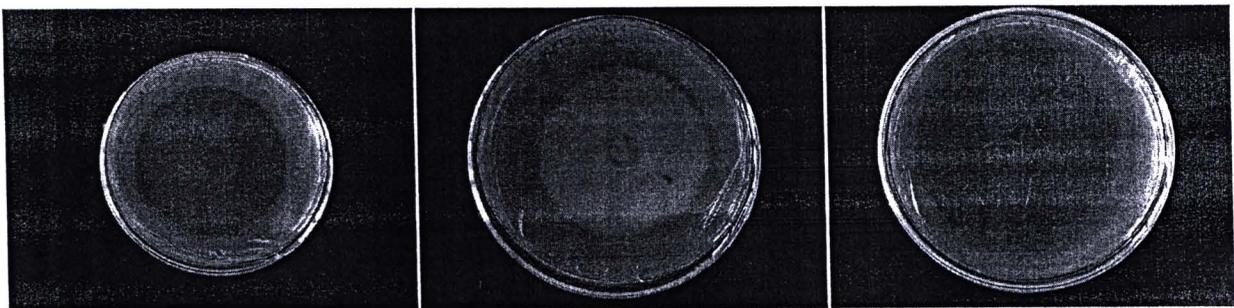


# เอกสารอ้างอิง



SU-1

SU-2

SU-3

---

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ  
(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

## เอกสารอ้างอิง

- โสภารวรรณ รัตนพันธุ์. (2547). การบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเส้นใย *Lentinus spp.* (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์).
- Agustin, M.B., Sengprache, W.P. and Phutdsawong, W. 2008. Electrocoagulation of palm oil mill effluent. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **5**, 177-180.
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G. and Zervakis, G.I. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 353-360.
- Ahmad, A. L., Ismail, S. and Bhatia, S. (2003) Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. *J. Desalination*. **157**, 87-195.
- Archibald, F., Paice, M.G. and Jurasek, L. (1990). Decolorization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 846-853.
- Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V. and Flegel, T.M. (1992). Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 198-202.
- Bhatia, S., Othman, Z. and Ahmad, A.L. 2006. Palm oil mill effluent pretreatment using *Moringa oleifera* seeds as an environmentally friendly coagulant: Laboratory and pilot plant studies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1852-1858.
- Blanquez, P., Caminal, G., Sarra, M., Vicent, M.T. and Gabarrell, X. (2002). Olive oil mill waste waters decolorization and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Biotechnol. Prog.* **18**, 660-662.

- Brenes M. and Corrido A. 1988. Regeneration de salmueras de acitunas verdes estilloo espanol con resinas cambiadoras de iones. *Grasas Aceites* **39**, 96-101.
- Brenes M., Montano A., Garrido A. 1990. Ultrafiltration of green table olive: influence of operating parameters and effects on polyphenol composition. *J. Food Sci.* **55**, 214-217.
- Chao, W.L., Lee. 1994. Decolorization of azo dyes by three white rot fungi : Influence of carbon source. *World J. Microb. Biotech.* **10**, 556-559.
- Clutterbuck A.J. 1990 Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1731-1738.
- Cripps, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *P. cryosporium*. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 1114-1118.
- Cheah, S. C., Ma, A. N and Obi, L. C. L. 1988. Biotechnological Application for Utilization of Waste from POME. *Fat. Sci. Tech.* **90**, 536-540.
- Chigusa, K., Hasegawa, T., Yamamota, N. and Watanabe, Y. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacture plant by yeasts. *Water Sci. Technol.* **34**, 51-58.
- Curir, P., Thurston, C.F., D'Aquila, F., Pasini, C. and Marchesini, A. (1997). Characterisation of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for Genista. *Plant Physiological Biochemistry*, **35** (2): 147-153.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M. and Pereira, A.N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* **92**, 7-13.
- Duran, N. and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied*

*Catalysis B: Environmental*, **28**: 83-99.

Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterisation of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (4): 1151-1158.

Farnet, A.M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G. and Le Petit, J. (2000). Purification, Partial characterisation, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**: 189-194.

Germann, U.A., Muller, G., Hunziker, P.E. and Lerch, K. (1988). Characterisation of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *The Journal of Biological Chemistry*, **263** (2): 885-896.

Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. and Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.*, **341**: 655-663.

Gomez-Millan A., Duran M.C., Garcia Garrido P.A., Gonzalez F., Rejano L., Sanchez F. and Sanchez J.C. 1983. Elaboracion de aceitunas verdes estilo espanol de la variedad Gordal con reutilizacion de lejias y supresion de lavados. Estudio de sus aguas residuales y algunos ensayos de purificacion. *Grasas Aceites* **1**, 162-167.

Haddadin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S. and Robinson, R.K. (2002). Bio-degradation of lignin in olive pomace freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresour. Technol.* **82**, 131-137.

Hammel, K.E. 1989. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 776-777.

- Hardin, I.R., Cao, H., Wilson, S.S. and Akin, D.E. (2000). Decolourisation of textile wastewater by selective fungi. *AATCC Review*, **32** (11): 38-42.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Mantinez, A.T. Bergbuer, M., Szewzyk, U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2788-2793.
- Kambe, T.N., Shimomura M., Nomura, N., Chanpornpong, T. and Nakahara, T. 1999. *J. Biosci & Bioeng.* **87**, 119-121.
- Kerem, Z. Friesem, D, and Hadar, Y. (1992) Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. And Environ. Microbiol.* **58**, 1121-1127.
- Kittikun, A. H., Prasertsan, P., Srisuwan, G. & Krause, A.2000. Environmental Management for Palm Oil Mill. <http://www.ias.unu.edu/proceedings/icibs/ic-mfa/kittikun/paper.html>
- Livernoche, K., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J. 1983. Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol.Bioeng.* **25**, 2055-2065.
- Miyata, N., Mori, T., Iwahori, K. and Fujita, M. 2000. Microbial decolorization of melanoidin-containing wastewater: combined use of activated sludge and the fungus. *Coritolus hirsutus*. *J. Biosci. & Bioeng.* **89**, 145-150.
- Machado, K.M.G., Compart, L.C.A., Morais, R.O., Rosa, L.H. and Santos, M.H. (2006). Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. *Braz. J. Microbiol.* **37**, 481-487.
- Moayed, P. and Asti, M.B. 1998. Decolorization of textile wastewater by *A. niger*. (Marine and Terrestrial). *Frensus Environ. Bulletin.* **5**, 223-120.

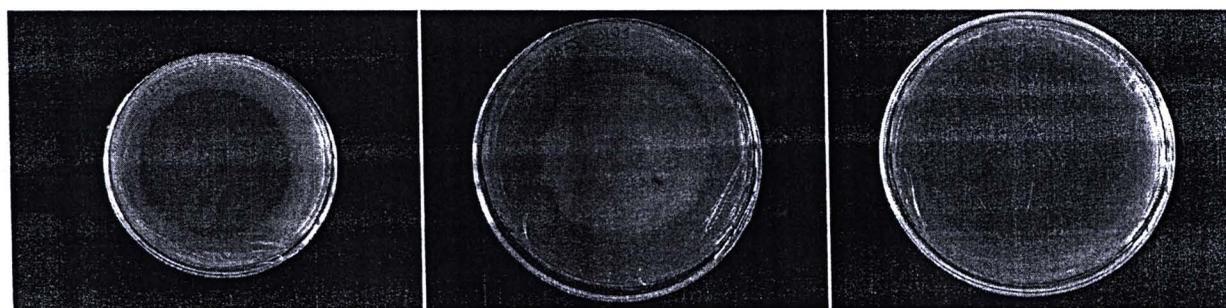
- Nagarathnamma, R. and Bajpai, P. (1999). Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1078-1082.
- Nang, H.L.L. May, C.Y., Ngan, M.A., and Hock, C.C. (2007) Extraction and Identification of Water-Soluble Compounds in Palm-Pressed Fiber by SC-CO<sub>2</sub> and GC-MS. *American Journal of Environmental Sciences*, 3 (2): 54-59,
- Ohkuma M., Maeda Y. and Kudo T. (2001) Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *Focused on Ecomolecular Science Research*, 42, 12-18.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. and Jurasek, L. (1995). Oxidative bleaching enzymes: A review. *Journal of pulp and paper science*, 21 (8): 280-284.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. and Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (50): 31301-31307.
- Paszczynski, A., Pasti, M.B., Goszcaynski, S., Crawford, D.L. 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. And *Phanerochete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 378-384.
- Perez, J., Marinez, J. and De la Rubia, T. (1996). Purification and partial characterisation of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4263-4267.
- Pointing, S.B. and Vrijmoed, L.L.P. (2000). Decolourisation of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 317-318.

- Sannia, P., Ligmongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. 1991. Purification and characterization of veratryl alcohol oxidase enzyme the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys., Acta* **1074**,114-119.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L. and Knowles, J.K.C. (1991). Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *Journal of General Microbiology*, **137**: 1537-1544.
- Schliephake, K., Lonerhan, G.T., Jones, C.L., Maniwareng, D.E. 1993. Decolorization of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1185-1188.
- Schliephake, K. and Lonergan, G.T. (1996). Laccase variation during dyedecolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, **18(8)**: 881-886.
- Shavali, M., Assaki, M.M. and Rostami K. 2000. Effect of environmental parameters on decolorization of textile wastewater using *Phanerochate chrysosporium*. *Bioprocess Eng.* **23**, 721-726.
- Shimada, M. F., Nakasubo, T. K. and Higuchi, T. (1981) Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation in lignin degradation in *Phanerochate chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **129**, 321-324.
- Shin, K.S. and Kim, C.J. (1998). Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology Techniques*, **12 (2)**: 101-104.
- Soares, G.M.B., Costa-Ferreira, M and Pessoa de Amorim, M.T. (2001). Decolorization of anthraquinone-type dye using a laccase formation. *Bioresour. Technol.* **79**, 171-177.

- Swamy, J., Ramsay, J.A. 1999. The evaluation of white rot fungi laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K. (1992). Purification and characterisation of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiol Biotechnology*, **37**: 321-323.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, **140**: 19-26.
- Trojanowski, J. (2001). Biological degradation of lignin. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **48**, 213-218.
- Wahleitner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P. (1996). The identification and characterisation of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet.*, **29**: 395-403.
- Xiao Y.X., Tu J., Wang M., Zhang Q and Shi Y (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 700-707.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H. (1996). Purification, characterisation, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (1): 834-841.
- Yosilada O., Fiskin K., Yosilada E. (1995) The use of white-rot fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive oil wastewater. *Environmental Tech.* **16**, 95-100.

Yun Ping N., Azis A., Chin P.T., Yew A.T. (2008) Determination of oil palm fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 1843-1837

# ภาคผนวก



SU-1

SU-2

SU-3

---

การศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Study of biological decolorization of palm oil mill effluent)

## 1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (Buswell et al., 1995)

### สารเคมี

-0.03% (w/v) 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonate (ABTS)	2	ml
-0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.0	2	ml
-Crude enzyme	0.1	ml

### วิธีการ

-ปิเปตสารละลาย ABTS และ acetate buffer ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และแช่หลอดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-ปิเปต crude enzyme ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

-นำสารละลายในหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer (กำหนดค่า discriminating = 10 %) ที่เวลา 1 2 3 4 5 และ 6 นาที

-เตรียม blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทน crude enzyme

1 unit ของเอนไซม์แลคเคส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการออกซิไดส์ ABTS 1  $\mu$ mol ในเวลา 1 นาที ต่อเอนไซม์ 1 ml

## 2. การวัดค่าสี โดยวิธีเปรียบเทียบแพลทตินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum cobalt standard) (APHA AWWA and WEF, 1998)

### สารเคมี

- สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทตินเนต (สารละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลทตินเนต 0.1246 g และผลึกโคบอลต์สคโลไรด์ 0.1 g ละลายในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ดังนั้นจะได้สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทตินเนตที่มีความเข้มข้น 500 หน่วยสี)

### วิธีการ

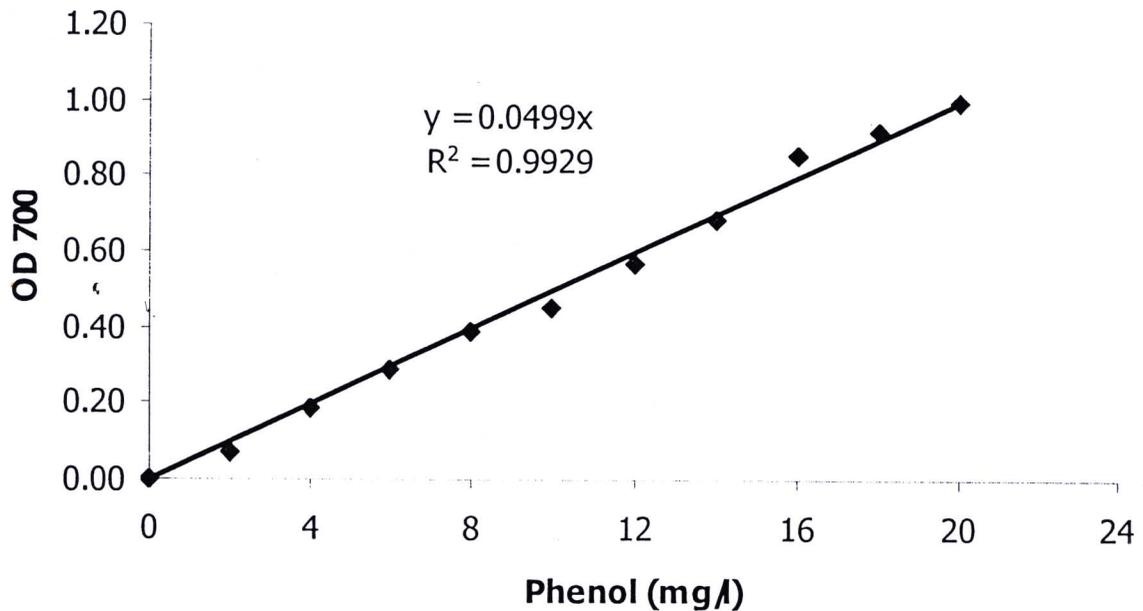
- นำตัวอย่างน้ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที
- นำตัวอย่างใสที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่มีความเจือจางที่เหมาะสม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank
- เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน



หน่วยสี (color units) =  $C \times D$

C = ค่าสีที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

D = อัตราการเจือจาง



**3. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) (จินตนา (2541) ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์แทนนิน APHA AWWA and WEF, 1998)**

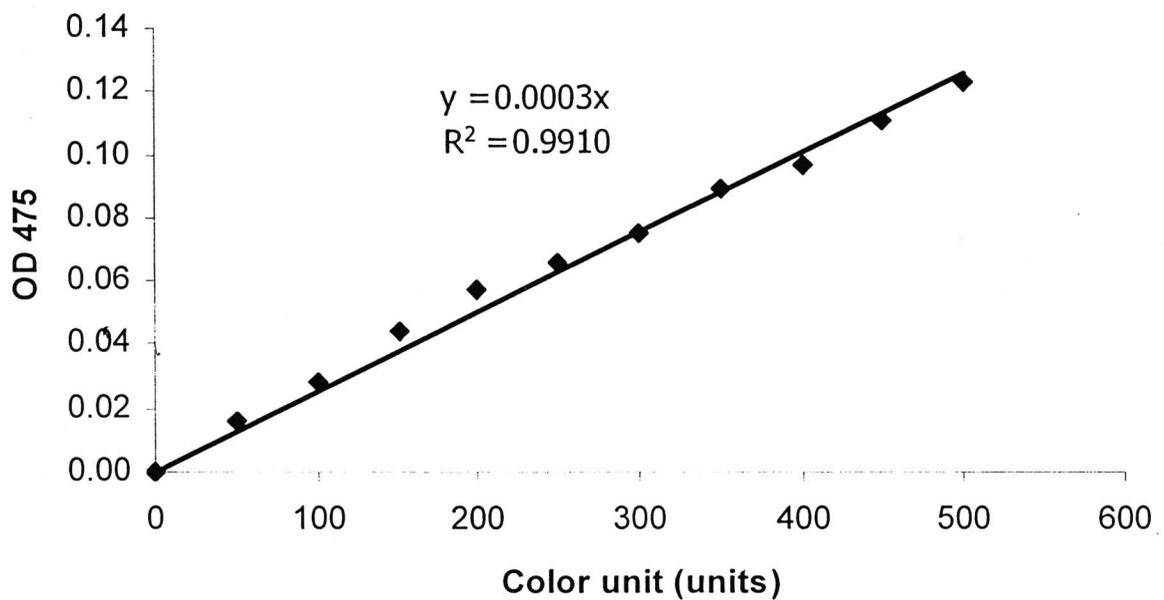
สารเคมี

- น้ำยาคาร์บอนेट-ทาร์เทรต : ละลาย  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณ 12 g ในน้ำกลั่นต้มเดือด 750 ml ทิ้งให้เย็นและปรับปริมาตรเป็น 1 L
- สารโพลินส์ฟีนอล

วิธีการ

- นำตัวอย่างน้ำที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 5 ml
- เติมสารโพลินส์ฟีนอล 0.1 ml
- เติมน้ำยาคาร์บอนेट-ทาร์เทรต 1.0 ml ทิ้งให้เกิดสี 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank
- เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นสารฟีนอล (mg/l) =  $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$



#### 4. ปริมาณของแข็ง (Solids)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

##### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชามระเหย/ถ้วยกระเบื้อง (Crusible)
2. เครื่องอังไอน้ำ (water bath)
3. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
4. เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace)
5. ตู้ดูดความชื้น (desiccator)
6. เครื่องชั่งละเอียด
7. กระดาษกรองใยแก้ว (GF/C) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร
8. ชุดกรองสุญญากาศ
9. กระจกนาฬิกา (watch glass)

(ก) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids)

1. นำจานระเหยเข้าอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (desiccator) แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกเป็น (B)
2. เลือกใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มล. แกว่งให้เข้ากันแล้วเทลงในชามระเหย จากนั้นนำไปตั้งบนเครื่องอังไอน้ำ
3. นำเข้าอบแห้งที่ อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกเป็น (A)

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

(ข) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended solids)

1. นำกระดาษกรอง Whatman 4.7 เซนติเมตร วางบนกระดาษฟิลา อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น นำมาชั่งละเอียด บันทึกเป็น (B) วางกระดาษกรองลงในกรวยบุชเนอร์ซึ่งต่อกับเครื่องดูดอากาศ ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษให้เปียก แล้วจึงเปิดเครื่องดูดอากาศ เพื่อให้กระดาษกรองติดกับกรวย
2. เลือกใช้ตัวอย่างน้ำปริมาตร 15-20 มล. แกว่งตัวอย่างให้เข้ากันดีแล้วเทลงในกรวยบุชเนอร์ที่เปิดเครื่องดูดอากาศไว้แล้ว จากนั้นใช้น้ำกลั่นประมาณ 10 มล. กัลวล้างสารที่ตกค้างในกระบอกตวง ปล่อยให้เครื่องดูดอากาศดูดจนกระดาษกรองแห้ง แล้วจึงเปิดสวิทช์ให้เครื่องทำงาน
3. นำกระดาษกรองวางบนกระดาษฟิลา แล้วอบที่ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักละเอียด บันทึกเป็น (A)

$$\text{ปริมาณของแข็งแขวนลอย (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

(ค) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งคงตัว (Fixed suspended solids) และของแข็งแขวนลอยระเหย (VSS)

นำกระดาษกรองที่ผ่านการวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งแขวนลอย เผาที่เตาเผาอุณหภูมิ 550±50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในตู้อบความชื้น จากนั้นนำมาชั่งหาปริมาณสารที่เหลืออยู่

$$\text{ของแข็งคงตัว (มก./ล.)} = \frac{\text{น้ำหนักสารที่เหลืออยู่ (ก.)} \times 10^6}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มล.)}}$$

ของแข็งแขวนลอยระเหย (มก./ล.) = ปริมาณของแข็งแขวนลอย - ปริมาณของแข็งคงตัว

หมายเหตุ

Mixed Liquor Volatile Suspended Solids (MLVSS) หมายถึง ปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นของแข็งที่ระเหยไปหลังจากนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และเป็นตัวแทนของมวลจุลินทรีย์ในระบบบำบัด ใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการหาของแข็งแขวนลอยระเหย

## 5. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. คอเป็น ground-glass 24/40
2. Condenser ขนาด jacket 300 มม. มี ground-glass joint 24/40
3. Hot plate

### สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแตสเซียมไดโครเมต  
นำสาร  $K_2Cr_2O_7$  อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น จากนั้นชั่งมา 12.259 ก. ละลายในน้ำกลั่น เจือจางให้เป็น 1 ล.
2. สารละลายกรดซัลฟิวริก

เติม  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  22 ก. ลงในขวดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ล. ปล่อยให้ทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ผลึก  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  ละลาย

3. mercuric sulfate

4. sulfamic acid

ใช้เมื่อมี nitrate ในตัวอย่างเท่านั้น ในอัตราส่วน 10 มก./1 มก. ในเตรท

5. ferroin indicator solution

ละลาย 1,10-ฟีเอเซนanthroline monohydrate ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 1.485 ก. และ ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 695 มก. ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้ได้ 100 มล.

