บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. คอปเปอร์ซัลเฟต แอนไฮดรัส ($CuSO_4$ anhydrous) (VWR International)
2. แคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2.2.5H_2O$) (RECL)
3. กรดไนตริก (HNO_3) (J.T. BAKER)
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Merck)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (VWR International)
6. กลูโคส (Glucose) (VWR International)
7. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) (Hardy Diagnostics)
8. สารสกัดจากยีสต์ (Malt extract) (Hardy Diagnostics)
9. เปปโตน (Peptone) (Hardy Diagnostics)
10. น้ำกลั่นปราศจากไอออน

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Mettler รุ่น Delta 320
2. เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) บริษัท GBC รุ่น Avanta
3. เครื่องเขย่า (Shaker) บริษัท Edmund Bühler รุ่น KS-A SWIP.
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hettich zentrifugen รุ่น universal 16A
5. เครื่องให้ความร้อน (Digestion block) บริษัท Gerhardt รุ่น Kjeldatherm
6. ตู้ดูดควัน (Fumehood) บริษัท Safelab Systems รุ่น BS 19-1BW

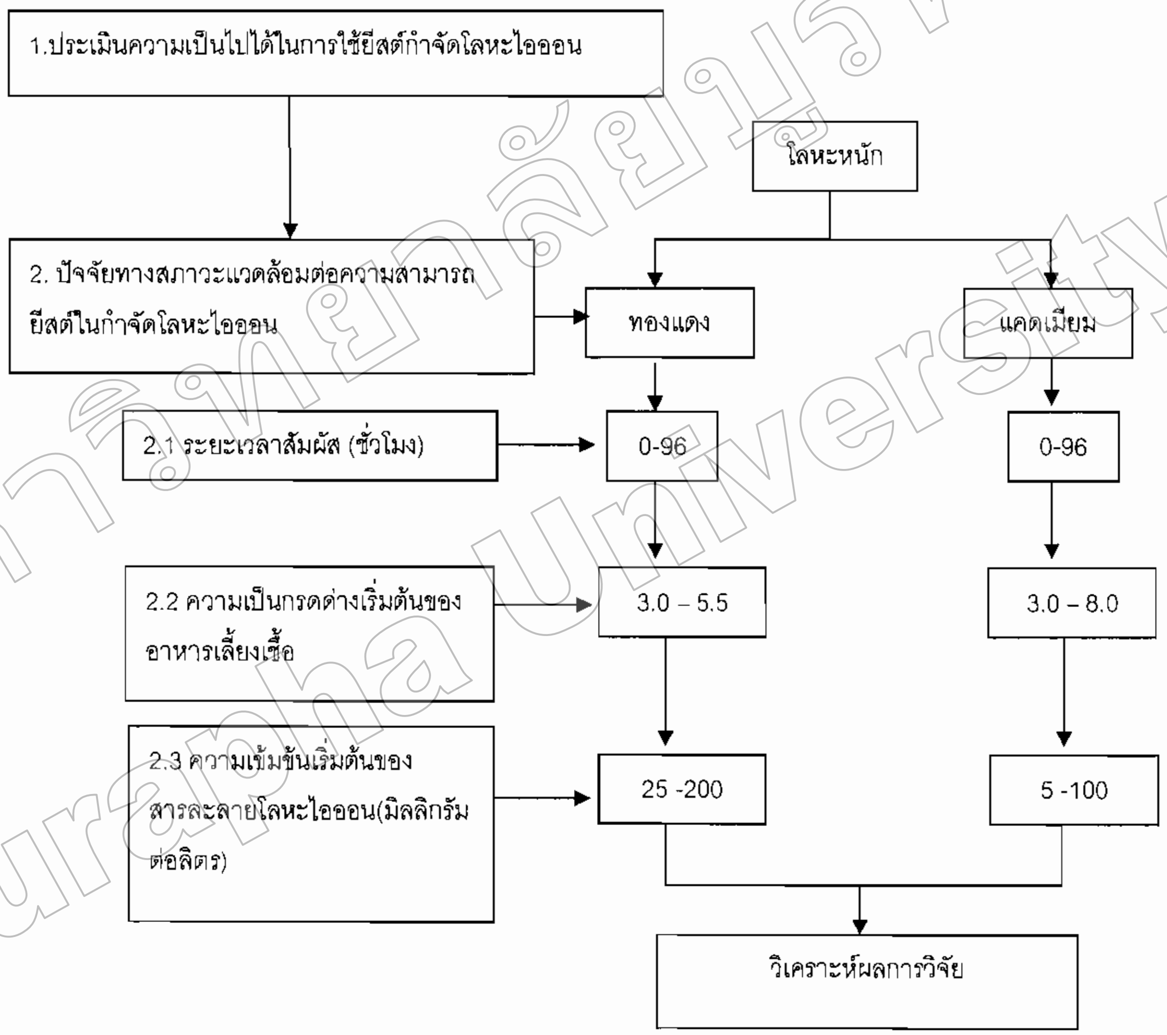
ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีสต์ที่ใช้เป็นยีสต์สำหรับหมักแอลกอฮอล์ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4105 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นำยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอียง Yeast-Malt extract agar (YM agar slant) เก็บเชื้อที่เจริญเต็มที่ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน โดยมีการย้ายลงเลี้ยงอาหารใหม่ทุกเดือน

แผนการดำเนินการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนการดำเนินการวิจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมยีสต์สำหรับการกำจัดโลหะไอออน

เตรียมเซลล์ยีสต์โดยเลี้ยงในอาหาร YM (Yeast-Malt extract broth) ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อยีสต์อยู่ในช่วงการเจริญแบบก้าวหน้าที่เวลา 5 ชั่วโมง (ภาคผนวก ง) จากนั้นเก็บเซลล์ยีสต์ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีการชั่งน้ำหนักไว้ก่อน แล้วชั่งจนได้น้ำหนักเซลล์เปียกตามกำหนด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ตะกอนเซลล์ยีสต์เปียกที่ได้นำไปใช้ในการทดลองการกำจัดโลหะไอออน

2. การเตรียมสารละลายโลหะไอออน

เตรียมสารละลายทองแดงไอออน และแคดเมียมไอออนความเข้มข้นสูง (Stock solution) 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยละลาย $CuSO_4$ anhydrous 2.5371 กรัม และ $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 2.0316 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ตามลำดับ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. การประเมินความเป็นไปได้ของการใช้ยีสต์ที่มีชีวิตในการกำจัดโลหะไอออน

การประเมินความเป็นไปได้ของการใช้ยีสต์ที่มีชีวิตในการกำจัดโลหะไอออนครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้ทองแดงไอออนเป็นตัวแทนในการศึกษา ดำเนินการโดยเตรียมเซลล์ยีสต์ 5 กรัมมวลเซลล์ยีสต์เปียกต่อลิตร ลงในสารละลายโซเดียมอะซิเตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 ที่มีสารละลายทองแดงไอออนความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 30 นาที 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของทองแดงไอออนที่เหลือในสารละลาย และน้ำหนักเซลล์แห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การศึกษาปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อความสามารถของยีสต์ในการกำจัดโลหะไอออน

4.1 ระยะเวลาสัมผัส

การศึกษาผลของระยะเวลาสัมผัสต่อความสามารถของยีสต์ในการกำจัดโลหะไอออน ดำเนินการโดยเติมสารละลายทองแดงไอออนความเข้มข้นสูงลงในอาหาร YM ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงไอออน เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปต 10 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงไอออน กำหนดให้เป็นค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงไอออน จากนั้นเติมเซลล์ยีสต์เปียกเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นปริมาณเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 1 กรัมมวลเซลล์ยีสต์แห้งต่อลิตร) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 30 นาที 1, 3, 6, 12 และทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของทองแดงไอออน และน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมคือสารละลายทองแดงไอออนในอาหาร YM ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 4.5 และไม่มีการเติมเซลล์ยีสต์ สำหรับการศึกษาผลของระยะเวลาสัมผัสต่อความสามารถของยีสต์ในการกำจัดแคดเมียมไอออน ดำเนินการเช่นเดียวกัน โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของแคดเมียมไอออน เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร YM ที่มีสารละลายทองแดงไอออนความเข้มข้น เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3.0 ถึง 5.5 ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลลาร์ การเปลี่ยนแปลงปริมาตรสุดท้ายไม่เกินร้อยละ 1 จากนั้นปิเปต 10 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงไอออน จากนั้นเติมเซลล์ยีสต์เปียก เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที หลังจากการกำจัดทองแดงไอออนเข้าสู่สภาวะสมดุล เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของทองแดงไอออน และน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ชุดควบคุมคือสารละลายทองแดงไอออนในอาหาร YM ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 ถึง 5.5 ที่ไม่มีการเติมเซลล์ยีสต์ สำหรับแคดเมียมไอออน ดำเนินการเช่นเดียวกัน โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร YM ซึ่งมีแคดเมียมไอออนความเข้มข้น เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3.0 ถึง 8.0 ด้วยกรด

ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลลาร์ และชุดควบคุม คือ สารละลายแคดเมียมไอออนในอาหาร YM ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 ถึง 8.0 และไม่การเติมเซลล์ยีสต์

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าเท่ากับ 3.0-5.5 การกำจัดทองแดงไอออน และ 3.0-8.0 ในการกำจัดแคดเมียมไอออน ซึ่งเป็นช่วงของค่าความเป็นกรดด่างที่ยีสต์สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ในการศึกษาไม่ดำเนินการที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 5.5 และ 8.0 ในการกำจัดทองแดงไอออน และแคดเมียมไอออนตามลำดับ เพื่อหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของทองแดงไอออน และแคดเมียมในสารละลาย โดยพิจารณาจากค่าคงที่ของการละลาย (Ksp) ดังภาคผนวก จ

4.3 ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโลหะไอออน

เตรียมอาหาร YM ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 5.0 ซึ่งมีสารละลายทองแดงไอออนความเข้มข้น 25 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นเริ่มต้นของทองแดงไอออน จากนั้นเติมเซลล์ยีสต์เปียก 5 กรัมต่อลิตรลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที หลังจากการกำจัดทองแดงไอออนเข้าสู่สภาวะสมดุล เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของทองแดงไอออน และและน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมคือสารละลายทองแดงไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆในอาหาร YM ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และไม่เติมเซลล์ยีสต์ สำหรับแคดเมียมไอออนดำเนินการเช่นเดียวกัน โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายแคดเมียมไอออนเท่ากับ 5 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโลหะไอออนที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ในการกำจัดทองแดงไอออน ความเข้มข้นของสารละลายทองแดงไอออนเท่ากับ 25 ถึง 200 ส่วนการกำจัดแคดเมียมไอออน เท่ากับ 5 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพิจารณาจากการที่ยีสต์ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายแคดเมียมไอออนความเข้มข้นสูงสุด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ ส่วนในกรณีของทองแดงไอออนยีสต์สามารถเจริญได้เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีทองแดงไอออนความเข้มข้นมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของทองแดงไอออนโดยพิจารณาค่าคงที่ของการละลาย (ภาคผนวก ฉ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโลหะไอออน

ตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาในข้างต้นจะนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโลหะไอออน (ทองแดงไอออน และแคดเมียม) และมวลเซลล์ยีสต์แห้ง โดยนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเก็บส่วนสารละลายไปย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้นจนตัวอย่างใส กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 นำตัวอย่างที่ผ่านกระดาษกรองไปปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยใช้ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโลหะไอออนด้วยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ส่วนในการวัดปริมาณมวลเซลล์ ทำโดยเก็บตัวอย่างเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การศึกษานี้ใช้ค่าประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะไอออน (Metal removal or Biosorption efficiency) และปริมาณการกำจัดโลหะไอออนจำเพาะ (Specific metal uptake: q_e) เป็นดัชนีในการประเมินความสามารถในการกำจัดโลหะไอออนด้วยยีสต์ (Goksungur et al., 2005) ดังสมการที่ (3.1) และสมการที่ (3.2) ตามลำดับ

$$\text{ประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะไอออน} = \frac{Ci - Ce}{Ci} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{ปริมาณการกำจัดโลหะไอออนจำเพาะ} = \frac{(Ci - Ce)v}{w} \quad (3.2)$$

เมื่อ Ci คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโลหะไอออน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

Ce คือ ความเข้มข้นของสารละลายโลหะไอออนที่สภาวะสมดุล (มิลลิกรัมต่อลิตร)

v คือ ปริมาตรของสารละลาย (ลิตร)

w คือ ปริมาณตัวดูดซับ (กรัม)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Anova)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University