# บทที่ 3

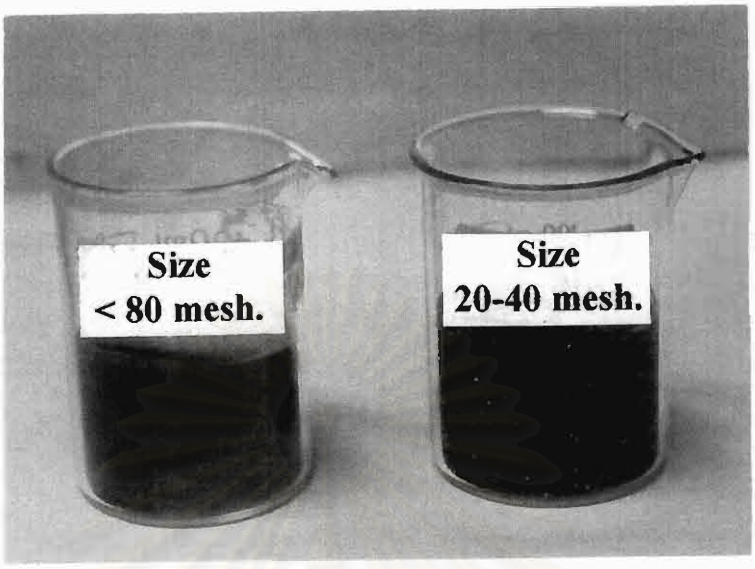
# แผนการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 แผนการวิจัย

การวิจัยนี้จัดทำขึ้นที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การศึกษาองค์ประกอบเริ่มต้นของกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ การศึกษากระบวนการลิชชิ่งโดยกรดซัลฟิวริก และ การศึกษากระบวนการลิชชิ่งโดยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการศึกษากระบวนการลิชชิ่งโดยเชื้อแบคทีเรียมีดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Thiobacillus ferrooxidans* ในสารอาหาร 9K medium และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Thiobacillus thiooxidans* ในสารอาหาร thiomedium จากนั้นทำการปรับปรุงเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดให้เคยชินกับสภาพที่มีความเข้มข้นของนิกเกิล เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์โดยเชื้อแบคทีเรีย ทั้งในระบบขวดเขย่าและในคอลัมน์

## 3.2 กากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลอง

กากตะกอนที่ใช้ในการศึกษานี้ นำมาจากลานตากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียทางเคมีของโรงงานอุตสาหกรรมที่มีกระบวนการชุบเคลือบโลหะนิกเกิล มีลักษณะเป็นกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ ($Ni(OH)_2$) ซึ่งมีค่าพีเอชสูงมาก จึงต้องมีขั้นตอนการเตรียมกากตะกอนให้เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการลิชชิ่งโดยเชื้อแบคทีเรีย ดังนี้ สำหรับการทดลองในระบบขวดเขย่า นำกากตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อลดการปนเปื้อนจากสารเคมีอื่นๆ จากนั้นนำไปอบแห้งแล้วคัดขนาดให้เล็กกว่า 80 mesh ส่วนการทดลองในคอลัมน์ นำกากตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่นและ 0.1 N $H_2SO_4$ เพื่อลดการปนเปื้อนจากสารเคมีอื่นๆ และเหมาะสมสำหรับกระบวนการลิชชิ่งโดยเชื้อแบคทีเรียต่อไป จากนั้นนำไปอบแห้งแล้วคัดขนาดระหว่าง 20 - 40 mesh สำหรับการทดลองในคอลัมน์ เพื่อป้องกันการอุดตัน และขนาดเล็กกว่า 80 mesh สำหรับการทดลองในระบบขวดเขย่า เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการลิชชิ่ง ดังแสดงในรูปที่ 3.1




รูปที่ 3.1 กากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ขนาดเล็กกว่า 80 mesh สำหรับการทดลองในระบบขวดเขย่า (ซ้าย) และขนาด 20-40 mesh สำหรับการทดลองในคอลัมน์ (ขวา)

เนื่องจากกากตะกอนที่เตรียมได้ อาจมีเชื้อแบคทีเรียบางชนิดปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นการนำกากตะกอนไปใช้ในการทดลองสามารถทำได้โดยการอบขจัดความชื้นที่ 105°C นาน 3 ชั่วโมงชั่งน้ำหนักกากตะกอนตามต้องการ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 150°C นาน 3 ชั่วโมง

## 3.3 แบคทีเรียและสารอาหาร

### 3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 และ *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

### 3.3.2 สารอาหาร 9K medium (Cote, 1984)

สารอาหาร 9K medium สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. ferrooxidans* ประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B ซึ่งถูกเก็บแยกกันไว้ เมื่อจะใช้จึงผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 4 : 1 จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เป็น 2.8 ด้วย 1N $H_2SO_4$

การเตรียมสารละลาย A ประกอบด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | = | 0.40 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | = | 0.20 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | = | 0.08 | กรัม |
| น้ำกลั่น | = | 400 | มิลลิลิตร |

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi. และอุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

การเตรียมสารละลาย B ประกอบด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| $FeSO_4.7H_2O$ | = | 10 | กรัม |
| 1 N $H_2SO_4$ | = | 1 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | = | 100 | มิลลิลิตร |

เนื่องจาก $FeSO_4.7H_2O$ จะเกิดการออกซิไดส์เมื่อได้รับความร้อน ดังนั้นจึงนำน้ำกลั่นไปนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำมาผสมกับ $FeSO_4.7H_2O$ แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.3.3 สารอาหาร thiomedium (DSM,1993)

สารอาหาร thiomedium สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. thiooxidans* ประกอบด้วยสารละลาย A และผงซัลเฟอร์ ซึ่งถูกเก็บแยกกันไว้ เมื่อจะใช้จึงนำเอาผงซัลเฟอร์ซึ่งไม่ละลายน้ำมาโรยบนของผสมระหว่างสารละลาย A และเชื้อ *T. thiooxidans*

การเตรียมสารละลาย A ประกอบด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| $NH_4Cl$ | = | 0.1 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | = | 3 | กรัม |
| $MgCl_2.6H_2O$ | = | 0.1 | กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | = | 0.14 | กรัม |
| น้ำกลั่น | = | 1000 | มิลลิลิตร |

จากนั้นปรับค่าพีเอชของสารละลายเป็น 4.2 ด้วย 1N $H_2SO_4$ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

การเตรียมผงซัลเฟอร์ สามารถทำได้โดย นำเอาผงซัลเฟอร์ปริมาณ 10 กรัม ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 112°C เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

## 3.4 ขั้นตอนการวิจัย

### 3.4.1 การวิเคราะห์ค่าพีเอชเริ่มต้นของกากตะกอน

วิธีการวิเคราะห์ค่าพีเอชเริ่มต้นของกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ คือ นำกากตะกอนที่บดละเอียดขนาดเล็กกว่า 80 mesh ปริมาณ 1 กรัม มาเจือจางโดยน้ำกลั่นซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแปรค่าปริมาณการเจือจางจำนวน 9 ค่า ได้แก่ 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 กรัมน้ำ/กรัมกากตะกอน จากนั้นวัดค่าพีเอชที่ปริมาณการเจือจางต่างๆ โดยที่ขณะวัดค่าพีเอชต้องกวนตลอดเวลาเพื่อให้มีสภาพเป็นเนื้อเดียวกัน

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการเจือจางกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์โดยน้ำกลั่นและค่าพีเอช วิเคราะห์ค่าพีเอชเริ่มต้นของกากตะกอนจากกราฟ เมื่อปริมาณการเจือจางโดยน้ำกลั่นมีค่าเป็น 0 กรัมน้ำ/กรัมกากตะกอน

