บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กมลชนก แสงสว่าง และชลอ จารุสุทธิรักษ์. (2552). ปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดฟอร์มัลดีไฮด์ในน้ำเสียด้วยระบบเอสบีอาร์. ใน **การประชุมวิชาการวิศวกรรมโยธาแห่งชาติ ครั้งที่ 14.** นครราชสีมา: สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

กรมควบคุมมลพิษ. (2541). **ฟอร์มัลดีไฮด์** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และวิบูลย์ลักษณ์ ศรีสวัสดิ์. (2540). **คู่มือการวิเคราะห์น้ำเสีย** (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อม.

ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3. (2539). **กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภท โรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ: กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. (2548). **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ** (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: แซน อี.68 แลบ.

Adroer, N., Casas, C., De Mas, C. and Sola, C. (1990). Mechanism of formaldehyde biodegradation by Pseudomonas putida. **Appl. Microbiol. Biotechnol,** 33(2), 217-220.

Ammary, B. Y. (2004). Nutrients requirements in biological industrial wastewater treatment. **African Journal of Biotechnology,** 3 (4), 236-238.

Arfman, N., Dijkhuizen, L., Kirchhof, G., Ludwig, W., Schleifer, K-H., Bulygina, E. S., et al. (1992). *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. **Int J Syst Bacteriol,** 42(3), 439-445.

Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Nagarajan, S. and Muralikrishnan, V. (2005). Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater, **Journal of Hazardous Materials,** 127 (1-3), 238-243.

Azachi, M., Henis, Y., Oren, A., Gurevich, P. and Sarig, S. (1995). Transformation of formaldehyde by a *Hafomonas* sp. **Can J Microbial,** 41(6), 548-553.

Budavari, S. (1989). **The merck index - an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals** (11^{th} ed.). Rahway, N.J., U.S.A. : Merck, & Co.

Cheng, C. R., Liang, S. Wang, H. C. and Beuhler, M. D. (1994). Enhanced coagulation for arsenic removal. **J. American Water Works Association,** 86(9), 79-90.

Chistoserdova, L., Vorholt, J. A. and Lidstrom, M. E. (2005). A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. **Genome Biology,** 6(2), 208.

Codd, G. A., Dijkhuzin, L. and Tabita, F. R. E. (1990). **Advances in autotrophic microbiology and one-carbon metabolism.** The Natherlands: Kluwer Academic.

Collins, J .J., Caporossi, J .C. and Utidjian, H .M. (1988). Formaldehyde exposure and nasopharyngeal cancer: Re-examination of the national cancer institute study and an update of one plant. **J Natl Cancer Inst,** 80(5), 376-377.

Costa, C., Vecherskaya, M., Dijkema, C. and Stams, A. J. (2001). The effect of oxygen or methanol oxidation by an obligate methanotrophic bacterium studied by in vivo ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J Ind Microbiol Biotechnol** 26(1-2), 9-14.

Crowther, G. J., Kosa´ly, G. and Lidstrom, M. E. (2008). Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 **Journal of Bateriology,** 190(14), 5057-5062.

Eiroa, M., Kennes, C. and Veiga, M. C. (2005). Simultaneous nitrification and formaldehyde biodegradation in an activated sludge unit. **Bioresource Technology,** 96(17) 1914-1918.

Eiroa, M., Vilar, A., Kennes, C. and Veiga, M.C. (2006). Biological treatment of industria wastewater containing formaldehyde and formic acid. **Water SA,** 32(1), 115-118.

Ernest, F. Gale and Helen, M. R. Epps. (1942). The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of acteria of bacteria (Escherichia coli and Micrococcus lysodeikticus) and the biological significance of the changes, produced. **Biochem J.,** 36(7-9), 600–618.

Garrido, J.M., Mendez, R. and Lema, J.M. (2000). Treatment of wastewater from formaldehyde-urea adhesives factory. **Water Science and Technology,** 42(5-6 293-300.

Glancer-soljan, M., Soljan, V., Dragicevic, T. L. and Cacic, L. (2001). Aerobic degradation of formaldehyde in wastewater from the production of melamine resins. **Food Technol. Biotechnol,** 39(3), 197-202.

Gonzalez, C. F., Proudfoot, M., Brown, G., Korniyenko, Y., Hirotada Mori, H., Savchenko, A. V., et al. (2006). Molecular basis of formaldehyde detoxification characterization of two s-formylglutathione hydrolases from *Escherichia coli*, *Frm*B and *Yei*G. **The Journal of Biological Chemistry,** 281(20), 14514-14522.

Goodman, L.S. and Gilman, A. (1975). **The pharmacological basis of therapeutics** (5th ed.). New York: Macmillan.

Gosselin, R. E., Smith R. P. and Hodge, H. C. (1984). **Clinical toxicology of commercial products.** (5th ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.

Grafstrom, R. C., Fornace, A. J. Jr, Autrup, H., Lechner, J. F. and Harris, C. C. (1983). Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. **Science,** 220(4593), 216-218.

Green, H. H. (1981). Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. **S. Afr. J. Sci,** 14, 465-467.

Hanson, R. S. and Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. **Microbiologica Reviews,** 60(2), 439-471.

Hidalgo, A., Lopategi, A., Prieto, M., Serra, J. L. and Llama, M. J. (2002). Formaldehyde removal in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. **Appl Microbiol Biotechnol,** 58(2), 260-263.

Harnden D. G. (1977). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk c chemicals to man. **Br J Cancer,** 35(1), 125.

Kalyuzhnaya, M. G., De Marco, P., Bowerman, S., Pacheco, C. C., Lara, J. C., Lidstrom M. E., et al. (2006). *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a nove taxon within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophi isolates. **Int J Syst Evol Microbiol,** 56(11), 2517-2522.

Kao, C.M., Liu, J.K., Lou, H.R., Lin, C.S. and Chen. S.C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. **Chemosphere**, 50(8), 1055-1061.

Kaszycki, P., Tyszka, M., Malec, P. and Koloczek, H. (2001). Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. An application to real wastewater treatment. **Biodegradation**, 12(3), 169-177.

Kato, N., Kobayashi, H., Shimao, M., and Sakazawa, C. (1984). Properties of formaldehyde dismutation catalyzing enzyme of *Pseudomonas putida* F61. **Agric Biol Chem**, 48, 2017-2023.

Kaulfers, P. M. and Laufs, R. bertragbare. (1985). Formaldehyde resistenz bei *Serratia marcescens*. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg1 Atb Orig B**, 181(3-5), 309-319.

Kaulfers, P. M. and Marquardt, A. (1991). Demonstration of formaldehyde dehydrogenase activity in formaldehyde-resistant Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiol Lett.**, 63(2-3), 335-338.

Kim, B.H. and Gadd, G.M. (2008). **Bacterial physiology and metabolism**. UK.: Cambridge University Press.

Kondo T., Morikawa Y., Hayashi N. and Kitamoto N. (2002). Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus. **Federation of European Microbiological Societies**, 214(1), 137-142.

Kondo T., Morikawa Y. and Hayashi N. (2008). Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus. **Appl Microbiol Biotchnol**, 77(5), 995-1002.

Lay, J.J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnol. Bioeng**, 68(3), 269-278.

Lotfy, H.R. and Rashed, I.G. (2002). A method for treating wastewater containing formaldehyde. **Water research**, 36(3), 633-637.

Material Safety Data Sheet (MSDS). (2009). [Brochure]. Canada: Mallinckrodt Baker.

Marx, C. J., Miller, J. A. and Chistoserdova, L. (2004). Multiple formaldehyde oxidation/ detoxification pathways in *Burkholderia fungarum* LB400. **Journal of bacteriology,** 186(7), 2173-2178.

Mirdamadi, S., Rajabi, A., Khalilzadeh, P., Norozian, D, Akbarzadeh, A. and Mohseni, F. A. (2005). Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** 21(6-7), 1299-1301.

Mitsui, R., Omori, M., kitazawa, H. and Tanaka, M. (2005). Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacteruim* sp. MF1: Enzymatic analysis related to C_1 metabolism. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** 9(1), 18-22.

Moteteb, M. A., Suidan, M. T., Kim, J., Maloney, S. W. (2002). Pertubated loading of a formaldehyde waste in an anaerobic granular activated carbon fluidized bec reactor. **Water Research,** 36(15), 3775-3785.

