

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 จัดหาวัตถุดิบและวิเคราะห์สมบัติ

ไคตินและไคโตซานจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1-4 สั่งซื้อจากบริษัท เอ เอ็น แล็บ จำกัด ตัวอย่างที่ 5 ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีแลนด์ คอปอเรชัน จำกัด และตัวอย่างที่ 6 สกัดขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 พร้อมทำการวิเคราะห์สมบัติของไคโตซานทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ความชื้นโดยดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC (2000), ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Spectroscopy และน้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์โดยใช้ Gel Permeation Chromatography

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างไคโตซานทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่	ชื่อไคโตซาน	แหล่งที่มา
1	Chitin_21/4/09	สั่งซื้อจากบริษัท เอ เอ็น แล็บ จำกัด
2	Chitosan D82	
3	Chitosan EX II	
4	Chitosan_10/01/11	
5	Chitosan Lot A	ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีแลนด์ คอปอเรชัน จำกัด
6	Chitosan B	สังเคราะห์ขึ้นเองในงานวิจัยนี้

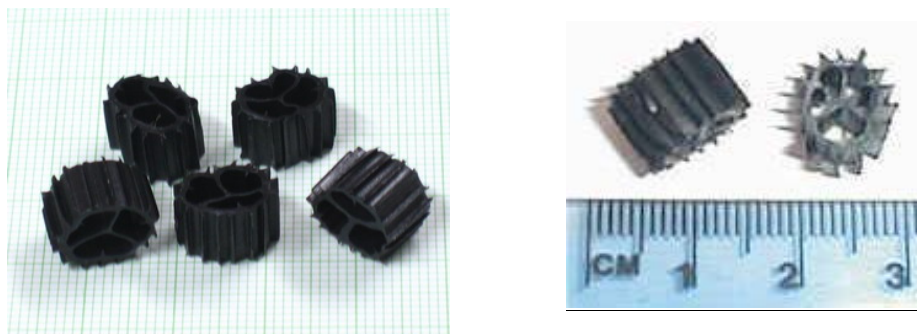
หมายเหตุ: การศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะดำเนินการในปีที่ 2

3.2 ศึกษาปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการตรึงเชื้อในไทรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.1 การเตรียมสภาพของตัวกรองชีวภาพในไตริฟเคชั่น

- ตัวกลางพลาสติกและการเตรียมตัวกลางก่อนการใช้งาน

ตัวกลางพลาสติกที่ใช้ในการทดลองเป็นวัสดุพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) ชนิดช่วยกระจายการไหลของน้ำให้ทั่วทั้งพื้นผิว (Random Flow Plastic Media) รุ่น BCN-009 (2H, Germany) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. สูง 8 มม. มีค่าพื้นที่ผิวจำเพาะเท่ากับ 864 ตร.ม.ต่อลบ.ม. โดยก่อนใช้ในการทดลองจะนำตัวกลางพลาสติกไปฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน และนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70-80 °ซ

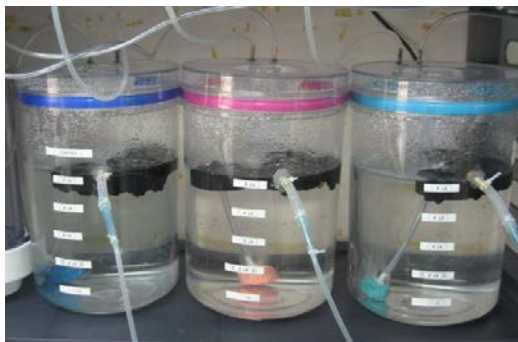


ภาพที่ 3.1 วัสดุพลาสติกโพลิเอทิลีน รุ่น BCN-009

- การตรึงห้วเชื้อไนตริไฟอิงแบคทีเรียจากระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ทำการตรึงห้วเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นบนตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยบรรจุในถุงตาข่ายแล้วนำไปแช่ในบ่อเลี้ยงกุ้งระบบปิด ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ระดับความลึกประมาณ 10 ซม. จากผิวน้ำเป็นเวลา 45 วัน เพื่อให้เกิดการเกาะติดของห้วเชื้อผสมไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing Bacteria ; AOB และ Nitrite-oxidizing Bacteria ; NOB) (Sesuk et al., 2009) จากนั้นนำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงห้วเชื้อแล้วมาเลี้ยงต่อเพื่อคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB ในถังปฏิกรณ์พลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

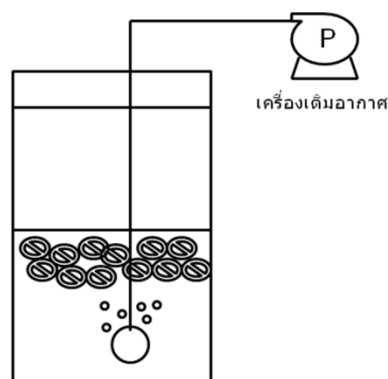
ไนโตรดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปรับค่าความเค็มเป็น 30 พีเอสยู เติมโซเดียมไนโตรดเพื่อเป็นแหล่งไนโตรดโดยควบคุมให้มีความเข้มข้น 10 มก.ไนโตรเจนต่อลิตรตลอดการทดลอง ในสภาวะที่มีการเติมอากาศในน้ำด้วยหัวทรายตลอดเวลา (ภาพที่ 3.2) ทดสอบประสิทธิภาพของตัวกลางพลาสติกที่คัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB โดยการตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตรดเป็นระยะ