### 3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณนิกเกิลเริ่มต้นในกากตะกอน (ASTM,1989)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณนิกเกิลเริ่มต้นในกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ คือ นำกากตะกอนที่บดละเอียดขนาดเล็กกว่า 80 mesh ปริมาณ 1 กรัมมาย่อยสลายด้วยกรด ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก 50 % (v/v) จำนวน 25 มิลลิลิตร ต้มจนเดือด
2. เติมสารละลายกรดไนตริก 50 % (v/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร ต้มนาน 10 นาที
3. เติมกรดไฮโดรฟลูออริก จำนวน 3 มิลลิลิตร ต้มนาน 10 นาที
4. ชะผนังบีกเกอร์ด้วยน้ำ
5. เติมกรดพรีคลอริก จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในระหว่างนี้จะเกิดควันของกรดพรีคลอริกนานประมาณ 2-3 นาที
6. เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร เพื่อละลายเกลือที่เกิดขึ้น จากนั้นกรองสารละลายเก็บไว้ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
7. นำตะกอนที่เหลือบนกระดาษกรองมาทำให้ชื้นด้วยน้ำ จากนั้นเติมกรดพรีคลอริก 3 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก 2 หยด และกรดไนตริกจำนวนเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในระหว่างนี้จะเกิดควันของกรดซัลฟิวริกนานประมาณ 2-3 นาที
8. เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายเกลือที่เกิดขึ้น จากนั้นกรองสารละลายไปเก็บไว้รวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ถ้ายังคงเหลือตะกอนบนกระดาษกรอง ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 7 จนไม่มีตะกอนเหลืออีก
9. ปรับปริมาตรสารละลายในขวดวัดปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วไปวัดปริมาณนิกเกิลโดยการวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer) แล้วคำนวนปริมาณนิกเกิลเริ่มต้นในกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์จากสมการ

$$\text{ปริมาณนิกเกิลเริ่มต้นในกากตะกอน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณนิกเกิลในสารละลาย (มิลลิกรัม/ลิตร)}}{100 \times \text{น้ำหนักกากตะกอนที่ใช้ (กรัม)}}$$

3.4.3 กระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลโดยกรดซัลฟิวริกในระบบขวดเขย่า

การลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์โดยใช้กรดซัลฟิวริก ในระบบขวดเขย่า ทำการทดลองโดยเติมกากตะกอนที่ผ่านการล้างน้ำกลั่น ขนาดเล็กกว่า 80 mesh ลงในกรดซัลฟิวริกเจือจางปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นนิกเกิลอิออน 10 กรัม/ลิตร โดยที่แปรค่าความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกเจือจางจำนวน 7 ค่าดังนี้ 0.01 0.05 0.1 0.15 0.5 1 และ 5 นอร์มัล โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นขวดควบคุม นำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณนิกเกิลที่ถูกลิชชิ่งออกมา

3.4.4 กระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลด้วยกรดซัลฟิวริกในคอลัมน์

การลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์โดยใช้กรดซัลฟิวริกในคอลัมน์ ทำการทดลองโดยใช้กากตะกอนที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นและ 0.1N $H_2SO_4$ ขนาด 20-40 mesh จำนวน 500 กรัม (ประกอบไปด้วยนิกเกิลอิออน 211.5 กรัม) บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร โดยมีใยแก้ววางอยู่ส่วนบนของคอลัมน์ เพื่อกระจายสารละลายให้ไหลผ่านกากตะกอนอย่างสม่ำเสมอ ป้องกันการไหลลัดทางเนื่องจากกากตะกอนถูกกัดเซาะเป็นร่อง ส่วนด้านล่างคอลัมน์บรรจุใยแก้วและลูกแก้ว เพื่อป้องกันกากตะกอนหลุดออกจากคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 3.2 จากนั้นนำกรดเจือจาง 1N $H_2SO_4$ ปริมาตร 1 ลิตรมาไหลผ่านจากด้วยบนของคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ตร.ซม.-ชม. และมีภาชนะรองรับสารละลายอยู่ด้านล่างของคอลัมน์ ซึ่งสารละลายจะไหลผ่านคอลัมน์จนหมดในเวลาประมาณ 3.5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างจากภาชนะรองรับสารละลายด้านล่างของคอลัมน์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณนิกเกิลที่ถูกลิชชิ่งออกมา

รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงกระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ในคอลัมน์โดยกรดซัลฟิวริก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5 การเพาะเลี้ยง *T. ferrooxidans* ในสารอาหาร 9K medium

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *T. ferrooxidans* ATCC 19859 ในสารอาหารละลาย 9K medium โดยใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10% (v/v) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเพื่อเติมอากาศในสารละลายให้กับแบคทีเรีย จนกระทั่งแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งสังเกตได้จากสีของสารอาหารละลาย 9K medium เปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองอำพัน หรือสีน้ำตาล และมีคราบสนิมเกาะที่ข้างขวด ทำการทดลองโดยมีสารอาหาร 9K medium เป็นชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น แบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° C โดยทำการเปลี่ยนสารอาหารทุก 14 วัน