Moussavi, G., Yazdanbakhsh, A., Heidarizad, M. (2009). The removal of formaldehyde from concentrated synthetic wastewater using $O_3/MgO/H_2O_2$ proces integrated with the biological treatment. **J. Hazard. Mater.,** 15(171), 907-13.

Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantsch reaction. **Biochemical Journal,** 55(3), 416-421.

Newton, G. L., Buchmeier, N. and Fahey, R. C. (2008) Biosynthesis and functions c mycothiol, the unique protective thiol of *Actinobacteria.* **Microbiology an Molecular Biology Reviews,** 72(3), 471-494.

Oliveira, S. V. W. B., Moraes, E. M., Adorno, M. A. T., Varesche, M. B. A., Foresti, E., an Zaiat, M. (2004). Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-be bioreactor. **Water Research,** 38(7), 1685-169.

Olukanni, O. D., Osuntoki, A. A. and Gbenle, G. O. (2006). Textile effluent biodegradatio potentials of textile effluent-adapted and non-adapted bacteria. **Africa Journal of Biotechnology,** 5(20), 1980-1984

Omil, F., Mendez, D., Vidal, G., Mendez, R., and Lema, J. M. (1999). Biodegradation of formaldehyde under anaerobic conditions. **Enzyme Microb. Technol,** 24(5-6) 255-262.

Ong, S. L., Sarkar, S. K., Lee, L.Y, Hu, J. Y., Ng, H. Y. and Van Loosdrecht, M. (2006) Effect of formaldehyde on biofilm activity and morphology in an ultracompac biofilm reactor for carbonaceous wastewater treatment. **Water Environ Res** 78(4), 372-80.

Osol, A. (1980). **Remington's pharmaceutical sciences** (16th ed.). Easton, Pennsylvania Mack.

Parker, D. L., Schram, B. R., Plude, J. L. and Moore, R. E. (1996). Effect of metal cation on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from th cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. **Applied And Environmenta Microbiology,** 62(4), 1208–1213.

Pereira, N. S. and Zaiat, M. (2009). Degradation of formaldehyde in anaerobi sequencing batch biofilm reactor (ASBBR). **Journal of Hazardous Material** 163(2-3), 777-782.

Pokhrel, D. and Viraraghavan, T. (2006). Arsenic removal from an aqueous solution by modified fungal biomass. **Water Res,** 40(3), 549-552.

Richard, M. (2003). Activated sludge microbiology problems and their control. **The 20th Annual USEPA National Operator Trainers Conference Buffal** NY: Fort Collins.

Roca, A., Rodríguez-Herva, J. J. and Ramos, J. L. (2009). Redundancy of enzymes f formaldehyde detoxification in *Pseudomonas putida*. **J Bacteriol,** 191(1(3367-3374.

Sancha, A. M. (2006). Review of Coagulation Technology for Removal of Arsenic: Ca of Chile. **J Health Popul Nutr,** 24(3), 267-272.

Schutte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, M-R. (1976). Purification and properties Formaldehyde dehydrogenase and Formate dehydrogenase from *Candi boidinii*. **Eur. J. Biochem,** 62(1), 151-160.

Sequencing batch reactor design and operational considerations. (2005). [Brochure] USA: NEIWPCC.

Singh, A. L. and Sarma, P. N. (2010). Removal of arsenic (III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. **Bioremediation Journal,** 14(2), 92-97.

Van Dijken, J. P., Otto, R. and Harder, W. (1976). Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol limited chemostat. Physiological responses due to the involvement of methanol oxidase as a key enzyme in methanol metabolism. **Archives of Microbiology,** 111(1-2), 137-144.

Van Spanning, R. J. M., de Vries, S. and Harms, N. (2000). Coping with formaldehyde during C1 metabolism of *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** 8(1-3), 37-50.

Vidal, G., Jiang, Z. P., Omil, F., Thalasso, F., Mendez, R., and Lema, J. M. (1999). Continuous anaerobic treatment of wastewaters containing formaldehyde and urea. **Bioresource Technology,** 70(3), 283-291.

Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. and Thauer, R. K. (1998). The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. **J. Bacteriol,** 180(20), 5351–5356.

Wang, Y-T. (2004) Role of bacteria in arsenic removal from an aqueous environment. **Journal of Environmental Engineering,** 130(10), 1071.

Yoshida, K., Ishii, H., Ishihara, Y., Saito, H. and Okada, Y. (2009). Bioremediation potential of formaldehyde by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3 strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** 157(2), 321-328.

Yurimoto, H., Kato, N. and Sakai, Y. (2005). Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. **The Chemical Record,** 5(6), 367-375.

ภาคผนวก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารเคมี

1. **การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์**

การเตรียม Acetyl acetone

ชั่ง Ammonium acetate 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน Volumetric flask ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติม Glacial Acetic Acid ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และ acetyl acetone ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น (สารละลายนี้สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์)

การเตรียม 1 M Na_2SO_3

ชั่ง Na_2SO_3 126 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ถ่ายลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 1 M NaOH

ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ถ่ายลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 0.1 M NaOH

ชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ถ่ายลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม Thymolphthalein indicator solution

ชั่งและละลาย Thymolphthalein 0.1 กรัม ใน ethanol 98% v/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Phenolphthalein indicator solution

ชั่งและละลาย Phenolphthalein 0.5 กรัม ใน ethanol 98% v/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 N H_2SO_4 Standart Solution

1. ปิเปต conc. H_2SO_4 ปริมาตร 27.8 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. ปิเปต 1 N H_2SO_4 ที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร หยด phenolphthalein indicator 2-3 หยด

3. ไตเตรทด้วย 0.1 M NaOH จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 และ 3 อีก 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยที่ได้ และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 standart solution จากสมการ

ความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 (N) = ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร) × N ของ NaOH (N) / ปริมาตรของ H_2SO_4 (มิลลิลิตร)

2. **การเตรียมสารเคมีสำหรับซีโอดี**

การเตรียม 0.25N Potassium Dichromate Standart Solution

ชั่งและละลาย Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หนัก 12.259 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

การเตรียม Sulfuric reagent

ละลาย $AgSO_4$ 22 กรัม ลงใน conc. sulfuric acid 1 ขวด ซึ่งมีน้ำหนัก 4 กิโลกรัม หรือ 2,650 มิลลิลิตร (ต้องใช้เวลาในการละลายสารนี้ประมาณ 1-2 วัน)

การเตรียม feroin indicator

ละลาย $FeSO_4.7H_2O$ 0.695 กรัม และ 1,10 phenanthroline monohydrate 1.485 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 0.1N Ferrus ammonium sulfate standart solution

ละลาย Ferrus ammonium sulfate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติม conc.sulfuric acid 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและทิ้งให้เย็น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การหานอร์มาลิตีของ Ferrus ammonium sulfate standart solution

นำสารละลาย Potassium dichromate standart solution 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร และ conc.sulfuric acid 30 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาไตเตรตด้วย Ferrus ammonium sulfate standart solution โดยใช้ Feroin indicator 2-3 หยด และคำนวณหาความเข้มข้นดังสมการ

$$\text{นอร์มาลิตี (N)} = \frac{\text{Potassium dichromate(มิลลิลิตร)} \times 0.25}{\text{Ferrus ammonium sulfate standart solution(มิลลิลิตร)}}$$

การเตรียม 3% H_2O_2

ส่วนประกอบ

Hydrogen peroxide solution (30% H_2O_2) 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ปิเปต H_2O_2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดทึบแสง แช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2-3 วัน

การเตรียม 0.5% Tetramethyl paraphenylen diamine hydrochloride

ส่วนประกอบ

Tetramethyl paraphenylen diamine hydrochloride 0.5 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่ง Tetramethyl paraphenylen diamine hydrochloride 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดทึบแสง แช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ภายใน 1 วัน

การเตรียม Kovic's reagent

ส่วนประกอบ

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5 กรัม
Amyl หรือ buthyl alcohol	75 มิลลิลิตร
Conc. HCl	25 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสม Para-dimethyl-amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30-60องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็น ริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ใส่ในขวดทึบแสง เก็บในตู้เย็น

การเตรียม Gram's stain solution

การเตรียม Crystal violet stain

ชั่ง Crystal violet 0.5 กรัม ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม Decolourizer

ตวง 95 % Ethanol ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง ผสมกับ Acetone 250 มิลลิลิตร

การเตรียม Gram's Iodine solution

ชั่ง Iodine 1 กรัม ละลายด้วย Potassium iodine 2 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

การเตรียม Safranin O solution

ชั่ง Safranin O 2.5 กรัม ละลายด้วย 95% ethanol 100 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

YM medium Agar

ส่วนประกอบ

Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v X มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น)

Peptone	5 กรัม
Yeast Extract	3 กรัม
Malt Extract	3 กรัม
Agar	15 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือดและนำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเติม Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v ลงไปตามความเข้มข้นที่ต้องการ

Formaldehyde enrichment medium I (FMI) Agar

ส่วนประกอบ

Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v X มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น)

$NaNO_3$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2 กรัม
K_2HPO_4	2 กรัม
KH_2PO_4	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
Yeast Extract	0.2 กรัม

Agar	15 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือด และนำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเติม Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v ลงไปตามความเข้มข้นที่ต้องการ

Formaldehyde enrichment medium II (FMII) Agar

ส่วนประกอบ

Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v	X มิลลิลิตร(ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น)
$(NH_4)_2SO_4$	0.89 กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.02 กรัม
KH_2PO_4	0.15 กรัม
Na_2HPO_4	0.16 กรัม
Agar	15 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือด และนำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเติม Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v ลงไปตามความเข้มข้นที่ต้องการ

Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ

Pancreatic digest of casein	15 กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.3±0.2 นำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

Pancreatic digest of casein	15 กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	5 กรัม
NaCl	5 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.3±0.2 นำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tryptone Broth

ส่วนประกอบ

Trytone	10 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม (pH 6.9 ± 0.2)

ละลายส่วนประกอบต่างๆให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.9±0.2 ถ่ายใส่หลอดทดลองที่มี durham tube อยู่ นำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบ

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือด ปรับพีเอชเป็น 7.0 และนำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Motility test medium

ส่วนประกอบ

Beef extract	3 กรัม
Tryptone	10 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	5 กรัม

น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารต่างๆตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือด และนำไป Autoclave ที่ความดันไอ 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์

การทดสอบ Motility test

วิธีทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการลงในอาหารโดยการ stab ลงในอาหารตรงๆ ประมาณ 2/3 ของอาหาร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

การแปลผล

ผลบวก เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย Stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจน บริเวณรอยที่ Stab แต่พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขุ่นกว่าเดิม

ผลลบ เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่บริเวณรอย Stab โดยเห็นขอบเขตการเจริญชัดเจน

การทดสอบ Catalase Test

วิธีทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่น slide ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อแตะลงในหยดของ H_2O_2

การแปลผล

ผลบวก เกิดฟองก๊าซขึ้น

ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซ

การทดสอบ Oxidase Test

วิธีทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการลงในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง หยด 0.5% Tetramethyl paraphenylen diamine hydrochloride ลงบนแผ่นกระดาษกรองให้พอหมาดๆ เขี่ยเชื้อที่ทดสอบลงบนกระดาษกรองดังกล่าว

การแปลผล

ผลบวก จะเกิดสีชมพูแล้วจะเกิดเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาที หลังหยดสาร 0.5% tetramethyl-p-phenylenediamine แสดงว่าเชื้อสร้าง enzyme oxidase จะเป็นพวก aerobe

ผลลบ ไม่เกิดสีภายใน 10 วินาทีแสดงว่าไม่มี enzyme oxidase

การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์

การสร้างกราฟมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียม formaldehyde stock solution เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปต Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v ปริมาตร 2.63 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. ปิเปต 1 M Na_2SO_3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่เติมไทมอลพทาลีน 2 หยด 1 N H_2SO_4 จำนวน 1-2 หยด เติม formaldehyde stock solution ที่เตรียม 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่สารละลายผสมจะมีสีน้ำเงิน และไตเตรตด้วย 1 N H_2SO_4 ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากน้ำเงินเป็นไม่มีสี

1 N H_2SO_4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะทำปฏิกิริยาพอดีกับฟอร์มาลดีไฮด์ 30.03 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของฟอร์มาลดีไฮด์ ได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{A \times 30.03 \times 1000}{25}$$

เมื่อ A = ปริมาตรของกรดซัลฟุริค 1 N ที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

ปริมาตร 1 N H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตจนถึงจุดยุติ เท่ากับ 0.86 มิลลิลิตร

$$\text{ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{0.86 \times 30.03 \times 1000}{25}$$

สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่เตรียมขึ้นมีความเข้มข้น = 1,033 มิลลิกรัม/ลิตร

ดังนั้น สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 1 มิลลิลิตร = 1,033 ไมโครกรัม

3. เตรียมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จาก formaldehyde stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีเนื้อสารอยู่ 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัม โดยปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น)

4. ใส่ตัวอย่างมาตรฐานและแบลงค์ ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม1 N H_2SO_4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1 M NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นทุกขวด เทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างขวดเดิมด้วย Acetyl acetone แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย Acetyl acetone

5. นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์เป็นไมโครกรัมกับค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่าง

1. เตรียมตัวอย่างโดยการนำน้ำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที 10 นาที เพื่อกำจัดสารรบกวนการวิเคราะห์ตัวอื่นออกไป อาทิ เซลล์จุลินทรีย์, ตะกอนต่างๆ เป็นต้น

2. ปิเปตน้ำตัวอย่าง 15 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม1 N H_2SO_4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม 1 M NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย Acetyl acetone

3. นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (มั่นสิน, 2548)

การวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี

วิธีวิเคราะห์

1. ใส่สาร $HgSO_4$ ประมาณ 0.4 กรัม ลงในขวดก้นแบน เติมตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างน้ำที่ทำการเจือจางแล้วลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ควรทำควบคู่ไปกับแบลงค์ที่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง) และทำการรีฟลักซ์เหมือนกับตัวอย่างน้ำทุกประการ ยกเว้น sulfuric reagent ให้ใช้กรดที่ไม่เติม $AgSO_4$

2. เติมสารละลายมาตรฐาน potassium dichromate จำนวน 10 มิลลิลิตร

3. ค่อยๆ เติม sulfuric reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปพร้อมเขย่าให้เข้ากัน

4. ใส่เม็ดแก้วลงไป 5-6 เม็ด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเดือดอย่างรุนแรงนำขวดก้นกลมไปต่อกับเครื่องควบแน่น และใช้บีกเกอร์เล็กปิดปลายไว้เพื่อป้องกันสารปนเปื้อนต่างๆ จากภายนอก

5. ต้มให้เดือดหรือรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพ 42) ปิดเตาและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ก่อนทำการถอดขวดทรงกลมก้นแบนออกจากเครื่องควบแน่น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นอีกครั้ง

6. นำไปไตเตรทหาปริมาณ dichromate ที่เหลือ ด้วยสารละลายมาตรฐาน ferrus ammonium sulfate โดยใช้ feroin indicator 2-3 หยด เมื่อถึงจุดยุติส่วนผสมจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นน้ำตาลแดง

การวิเคราะห์ตัวอย่างมาตรฐาน

เราสามารถตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และสารเคมีจากตัวอย่างสารมาตรฐาน คือ กลูโคส ที่ 1 กรัม จะมีค่าซีโอดีเท่ากับ 1.067 กรัม หรือโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาเลท ที่อบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส 1 กรัม จะมีค่าซีโอดีเท่ากับ 1.176 กรัม

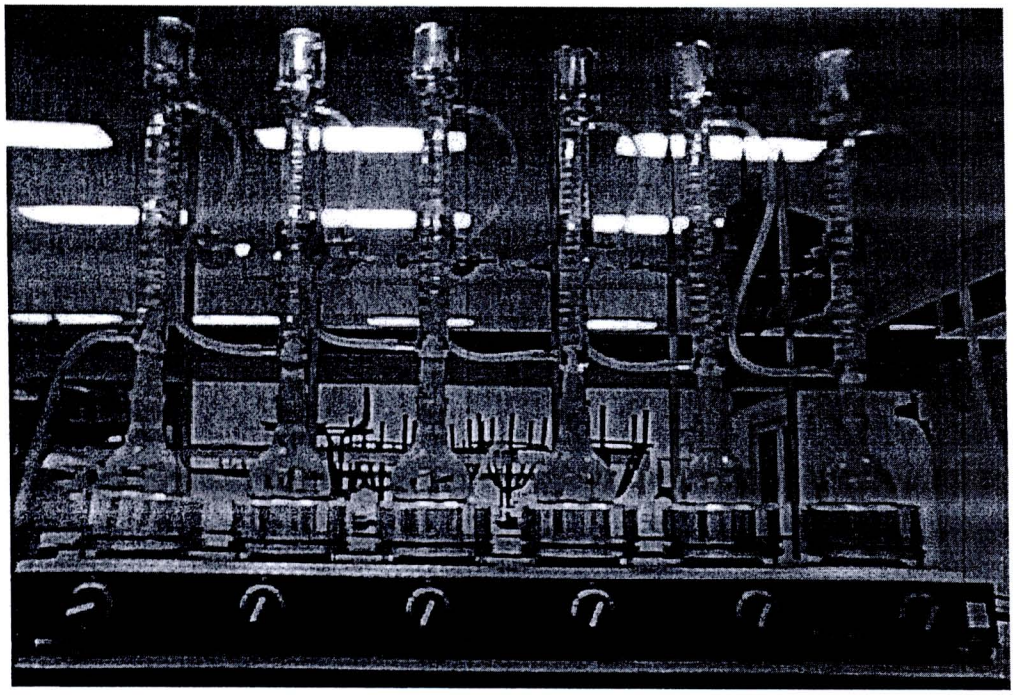
สูตรการคำนวณค่าซีโอดี

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B)\times N\times 8{,}000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง(มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน ferrus ammonium sulfate ที่ใช้ไตเตรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน ferrus ammonium sulfate ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = นอร์มาลิตีของสารละลายมาตรฐาน ferrus ammonium sulfate



ภาพ 42 ชุดอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ซีโอดี

การทดสอบประสิทธิภาพการตกตะกอน (SVI)

คำนวณจาก

$$SVI = \frac{SV30 \times 1{,}000}{MLSS}$$

โดย SVI = Sludge Volume Index (มิลลิกรัม/ ลิตร)

SV30 = ปริมาณของตะกอนที่ตกลงมาภายใน 30 นาที (มิลลิลิตร) จากการเติมน้ำในถังลงในกระบอกตวงหรือกรวยขนาด 1 ลิตร และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และวัดดูปริมาณตะกอนที่ตกลงมา

MLSS = Mixed-liquor suspended solids (มิลลิกรัม/ ลิตร) เป็นปริมาณของสารแขวนลอยชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และแร่ธาตุรวมทั้งจุลินทรีย์ ซึ่งหาได้จากการกรอง แล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

นำค่าที่ได้จากการคำนวณไปเทียบประสิทธิภาพกับตาราง 10

ตาราง 10 ค่า SVI และประสิทธิภาพการตกตะกอน

SVI	ประสิทธิภาพการตกตะกอน
<50	เลว
50	ดีมาก
100	ใช้ได้
200	พอใช้
300	เลว

ที่มา: ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และวิบูลย์ลักษณ์ ศรีสวัสดิ์, 2540

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

SV (Sludge volume) : ปริมาณของตะกอนที่ตกลงมาภายใน 30 นาที (มิลลิลิตร) ในกระบอกตวงหรือกรวยขนาด 1 ลิตร และตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีและนำมาวัดดูปริมาณของแข็งแขวนลอยที่ตกตะกอนว่ามีปริมาณเท่าใด

Methylotroph : จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น methane methanol methylamine formate และ formaldehyde เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้

SV30 : ปริมาณของตะกอนที่ตกลงมาภายใน 30 นาที (มิลลิลิตร) จากการเติมน้ำในถังลงในกระบอกตวงหรือกรวยขนาด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และวัดดูปริมาณตะกอนที่ตกลงมา

MLSS : Mixed-liquor suspended solids (มิลลิกรัม/ ลิตร) เป็นปริมาณของสารแขวนลอยชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และแร่ธาตุรวมทั้งจุลินทรีย์ ซึ่งหาได้จากการกรอง แล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล	ภัคภูมิ นุ่นจุ้ย
วัน เดือน ปี เกิด	17 กันยายน 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	5/3 หมู่ 5 ตำบลทุ่งโพธิ์ อำเภอจุฬาภรณ์
	จังหวัดนครศรีธรรมราช 80130

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร