# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# อาหารเลี้ยงเชื้อ

**Potato dextrose Agar (PDA)**

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| เดกซ์โทรส | 20 | กรัม |
| วุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนเดือดนานประมาณ 10-15 นาที อย่าทำให้เนื้อมันฝรั่งเละ กรองเอาแต่น้ำโดยใช้ผ้าขาวบาง ชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และวุ้นให้ได้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร

**Potato dextrose Broth (PDB)**

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| เดกซ์โทรส | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

**YPDA (Yeast extract Peptone Dextrose Agar)**

| | | |
|---|---|---|
| Yeast extract | 10 | กรัม |
| Peptone | 20 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| วุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร นำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งและแป้งมันฝรั่ง

### 1. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี DNS Method (Miller, 1959)

**สารเคมี**

1. 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนตลบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีก 0.05 % ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้)

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมชั่งสารกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

**ตารางที่ 9** การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส (ml) | น้ำกลั่น (ml) | ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 1.0 | 0 |
| 2 | 0.2 | 0.8 | 0.2 |
| 3 | 0.4 | 0.6 | 0.4 |
| 4 | 0.6 | 0.4 | 0.6 |
| 5 | 0.8 | 0.2 | 0.8 |
| 6 | 1.0 | 0 | 1.0 |

**วิธีการ**

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคส (ความเข้มข้น 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 1 มิลลิลิตร

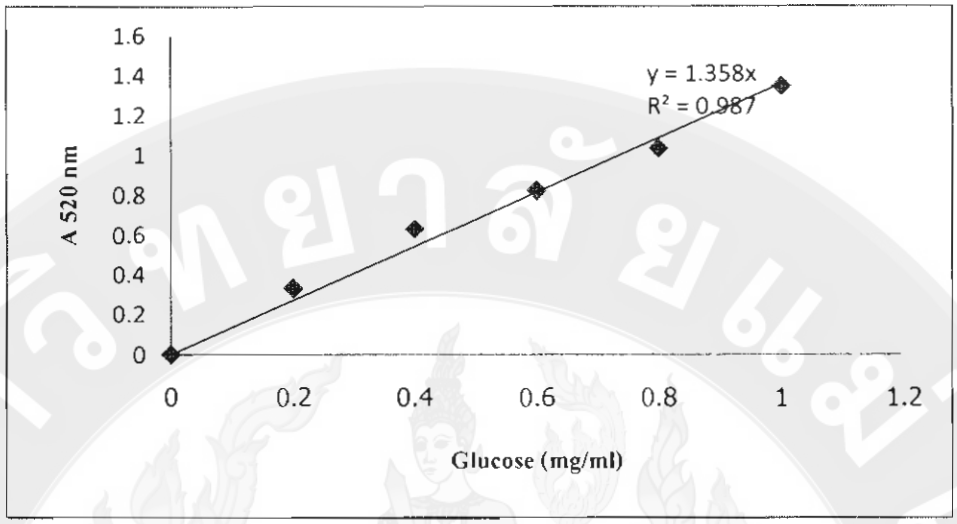
3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เพื่อรอให้เย็น

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

**ตารางที่ 10** ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm

| กลูโคส (mg/ml) | $A_{520}$ |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.2 | 0.3335 |
| 0.4 | 0.633 |
| 0.6 | 0.824 |
| 0.8 | 1.0355 |
| 1.0 | 1.346 |




**ภาพที่ 13** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS method ที่ความยาวคลื่น 520 nm

**2. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol Sulfuric (Dobois, 1956)**

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดย ชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.0400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

**ตารางที่ 11** การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส (µl) | น้ำกลั่น (µl) | ความเข้มข้นของกลูโคส (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 1000 | 0 |
| 2 | 25 | 975 | 10 |
| 3 | 50 | 950 | 20 |
| 4 | 100 | 900 | 40 |
| 5 | 125 | 875 | 50 |
| 6 | 200 | 800 | 80 |

**วิธีการ**

1. ปีเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่า

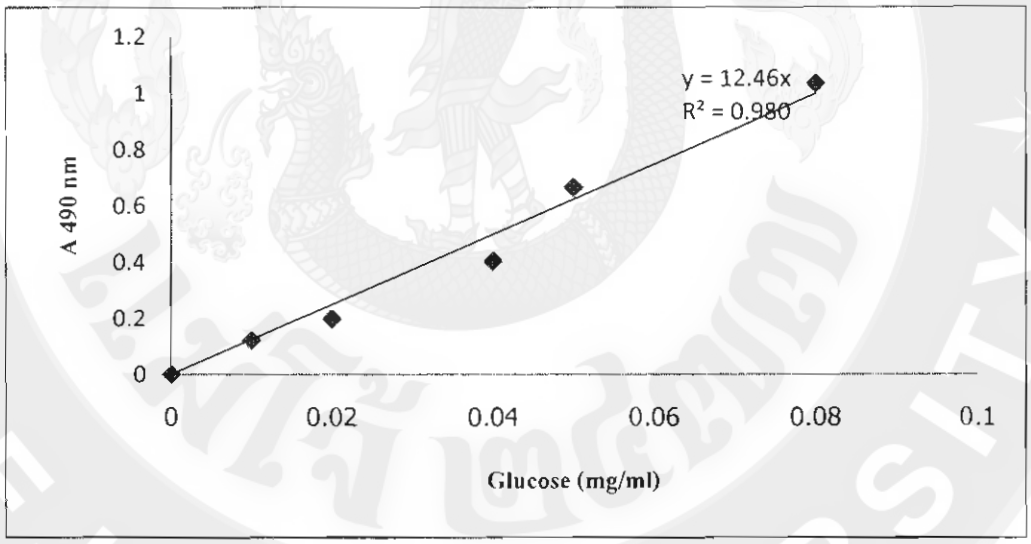
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วรออีก เป็นเวลา 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยใช้ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

**ตารางที่ 12** ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm

| Glucose (mg/ml) | OD at 490nm |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.01 | 0.1215 |
| 0.02 | 0.1985 |
| 0.04 | 0.404 |
| 0.05 | 0.665 |
| 0.08 | 1.031 |




**ภาพที่ 14** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี Phenol sulfuric ที่ความยาวคลื่น 490 nm

**3. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen) ด้วยวิธี Kjeldahl ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม A.O.A.C (1990)**

**ไนโตรเจนและการหาปริมาณไนโตรเจน**

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนในอาหารคำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งจะเป็นพวกสารประกอบโปรตีน (True protein) และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่ (Non-protein nitrogen) ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงเป็นโปรตีนรวม หรือโปรตีนหยาบ (Crude protein) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตามวิธีของ Kjeldahl method โดยวิธีการมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย (Digestion)

เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารให้อยู่ในรูป $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้น ($H_2SO_4$) เพื่อทำให้จุดเดือดของกรดสูงขึ้นควรเพิ่มเติมโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อเร่งให้สารตัวอย่างถูกย่อยได้เร็วขึ้นควรเติมตัวเร่ง (Catalyst) ซึ่งได้แก่ Cu, Hg และ Se ในการย่อยใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งไม่ต่ำกว่า 405 องศาเซลเซียส และไม่ควรเกิน 417 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เวลาสั้นลงและไม่เกิดการสูญเสียแอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia nitrogen)

สมการการย่อย

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \longrightarrow Co_2 + H_2O + (NH_4)\,2SO_4 + SO_2$$

คาร์บอนและไฮโดรเจนถูกออกซิไดซ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำส่วนหนึ่งของกรดซัลฟูริกถูกออกซิไดส์เป็น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์นี้จะไปรีดิวซ์สารไนโตรเจนอินทรีย์ให้เป็นแอมโมเนีย แล้วทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก ได้แอมโมเนียมซัลเฟต

2. การกลั่น (Distillation)

ตัวอย่างที่ย่อยทิ้งไว้อาจจะเกิดผลึกควรเติมน้ำเพื่อละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ในส่วนผสมที่ได้จากสมการ ย่อยทำให้กลายเป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (NaOH) แล้วทำการกลั่นเพื่อไล่ก๊าซแอมโมเนียมออกมา ซึ่งใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 หรือ เป็นตัวจับก๊าซแอมโมเนียม

3. การไทเทรต (Titration)

ใช้ Boric acid เป็นตัวเก็บแอมโมเนียม ให้ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาแอมโมเนียม

จากปริมาณแอมโมเนียมคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้ Conversion factor โดยทั่วไปคูณด้วย 6.25 โดยถือว่าโปรตีนทั่วไปมีปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยร้อยละ 16

**การคำนวณ**

**1. การหาเปอร์เซ็นต์ Nitrogen** ทำได้โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{14.007 \times (A-B) \times N \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)} \times 1,000}$$

A = ปริมาตรของกรดที่ไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของกรดที่ไทเทรตกับ Bank

N = ความเข้มข้นเป็น Normal ของกรด

**2. การหาปริมาณโปรตีน** การคำนวณหาปริมาณโปรตีนนั้นหาจากปริมาณไนโตรเจนที่ได้โดยปกติแล้วในตัวอย่างทั่วๆ ไป จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16% ของไนโตรเจนในโปรตีน = 6.25 (100/ 16)

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = 6.25 \times \text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน}$$

* Factor ของไนโตรเจน อาจเปลี่ยนได้ในอาหารบางชนิด เช่น นมและผลิตภัณฑ์นม มีค่า Factor = 6.38 ข้าวสาลี Factor = 5.7 เป็นต้น

**TKN (Total Kjeldahl Nitrogen)**

เป็นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดที่อยู่ในน้ำเสีย ทั้งในรูปของแข็งและสารละลาย ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกสภาพของน้ำเสียอีกตัวหนึ่ง ถ้าค่าน้ำเสียมีค่า TKN มาก น้ำจะมีสภาพเป็นด่าง และมีกลิ่นค่อนข้างเหม็น (เหม็นเปรี้ยวเหมือนกลิ่นแอมโมเนีย) ซึ่งระบบไร้อากาศหรือระบบก๊าซ

ชีวภาพไม่สามารถจะกำจัด TKN ได้ การกำจัด TKN ต้องใช้อากาศหรือใช้พืชน้ำ เพราะพืชน้ำใช้ไนโตรเจนในการเจริญเติบโต

**การเตรียมสาร**

1. สารละลาย NaOH 32% ชั่ง Sodium Hydrogen (NaOH) 320 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใน Hood)

2. Mixed indicator ชั่ง Methyl จำนวน 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย Ethanol 50 มิลลิลิตร และชั่ง Bromocresal green จำนวน 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย Ethanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองเทรวมกัน และคนให้เข้ากัน

3. สารละลาย Boric acid 4% ชั่ง Boric acid จำนวน 40กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายหมด จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4. Mixed Catalyst ชั่ง Potassium Sulfate ($K_2SO_4$) + Copper Sulfate ($CuSo_4.5H_2O$) ในอัตราส่วน 95 : 5 โดยน้ำหนัก (ใช้ 7 กรัม/ หลอด)

5. 0.002 N HCl ปิเปตกรด Hydrochloric acid (HCl) จำนวน 1.70 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีในน้ำกลั่นอยู่ส่วนหนึ่ง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

**ตอนที่ 1 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดมาตรฐาน 0.02 N HCl**

1. อบ $Na_2CO_3$ Anhydrous ที่บดละเอียด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. ชั่ง $Na_2CO_3$ Anhydrous มา 0.1300 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

3. หยด Mixed indicator 3-5 หยด

4. ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐาน 0.o2 N HCl สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น $A_1$

5. ต้มสารละลายในขวดรูปชมพู่ให้เดือดประมาณ 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ไทเทรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐาน 0.02 N HCl จนได้สีชมพูอีกครั้งบันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น $A_2$

$$\text{ความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl} = \frac{2000 \times \text{น้ำหนักที่แน่นอนของ } Na_2CO_3}{(A_1+A_2) \times \text{น้ำหนักโมเลกุลของ } Na_2CO_3}$$

**ตอนที่ 2 การเตรียมตัวอย่างน้ำ**

เก็บตัวอย่างน้ำในขวด Polyethylene หรือขวดแก้ว ตัวอย่างน้ำที่เก็บควรจะทำการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุด หรือหากยังไม่วิเคราะห์ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 2-5 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้องการจะวิเคราะห์ เติมกรดซัลฟูริคที่มีค่า pH ต่ำกว่า 2 จะช่วยในการเก็บรักษาได้ดีขึ้น ทั้งนี้เพื่อไม่ให้สารอินทรีย์ที่ระเหยได้ออกไป หรือให้สารอินทรีย์ที่อยู่ยังคงอยู่ในน้ำ

ถ้ารู้ว่าค่าโดยประมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนของตัวอย่าง สามารถที่จะเลือกปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้

| ความเข้มข้นไนโตรเจน (mg N/ L) | ปริมาตรที่ควรใช้ (ml) |
|---|---|
| < 10 mg N/ L | 200 |
| 10-20 mg N/ L | 100 |
| 20-50 mg N/ L | 50 |
| 50-100 mg N/ L | 25 |
| > 100 mg N/ L | 10 |

**ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ TKN (Total Kjeldahl Nitrogen)**

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย
2. เติม Catalyst 7 กรัม
3. เติม Conc. $H_2SO_4$ 15 มิลลิลิตร
4. เติม Hydrogen peroxide 30% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือ Stearic acid ปริมาณปลายช้อน
5. ทำการย่อยสาร

5.1 ทำการ Preheat โดยการปรับความร้อนไปที่ตำแหน่ง 10 เป็นเวลา 10 นาที

5.2 เปิดเครื่องกำจัดไอกรด (หลักการทำงานของ Scrubber) ไอกรดที่มาจากเครื่องย่อยจะผ่าน Condenser เพื่อทำให้ไอน้ำกลั่นตัวเป็นหยดน้ำลงมาในขวดที่อยู่ด้านล่างแล้วจึงผ่านสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเพื่อกำจัดกรดส่วนที่เหลือ และผ่านผงถ่านเพื่อกำจัดกลิ่นในขณะที่รอให้สารเย็นต้องเปิด Scrubber ตลอดเวลาจนกว่าไอของกรดจะหมดไป ใน Scrubber ประกอบด้วย Bromothymol biue ลงไป (Bromothymol biue 1 กรัม ผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เมื่อสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจับกับกรดมากๆ เข้า จะเปลี่ยนจากสารน้ำเงินเป็นเขียว เหลือง และส้มตามลำดับ

5.3 นำหลอดย่อยสารซึ่งใส่ตัวอย่างน้ำและสารเคมีเรียบร้อยแล้วมาประกอบเข้าเป็นชุดแล้วเข้าเครื่องย่อยสาร

5.4 ปรับความร้อนมาที่ตำแหน่งเลข 8 พร้อมทั้งจับเวลาในการย่อยสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างโดยสามารถยกขึ้นมาดูได้ ตัวอย่างที่ย่อยสมบูรณ์จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวใสไม่มีตะกอน (ประมาณ 3 ชั่วโมง)

5.5 หลังจากการย่อยสารเสร็จ นำหลอดย่อยออกจากเครื่องย่อยสารมาวางไว้บน Rack เพื่อรอให้หลอดย่อยเย็นก่อนที่จะนำไปเข้าเครื่องกลั่นสาร (วางไว้ใน Hood)

6. การกลั่นสาร

6.1 การเตรียมเครื่องกลั่นสาร

1) เติม Sodium Hydroxide 32% ซึ่งถูกปล่อยให้เย็นแล้วเทลงในถังด่าง

2) เปิดเครื่องกลั่นสาร พร้อมเปิดน้ำหล่อเย็น

3) ทำการ Preheat เครื่อง 1 ครั้ง โดยการเติมน้ำกลั่นในหลอดย่อยประมาณครึ่งหลอด ตั้งเวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที แล้วกดปุ่ม Star

6.2 การกลั่นสาร

1) เตรียม Boric acid 4% จำนวน 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2) หยด Mixed Indicator 2-3 หยด (จะได้สารละลายสีชมพู)

3) นำขวดรูปชมพู่ดังกล่าวใส่เข้าไปในเครื่องกลั่น

4) เติมน้ำกลั่นจำนวน 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยสารเพื่อทำการเจือจางตัวอย่าง

5) นำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น

6) เติม NaOH 32% โดยกดปุ่ม REAGENT รอจนกระทั่งสีในหลอดกลั่นสารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือฟ้า หรือที่ตัวเลขแสดง 5.0 (ใช้ด่างประมาณ 70-80 มิลลิลิตร)

7) ตั้งเวลาในการกลั่นประมาณ 4 นาที หรือดูจากสารที่กลั่นได้ประมาณ 100 มิลลิลิตร

8) กดปุ่ม Start

9) หลังจากกลั่นสารเสร็จสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส และนำสารที่กลั่นได้ไปทำการไตเตรทด้วย 0.05 N HCl ไตเตรทจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนบันทึกค่าปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร

**การคำนวณ** $$\text{mg TKN/ L} = \frac{(T-B) \times 14.007 \times N \times 1,000}{\text{Volume of sample (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ T = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท Bank

N = ความเข้มข้นในหน่วย Normality ของกรด

**4. ปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium) โพแทสเซียม (Potassium) โดยใช้เครื่อง Flame ASS ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม A.O.A.C (1959)**

**หลักการ**

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยเปลี่ยนตัวอย่างให้อยู่ในรูปเถ้า ละลายเถ้าด้วยกรด หลังจากนั้นวัดค่าอะตอมมิคแอบซอพชั่นด้วยเครื่อง AAS ปริมาณแสงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของธาตุที่มี

**สารเคมี**

1. แลนทานัม เข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) เก็บได้นาน 6 เดือน

1.1 ชั่ง แลนทานัมออกไซด์ ($La2O_3$ หรือ $LaCl_3$) 14.66 กรัม ในขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.2 เติมน้ำปราศจากไอออนเล็กน้อย

1.3 เติมกรด HCl เข้มข้น 62.5 มิลลิลิตร

2. CsCl 5% ชั่ง CsCl 6.35 กรัม ปรับปริมาตรในน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิตร

3. สารละลายมาตรฐาน Merck 1,000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

**ตารางที่ 13** การเตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะ

| สารมาตรฐานที่ต้องเตรียม | | สารละลายมาตรฐาน | | 5% $LaCl_3$ (ml) | 5%CsCl (ml) | ปรับด้วย | อายุสาร |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ความเข้มข้น (µg/ ml) | ปริมาตร (ml) | ความเข้มข้น µg/ ml | ปริมาตร (ml) | | | | |
| Mg 10 | 100 | 1,000 | 1 | 0 | 0 | 1 N $HNO_3$ | 1 เดือน |
| 0 | 50 | 10 | 0 | 2 | 0 | | |
| 0.2 | 50 | 10 | 1 | 2 | 0 | | |
| 0.4 | 50 | 10 | 2 | 2 | 0 | | |
| 0.6 | 50 | 10 | 3 | 2 | 0 | | |
| 0.8 | 50 | 10 | 4 | 2 | 0 | | |
| 1.0 | 50 | 10 | 5 | 2 | 0 | | |
| K 10 | 100 | 1,000 | 1 | 0 | 0 | 1 N $HNO_3$ | 1 เดือน |
| 0 | 100 | 10 | 0 | 0 | 2 | | |
| 0.1 | 100 | 10 | 1 | 0 | 2 | | |
| 0.5 | 100 | 10 | 5 | 0 | 2 | | |
| 1.0 | 100 | 10 | 10 | 0 | 2 | | |
| 1.5 | 100 | 10 | 15 | 0 | 2 | | |
| 2.0 | 100 | 10 | 20 | 0 | 2 | | |

**วิธีการทดสอบ**

**1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง**

1.1 ชั่งสารตัวอย่างในถ้วยพอสเลน 1 กรัม สำหรับ Magnesium ใช้มากกว่า อาจถึง 50 กรัม

1.2 วางบนเตาค่อยๆ ให้ความร้อนจนแห้ง นำไปอบไล่น้ำในเตาเผาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เผาตัวอย่างจนควันหมด

1.2 เผาในเตาอบที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปล่อยจนเย็น กลายเป็นเถ้า

1.3 เถ้าที่ไม่ขาวหยดน้ำลงบนเถ้าให้เปียก เติมกรดไนตริกเข้มข้น 0.5-3 มิลลิลิตร ระเหยจนกรดแห้งบนเตาไฟฟ้า เผาที่เตาอบ 525 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง ทำซ้ำจนเถ้าขาว (ถ้าหากวัด Potassium ควรหลีกเลี่ยง)

1.4 ละลายเถ้าที่ได้ด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.5 ให้ความร้อนบนเตาไฟฟ้า 2-3 นาที เพื่อช่วยให้เถ้าละลาย

1.6 ถ่ายสารละลายลงขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.7 ล้างสารละลายที่ติดถ้วยด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล

1.8 ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก 1 นอร์มอล

2. การเตรียม Bank ทำเหมือนข้อ 1 แต่ไม่ใส่สารตัวอย่าง

3. หา % Recovery โดย Spiked Sample ชั่งตัวอย่างเหมือนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ เติมสารละลายมาตรฐานโลหะลงปกติเติมสารละลายมาตรฐาน 1 เท่าตัวอย่าง ทำเหมือนข้อ 1

**ตารางที่ 14** ปริมาณการเติมสารละลายมาตรฐานเพื่อหา % Recovery

| สาร | ความเข้มข้น (µg/ ml) | ปริมาตรที่เติม (ml) |
|---|---|---|
| Ca | 1,000 | 5 |
| Cu | 10 | 2 |
| Fe | 10 | 2 |
| K | 1,000 | 5 |
| Mg | 1,000 | 5 |
| Mn | 10 | 2 |
| Na | 1,000 | 5 |
| Zn | 10 | 2 |

4. วิธีการวัด FAAS สำหรับ Ca, Mg เติม $LaCl_3$ ลง Bank, สารละลายตัวอย่าง ในขั้นตอนสุดท้ายที่เจือจาง (ก่อนวัด) $LaCl_3$ 0.2% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) สำหรับ Na, K เติม CsCl ลงใน Bank, สารมาตรฐาน, สารละลายตัวอย่าง ในขั้นตอนสุดท้ายที่เจือจาง (ก่อนวัด) CaCl 0.2% (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

**ตารางที่ 15** ปริมาตรของสารละลาย $LaCl_3$ CsCl

| ปริมาตรสารที่เติม | 5% La $Cl_3$ | 5% CsCl |
|---|---|---|
| 10 | 0.4 | 0.2 |
| 25 | 1 | 0.5 |
| 50 | 2 | 1 |
| 100 | 4 | 2 |
| 250 | 10 | 5 |
| 500 | 20 | 10 |

นำสารละลายมาตรฐาน, Bank, สารละลายตัวอย่าง วัด FAAS ปรับความยาวคลื่น ดังตารางที่ 16

**ตารางที่ 16** การวัด FAAS และการปรับความยาวคลื่น

| สาร | ความยาวคลื่น | ความเข้มข้น (µg/ ml) | | องศา Burner |
|---|---|---|---|---|
| | | หา Sensitivity | หา Detection Limit | |
| Ca | 422.7 | 10 | 5 | 0 |
| Cu | 324.8 | 2 | 0.1 | 0 |
| Fe | 248.3 | 4 | 0.6 | 0 |
| K | 766.5 | 2 | 0.1 | 10 |
| Mg | 285.2 | 0.4 | 0.2 | 1 |
| Mn | 279.5 | 1 | 0.2 | 0 |
| Na | 589.0 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| Zn | 213.8 | 1 | 0.2 | 0 |

5. การคำนวณ

5.1 การหาปริมาตรของสารละลาย $LaCl_3$ หรือ CsCl ที่เติมลงไปในตัวอย่าง

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2}$$

5.2 การหาความเข้มข้นของโลหะ

$$\text{ppm } (\mu g/g, \mu g/ml) = \frac{CVF}{W}$$

เมื่อ C = µg/ ml

V = ml

F = จำนวนเท่าของสารละลาย

= ผลคูณของ (ปริมาตรที่เตรียม ml/ ปริมาตรที่เจือจาง ml)

โลหะ (มิลลิกรัม/ 100 กรัม หรือ มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตร) = โลหะ ppm/ 10

โลหะ (กรัม/ 100 กรัม หรือ กรัม/ 100 มิลลิลิตร) = โลหะ ppm/ $10^4$

5.3 การคำนวณ % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = (Csp-Cs/Ca) \times 100$$

เมื่อ Csp = ความเข้มข้นโลหะที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานโลหะ (ไมโครกรัม/ กรัม หรือ ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)

Cs = ความเข้มข้นโลหะที่วัดสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/ กรัม หรือ ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)

Ca = ความเข้มข้นที่เติมในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/ กรัม หรือ ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)

**การรายงานผล**

วิเคราะห์ได้ ± ความไม่แน่นอน

1. ต่ำกว่า LOD ตรวจไม่พบ
2. LOD-LOQ น้อยกว่า LOD (<LOQ)

3. หากปริมาตรตัวอย่าง การปรับปริมาตรสุดท้ายก่อนการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามวิธีทดสอบมีการเจือจางสารละลาย ให้คำนวณค่า LOD และ LOQ ใหม่โดยแทนค่าตัวแปรต่างๆ ดังสมการ $V_2 = (C_1 \times C_2)/ C_2$ เมื่อ C คือค่า LOD (มิลลิกรัม/ ลิตร) หรือ LOQ (มิลลิกรัม/ ลิตร)

**5. ปริมาณ Chemical Oxygen Demand (COD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)**

**สารเคมี**

**1. สารละลายย่อยสลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต**

| | | |
|---|---|---|
| โพแทสเซียมไดโครเมตปฐมภูมิ (Primary Standard) | 4.1913 | กรัม |
| เมอร์คิวริคซัลเฟต | 33.3 | กรัม |
| กรดซัลฟูริคเข้มข้น | 137 | มิลลิลิตร |

อบโพแทสเซียมไดโครเมตปฐมภูมิในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น แล้วเติมเมอร์คิวริคซัลเฟตคนให้ละลายกันอย่างดีปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**2. ซัลฟูริครีเอเจนต์**

| | | |
|---|---|---|
| ซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$) | 22 | กรัม |
| กรดซัลฟูริคเข้มข้น | 4.0 | กิโลกรัม |

เติมซิลเวอร์ซัลเฟตในขวดของกรดซัลฟูริคเข้มข้นทิ้งไว้ให้ละลาย 2 วัน

**3. สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์**

| | | |
|---|---|---|
| 1,10 – ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8H_2N_2O$) | 1.485 | กรัม |
| ไอร์ออนซัลเฟตเฮฟต้าไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) | 0.695 | กรัม |

ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**4. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)**

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต | 39.2 | กรัม |
| กรดซัลฟูริคเข้มข้น | 20 | มิลลิลิตร |

ละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรตในน้ำกลั่นแล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นทิ้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตร ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**วิธีการวิเคราะห์ COD (Chemical oxygen demand)**

1. ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจุกด้วยกรดซัลฟูริก 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารอินทรีย์

2. เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม

3. นำตัวอย่างน้ำมาใส่ในหลอดย่อยสลาย เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

4. ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกรีเอเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดเพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ภายใต้ตัวอย่างน้ำและสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

5. ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่นแล้วคว่ำหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้สารละลายผสมกันอย่างทั่วถึง

6. นำหลอดทดสอบนี้ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง โดยนำมาวางในที่วางหลอดทดลอง

7. เทสารผสมลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมเฟอโรอินอินดิเคเดอร์ 1 – 2 หยด นำไปไตเตรทกับ 0.1 โมลาร์ เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนถึงจุดยุติเมื่อสารละลายเปลี่ยนสีจากฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง

8. ด้วยวิธีการเดียวกันให้อบน้ำกลั่น (blank) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรน้ำตัวอย่าง รวมทั้งใช้รีเอเจนท์เดียวกันและไตเตรทด้วย 0.1 โมลาร์ เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เช่นกัน

**การคำนวณ**

$$COD\ (\text{มิลลิกรัม } O_2 \text{ต่อ ลิตร}) = [(A - B) \times M \times 8{,}000] / \text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}$$

โดย A = ปริมาตรของ 0.1 โมลาร์ เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ 0.1 โมลาร์ เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการไตเตรทน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M = โมลาริตีของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

**6. ปริมาณออกซิเจนละลาย หรือดีโอ (dissolved oxygen, DO) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)**

**หลักการ**

การหาค่าออกซิเจนละลาย คือ การหาปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำ อันเป็นลักษณะสำคัญที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และแนวการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำว่าเป็นแบบใช้ออกซิเจนอิสระ (aerobic) หรือไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (anaerobic) ปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในน้ำที่มีความสัมพันธ์กับ

1. อุณหภูมิของน้ำ
2. ความกดดันของอากาศ
3. สิ่งเจือปนในน้ำ (impurities)

การหาค่าออกซิเจนละลายสามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วัดโดยใช้เครื่องดีโอมิเตอร์ (DO meter) หรือออกซิเจนมิเตอร์ (oxygen meter) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเป็น มก./ลบ.ดม. ได้โดยตรง หรือจะใช้วิธีทางเคมี เช่น วิธีเอไซด์โมดิฟิเคชันของไอโอโดเมตริก (Azide Modification of Iodometric Method) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในน้ำที่สกปรก เช่น น้ำทิ้ง น้ำในแม่น้ำลำคลอง เป็นต้น วิธีการวัดดีโอโดยใช้เครื่องขึ้นอยู่กับวิธีการเฉพาะของแต่ละบริษัท

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร
2. ขวดวัดปริมาตร
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

**รีเอเจนต์**

1. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate solution) ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรอง แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. อัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (Alkali-Iodide-Azide Reagent) – AIA ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม หรือโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ ($NaN_3$) 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น (NaOH+NaI หรือ KOH+KI)

3. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (Conc. $H_2SO_4$) ซึ่งกรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 มิลลิลิตร จะสมมูลกับ 3 มิลลิลิตร อัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์

4. น้ำแป้ง ละลายแป้ง (Soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร และเติมกรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) 0.2 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0250 โมล/ลบ.ดม. ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 6 โมล/ลบ.ดม. จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ด้วยสารไบไอโอเดต

6. สารละลายมาตรฐานไบไอโอเดต 0.0021 โมล/มิลลิลิตร ละลาย $KH(IO_3)_2$ 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7. สารละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ (potassium fluoride solution) ละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ไดไฮเดรต ($KF.2H_2O$) 40 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ใช้ต่อเมื่อตัวอย่างน้ำมีไอร์ออน Fe(III) มาก

**การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต**

ละลาย KI ประมาณ 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 – 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 โมล/ลบ.ดม. จำนวน 1 มิลลิลิตร หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. $H_2SO_4$) 2-3 หยด และสารละลายมาตรฐานไบไอโอเดต 20.00 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 200 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตไอโอดีนซึ่งถูกขับออกมาด้วยสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต ที่เตรียมไว้ เติมน้ำแป้ง เมื่อใกล้จะถึงจุดยุติ (end of titration) สังเกตจากสีของสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ถ้าสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟตมีความเข้มข้น 0.0250 โมล/ลบ.ดม. ปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรตจะเท่ากับ 20.00 มิลลิลิตร ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟตไม่ได้ค่าดังกล่าว ให้ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.0250โมล/ลบ.ดม.

**การวิเคราะห์ออกซิเจนละลายน้ำ (DO)**

การหาค่าออกซิเจนละลายจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งเก็บไว้ในขวดบีโอดี ขนาด 300 มิลลิลิตร ทำได้ดังต่อไปนี้

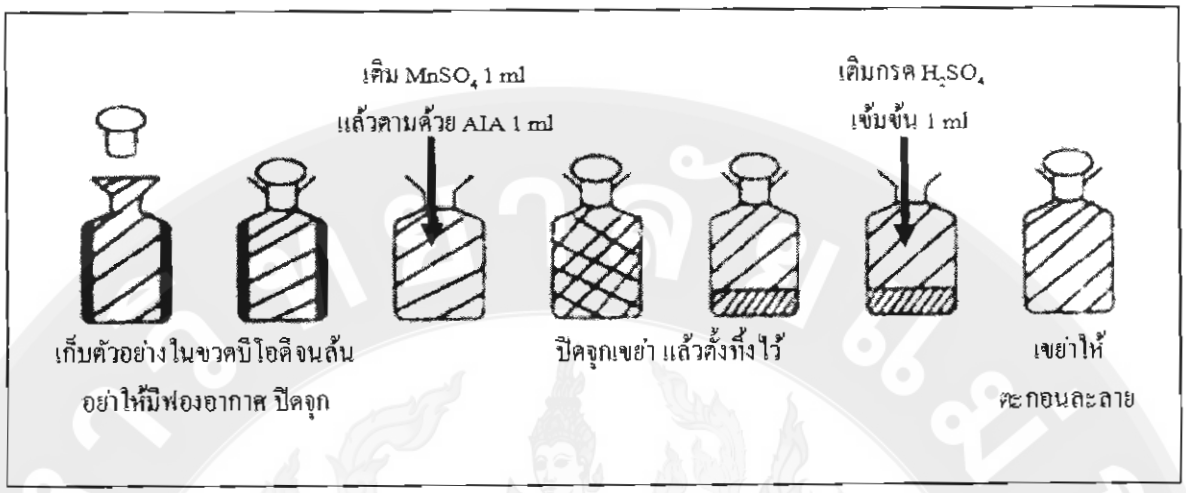
1. เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$ solution) 1 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (AIA) 1 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำแล้ว โดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของตัวอย่างน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ผสมให้เข้ากัน โดยจับขวดโดยใช้นิ้วชี้กดฝาขวดไว้ แล้วคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง

2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส 1/2 ของขวด (อย่างน้อย 15 นาที จะมีตะกอนเกิดขึ้น)

3. เมื่อตั้งทิ้งไว้จนเกิดสารละลายใสข้างบนปริมาณ 1/2 ของขวดแล้ว เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นมา แล้วให้ปลายปิเปตแตะข้างขวดและค่อยๆ ปล่อยให้กรดไหลลงไปข้างๆ คอขวด ปิดจุกและผสมให้เข้ากัน โดยจับขวดโดยใช้นิ้วชี้กดฝาขวดไว้ แล้วคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

4. เทน้ำตัวอย่างในขวดบีโอดีลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะเหลือน้ำในขวดบีโอดีปริมาตร 201 มิลลิลิตร เพื่อนำไปไทเทรต (ปริมาตรตัวอย่างน้ำนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 200 มิลลิลิตร เนื่องจากมีการสูญเสียตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดี โดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมลงไปทั้งสิ้น 2 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรตัวอย่างซึ่งใช้ในการไทเทรตจึงควรเท่ากับ {(200 x 300)/(300-2)} = 201 มิลลิลิตร)

5. นำน้ำตัวอย่างที่เหลือในขวดบีโอดี (201 มิลลิลิตร) เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด (อินดิเคเตอร์) น้ำตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.025 โมล/ลบ.ดม. จนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้




**ภาพที่ 15** Flow chart การเก็บรักษาตัวอย่าง

**การคำนวณ**

ถ้าใช้ตัวอย่างน้ำในการไทเทรต 200 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมล/ลบ.ดม. 1 มิลลิลิตร มีค่าสมมูลพอดีกับ 1 มก./ลบ.ดม. ของออกซิเจนละลาย

ออกซิเจนละลาย (DO) = ปริมาตรโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)
หน่วยเป็น มก./ลบ.ดม

**7. ปริมาณ Biochemical Oxygen Demand (BOD) โดยวิธีวิเคราะห์ตาม APHA-AWWA (2005)**

**หลักการทั่วไป**

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดี เป็นการวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงปริมาณความสกปรกของน้ำ เช่น น้ำในแม่น้ำลำคลอง น้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือน และโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการออกแบบระบบบำบัด ควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของระบบนั้นๆ โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดี โดยทั่วไปเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้หมดไปในเวลา 5 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20°C

เนื่องจากออกซิเจนในอากาศสามารถละลายน้ำได้ในจำนวนจำกัด คือ ประมาณ 9 มก./ลบ.ดม. ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20°C ดังนั้น ในน้ำเสียซึ่งมีความสกปรกมาก จำเป็นจะต้องทำให้ปริมาณความสกปรกเจือจางลงอยู่ในระดับ ซึ่งสมมูลพอดีกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ การวิเคราะห์

นี้เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในน้ำ จึงจำเป็นต้องทำให้มีสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ กล่าวคือไม่มีสารพิษ แต่มีอาหารเสริมเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกระทำโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ในตัวอย่างน้ำที่ทำการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เหล่านี้อยู่อย่างเพียงพอ ถ้าไม่มีหรือมีปริมาณน้อยไปควรเติมจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า หัวเชื้อ (Seed) ลงไป

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ขวดอินคิวเบท (incubation bottles) หรือขวดบีโอดี (BOD) ขนาด 300 มิลลิลิตร ซึ่งมีจุกเป็นจุกแก้วปิดสนิท พร้อมฝาครอบพลาสติก (BOD cap) เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศผ่านเข้าไปในขวดบีโอดีในระหว่างการเพาะเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้น้ำหล่อปากขวดไว้โดยกลับขวดบีโอดีคว่ำลงในอ่างน้ำอุ่น (water bath) หรือหล่อน้ำไว้รอบๆ ปากขวดบีโอดี และใช้ถ้วยกระดาษหรือถ้วยพลาสติกครอบปากขวดไว้เพื่อลดการระเหยของน้ำหล่อ ก่อนที่จะนำขวดบีโอดีมาใช้ จะต้องนำขวดมาล้างให้สะอาดปราศจากอินทรีย์สารต่างๆ การล้างควรล้างด้วยสารละลายของกรดโครมิก (chromic acid solution) หลังจากนั้นนำขวดมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ครั้งสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่งแล้วทำให้แห้ง

2. ตู้อินคิวเบท (incubator) ชนิดใช้อากาศหรือน้ำ ซึ่งสามารถควบคุมและปรับอุณหภูมิได้เองโดยอัตโนมัติ 20 ± 1°C และต้องเป็นตู้ซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้แสงผ่านเข้าไปได้ เพื่อป้องกันการเกิดดีโอโดยการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

3. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

5. กระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

**รีเอเจนต์**

1. น้ำกลั่น น้ำกลั่นจะต้องมีคุณภาพดีกลั่นจากเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้ว และต้องเป็นน้ำกลั่นซึ่งมีปริมาณของทองแดงน้อยกว่า 0.01 มก./ลบ.ดม. และต้องปราศจากคลอรีน คลอรามีน ความเป็นด่างเนื่องจากไฮดรอกไซด์ อินทรีย์สาร และกรด

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) 8.5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 33.4 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$)

1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าพีเอช เท่ากับ 7.2

3. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ละลายแอนไฮดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous $CaCl_2$) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ ละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6. สารละลายกรดและด่างเข้มข้น 1 โมล/ลบ.ดม.ใช้สำหรับปรับตัวอย่างน้ำที่เป็นกรดและด่างให้เป็นกลาง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

7. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate solution) ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO4.2H_2O$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรอง แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ในสภาพที่เป็นกรด)

8. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ รีเอเจนต์ (Alkali-Iodide-Azide Reagent) - AIA ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม (หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม) ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ ($NaN_3$) 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น (สารละลายนี้ไม่ควรเกิดสีกับน้ำแป้ง เมื่อทำให้เป็นกรด หรือทำให้เจือจาง)

9. กรดซัลฟูริก เข้มข้น ซึ่งกรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 มิลลิลิตร จะสมมูลกับ 3 มิลลิลิตร อัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์รีเอเจนต์

10. น้ำแป้ง ละลายแป้ง (Soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน 100 มิลลิลิตร และเติมกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) 0.2 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

11. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0250 โมล/ลบ.ดม. ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 6 โมล/ลบ.ดม. จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

12. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมล/ลบ.ดม. ละลายแอนไฮดรัสโซเดียมซัลไฟต์ ($Na_2SO_3$) 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ไม่อยู่ตัว ต้องเตรียมในวันที่จะใช้งานเท่านั้น)

**การวิเคราะห์หาค่า BOD**

**การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์ (pretreatment)**

1. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำเป็นกลาง จะต้องทำให้มีพีเอช 6.5 – 7.5 โดยใช้กรดซัลฟูริก 0.5 โมล/ลบ.ดม. หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล/ลบ.ดม.

2. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีคลอรีนตกค้าง จะต้องกำจัดออกก่อน โดยปกติคลอรีนตกค้างจะลดลงเอง เมื่อตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 1 – 2 ชั่วโมง แต่ในตัวอย่างซึ่งมีคลอรีนตกค้างปริมาณมากๆ จะต้องกำจัดโดยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ซึ่งจะทราบปริมาณว่าต้องเติมไปเท่าใด โดยนำตัวอย่างน้ำมาในปริมาณที่เหมาะสม (ระหว่าง 100 – 1,000 มิลลิลิตร) เติมกรดแอซิติก (1+1) หรือกรดซัลฟูริก (1+50) 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมล/ลบ.ดม. โดยใช้น้ำแป้งไอโอไดด์ เป็นอินดิเคเตอร์ จากนี้ก็จะทราบปริมาณของโซเดียมซัลไฟต์ที่เติมลงไปในตัวอย่าง หลังจากเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ตามปริมาณที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างแล้ว กวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 – 20 นาที

3. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีสารพาเจือปนอยู่ เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานชุบโลหะ จะต้องศึกษาหาทางแก้ไขเป็นกรณีๆ ไป

4. ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง เทลงในถังพลาสติก แล้วเติมอากาศอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้น้ำอิ่มตัวด้วยปริมาณออกซิเจน

**การวิเคราะห์มี 2 วิธี**

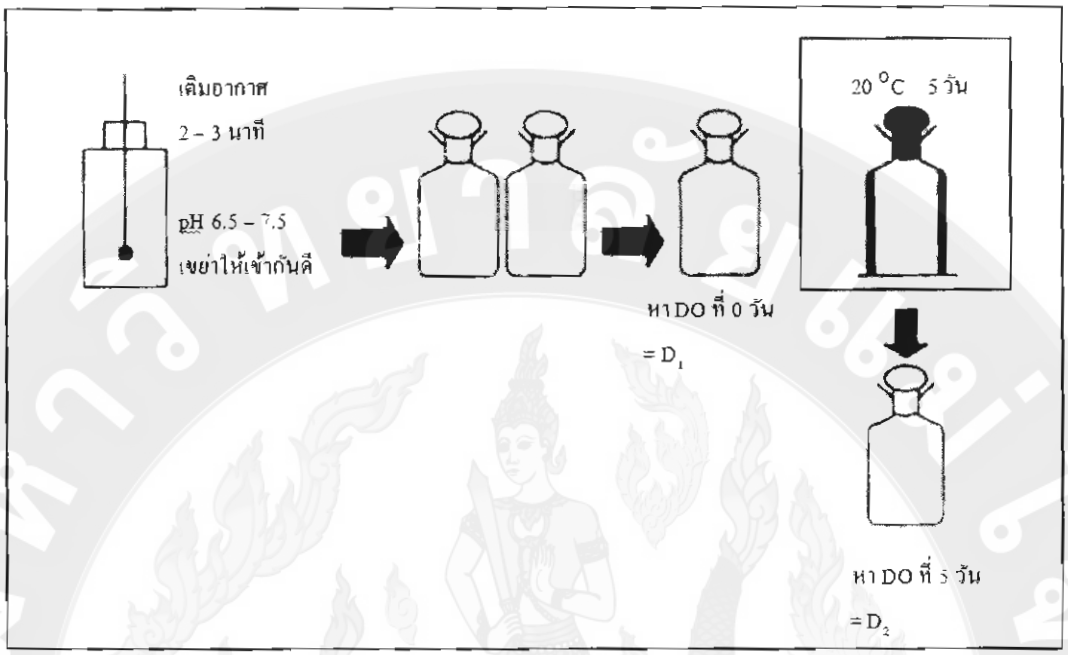
**1. วิธีตรง (Direct Method)** ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีค่าบีโอดีน้อยกว่า 7 มก./ลบ.ดม. ทำได้ดังนี้

1.1 นำตัวอย่างน้ำที่ปรับปรุงแล้ว มาปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 20°C

1.2 เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว (ใช้เวลาประมาณ 5 – 10 นาที)

1.3 รินตัวอย่างน้ำลงใส่ขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ดูให้แน่ใจว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีก 2 ขวดนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 5 วัน

1.4 หลังจาก 5 วันแล้ว นำตัวอย่างนั้นมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่




**ภาพที่ 16** Flow chart วิธีการโดยตรง (ไม่ต้องเจือจางตัวอย่าง)

**การคำนวณ**

ค่าบีโอดี (BOD) = D1 - D2 มีหน่วยเป็น มก./ลบ.ดม.

เมื่อ D1 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันแรก

D2 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันที่ 5

**2. วิธีทำให้เจือจาง** ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีความสกปรกสูง (มีค่าบีโอดีมากกว่า 7 มก./ลบ.ดม.) จำเป็นจะต้องทำให้ตัวอย่างน้ำที่สกปรกเจือจางลงโดยใช้น้ำผสมเจือจาง (dilution water) และควรทำหลายๆ ความเข้มข้น อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

2.1 การเตรียมน้ำผสมเจือจาง

1) นำน้ำกลั่นที่ปราศจากสารมีพิษ (กลั่นจากเครื่องกลั่นแก้ว) มาปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง $20 \pm 1\ ^{\circ}C$

2) ปรับคุณภาพให้เหมะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และไอร์ออน (III) คลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 1 ลบ.ดม.

3) เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว

2.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (seed)

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย จำเป็นจะต้องเลือกหัวเชื้อที่เหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิด โดยทั่วไปใช้น้ำจากส้วมหรือน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์

2.3 การผสมเจือจาง

เนื่องจากการวิเคราะห์ค่าบีโอดีอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวกลางในการย่อยสลาย สภาวะแวดล้อมจะมีผลต่อการวิเคราะห์มาก ทำให้ค่าบีโอดีที่ได้มีความผันแปรสูง การวิเคราะห์ตัวอย่างหนึ่งๆ จึงมักจะทำการผสมเจือจางหลายๆ ความเข้มข้น (โดยทั่วไปไม่น้อยกว่า 3 ความเข้มข้น) ส่วนอัตราส่วนในการผสมเจือจางอาจประมาณจากชนิดของตัวอย่าง (ดูตารางที่ 15) หรือค่าความเข้มข้นโดยประมาณ (ดูตารางที่ 16)

**ตารางที่ 17** การเจือจางและชนิดตัวอย่างน้ำ (Dilution and Type of Sample)

| Dilution | Type of sample |
|---|---|
| 0.0 – 1.0 % | Strong industrial wastes |
| 1 – 5 % | Raw & settled wastewater |
| 5 – 25 % | Biologically treated effluent |
| 25 – 100 % | Polluted river waters |

**ตารางที่ 18** บีโอดีที่วัดได้กับอัตราการเจือจางต่าง ๆ

| By direct pipetting into 300 ml bottle | |
|---|---|
| **ml** | **Range of BOD** |
| 0.02 | 30,000 – 105,000 |
| 0.05 | 12,000 – 42,000 |
| 0.10 | 6,000 – 21,000 |
| 0.20 | 3,000 – 10,500 |
| 0.50 | 1,200 – 4,200 |
| 1.0 | 600 – 2,100 |
| 2.0 | 300 – 1,050 |
| 5.0 | 100 – 420 |
| 10.0 | 60 – 210 |
| 20.0 | 30 – 105 |
| 50.0 | 12 – 42 |
| 100 | 6 – 21 |
| 300 | 0 – 7 |

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผสมเจือจาง ดังนี้

1) ค่อยๆ รินน้ำผสมเจือจาง (หัวข้อ 2.2.1) ลงในกระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ประมาณ 500 มิลลิลิตร โดยให้น้ำค่อยๆ ไหลลงตามข้างกระบอกตวง

2) เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (หัวข้อ 2.2.2) ลงในกระบอกตวง 2 มิลลิลิตร (ในกรณีที่จำเป็นต้องเติม)

3) เติมตัวอย่างน้ำตามส่วนที่คำนวณได้ จากตารางที่ 1 และ 2

4) เติมน้ำผสมเจือจางลงจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

5) กวนให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วเสียบจุกยางไว้ที่ปลาย ชักขึ้นลงเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

6) ค่อยๆ รินตัวอย่างน้ำที่ผสมเข้ากันดีแล้วนี้ลงในขวดบีโอดีที่แห้งและสะอาดจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ขวดหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนละลายวันแรก อีก 2 ขวด

นำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปอินคิวเบทให้ตรวจดูว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวด และควรตรวจดูทุกวันอย่าให้แห้ง (ถ้าแห้งให้เติมด้วยน้ำผสมเจือจาง)

2.4 การอินคิวเบท

หลังจากอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20 °C ในที่มืดครบ 5 วันแล้ว นำมาหาค่าออกซิเจนละลาย ตัวอย่างที่ใช้ได้จะต้องมีค่าออกซิเจนละลายเหลืออยู่อย่างน้อย 1 มก./ลบ.ดม. และมีการใช้ออกซิเจนไปอย่างน้อย 2 มก./ลบ.ดม.

2.5 การแก้ค่าเนื่องจากการเติมหัวเชื้อ (seed correction)

ถ้ามีการใส่หัวเชื้อ จะต้องนำหัวเชื้อมาทำให้เจือจาง แล้วนำไปอินคิวเบทเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ หลังจากนั้นนำมาหาค่าการใช้ออกซิเจนหลังจาก 5 วัน เลือกอันที่มีการใช้ออกซิเจนระหว่าง 40 – 70 % การคำนวณดูในหัวข้อสุดท้าย

2.6 การตรวจสอบคุณภาพน้ำผสมเจือจาง (dilution water check)

เติมน้ำผสมเจือจางที่ยังไม่ได้ใส่หัวเชื้อลงในขวดบีโอดี 3 ขวด ขวดหนึ่งนำไปหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีก 2 ขวด ปิดจุกนำไปอินคิวเบท หลังจากนั้นนำมาหาค่าการใช้ออกซิเจนไปหลังจากอินคิวเบท 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 °C และไม่ต้องนำไปใช้ในการคำนวณผลต่างของค่าออกซิเจนละลายก่อนและหลัง 5 วันที่อุณหภูมิ 20 °C ไม่ควรเกิน 0.2 มก./ลบ.ดม. และยิ่งดีถ้าไม่เกิน 0.1 มก./ลบ.ดม.

2.7 การตรวจสอบโดยใช้กลูโคส – กรดกลูตามิค (glucose-glutamic acid check)

เนื่องจากน้ำกลั่นที่ใช้อาจจะมีสารพิษเจือปนอยู่ โดยเฉพาะทองแดง ซึ่งจะทำให้หัวเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง มีผลทำให้ค่าบีโอดีที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ควรตรวจสอบโดยใช้สารอินทรีย์บริสุทธิ์ที่ทราบค่าบีโอดีแล้ว ซึ่งได้แก่ กลูโคสและกรดกลูตามิค กลูโคสออกซิไดซ์ได้ง่าย และอัตราการออกซิไดซ์ไม่คงที่ ใช้ได้กับหัวเชื้อทั่วๆไป เมื่อใช้ผสมกับกรดกลูตามิค ทำให้อัตราการออกซิไดซ์จะคงที่ และมีสมบัติคล้ายกับน้ำเสียชุมชน

วิธีการตรวจสอบการวิเคราะห์ ทำโดย

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคสและกรดกลูตามิค ซึ่งอบแห้งที่ 103 °C นาน 1 ชั่วโมง อย่างละ 150 มก./ลบ.ดม.

2) ดูดสารละลายที่เตรียมมา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดบีโอดี จำนวน 3 ขวด เติมน้ำผสมเจือจางที่ใส่หัวเชื้อแล้วลงไปจนเต็ม ปิดจุกให้แน่น

3) ขวดหนึ่งนำไปไทเทรตหาค่าออกวิเจนละลายวันแรก อีก 2 ขวดนำไปอินคิวเบทพร้อมกับตัวอย่างน้ำ (ดูหัวข้อ 2.2.5) ที่อุณหภูมิ 20 °C นาน 5 วัน

4) นำมาหาค่าออกวิเจนที่ใช้ไป (oxygen depletion) และค่าบีโอดีนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของหัวเชื้อที่ใส่ลงไป ดังตัวอย่างในตารางที่ 17

**ตารางที่ 19** ชนิดของแหล่งน้ำต่อค่าบีโอดี

| Type of Seed | 5-day Seed Correction (mg/l) | Mean 5-day BOD (mg/l) | Standard Deviation (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Settled fresh sewage | > 0.6 | 218 | ± 11 |
| Settled stale sewage | > 0.6 | 207 | ± 8 |
| River water (4 sources) | 0.05 – 0.22 | 224 – 242 | ± 7 – 13 |
| Activated sludge effluent | 0.07 – 0.68 | 221 | ± 13 |
| Trickling filter effluent | 0.2 – 0.4 | 225 | ± 8 |

2.8 ไอดีโอดี (Immediate Dissolved oxygen Demand, IDOD)

สารประกอบพวกไอร์ออน(II)ซัลไฟด์ (sulfide compound) และอัลดีไฮด์สามารถถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจน ถ้ามีอยู่ในตัวอย่างน้ำจะทำให้ปริมาณการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้องนำมาพิจารณาด้วย ปริมาณการใช้ออกซิเจนทั้งหมดของสารดังกล่าว สามารถหาได้โดยการคำนวณหาออกซิเจนละลายเริ่มต้น (initial dissolved oxygen) หรือโดยใช้ผลบวกของค่าออกซิเจนละลายที่ถูกใช้ไปในตัวอย่างที่ทำให้เจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาที (immediate dissolved oxygen demand) และค่าบีโอดี 5 วัน แต่ต้องทราบเสียก่อนว่าค่าไอดีโอดีอาจเกิดขึ้นในขณะที่ทำการเติมกรดลงไปเพื่อให้เกิดไอโอดีนอิสระ (free I2) ในการวิเคราะห์ออกซิเจนละลายโดยวิธีไอโอโดเมตริกก็ได้

วิธีทำ ต้องหาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่าง (S) (ส่วนมากเป็นศูนย์) และออกซิเจนละลายของน้ำผสมเจือจางก่อน แล้วจึงนำตัวอย่างนั้นมาทำให้เจือจางด้วยน้ำผสมเจือจาง (DO) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จึงทำการหาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง (DI) แล้วคำนวณหาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่ทำให้เจือจางลงนี้ จากนั้นจะสามารถหาค่าไอดีโอดี (มก./ลบ.ดม.) ของตัวอย่างได้โดยเอาค่าออกซิเจนละลายที่คำนวณได้ลบด้วยค่าออกซิเจนละลายที่หาได้หลังจากตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

2.9 การหาค่าออกซิเจนละลาย

การหาค่าออกซิเจนละลายในวันแรก และวันหลังจากอินคิวเบทแล้ว 5 วัน ใช้วิธีเดียวกับวิธีการวิเคราะห์หาออกซิเจนละลายน้ำ (DO)

**การคำนวณ**

ค่าบีโอดี เมื่อไม่ใส่หัวเชื้อ : บีโอดี (มก./ลบ.ดม.) = $\frac{(D1 - D2)}{P}$

ค่าบีโอดี เมื่อใส่หัวเชื้อ : บีโอดี (มก./ลบ.ดม.) = $\frac{(D1 - D2) - (B1 - B2)}{P}$

ค่าบีโอดี เมื่อคิดไอดีโอดี : บีโอดี (มก./ลบ.ดม.) = $\frac{(DC - D2)}{P}$

ค่าไอดีโอดี : บีโอดี (มก./ลบ.ดม.) = $\frac{(DC - D1)}{P}$

PW = decimal fraction of dilution water used

PS = decimal fraction of sample used

DO = DO of original dilution water (mg/l)

D1 = DO of diluted sample 15 minutes after preparation (mg/l)

D2 = DO of original sample after 5 days incubation at 20 °C (mg/l)

S = DO of original undiluted sample (mg/l)

DC = DO available in dilution at zero time (mg/l)

= PWDO + PS

B1 = DO of dilution of seed control before incubation (mg/l)

B2 = DO of dilution of seed control after incubation (mg/l)

f = ratio of seed in diluted sample to seed in seed control

= % seed in D1 / % seed in B1

Seed correction = (B1 – B2)f

**การควบคุมคุณภาพ**

1. ผลต่างของปริมาณ DO0 และ DO5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 2 mg/l
2. ปริมาณ DO5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 1 mg/l
3. ผลต่างของ DO0 และ DO5 สำหรับ Blank ของน้ำเจือจางต้องมีค่าไม่มากกว่า 0.2 mg/l
4. ทำการวิเคราะห์ซ้ำ
5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง QC (Glucose-glutamic acid) 198 30.5mg/l

# ภาคผนวก ค

## ข้อมูลการวิจัย

**ตารางที่ 20** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทางการค้า (Dextrose 10g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 151 | 169 | 176 | 165.33 | $1.7\times10^{5}$ | 5.23 |
| 12 | 25 | 33 | 72 | 43.33 | $4.3\times10^{6}$ | 6.63 |
| 24 | 214 | 254 | 216 | 228.00 | $2.3\times10^{7}$ | 7.36 |
| 36 | 42 | 20 | 17 | 26.33 | $2.6\times10^{7}$ | 7.41 |
| 48 | 31 | 44 | 39 | 38.00 | $3.8\times10^{7}$ | 7.58 |
| 60 | 30 | 7 | 0 | 12.33 | $1.2\times10^{7}$ | 7.08 |
| 72 | 66 | 53 | 88 | 69.00 | $6.9\times10^{8}$ | 8.84 |

**ตารางที่ 21** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (Dextrose 10g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 131 | 135 | 155 | 140.33 | $1.4\times10^{5}$ | 5.15 |
| 12 | 13 | 9 | 30 | 17.33 | $1.7\times10^{6}$ | 6.23 |
| 24 | 269 | 295 | 225 | 263.00 | $2.6\times10^{7}$ | 7.41 |
| 36 | 19 | 15 | 30 | 21.33 | $2.1\times10^{7}$ | 7.32 |
| 48 | 40 | 35 | 20 | 31.67 | $3.2\times10^{7}$ | 7.51 |
| 60 | 10 | 13 | 14 | 12.33 | $1.2\times10^{7}$ | 7.08 |
| 72 | 24 | 21 | 17 | 20.67 | $2.1\times10^{7}$ | 7.32 |

**ตารางที่ 22** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (Dextrose 10g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 143 | 171 | 174 | 162.67 | $1.6\times10^{5}$ | 5.20 |
| 12 | 76 | 152 | 164 | 130.67 | $1.3\times10^{7}$ | 7.11 |
| 24 | 249 | 111 | 125 | 161.67 | $1.6\times10^{7}$ | 7.20 |
| 36 | 16 | 20 | 13 | 16.33 | $1.6\times10^{7}$ | 7.20 |
| 48 | 38 | 19 | 31 | 29.33 | $2.9\times10^{7}$ | 7.46 |
| 60 | 22 | 32 | 0 | 18.00 | $1.8\times10^{7}$ | 7.26 |
| 72 | 46 | 25 | 43 | 38.00 | $3.8\times10^{7}$ | 7.58 |

**ตารางที่ 23** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทางการค้า (Dextrose 20g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 3 | 5 | 2 | 3.33 | $3.3\times10^{5}$ | 5.52 |
| 12 | 228 | 173 | 266 | 222.33 | $2.2\times10^{7}$ | 7.34 |
| 24 | 263 | 155 | 275 | 231.00 | $2.3\times10^{7}$ | 7.36 |
| 36 | 34 | 31 | 37 | 34.00 | $3.4\times10^{7}$ | 7.53 |
| 48 | 35 | 27 | 30 | 30.67 | $3.1\times10^{7}$ | 7.49 |
| 60 | 47 | 48 | 36 | 43.67 | $4.4\times10^{7}$ | 7.64 |
| 72 | 51 | 46 | 39 | 45.33 | $4.5\times10^{7}$ | 7.65 |

**ตารางที่ 24** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากน้ำทิ้ง (Dextrose 20g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 4 | 8 | 2 | 4.67 | $4.7\times10^{5}$ | 5.67 |
| 12 | 39 | 40 | 37 | 38.67 | $3.9\times10^{7}$ | 7.59 |
| 24 | 72 | 157 | 181 | 136.67 | $1.4\times10^{7}$ | 7.15 |
| 36 | 19 | 21 | 30 | 23.33 | $2.3\times10^{7}$ | 7.36 |
| 48 | 20 | 29 | 46 | 31.67 | $3.2\times10^{7}$ | 7.51 |
| 60 | 21 | 32 | 26 | 26.33 | $2.6\times10^{7}$ | 7.41 |
| 72 | 40 | 34 | 37 | 37.00 | $3.7\times10^{7}$ | 7.57 |

**ตารางที่ 25** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เตรียมจากหัวมันฝรั่ง (Dextrose 20g/L)

| ชั่วโมง | จำนวนโคโลนี | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | CFU/ml | log CFU/ml |
| 0 | 6 | 9 | 12 | 9.00 | $9\times10^{5}$ | 5.95 |
| 12 | 36 | 44 | 41 | 40.33 | $4.3\times10^{7}$ | 7.63 |
| 24 | 276 | 227 | 209 | 237.33 | $2.7\times10^{7}$ | 7.43 |
| 36 | 41 | 32 | 53 | 42.00 | $4.2\times10^{7}$ | 7.62 |
| 48 | 26 | 15 | 22 | 21.00 | $2.1\times10^{7}$ | 7.32 |
| 60 | 30 | 30 | 49 | 36.33 | $3.6\times10^{7}$ | 7.56 |
| 72 | 38 | 40 | 27 | 35.00 | $3.5\times10^{7}$ | 7.54 |

**ตารางที่ 26** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ชนิดต่าง ๆ

| ชนิดอาหาร | ปริมาณน้ำหนักแห้ง (g/L) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | วันที่ 1 | วันที่ 2 | วันที่ 3 | วันที่ 4 | วันที่ 5 | วันที่ 6 | วันที่ 7 |
| PDB การค้า | 0.5363 | 5.6463 | 7.5723 | 7.9573 | 7.9857 | 7.8853 | 7.5810 |
| PDB มันฝรั่ง | 0.5140 | 3.6687 | 4.9028 | 6.0763 | 6.8450 | 7.0303 | 7.2267 |
| PDB น้ำล้าง | 0.6400 | 2.2967 | 3.0270 | 4.2583 | 4.4037 | 4.9610 | 5.3650 |