3.4.6 การเพาะเลี้ยง *T. thiooxidans* ในสารอาหาร thiomedium

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *T. thiooxidans* ATCC 8085 ในสารอาหารละลาย thiomedium ใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10% (v/v) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและเพื่อเติมอากาศในสารละลายให้กับแบคทีเรีย จนกระทั่งแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งสังเกตได้จากผงซัลเฟอร์ที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของสารอาหารละลาย thiomedium นั้นเกิดการตกตะกอน สารละลายมีสีขุ่น เมื่อวัดค่าพีเอชพบว่ามีค่าลดลง ทำการทดลองโดยมีสารละลาย thiomedium เป็นชุดควบคุมเพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น แบคทีเรียที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° C โดยทำการเปลี่ยนสารอาหารทุก 14 วัน

3.4.7 การปรับสภาพแบคทีเรียให้เคยชินกับกากตะกอน

การปรับสภาพเชื้อให้เคยชินกับกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ในการทดลองในระบบขวดเขย่า สามารถทำได้โดย เติมกากตะกอนที่ผ่านการล้างน้ำกลั่นขนาดเล็กกว่า 80 mesh ลงในสารอาหาร 9K medium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. ferrooxidans* 10% (v/v) และสารอาหาร thiomedium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. thiooxidans* 10% (v/v) นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเพื่อเติมอากาศในสารละลายให้กับแบคทีเรีย ศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยมีสารอาหาร 9K medium และสารอาหาร thiomedium เป็นชุดควบคุม จนกระทั่งการลิชชิ่งนิกเกิล

ออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์มีค่าคงที่ ทำการปรับสภาพเชื้อโดยการเพิ่มปริมาณกากตะกอนอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นนิกเกิล 10 กรัม/ลิตร

การปรับสภาพเชื้อให้เคยชินกับกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ในการทดลองในคอลัมน์ สามารถทำได้โดย เติมกากตะกอนที่ผ่านการล้างน้ำกลั่นขนาดเล็กกว่า 80 mesh ลงในสารอาหาร 9K medium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. ferrooxidans* 10% (v/v) นาน 18 ชั่วโมง และสารอาหาร thiomedium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *T. thiooxidans* 10% (v/v) นาน 5 วัน ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (ขวัญเรือน, 2540) จากนั้นนำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง ทำการปรับสภาพเชื้อโดยเพิ่มปริมาณกากตะกอนอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นนิกเกิล 15 กรัม/ลิตร

3.4.8 กระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลในระบบขวดเขย่าโดยแบคทีเรียที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการทดลองโดยเติมกากตะกอนที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น ขนาดเล็กกว่า 80 mesh ลงในสารละลายที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นนิกเกิลอิออน 10 กรัม/ลิตร

1. สารอาหาร 9K medium เพียงอย่างเดียว
2. สารอาหาร 9K medium ผสมเชื้อ *T. ferrooxidans* ที่ผ่านการปรับสภาพ 10% (v/v)
3. สารอาหาร 9K medium ผสมเชื้อ *T. ferrooxidans* ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ 10% (v/v)
4. สารอาหาร thiomedium เพียงอย่างเดียว
5. สารอาหาร thiomedium ผสมเชื้อ *T. thiooxidans* ที่ผ่านการปรับสภาพ 10% (v/v)
6. สารอาหาร thiomedium ผสมเชื้อ *T. thiooxidans* ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ 10% (v/v)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงเติมกากตะกอน จากนั้นนำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเพื่อเติมอากาศในสารละลายให้กับแบคทีเรีย ศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จนกระทั่งการลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์มีค่าคงที่

3.4.9 กระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลในคอลัมน์โดยแบคทีเรียที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการทดลองโดยใช้กากตะกอนขนาด 20-40 mesh ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นและ 0.1N $H_2SO_4$ บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ซึ่งด้านล่างของคอลัมน์รองด้วยใยแก้วและลูกแก้ว เพื่อป้องกันตัวอย่างกากตะกอนหลุดออกจากคอลัมน์ ส่วนด้าน

บนของคอลัมน์หลังจากใส่ตัวอย่างกากตะกอนแล้วให้รองด้วยใยแก้ว เพื่อกระจายสารละลายให้ไหลผ่านอย่างสม่ำเสมอ และป้องกันการไหลลัดทางเนื่องจากกากตะกอนถูกสารละลายเซาะเป็นร่อง ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ด้านล่างของคอลัมน์จะมีขวดรูปชมพู่บรรจุสารละลายปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งจะมีการเติมอากาศอิ่มตัวด้วยน้ำ และมีการกวนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันตลอดเวลา โดยมีเครื่องสูบแบบรีดสายทำหน้าที่ดูดสารละลายจากขวดรูปชมพู่ไปหยดลงส่วนบนของคอลัมน์ จากนั้นสารละลายจะไหลผ่านคอลัมน์กลับคืนสู่ขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายเช่นเดิม วนเวียนอยู่เช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งปริมาณโลหะหนักนิกเกิลละลายในน้ำไม่เปลี่ยนแปลง จึงหยุดการทดลอง

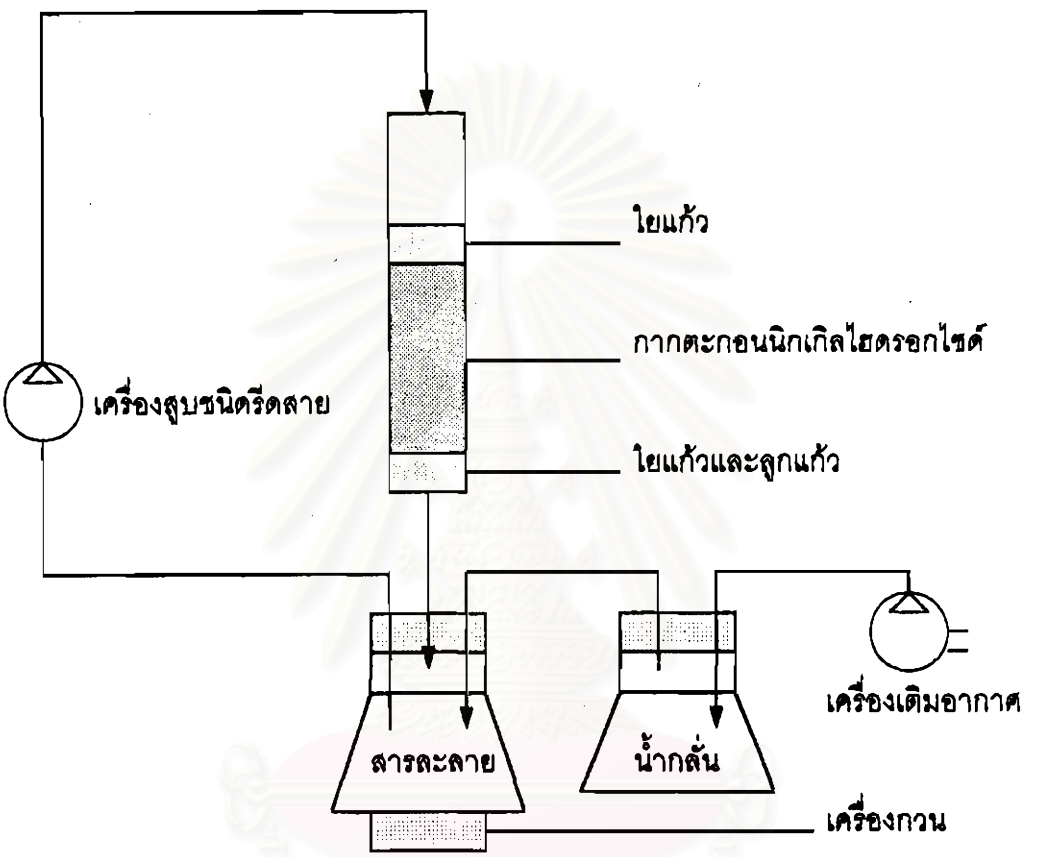
การทดลองนี้มี 18 ชุดการทดลองที่มีตัวแปรแตกต่างกันดังนี้ ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย สารอาหาร อัตราการไหล ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส ปริมาณซัลเฟอร์ ปริมาณกากตะกอน และควบคุมพีเอชของสารละลายด้วย 5N $H_2SO_4$ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลิชชิ่งในคอลัมน์ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยเติมสารอาหารจำเป็นสำหรับเชื้อแบคทีเรียทุกๆ 30 วัน

ตารางที่ 3.1 การทดลองการลิชชิ่งนิกเกิลในคอลัมน์โดยแบคทีเรียที่ผ่านการปรับสภาพ

| ชุดที่ | สารละลายในขวดรูปชมพู่ | | | | | | | คอลัมน์ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | แบคทีเรีย | สารอาหาร | อัตราการไหล (มล/ตร.ซม-ชม) | เชื้อ (%) | เฟอร์รัส (ก./ล.) | ซัลเฟอร์ (ก./ล.) | พีเอช | กากตะกอน (กรัม) | ซัลเฟอร์ (ก./ล.) |
| 1 | none | 9K medium | 5[a] | - | 4 | - | 2.8 | 500 | - |
| 2 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 5[a] | 10 | 4 | - | 2.8 | 500 | - |
| 3 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 10[a] | 10 | 4 | - | 2.8 | 500 | - |
| 4 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15[a] | 10[b] | 4 | - | 2.8 | 500 | - |
| 5 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 20[a] | 10 | 4 | - | 2.8 | 500 | - |
| 6 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20[b] | 4[c] | - | 2.8 | 500 | - |
| 7 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 10[c] | - | 2.8 | 500 | - |
| 8 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 20[c] | - | 2.8 | 500 | - |
| 9 | none | 9K medium | 15 | - | 30 | - | 2.8 | 500[d] | - |
| 10 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 30[c] | - | 2.8 | 500[d] | - |
| 11 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 40[c] | - | 2.8 | 500 | - |
| 12 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 50[c] | - | 2.8 | 500 | - |
| 13 | none | 9K medium | 15 | - | 30 | - | 2.8 | 250[d] | - |
| 14 | *T.ferrooxidans* | 9K medium | 15 | 20 | 30 | - | 2.8 | 250[d] | - |
| 15 | none | thiomedium | 15 | - | - | 10 | 4.2 | 250 | 0[e] |
| 16 | *T.thirooxidans* | thiomedium | 15 | 20 | - | 10 | 4.2 | 250 | 0[e] |
| 17 | none | thiomedium | 15 | - | - | 10 | 1.8 | 250 | 0.2[e] |
| 18 | *T.thirooxidans* | thiomedium | 15 | 20 | - | 10 | 1.8 | 250 | 0.2[e] |

หมายเหตุ 1. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลิชชิ่งโดย *T. ferrooxidans* ดังนี้ อัตราการไหล[a] ปริมาณเชื้อเริ่มต้น[b] ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส[c] และปริมาณกากตะกอนในคอลัมน์[d]

2. อิทธิพลจากการผสมซัลเฟอร์ในกากตะกอนสำหรับการลิชชิ่งโดย *T. thiooxidans*[e]




รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงกระบวนการลิชชิ่งนิกเกิลออกจากกากตะกอนนิกเกิลไฮดรอกไซด์ในคอลัมน์โดยเชื้อแบคทีเรีย

## 3.5 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผล

ค่าพารามิเตอร์ที่ต้องวิเคราะห์ในการทดลองและวิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าพารามิเตอร์ที่ต้องวิเคราะห์ผล

| พารามิเตอร์ | การวิเคราะห์ผล |
|---|---|
| พีเอช | เครื่องวัดค่าพีเอช |
| โออาร์พี | เครื่องวัดค่าโออาร์พี |
| ปริมาณแบคทีเรีย | plate count method / Lowry method |
| ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส ($Fe^{2+}$) | new - σ - Phenonthroline method |
| ปริมาณนิกเกิล ($Ni^{2+}$) | วัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ |

### 3.5.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ มี 2 วิธีคือ การวิเคราะห์โดยตรงจากปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *T. ferrooxidans* ที่เจริญบนอาหารแข็ง FeTSB โดยวิธี plate count method (Johnson และคณะ,1987) และการวิเคราะห์โดยอ้อมจากปริมาณโปรตีนของเชื้อ *T. ferrooxidans* และเชื้อ *T. thiooxidans* โดยวิธี Lowry method (ASM, 1981)

#### 3.5.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดย plate count method (Johnson และคณะ,1987)

การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *T. ferrooxidans* โดยวิธี plate count method สามารถทำได้โดยการตรวจนับเซลล์แบคทีเรีย ที่เจริญบนอาหารแข็ง FeTSB ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย A B และ C ผสมกันในอัตราส่วน 14 : 5 : 1 ตามลำดับ

การเตรียมสารละลาย A ประกอบไปด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | = | 1.25 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | = | 0.50 | กรัม |
| Tryptic Soy Broth (TSB) | = | 0.25 | กรัม |
| น้ำกลั่น | = | 700 | มิลลิลิตร |

การเตรียมสารละลาย B ประกอบไปด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| Agarose | = | 7 | กรัม |
| น้ำกลั่น | = | 250 | มิลลิลิตร |

นำสารละลาย A และสารละลาย B ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi. และอุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุณภูมิลดลงเหลือ 50°C โดยประมาณ

การเตรียมสารละลาย C ประกอบไปด้วย

| | | | |
|---|---|---|---|
| $FeSO_4.7H_2O$ | = | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | = | 50 | มิลลิลิตร |

เนื่องจาก $FeSO_4.7H_2O$ จะเกิดการออกซิไดส์เมื่อได้รับความร้อน ดังนั้นจึงนำน้ำกลั่นไปนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำมาผสมกับ $FeSO_4.7H_2O$ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (ASM, 1981)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method ต้องทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก เพื่อให้โปรตีนในเซลล์ทำปฏิกิริยากับทองแดงอิออนในสารละลายสภาวะเบส จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายดังกล่าวด้วยการวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสง เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณโปรตีน ด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method ประกอบด้วย

สารละลาย A เตรียมจากการละลาย $Na_2CO_3$ 20 กรัม ใน 0.1 N NaOH 1ลิตร

สารละลาย B เตรียมจากการละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม ใน 1% $NaKC_4H_4O_6$ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C เตรียมจากการผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 50 : 1 ตามลำดับ ซึ่งต้องใช้ภายใน 1 วันหลังจากผสมแล้ว

สารละลาย D เตรียมจากการผสม Commercial Folin-Cicaltean 2 N และ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 1 เพื่อให้เป็น Commercial Folin-Cicaltean 1 N

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมจากสารละลาย Brovine Seram Albumin (BSA) 0.5 กรัม/ลิตร ผสมกับสารละลาย $NaN_3$ 1 กรัม/ลิตร ในอัตราส่วน 1 : 1 ซึ่งจะได้สารละลาย BSA เข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0-250 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปใช้แทนสารตัวอย่างในการสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายโดยวิธี Lowry method

1. ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก โดยการนำสารตัวอย่างมาเติม 1 N NaOH แล้วต้มนาน 30 นาที
2. นำสารตัวอย่าง / Blank มา 1 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย C ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
4. เติมสารละลาย D ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
5. นำไปวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสงที่ 750 นาโนเมตร
6. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและความดูดกลืนคลื่นแสง โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานแทนสารตัวอย่าง ทำตามขั้นตอนที่ 1-5

3.5.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส (Herrera และคณะ, 1989)

การวิเคราะห์ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส ($Fe^{2+}$) โดยวิธี new-σ-Phenonthroline method จะต้องลดการรบกวนของเหล็กเฟอร์ริก($Fe^{3+}$)ที่มีอยู่ในสารละลาย โดยเปลี่ยนเฟอร์ริกอิออนเป็นเหล็กเฟอร์ริกฟลูออไรด์ซึ่งเสถียรกว่า จากนั้นเติมสารละลายต่างๆซึ่งทำปฏิกิริยากับเหล็กเฟอร์รัส แล้ววัดปริมาณเหล็กเฟอร์รัสในสารละลายดังกล่าวด้วยการวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสง เปรียบเทียบกับสารละลายเหล็กเฟอร์รัสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กเฟอร์รัสโดยวิธี new-σ-Phenonthroline method ประกอบด้วย

Complex reagent เตรียมจากการละลาย NaF 2.1 กรัม ในน้ำกลั่น และเติม $H_2SO_4$ 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ซึ่งสารละลายที่เตรียมได้ต้องเก็บไว้ในขวดโพลีเอทธิลีน และใช้ภายใน 24 ชั่วโมง

O-phenan solution เตรียมจากการละลาย 1,10 phenanthrolene monohydrate 10 กรัม ในน้ำกลั่น และเติม HCl 10 หยด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

Acetate buffer เตรียมจากการละลาย Ammonium acetate 125 กรัม ในน้ำกลั่น และเติม Glacial acetic acid 300 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

O-phenan reagent ซึ่งประกอบด้วย O-phenan solution และ Acetate buffer เมื่อจะใช้จึงนำ มาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 ตามลำดับ

สารละลายเหล็กเฟอร์รัสมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร เตรียมจากการละลาย $FeSO_4.7H_2O$ 4.7782 กรัม ในน้ำกลั่น เติม $H_2SO_4$ และ Hydroxyamide เพียงเล็กน้อย เพื่อลดการรีดิวส์ของเหล็กเฟอร์รัสไปเป็นเหล็กเฟอร์ริก โดยการทำให้เหล็กเฟอร์รัสเสถียรขึ้น จากนั้นปรับ

ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายเหล็กเฟอร์รัสมาตรฐานที่ได้มาเจือจางให้มีค่าความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้แทนสารตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กเฟอร์รัสโดยวิธี new - σ - Phenonthroline method

1. นำสารตัวอย่าง / Blank มา 0.2 มิลลิลิตร
2. เติม Complex reagent 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่า
3. เติม O-phenan reagent 0.8 มิลลิลิตร แล้วเขย่า
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
5. วัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 นาโนเมตร
6. การสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กเฟอร์รัส และค่าความดูดกลืนคลื่นแสง โดยใช้สารละลายเหล็กเฟอร์รัสมาตรฐานแทนสารตัวอย่าง ทำตามขั้นตอนที่ 1-5

3.5.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณนิกเกิล (Eaton และคณะ, 1995)

การวิเคราะห์ปริมาณนิกเกิลในสารละลายด้วยการวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสงโดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดเปลวไฟ มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

1. เตรียมสารละลายให้เหมาะสม โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วรินเฉพาะน้ำใสที่มีความเข้มข้นของนิกเกิลมา ถ้ามีความเข้มข้นสูงเกินไปต้องเจือจางก่อนนำไปวัด
2. จัดเครื่องมือให้อยู่ในสภาวะที่พร้อมจะทำงานกับธาตุนิกเกิลที่ต้องการวัด ดังแสดงในตารางที่ 3.3
3. สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นนิกเกิลและค่าความดูดกลืนแสง โดยการนำสารละลายมาตรฐานนิกเกิลเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.1 - 20 มิลลิกรัม/ลิตร แล้ววัดค่าความดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น
4. นำสารละลายที่เตรียมไว้มาวัดค่าความดูดกลืนแสง ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นค่าความเข้มข้นนิกเกิลจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวนหาปริมาณนิกเกิลที่แท้จริงในสารละลายจากสมการ

ปริมาณนิกเกิลแท้จริง = จำนวนเท่าการเจือจาง x ปริมาณนิกเกิลที่วัดได้

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุนิกเกิลในสารละลายด้วยการวัดค่าความดูดกลืนคลื่นแสงโดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดเปลวไฟ

| hallow cathod lamp | นิกเกิล |
|---|---|
| ความยาวคลื่นแสง | 232.0 นาโนเมตร |
| ความกว้างช่องผ่านของแสง | 0.2 นาโนเมตร |
| ความเข้มข้นนิกเกิลที่เหมาะสม | 0.1-20 มิลลิกรัม/ลิตร |
| lamp current | 4 มิลลิแอมป์ |
| ชนิดเปลวไฟ | air - acetylene |
| อัตราการไหลของก๊าซอะเซทิลีน | 0.5 ลิตร/นาที |
| อัตราการไหลของอากาศ | 1.5 ลิตร/นาที |

ที่มา : คู่มือการใช้งานเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Varian SpectrAA-10Plus, บริษัทไทยยูนีค จำกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย