

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนไตรต์ (Nitrite broth)

NaNO_2	1.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
NaCO_3	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
MgSO_4	0.3	กรัม
FeSO_4	0.01	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งสารเคมีต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสัดส่วน นำมาละลายน้ำให้ละลายและเข้ากันดี ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7-8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อปรับความดันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นไนไตรต์ประมาณ 203 มก.ไนไตรต์ในโตรเจนต่อลิตร

วิธีวิเคราะห์สมบัติของไคโตซาน

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC, 2000)

1. อบ crucible ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °ซ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง
2. นำ crucible ดังกล่าวมาใส่ใน desiccator และทิ้งไว้ให้เย็นลง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที ก่อนชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งตัวอย่างไคโตซานประมาณ 1 กรัม ใส่ใน crucible ดังกล่าว และจดบันทึกน้ำหนัก ก่อนนำไปอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำมาใส่ใน desiccator ให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที และทำการชั่งน้ำหนัก

คำนวณปริมาณความชื้นดังสมการข้างล่างนี้:

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(B - C) \times 100}{(B - A)}$$

โดยที่ A = น้ำหนัก crucible หลังอบที่ 105 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง
 B = น้ำหนัก crucible ที่มีตัวอย่างไคโตซานอยู่ก่อนอบที่ 105 °ซ
 C = น้ำหนัก crucible ที่มีตัวอย่างไคโตซานอยู่หลังอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ: การชั่งน้ำหนักจะใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตลอดการทดลอง

ก.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการละลาย (solubility) (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงวิธีมาจาก Roberts, 1992)

1. ชั่งโคโคซาน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. จากนั้นเติมสารละลายกรด อะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มล. และปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์มหรือพลาสติก
2. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทำการอบกระดาศกรอง GF/C ที่ 105 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักกระดาศกรองหลังทิ้งให้เย็นลงใน desiccator เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
4. เมื่อเขย่าสารละลายโคโคซานครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายดังกล่าวมากรองด้วยกระดาศกรองที่เตรียมไว้ โดยใช้ suction ช่วยในการกรอง
5. นำกระดาศกรองที่มีโคโคซานเจลและสิ่งเจือปนที่กรองได้ไปอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำมาใส่ไว้ใน desiccator ประมาณ 30 - 60 นาที ก่อนชั่งน้ำหนัก

คำนวณความสามารถในการละลายดังสมการข้างล่างนี้:

$$\text{ความสามารถในการละลาย (\%)} = \left(1 - \frac{(B - A)}{C} \right) \times 100$$

โดยที่ A = น้ำหนักกระดาศกรอง (กรัม)
 B = น้ำหนักส่วนที่กรองได้และกระดาศกรองหลังอบที่ 105 °ซ
 นาน 24 ชั่วโมง (กรัม)
 C = น้ำหนักโคโคซานเริ่มต้น (กรัม)

หมายเหตุ: การชั่งน้ำหนักจะใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่งตลอดการทดลอง

ก.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (Degree of Deacetylation) (พัฒนาเทคนิคและดัดแปลงมาจาก Muzzarelli และ Rocchetti, 1985)

1. ละลาย 0.2 กรัม ของตัวอย่างไคโตซาน ใน 100 มล. ของ 0.2 โมลาร์กรดอะซิติก โดยนำมาเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าไคโตซานจะละลาย
2. นำสารละลายไคโตซานดังกล่าวมา 5 มล. และเติมน้ำให้ได้ 100 มล. ใน volumetric flask ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไคโตซาน คือ 0.01 กรัม ไคโตซานใน 100 มล. ของ 0.01 โมลาร์กรดอะซิติก
3. นำสารละลายที่ได้หา the first derivative โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และหาค่า H เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine จากสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) ของ N-acetyl-D-glucosamine

คำนวณค่า degree of deacetylation ดังสมการข้างล่างนี้:

$$\% \text{ degree of deacetylation (\%DD)} = \left(1 - \left(\frac{A}{((10 \times W) - 204 A) + A} \right) \right) \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้ (กรัมต่อลิตร) หาคด้วย 204

W = น้ำหนักของตัวอย่างไคโตซาน (กรัม) ใน 100 มล. ของ 0.01 โมลาร์ กรดอะซิติก

204 = น้ำหนักโมเลกุลของ N-acetyl-D-glucosamine

161 = น้ำหนักโมเลกุลของ D-glucosamine

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ข.1 วิธีวิเคราะห์แอมโมเนีย

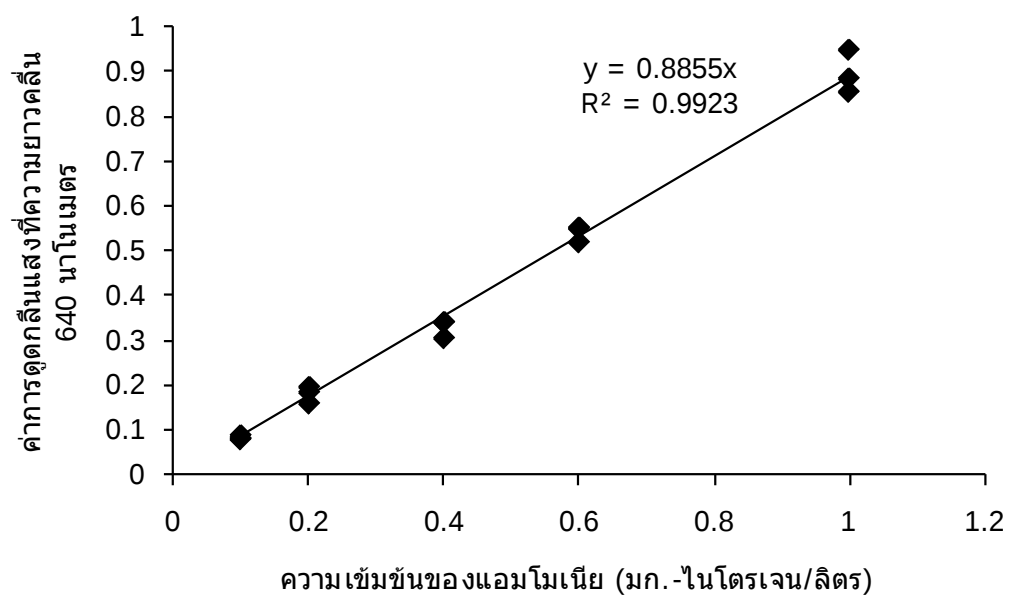
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. การทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควรนำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15 °ซ

- การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟีนอล เตรียมโดยการละลายฟีนอล 20 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ และปรับให้ได้ปริมาตร 200 มล.
2. สารละลายโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ เตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม ในน้ำ D.I. และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 200 มล.
3. สารละลายออกซิไดซ์ซิงค์ เตรียมโดยการผสมอัลคาไลนรีเอเจนต์ (ละลายโซเดียมซิงค์เตรต 100 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัม ในน้ำ D.I. ปริมาตร 500 มล.) กับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ใช้สารละลายไฮโปคลอไรด์ทางการค้าซึ่งมีความเข้มข้น 1.5 นอร์มอล) ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1

- ขั้นตอนการวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่าง 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.2 มล. และสารละลายโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ปริมาตร 0.2 มล. ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายออกซิไดซ์ซิงค์ แล้วจึงปิดฝาหลอดทดลองด้วยฟาราฟิล์มและเขย่าให้เข้ากัน (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ข้าง) ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ก่อนทำการวิเคราะห์ สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่น (De-ionized water) ที่ใส่สารเคมีแบบเดียวกับตัวอย่างน้ำ จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร สำหรับสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 และ 1.0 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานสำหรับแอมโมเนีย

ข.2 วิธีวิเคราะห์ไนโตรต์

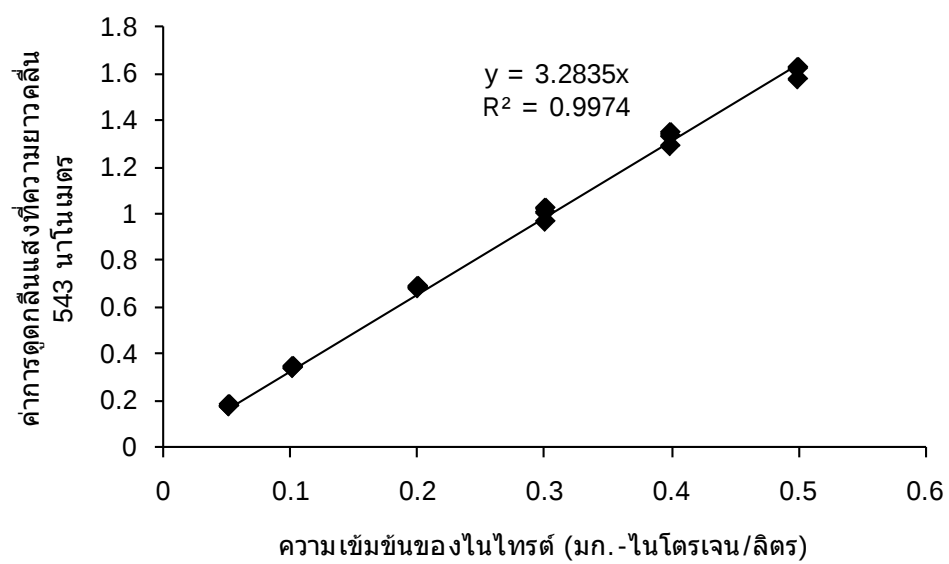
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรต์ในน้ำ ใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงมาจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควร นำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15°C

- การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายซัลฟานิลาไมด์ เตรียมโดยละลายซัลฟานิลาไมด์ 5 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เท่ากับ 500 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ถึง 8 นาที
2. สารละลายเอ็นเอ็นอีดี เตรียมโดยละลาย N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 500 มล.

- ขั้นตอนการวิเคราะห์

ปิเปตน้ำตัวอย่าง 5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ ปริมาตร 0.1 มล. และสารละลายเอ็นเอ็นอีดีปริมาตร 0.1 มล. ตามลำดับ ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มและเขย่าให้เข้ากัน (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์ โดยใช้ น้ำกลั่น (De-ionized water) เป็น Blank และใส่สารเคมีแบบเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร สำหรับสารละลายไนโตรต์มาตรฐานเตรียมที่ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานไนโตรต์เข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-2

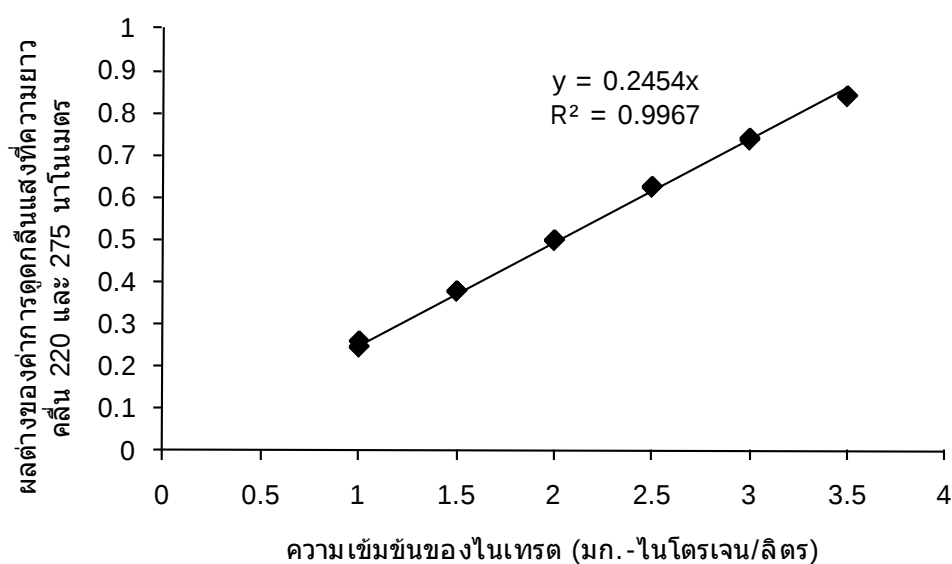


รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานสำหรับไนไตรต์

ข.3 วิธีวิเคราะห์ไนเตรต

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรตใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่อ้างอิงมาจาก Strickland และ Parsons (1972) โดยเก็บตัวอย่างน้ำมาทำการกรองก่อนเก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แต่หากยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีควรนำตัวอย่างน้ำแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -15°C

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนเตรตดำเนินการโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร ตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank โดยไม่มีการเติมสารเคมี จากนั้นจึงนำผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองค่าไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณไนเตรต ซึ่งค่าไนเตรตที่คำนวณได้ต้องนำไปลบด้วยปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำเดียวกัน เนื่องจากการวิเคราะห์ไนเตรตด้วยวิธีการนี้จะเป็นการวิเคราะห์ไนโตรเจนรวมไปด้วย สำหรับสารละลายไนเตรตมาตรฐานได้เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากสารละลายมาตรฐานไนเตรตเข้มข้น (ความเข้มข้น 100 มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร) ดังแสดงในรูปที่ ข-3



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานสำหรับไนเตรต

ข.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำ

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดด้วยวิธีการซึ่งอ้างอิงมาจาก Standard Method (1998) โดยการนำกระดาษกรอง GF/C ขนาด 47 มม. มาอบและชั่งน้ำหนักจนคงที่ จากนั้นนำน้ำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อนำกระดาษกรองออกจากตู้อบให้นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้นจนกระดาษกรองเย็นลง แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อหาค่าน้ำหนักของของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด} = \frac{\text{นน.กระดาษกรองหลังกรองน้ำ} - \text{นน.กระดาษกรองก่อนกรองน้ำ}}{\text{ปริมาตรน้ำที่กรอง (มล.)}} \times 10^6$$

ภาคผนวก ก
ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัย

1. บัณฑิตในระดับปริญญาโทสาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์:
นางสาวดวงชีวัน บุญเผือก
หัวข้อวิทยานิพนธ์: การตรึงไนโตรดออกซิไดซิงแบคทีเรียบนไคโตซานเพื่อใช้ในการบำบัด
น้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. บทความวิชาการในระดับนานาชาติที่มี impact factor:
Lertsutthiwong, P., Boonpuak, D., Pungrasmi, W., Powtongsook, S. Immobilization of Nitrite Oxidizing Bacteria using Biopolymeric Chitosan Media. Journal of Environmental Sciences. 2013, **25(2):** 262–267
3. เผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ:
Boonpuak, D., Pungrasm, W., **Lertsutthiwong, P.,** Powtongsook, S. Effects of Immobilization Time and pH adjustment on the Immobilization of Nitrite-oxidizing Bacteria on Chitosan. The 2010 International Conference on Biology, Environment and Chemistry (ICBEC 2010), Hong Kong, 28-30 December, 2010.