ภาพที่ 3.2 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกไนโตรไฟอิงแบคทีเรียกลุ่ม NOB บนตัวกลางพลาสติก

- การตรวจวัดอัตราการบำบัดไนโตร

นำตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงเชื้อแล้วมาแยกใส่ลงในขวดโหลพลาสติกใส ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอสยู และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ลิตร เติมโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 2 มก./ในโตรเจนต่อลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อเพิ่มค่าสภาพด่างของน้ำให้อยู่ในช่วง 100-150 มก.ต่อลิตร ทำการเติมอากาศด้วยหัวทรายพ่นอากาศที่ต่อเข้ากับชุดเครื่องเติมอากาศ (Aqua Tech, Model A-T 2001) ที่มีไส้กรองอากาศขนาด 0.3 ไมครอน (PURE PE Capsile Filter) เพื่อให้อากาศที่เข้าถึงปฏิกรณ์อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ (ภาพที่ 3.3) โดยทำการทดลองจำนวน 3 ชั่วโมง ตรวจวัดคุณภาพน้ำในโหลพลาสติกเป็นระยะเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนไตรต์ โดยความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำจะขึ้นอยู่กับอัตราการลดลงของความเข้มข้นไนไตรต์ และหยุดเก็บตัวอย่างน้ำเมื่อไม่สามารถตรวจวัดค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ในน้ำได้



ภาพที่ 3.3 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดอัตราการบำบัดไนไตรต์ของตัวกลางพลาสติกที่ผ่านการตรึงเชื้อและคัดเลือกให้เหลือเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม NOB

- การตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

บรรจุวัสดุตัวกลางพลาสติก BCN-009 ที่มีหัวเชื้อ NOB เจริญบนพื้นผิวจำนวน 20 ชิ้น ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนไตรต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 40 มล. จากนั้นทำการ sonication และเขย่าหลอดทดลองบนเครื่องเขย่า (Vortex-Genie mixers) เป็นเวลา 4 นาที แยกตัวกลางพลาสติกออกก่อนที่จะนำหัวเชื้อ NOB ที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวมาเขย่ารวมกับไคโตซานปริมาณ 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอล 70% ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 2 นาที และทำการปรับพื้นผิวด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 2 นาทีแล้ว จากนั้นเติมโซเดียมไนไตรต์ให้มีความเข้มข้น 2 มก./ไนโตรเจนต่อลิตร ทำการบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เพื่อให้หัวเชื้อ NOB เกาะติดบนไคโตซาน

3.2.2 ระยะเวลาในการตรึงเชื้อ

นำไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะมิโนร้อยละ 91.13 ± 0.57 ไปบด และร่อนผ่านตะแกรงเพื่อคัดขนาดให้อยู่ในช่วง 1-2 มม. จากนั้นนำไคโตซานดังกล่าวจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ ดังนี้ คือ 0 3 6 12 24 และ 72 ชม. จากนั้นตรวจสอบการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิวไคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดไนไตรต์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อไนไตรต์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.3 ผลของการปรับพื้นผิวของไคโตซาน

นำไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหุ้ะชิทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 ขนาดที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ผ่านมาจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอล ไปทำการปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้ คือ พีเอช 5.5 (ใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ในการปรับพื้นผิวของไคโตซาน) และ พีเอช 6.5 และ 7.5 (ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการปรับพื้นผิวของไคโตซาน) ส่วนชุดควบคุมจะแช่ใน น้ำกลั่นแทนบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสม และตรวจสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรด์ เพื่อหาสภาวะการปรับพื้นผิวไคโตซานที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.4 ขนาดอนุภาคของไคโตซาน

นำไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหุ้ะชิทิลร้อยละ 91.13 ± 0.57 ไปบดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อคัดขนาดให้ได้ 3 ระดับ ได้แก่ ขนาดเล็ก (อยู่ในช่วง 1-2 มม.) ขนาดกลาง (อยู่ในช่วง 3-5 มม.) และขนาดใหญ่ (อยู่ในช่วง 8-10 มม.) จากนั้นนำไคโตซานแต่ละขนาดจำนวน 0.60 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการแช่ใน 70% เอทานอลและปรับพื้นผิวของไคโตซานด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ไปตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียตามเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการแปรค่าระยะเวลาในการตรึงเชื้อ และตรวจสอบประสิทธิภาพการบำบัดในไทรด์ เพื่อหาขนาดของไคโตซานที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อในไทรด์ออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซาน

3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการบำบัดในไทรด์

ประสิทธิภาพในการบำบัดในไทรด์นั้นเป็นการเปรียบเทียบอัตราการบำบัดในไทรด์ต่อกรัมต่อวัน

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ analysis of variance with a further Duncan's multiple range test