6. สารละลายมาตรฐาน ferrous ammonium sulfate (FAS)

ละลาย  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  98 ก. ในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มล. จากนั้นทำให้เย็น แล้วเจือจางให้ได้ 1 ล. หาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้

### วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 20 มล. ลงใน refluxing flask ขนาด 250 มล.
2. เติมผง  $\text{HgSO}_4$  ประมาณ 0.4 ก. พร้อมด้วย glass bead
3. ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริก 5.0 มล. แล้วผสมให้เข้ากันดีจน  $\text{HgSO}_4$  ละลายหมด ขณะผสมควรทำให้ของผสมเย็น เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดสารจำพวกระเหยง่าย (volatile material) สูญหายไป
4. เติมสารละลายมาตรฐานโปรแตสเซียมไดโครเมต 10.0 มล. ผสมให้เข้ากันจนดี
5. ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริก อีก 25.0 มล. ขณะเติมควรแกว่งของเหลวให้ผสมเข้ากันจนดี แล้วจึงติดตั้งฟลasks เข้ากับท่อหล่อเย็น เปิดน้ำที่ใช้หล่อเย็น จากนั้นเปิดเตาให้ความร้อน ใช้ปิเปกเกอร์เล็ก ๆ ปิดปลายเปิดของท่อหล่อเย็นไว้เพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนจากภายนอก
6. ทำการรีฟลักซ์นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงทิ้งไว้ให้เย็น
7. เทน้ำกลั่นจากปลายบนของท่อหล่อเย็นเพื่อล้างสิ่งตกค้างผสมลงในฟลasks
8. ถอดฟลasks ออก เจือจางของเหลวที่ให้เป็น 150 มล.
9. เมื่อเย็นลงเท่าอุณหภูมิห้องแล้ว นำไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS โดยเติมสารละลาย ferroin 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งจุดยุติสังเกตได้จากสารละลายจะเปลี่ยนสีจากเขียวอมฟ้าเป็นสีน้ำตาลแดงทันที โดยให้จุดบันทึกปริมาตร FAS ที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีเป็นครั้งแรกในการนำไปคำนวณเพื่อหาค่าซีไอดี
10. แบลงค์ทำตามขั้นตอนทุกประการ

$$\text{ซีโอดี (มก./ล.)} = \frac{(A-B) \times \text{ความเข้มข้นของ FAS} \times 8000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย (มล.)}}$$

## 6. ปริมาณเจลดาคาร์บอนไนโตรเจน (Total Kjeldahl-Nitrogen)

วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1998)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดย่อยโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Turbosog
2. ชุดกลั่นตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน
3. เครื่องวัดพีเอช

### สารเคมี

1. HgSO<sub>4</sub> solution  
ละลาย red mercuric oxide (HgO) 8 ก. ในกรดซัลฟิวริก 6 โมลาร์ 100 มล.
2. Digestion reagent
3. ละลาย K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 134 ก. ในน้ำกลั่น 650 มล. และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 200 มล. เติมสาร HgSO<sub>4</sub> solution จากข้อ 1 ปริมาตร 25 มล. คนให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 1 ล. เก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกผลึก
4. Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent  
ละลาย NaOH 500 ก. และ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O 25 ก. ในน้ำกลั่น 1 ล.
5. สารเคมีที่ใช้ในวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

### วิธีวิเคราะห์

1. ใช้ตัวอย่าง 300 มล. หรือเจือจางให้เป็น 300 มล. ปรับพีเอชให้เป็นกลาง
2. เติม digestion reagent 50 มล.
3. นำพลาสติกตัวอย่างไปติดตั้งเข้ากับชุดย่อย ต้มจนปริมาตรตัวอย่างลดลงเหลือ 25-50 มล. จะเห็นควันสีขาวทึบ (อาจเป็นสีดำกรณีตัวอย่างมีสารประกอบอินทรีย์ปริมาณมาก) ต้มต่ออีก 30 นาที จะได้ของเหลวใส

4. หลังจากย่อยเสร็จ ปล่อยให้เย็นลง เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 300 มล. เติม phenolphthalein 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันดี
5. เอียงฟลasks แล้วค่อย ๆ เท Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent ลงไป จะได้ alkaline layer ที่บริเวณก้นฟลask
6. นำฟลask เข้าติดตั้งกับชุดกลั่นที่เตรียมสำหรับวิเคราะห์แอมโมเนียในโตรเจน จากนั้น แกว่งฟลask ให้สารทั้งสองชั้นผสมเข้ากันดี ถ้าตัวอย่างไม่เป็นสีชมพูให้เติม Sodium hydroxide-sodium thiosulfate reagent อีกจนได้สีชมพู อาจมีตะกอนดำของ HgS เกิดขึ้น
7. กลั่นตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียในโตรเจน จนได้ distillate ประมาณ 200 มล. แล้วนำไปไทเทรต



