็นรูประฆังคว่ำ และถ้ามีส่วนใดส่วนหนึ่งของกราฟดังกล่าวนี้ อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (Visible range) ทำให้สามารถเห็นสีของสีย้อมได้เช่นกัน ดังนั้นในการบอกประสิทธิภาพการดูดซับสีย้อมจึงต้องบอกทั้งในเทอมของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และการลดลงของค่าการดูกลืนแสงของพื้นที่ใต้พีกหลักในช่วง Visible range ดังนี้

1. การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

- หาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยนำสารละลายสีย้อมและตัวอย่างน้ำจากโรงงานฟอกย้อมจากข้อ 3.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 190-900 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
- อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในข้อ 1

2. การหาค่าการดูดกลืนแสงของพื้นที่ใต้พีกหลัก

- พล็อตกราฟของความยาวคลื่นกับค่าการดูดกลืนแสง
- หาพื้นที่ใต้กราฟรูประฆังคว่ำที่เป็นพีกหลัก

3.3.5 การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายสีย้อม

1. เตรียมสารละลายสีแอซิด ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ณ ความยาวคลื่น จากข้อ 3.3.4 ซึ่งสารละลายสีย้อมที่เตรียมสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0 – 1 ได้

3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและความเข้มข้นของสารละลายสีย้อมแต่ละชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เตรียมสารละลายสีไดเร็กต์ ความเข้มข้น 10 20 30 40 60 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายสีรีแอกทีฟ ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำตามข้อ 2 และ 3

3.3.6 การศึกษาความสามารถของไคโตซานในการบำบัดสีย้อมจากตัวอย่างน้ำของโรงงานฟอกย้อม ด้วยเครื่องจาร์เทส (Jar-test)

1. ทดสอบสภาวะในการบำบัดสีย้อม ได้แก่ อัตราเร็วของการกวน และเวลาที่ใช้ในการกวน โดยใช้การสำรวจเอกสาร หรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังตารางที่ 3.1 ทำการทดลองบำบัดน้ำหลังจากการย้อม และน้ำเสียรวมของโรงงานฟอกย้อม โดยทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม เป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ณ ความยาวคลื่นของแต่ละสี และร้อยละการลดลงของพื้นที่ใต้พีกหลักในช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.1 สภาวะในการบำบัดสีย้อม

พารามิเตอร์	สภาวะ*				
	1	2	3	4	5
1. พีเอช	6	5	6	5	ไม่ปรับพีเอช
2. ปริมาณไคโตซานต่อปริมาตรน้ำเสีย 200 มิลลิลิตร	0.5	0.4	0.4	0.4	6.4
3. อัตราเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	กวนเร็ว 100 รอบต่อนาที	150	150	80	กวนเร็ว 100 รอบต่อนาที
4. เวลาในการกวน (ชั่วโมง)	เป็นเวลา 5 นาที กวนช้า 20 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที	1	4	4	เป็นเวลา 1 นาที กวนช้า 30 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

หมายเหตุ * สภาวะที่ 1 จาก นัยนันทน์ (2546) สภาวะที่ 4 จาก จินตนา (2542)
สภาวะที่ 2 จาก Tran Si Trung (2003) สภาวะที่ 5 จาก บุญศรี (2545)
สภาวะที่ 3 จาก Sakkayawong (2003)

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในรูปของพีเอชและปริมาณเกล็ดไคโตซาน โดยใช้ค่าอัตราเร็วในการกวนและเวลาในการกวนที่เหมาะสมที่สุด ตามข้อ 1

- นำน้ำตัวอย่างจากโรงงานฟอกย้อม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์
- หาพีเอชที่เหมาะสม โดยปรับพีเอชเท่ากับ 5 6 และ 7 โดยใช้ปริมาณเกล็ดไคโตซานปริมาณ 0.4 กรัม ในแต่ละบีกเกอร์ กวนด้วยเครื่องจาร์เทส ตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 1 วัดปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่
- หาปริมาณเกล็ดไคโตซานที่เหมาะสมโดยเติมเกล็ดไคโตซาน ปริมาณ 0.2 0.4 0.8 และ 1.2 กรัม ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ กวนด้วยเครื่องจาร์เทส ตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 1 วัดปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่ในน้ำตัวอย่าง
- คำนวณสีย้อมที่ถูกดูดซับต่อปริมาณไคโตซาน 1 กรัม

3. วิเคราะห์ค่าความสกปรกของน้ำในรูป BOD COD และ TSS หลังจากการบำบัดด้วยเกล็ดไคโตซานตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 ด้วยวิธีวิเคราะห์ ดังแสดงในภาคผนวก ข

4. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการบำบัดสีย้อม ได้แก่ 30°C 45 °C และ 60 °C เนื่องจากการย้อมผ้าใช้อุณหภูมิในการย้อมสูง ทำให้น้ำเสียที่ปล่อยออกมามีอุณหภูมิสูง

3.3.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์การดูดซับสีย้อม

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่กับเวลาที่ใช้ในการกวน เพื่อหาจลนพลศาสตร์การบำบัดสีย้อม โดยทำการทดลองทั้งในสภาวะของน้ำหลังจากการย้อมจริงจากโรงงานฟอกย้อม และน้ำย้อมสังเคราะห์ ซึ่งเตรียมให้มีปริมาณสีย้อมครอบคลุมกับปริมาณที่มีอยู่จริงในน้ำหลังจากการย้อมของโรงงานฟอกย้อม โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 มาทำการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่ในน้ำเสียทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยไม่ทำการศึกษากับน้ำเสียรวม เนื่องจากในน้ำเสียรวมมีโทนสีปะปนกัน ทำให้ไม่สามารถเทียบความเข้มข้นของสีกับกราฟมาตรฐานสารละลายสีย้อมได้

3.3.8 การศึกษากลไกการบำบัดสีย้อม

1. วิเคราะห์ระบบการดูดซับสีย้อมโดยอาศัยพื้นฐานทางคณิตศาสตร์ เพื่อศึกษารูปแบบสมการการดูดซับของ Langmuir และ Freundlich ดังนี้

- เตรียมน้ำย้อมสังเคราะห์ประเภทสีแอซิด ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

- ทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2 ในหัวข้อ 3.3.6

- วัดปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่ในน้ำย้อมสังเคราะห์

- เตรียมน้ำย้อมสังเคราะห์ประเภทสีไดเร็กต์ ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำเหมือนสีย้อมสังเคราะห์สีแอซิด

2. ศึกษาลักษณะของไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ทั้งก่อนและหลังใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อม วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิเคราะห์ตะกอนไคโตซานด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟาเรด สเปกโทรสโกป (Fourier Transform Infrared Spectroscope: FTIR) วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.9 การศึกษาการลดลงของปริมาณสีย้อม การคัดเลือก และการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในตะกอนไคโตซาน

1. ศึกษาการลดลงของปริมาณสีย้อมในตะกอนไคโตซาน

บ่มตะกอนไคโตซานที่ได้จากการทดลองกับน้ำเสียและน้ำย้อมจากโรงงานฟอกย้อม ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 ^{o}C วิเคราะห์หาปริมาณสีย้อมที่เหลืออยู่ในตะกอนไคโตซาน ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยชะตะกอนไคโตซานปริมาณ 0.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Bhavani et al, 1999) นำสารละลายที่ได้ ปั่นที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณสีย้อมในสารละลายด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

2. จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีอยู่ในตะกอนไคโตซาน

- เก็บตะกอนไคโตซานที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 และ 55^{o}C ปริมาณ 5 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวนิวเทรียน (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- นับปริมาณแบคทีเรีย (Plate count) ตามวิธีการกระจายเชื้อ (Spread plate) (สุราษฎร์, 2540) โดยทำการเจือจาง (dilution) เชื้อแบคทีเรีย ให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่า เป็นลำดับ (Ten fold serial dilution) ซึ่งจะทำทั้งหมด 7 ลำดับ คือ 1:10 $1:10^2$ $1:10^3$ $1:10^4$ $1:10^5$ $1:10^6$ และ $1:10^7$

- กระจายเชื้อ (Spread plate) ในระดับความเจือจาง $1:10^5$ $1:10^6$ และ $1:10^7$ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Nutrient agar: NA) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีสีย้อม (สีแอซิด หรือ สีไดเร็กต์ หรือ สีรีแอกทีฟ) ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิเดียวกับตะกอนที่เก็บมา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียด้วยตาเปล่า

- คัดเลือก และส่งแบคทีเรียเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย