รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2539. การบำบัดน้ำเสีย. นนทบุรี: สำนักพิมพ์มิตรนราการพิมพ์.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2539. แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภรณี ลิมปิสุต. 2538. การตรึงเซลล์ *CANDIDA OLEOPHILA C-73* เพื่อการผลิตกรดมะนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2537. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ. 2528. ฟลูอิดไดเซชั่น. พิมพ์ครั้งที่1. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2524. การใช้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำและเซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Alan L. Prouty. 1990. Bench-scale development and evaluation of a fungal bioreactor for color removal from bleach effluents. Appl.Microbiol.Biotechnol. 32 : 490-493.

Andrzej Paszczynski and Ronald L. Crawford. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Prog. 11 : 368-379.

APHA, AWWA, and WEF. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (18th ed.). Washington: American Public Health Assocoation.

Bickerstaff, G.F.1997. Method in biotechnology. Vol.1: Immobilization of enzyme and cell.1-11. Totowa, NJ : Human Press .

Bruke., C. 1987. Cell immobilization in calcium alginate. In Klaus Mosbach, Method in enzymology Vol.135 : Immobilized enzymes and cells Part B, 1:175-189. New York:Academic press.

Bryce, J.R.G. 1980. Sulfite pulping. In Pulping. In James.P. Casey, Pulp and paper, 291-376. 1(3rd edition.) New York : John wiley and sons.

Bumpus, J.A., Aust, S.D. 1987b. Biodegradtion of DDT (1,1,1-tetrachloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethene) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* . Appl.environ.Microbiol. 53: 2001-2008.

Capalach, N., and Prince Sharma. 1992. Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8 : 309-312.

Chang,H-m., Joyce, T W., and Kirk, T. K. 1987. United states patent No. 4,655,926.

Cheetham, P.S.J., Blunt ,K.W., and Bucke,C. 1979. Phisical studies on cell immobilation using calcium alginate gels. Biotech. And Bioeng. 21: 2155-2618.

Chibata,I. 1978. Immobilized Enzymes Tokyo : Kodansha Ltd.

Datta, A., Bettermann, A., and Kirk, T.K. 1991. Identification of a specific lignin peroxidase among ligninolytic enzyme secrete by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. Appl. Microbiology. 57(5) : 1453-1459.

Eaton, D. C. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium* : a ligninolytic fungus. Enzyme Microb. Technol. 7: 194-196.

Fahy,V., FitzGibbon,F.J., Mcmullan,G., Singh,D.R., and Marchant,R. 1997. Decolorisation of molasses spent wash by *Phanerochaete chrysosporium* . Biotechnology Letters 19: 97-99.

Fenn, P., Choi,S., and Kirk, T.K.. 1981. Ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium* : Physiology of a suppression by ammonia and l-glutamate. Arch.Microbiol . 130: 66-71.

Fraser, J.E., and Bickerstaff, G.F. 1997. Entrapment in calcium alginate. In Gordon F. Bickerstaff, Method in biotechnology Vol.1: Immobilization of enzyme and cell, 61-66. Totowa, NJ. : Human Press.

Hakulinen, R., and Mirja, S.S. 1982. Treatment of pulp and paper industry wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. Process Biochemistry March/ April:18-22.

Hammel, K.E. 1995. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. In Lily Y. Young and Carl E. Cerniglia, Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, 331-346. New york : John wiley and sons.

Huynh, V.B., Chang,H-m., Jojce, T.W., and Kirk, T.K. 1985. Dechloination of chloro-organics by a white-rot fungus. Tappi Journal 68(7) : 98-102.

Jefferies, T.W., Choi, S., and Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *P.chrysosporium*. Appl.Environ.Microbiol. 42: 290-296

John F. Kennedy and Joaquim M.S. Cabral. 1983. Immobilized living cells and their applications. In Ichiro chibata and Lemuelb.wingard, JR., Applied Biochemistry and Bioengineering, 191-233. New York : Academic press.

Joyce,T.W., Chang,H-m., Campbell,A.G., Gerrard, Jr.E.D., and Kirk,T.K. 1984. A Continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. Biotech. Advs. 2: 301-308.

Keyser, P., Kirk, T.K., and Zeikus, J.G. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* : synthesized in the absence of lignin inresponse nitrogen stavation. J.Bacteriod. 135 : 790-797.

Kirk, T.K., and Obst, J.R. 1988. Lignin determination. In Willis A.Wood and Scott T. Kellogg, Method in enzymology , 16 (part B) : 87-100.

Kurdin, J.A. 1980. Refiner mechanical and thermomechanical pulping. In Pulping. In James.P. Casey, Pulp and paper, 157-252. 1(3rd edition). New York: John wiley and sons.

Leisola, M., Ulmer,D.C., and Fiechter, A. 1984. Factors affecting lignin degradation in lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* . Arch.Microbiol. 137: 171-175.

Lewandowski,G., Armenante, P.M., and Daewon Pan. 1990. Reactor desing for hazardous waste treament using a white rot fungus. Water Research 24: 75-82.

Lorås,V.1980. Bleaching. In James.P. Casey, Pulp and paper, 633-702. 1(3rd ed.) New York : John wiley and sons.

Marteny,W.W. 1980. Semichemical pulping. In Pulping. In James.P. Casey, Pulp and paper, 252-291. 1 (3rd ed.) New York : John wiley and sons.

Mileski,G.J., Bumpus,J.A., Jurek, M.A., and Aust, S.D. 1988. Biodegradation of pentachloro phenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl.Environ.Microbiol. 54(12) : 2885-2889.

Nemerow, L..N., and Avijit, D., 1991. Industrial and hazardous waste treatment. New York: Van Nostrnd Reinhold Press.

Presnell,T.L., Joyce,T.W., and Chang, H-m. 1992. Dechlorination and detoxification of bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of biotechnology 24: 267-275.

R.Gälli. 1987. Biodegradationof dichloromethane in wastewater using a fluidized bed bioreacter. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 206-213.

Rield,I.D. 1983a. Effect of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl.Environ.Microbiol. 45: 830-837.

Rield,I.D. 1983b. Effect of nitrogen sorces on cellulose and synthetic lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl.Environ.Microbiol. 45: 838-842.

Ruckenatein,E., and Wang, X-B. 1994. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* on porous poly(styrene-divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. Biotechnol.and Bioeng. 44 : 79-86.

Ryhiner,G., Petrozzi,S., and Dunn,I.J. 1988. Operation of a three-phase biofilm fluidized sand bed reactor for aerobic wastewate treatment. Biotechnol. Bioeng. 32: 677-688.

Sammaiah Pallerla and Robert P.Chambers. 1996. New urethane prepolymer immobilized fungal bioreactor for decolorization and dechlorination of klaft bleach effluents. Tappi Journal 79(5):155-161.

Sayadi S., and Ellouz, R. 1992. Decolorization of olive mill wastewaters by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : involvement of the lignin degrading system. Appl. Microbiol. and Biotech. 37 : 813-817.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต (Synthetic Growth medium) (Chang และคณะ,1987)

มีองค์ประกอบดังนี้

1. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	(KH_2PO_4)	2.0	กรัม
2. แมกนีเซียมซัลเฟต	($MgSO_4$)	0.5	กรัม
3. แคลเซียมคลอไรด์	($CaCl_2$)	0.1	กรัม
4. แอมโมเนียมคลอไรด์	(NH_4Cl)	0.12	กรัม
5. น้ำตาลกลูโคส	(Glucose)	10.0	กรัม
6. ไทเอมีน	(Thiamine)	0.001	กรัม
7. น้ำกลั่น		1.0	ลิตร

อาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์ (Induction medium)

(Gordon A. Lewandoski และคณะ, 1990)

มีองค์ประกอบดังนี้

1. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	(KH_2PO_4)	2.0	กรัม
2. แมกนีเซียมซัลเฟต	($MgSO_4$)	0.5	กรัม
3. แคลเซียมคลอไรด์	($CaCl_2$)	0.1	กรัม
4. แอมโมเนียมคลอไรด์	(NH_4Cl)	0.012	กรัม
5. น้ำตาลกลูโคส	(Glucose)	2.0	กรัม
6. ไทเอมีน	(Thiamine)	0.001	กรัม
7. น้ำกลั่น		1.0	ลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์สี (NCASI Standard, 1971)

หลักการ

สีของน้ำมี 2 ประเภท คือ (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต,2539)

1) สีที่แท้จริง (True color) เกิดจากการละลายของสารประกอบที่มีในน้ำ

2) สีที่ปรากฏ (Apparent color) เกิดจากการสะท้อนของสิ่งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ หรือไม่ก็อาจเกิดจากการสะท้อนของท้องฟ้า การทราบสีที่แท้จริงของน้ำ อาจทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำขึ้นมาทำการกรองสิ่งที่แขวนลอยออกไป ใช้ Millipore filter หรือ ทำการเหวี่ยงแยก แล้วนำส่วนที่เป็นน้ำที่แท้จริงมาทำการเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน สีมาตรฐานจะได้จากการเจือจางในหลายๆขั้นตอนของสารละลาย Potassium chloroplatinate (K_2PtCl) และ Cobaltous chloride ($CoCl_2.H_2O$) หน่วยที่ใช้วัดคือ Platinum cobalt unit (1 unit = 1 mg Pt / L) เช่น 1 unit คือ ใสมาก , 300 units คือ สีคล้ำมาก

การเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ

ถ้ายังไม่ได้ทำการวิเคราห์สีในทันที ควรเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4^0ซ แต่มีช่วงเวลาที่ยอมให้เก็บได้นานที่สุดคือ 2 วัน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. กระดาษกรองเบอร์ 1
3. ชุดกรอง
   3.1 กรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
4. เครื่องดูดสูญญากาศ (Suction pump) พร้อมขวดดูดสูญญากาศ

วิธีวิเคราะห์

การวัดสี จะวัดในรูปความเข้มของสี ซึ่งจะวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสง

1. ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของตัวอย่างน้ำให้เท่ากับ 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

2. เมื่อปรับพีเอช เท่ากับ 7.6 แล้วจะเกิดตะกอนขาวขุ่นขึ้น กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศและขวดกรอง

3. นำส่วนที่เป็นน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร

การวัดสีโดยเปรียบเทียบกับแพลทินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum Cobalts standard)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดเนสเลอร์ (Nessler tubes)

2. สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทิเนท (Standard chloroplatinate solution) ละลายสารโพแทสเซียมคลอโรแพลทิเนท (K_2PtCl_6) 1.246 กรัม และสารโคบอลตัสคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอยู่ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มสีเท่ากับ 500 หน่วยสี จากสารละลายนี้นำมาเตรียมสารละลายที่มีความเข้มสีเท่ากับ 50 – 450 หน่วยสี โดยการเจือจาง

วิธีการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. นำสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทิเนทที่มีความเข้มสีตั้งแต่ 50 – 500 หน่วยสี ไปวัดค่าแอบซอร์แบนซ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร

2. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าแอบซอร์แบนซ์กับค่าหน่วยสี

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ปริมาณบีโอดี (BOD)

หลักการ

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดี เป็นการวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงปริมาณความสกปรกของน้ำ เพื่อประโยชน์ในการออกแบบระบบบำบัดควบคุมคุณภาพน้ำทิ้ง และประสิทธิภาพของระบบนั้นๆ โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ภายใต้สภาวะที่เหมือนกับเกิดในธรรมชาติที่สุด เพื่อให้การวิเคราะห์เป็นแบบปริมาณวิเคราะห์

การวิเคราะห์ค่าบีโอดี โดยทั่วไปเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ชนิดที่ย่อยสลายได้ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 20 ^{0}ซ เป็นเวลา 5 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เนื่องจากออกซิเจนในอากาศสามารถละลายน้ำได้ในจำนวนจำกัด คือ ประมาณ 9 มก./ล ในน้ำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 20^{0}ซ ดังนั้นในน้ำเสียที่มีความสกปรกมาก จำเป็นต้องทำให้ปริมาณความสกปรกเจือจางลงอยู่ในระดับที่สมมูลพอดีกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่

การวิเคราะห์นี้เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในน้ำ จึงจำเป็นต้องให้มีสภาพที่พอเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ กล่าวคือ ไม่มีสารพิษแต่มีอาหารเสริมสำหรับจุลินทรีย์เพียงพอ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ จะกระทำโดยจุลินทรีย์หลายชนิด จึงจำเป็นต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้อย่างเพียงพออยู่ในน้ำตัวอย่างซึ่งจะทำการวิเคราะห์ ถ้าไม่มีหรือมีปริมาณน้อยควรเติมจุลินทรีย์ซึ่งเรียกว่า " หัวเชื้อ (seed) " ลงไป

การเลือกวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์มี 2 วิธี

1. วิธีแบบโดยตรง (Direct Method) ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีค่าบีโอดีน้อยกว่า 7 มก./ล คือน้ำที่มีความสกปรกน้อย เช่น น้ำธรรมชาติจากแม่น้ำลำคลองที่สะอาด วิธีนี้ไม่ต้องเติมหัวเชื้อและไม่ต้องทำให้น้ำตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างน้ำหาค่าบีโอดีได้เลย

2. วิธีแบบเจือจาง (Dilution Method) ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีค่าบีโอดีเกิน 7 มก./ล คือ น้ำที่มีความสกปรกมาก เนื่องจากปริมาณของออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับจำนวนสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนั้น เมื่อตัวอย่างน้ำมีสารอินทรีย์จำนวนมาก จึงต้องเจือจางตัวอย่างน้ำเพื่อให้มีออกซิเจนเพียงพอที่แบคทีเรียจะใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์นั้น

วิธีเจือจางจะแบ่งออกเป็น 2 กรณี คือ

ก. ไม่ต้องมีการเติมหัวเชื้อ (no seeding)

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างน้ำเสียหรือน้ำทิ้งทั่วไป ซึ่งมีจุลินทรีย์เพียงพอ และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายทางชีวภาพ ตัวอย่างน้ำจะต้องไม่ผ่านการเติมคลอรีนหรือความร้อนมาก่อน

ข. ต้องมีการเติมหัวเชื้อ (seeding)

วิธีนี้ใช้สำหรับตัวอย่างน้ำที่ไม่มีแบคทีเรียอยู่เลย หรือมีอยู่ปริมารน้อยมาก และไม่ active จำเป็นที่จะต้องหาแบคทีเรียจากที่อื่นมาช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียชนิดนั้นๆ น้ำทิ้งที่เป็นกรดหรือด่างสูง ต้องปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนจึงใส่หัวเชื้อ น้ำทิ้งที่อุณหภูมิสูง น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน จะต้องกำจัดคลอรีนก่อน แล้งจึงเติมหัวเชื้อ บางกรณีที่น้ำเสียบางชนิดมีสารพิษ แบคทีเรียจะไม่สามารถอยู่ได้ ถ้าใส่หัวเชื้อลงไปโดยตรงจะทำให้แบคทีเรียตาย จำเป็นต้องเลี้ยงแบคทีเรียให้คุ้นเคยกับตัวอย่างน้ำที่มีสารพิษนั้นก่อน แล้วจึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป แหล่งหัวเชื้อหาได้จากน้ำโสโครกจากบ้านเรือน น้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ หรืออาจเตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

การเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ

หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำมาแล้วควรจะทำการวิเคราะห์ทันที แต่ถ้าไม่สามารถทำได้ ควรนำตัวอย่างน้ำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เมื่อจะทำการวิเคราะห์ ต้องปล่อยตัวอย่างน้ำให้มีอุณหภูมิห้องเสียก่อน จึงจะทำการวิเคราะห์ได้

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดบีโอดี (BOD bottles) หรือขวดอินคิวเบท (incubation bottles) ขนาด 300 มิลลิลิตร ซึ่งมี จุกปิดเป็นจุกแก้วปิดสนิท พร้อมฝาครอบพลาสติก (BOD CAP) เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศผ่านเข้าไปในขวดบีโอดีในระหว่างการเพาะเชื้อ สามารถทำได้โดยหล่อน้ำไว้รอบๆ ปากขวดบีโอดีแล้วใช้ฝาครอบพลาสติก (BOD CAP) ครอบปากขวดไว้ เพื่อลดการระเหยของน้ำหล่อ ก่อนที่จะนำขวดบีโอดีมาใช้ จะต้องนำขวดมาล้างให้สะอาดปราศจากอินทรียสารต่างๆ การล้างต้องล้างด้วยสารละลายของกรดโครมิก (chromic acid solution) หลังจากนั้นนำขวดมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ครั้งสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่งแล้วทำให้แห้ง

2. ตู้อินคิวเบท (incubator) ซึ่งสามารถควบคุมและปรับอุณหภูมิได้เองโดยอัตโนมัติ ที่ 20 ± 2^{0}ซ และต้องเป็นตู้ซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้แสงผ่านเข้าไปได้ เพื่อป้องกันการเกิดดีโอโดยการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

3. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บิวเรตต์ (burette) ขนาด 25 มิลลิลิตร ขวดเออร์เลนเมเยอร์ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร กระบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปิเบต (pipette)

4. เครื่องจ่ายลม แบบเดียวกับที่ใช้กับตู้เลี้ยงปลา และหัวจ่ายลม

สารเคมี

1. น้ำกลั่น

จะต้องมีคุณภาพดี กลั่นจากเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้วและต้องเป็นน้ำกลั่นซึ่งมีปริมาณทองแดงน้อยกว่า 0.001 มก./ล ปราศจากคลอรีน คลอรามีน ความเป็นด่างเนื่องจากไฮดรอกไซด์ อินทรีย์สาร และกรด อาจเตรียมได้โดยการนำมาต้มก่อน และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปต้าไอเดรต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 33.4 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.2

ข้อควรระวัง : ให้เททิ้งทันทีถ้าพบเห็นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเก็บสารละลาย (stock bottle)

3. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ละลายแอนไฮดรัสแคลเซียมคลอไรด์ (anhydrous $CaCl_2$) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลายเฟอริกคลอไรด์

ละลายเฟอริกคลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6. สารละลายกรดและด่างเข้มข้น 1 โมลาร์ ใช้สำหรับปรับตัวอย่างน้ำที่เป็นกรดและด่างให้เป็นกลางก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์

7. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมลาร์

ละลายแอนไฮดรัสโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) 1.575 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (สารลายนี้ไม่อยู่ตัว ต้องเตรียมในวันที่จะใช้เท่านั้น)

8. ไนตริฟิเคชั่น อินฮิบิเตอร์ (nitrification inhibitor) ได้แก่ 2.2% 2-คลอโร 6-ไตรคลอโรเมทธิลไพริดีน (2-chloro-6-trichloromethyl pyridine หรือ CTCMP)

9. สารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก (Glucose-glutamic acid solution) นำกลูโคสและกรดกลูตามิกซึ่งอบแห้งที่ 103 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างละ 150 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและเจือจางเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ ทุกครั้งก่อนใช้)

10. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4.2H_2O$) 400 กรัม หรือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรอง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้ง เมื่อเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ในสภาพที่เป็นกรด

11. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (alkali-iodide-azide reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม (หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม)ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นจำนวน 40 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใช้เติมในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อทำให้เป็นกรดหรือทำให้เจือจาง

12. กรดกำมะถันเข้มข้น

13. น้ำแป้ง

ละลายแป้ง (Soluble Starch) 5 กรัม ในน้ำที่ร้อน 800 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน ใช้แต่น้ำใส และเติมกรด ซาลิไซลิก (Salicylic acid) 1.25 กรัม ต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร

14. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) จำนวน 24.82 กรัม ในน้ำต้มที่เย็นแล้ว ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาโดยการเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัมต่อสารละลาย 1 ลิตร

15. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 โมลาร์

เจือจางสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล จำนวน 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาโดยการเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐานไดโครเมต

<u>การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์ (Pretreatment)</u>

1. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำไม่เป็นกลาง จะต้องทำให้มีพีเอช 6.5 - 7.5 ด้วยกรดกำมะถัน 0.5 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ และต้องระวังไม่ให้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำเปลี่ยนแปลงมากกว่า 0.5%

2. ในกรณีที่น้ำตัวอย่างมีคลอรีนตกค้างจะต้องกำจัดออกก่อน โดยปกติคลอรีนตกค้างจะลดลงเองเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง แต่ถ้าในตัวอย่างน้ำมีคลอรีนตกค้างปริมาณมาก ๆจะต้องกำจัดโดยเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ซึ่งจะทราบปริมาณที่จะต้องเติมไปเท่าใด โดยนำตัวอย่างน้ำมาในปริมาณที่เหมาะสม (ระหว่าง 100 - 1,000 มิลลิลิตร) เติมกรดแอซีติก (กรดเข้มข้น+น้ำกลั่น = 1+1 ส่วน) หรือ กรดกำมะถัน (กรดเข้มข้น+น้ำกลั่น = 1+50 ส่วน) 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.0125 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ นำปริมาณของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ใช้ไทเทรตไปคำนวณหาปริมาณโซเดียมซัลไฟต์ที่ต้องใช้เติมลิลิตรงไปในตัวอย่างน้ำที่ปรับพีเอชแล้วหลังจากเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ตามปริมาณที่คำนวณได้ลงในตัวอย่างแล้วกวนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที ข้อควรระวัง โซเดียมซัลไฟต์ที่มากเกินไปจะใช้ออกซิเจนและทำปฏิกิริยาอย่างช้าๆกับสารประกอบพวกคลอรามีนซึ่งอาจพบในตัวอย่างน้ำที่มีคลอรีน

3. ในกรณีตัวอย่างน้ำอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturated) ด้วยออกซิเจนละลาย คือ ตัวอย่างน้ำที่มีออกซิเจนละลายมากกว่า 9 มก./ล ที่ 20 ^{0}ซ ซึ่งอาจพบได้ในน้ำที่เย็นจัด หรือในน้ำที่มีการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น ให้ลดออกซิเจนละลายอยู่ในขั้นอิ่มตัว โดยเตรียมตัวอย่างให้มีอุณหภูมิ 20 ^{0}ซ และบรรจุลงในขวดแก้วเพียงบางส่วนไม่ให้เต็มแล้วเขย่าอย่างแรง หรือโดยการเป่าอากาศอัดที่กรองสะอาดแล้วผ่านลงไปทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียออกซิเจนละลายในการวิเคราะห์

4. การปรับอุณหภูมิของตัวอย่าง ทำให้อุณหภูมิของตัวอย่างคงที่ประมาณ 20$\pm$2 ^{0}ซ ก่อนทำการวิเคราะห์

5.ตัวอย่างน้ำที่มีโลหะหนักหรือสารที่เป็นพิษชนิดอื่นๆเจือปนอยู่ จะต้องศึกษาและกำจัดเสียก่อนเป็นเฉพาะกรณี

6. ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำเกิดไนตริฟิเคชั่น ต้องทำการยับยั้งโดยเติม 2-คลอโร 6-ไตรคลอโรเมทธิลไพริดีน (2-chloro-6-trichloromethyl pyridine หรือ CTCMP) 3 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างน้ำ 300 มิลลิลิตร หรือเติมในตัวอย่างน้ำเจือจางจนมีความเข้มข้น 10 มก./ล ก่อนก็ได้

วิธีวิเคราะห์ค่าบีโอดีแบบโดยตรง

1. วิธีวิเคราะห์

1.1 นำตัวอย่างน้ำมาปรับอุณหภูมิให้ได้ 20$\pm$2 ^{0}ซ

1.2 เติมอากาศผ่านหัวจ่ายลม ให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว ใช้เวลาประมาณ 10 - 15 นาที

1.3 รินตัวอย่างน้ำลงขวดบีโอดีจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ดูให้มีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่ง มาหาค่าออกซิเจนที่ละลายก่อน ถือว่าเป็นออกซิเจนละลายที่มีเริ่มต้น สมมติเป็น DO_0 อีกสองขวด นำไปอินคิวเบทอุณหภูมิ 20$\pm$2 ^{0}ซ เป็นเวลา 5 วัน

1.4 หลังจาก 5 วันแล้ว นำตัวอย่างนั้นมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่ สมมติเป็น DO_5

2. การคำนวณ

ค่าบีโอดี (มก ออกซิเจน / ลิตร) = $DO_0 - DO_5$

เมื่อ DO_0 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันแรก

DO_5 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันที่ 5 (ค่าเฉลี่ยของ 2 ขวดที่เหลือ)

วิธีวิเคราะห์แบบเจือจางที่ไม่ต้องเติมหัวเชื้อ (No seed)

1. **การเตรียมน้ำผสมเจือจาง**

น้ำเจือจาง หมายถึง น้ำสะอาดซึ่งมีออกซิเจนละลายอยู่มากหรือเกือบอิ่มตัว วิธีเตรียมทำได้โดยการพ่นอากาศเข้าไปในน้ำ น้ำสำหรับเจือจางต้องมีพีเอชที่เหมาะสม และมีสารที่จำเป็นแก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย วิธีเตรียมมีดังนี้

1.1 นำน้ำกลั่นที่ปราศจากสารมีพิษซึ่งกลั่นจากเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้วมาปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง $20\pm2^{\circ}$ซ

1.2 ปรับคุณภาพน้ำให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, แมกนีเซียมซัลเฟต, แคลเซียมคลอไรด์ และ เฟอริกคลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

1.3 เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว

2. **การตรวจสอบคุณภาพน้ำผสมเจือจาง** (dilution water check)

เติมน้ำผสมเจือจางที่ยังไม่ได้ใส่หัวเชื้อลงในขวดบีโอดี 3 ขวด ขวดหนึ่ง นำไปหาค่าออกซิเจนละลายทันที อีก 2 ขวดปิดจุกแล้วนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20°ซ หลังจากนี้นำมาหาค่าการใช้ออกซิเจนไป หลังจากอินคิวเบท 5 วัน และไม่ต้อง นำไปใช้ในการคำนวณ ผลต่างของค่าออกซิเจนละลายก่อนและหลัง5 วัน ที่ 20°ซ ไม่ควรเกิน 0.2 มก./ล และถ้าจะยิ่งดีถ้าไม่เกิน 0.1 มก/ล

3. **วิธีวิเคราะห์**

3.1 การเลือกปริมาณตัวอย่างที่จะใช้ ถ้าไม่ทราบค่าบีโอดีโดยประมาณของตัวอย่างน้ำต้องหาค่าซีโอดีก่อน พร้อมกับพิจารณาลักษณะของตัวอย่างน้ำ แล้วเก็บตัวอย่างน้ำร่วมด้วย เพื่อกะประมาณค่าบีโอดี เช่น น้ำตัวอย่างที่มีค่าของแข็งละลายมาก ควรจะมีค่าบีโอดี ร้อยละ 60-70 ของซีโอดี หรือเมื่อทราบว่าเป็นน้ำเสียชุมชนก็ควรมีค่าบีโอดีระหว่าง 100-300 มก./ล การเลือกปริมาณตัวอย่างน้ำนิยมเลือให้มีปริมาณออกซิเจนเหลืออยู่อย่างน้อย 1 มก./ล และควรมีการใช้ออกซิเจนอย่างน้อย 2 มก./ล เมื่อทราบค่าบีโอดีโดยประมาณ ควรเลือกปริมาณตัวอย่างที่คาดว่าจะให้ค่าบีโอดีอยู่ในช่วงที่กำหนด แล้วจึงเลือกปริมาณตัวอย่างที่ใช้ให้สูงและต่ำกว่าที่อยู่ติดกันตามตาราง ค-1 เช่น ประมาณค่าบีโอดีไว้ประมาณ 100 มก./ล จะเลือกใช้ปริมาณตัวอย่าง 10.0 มิลลิลิตร เลือกสูงขึ้นเป็น 20.0 มิลลิลิตร และต่ำลงเป็น 5.0 มิลลิลิตร

ตาราง ค-1 การเลือกขนาดตัวอย่างและอัตราเจือจางสำหรับช่วงบีโอดีต่าง ๆ

ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ช่วงบีโอดี (มก./ล)	อัตราเจือจาง
0.02	30,000-105,000	15,000
0.05	12,000-42,000	6,000
0.10	6,000-21,000	3,000
0.20	3,000-10,500	1,500
0.50	1,200-4,200	600
1.0	600-2,100	300
2.0	300-1,050	150
5.0	120-420	60
10.0	60-210	30
20.0	30-105	15
50.0	12-42	6
100.0	6-21	3
300.0	0-7	1

3.2 เมื่อเลือกปริมาณตัวอย่างได้แล้ว ปิเปตตัวอย่างตามจำนวนที่เลือกไว้ลงในขวดบีโอดี ขนาด 300 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ขวด เติมน้ำสำหรับเจือจางจนเต็มขวดบีโอดี ต้องระมัดระวังพยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปิดฝาให้แน่น นำขวดบีโอดีขวดหนึ่งของแต่ละปริมาตรที่เลือก มาหาค่าออกซิเจนละลายที่มีเริ่มต้น สมมติเป็น DO_0 ส่วนอีก 2 ขวดนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 20^0ซ เป็นเวลา 5 วัน

3.3 เมื่อครบ 5 วัน นำขวดบีโอดีที่บ่มไว้มาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่ สมมติเป็น DO_5

4. การคำนวณ

ค่าบีโอดี (มก. ออกซิเจน / ลิตร) = (DO_0 - DO_5) x อัตราส่วนเจือจาง

เมื่อ DO_0 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันแรก

DO_5 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไทเทรตได้ในวันที่ 5 (ค่าเฉลี่ยของ 2 ขวด)

$$\text{อัตราเจือจาง} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำเต็มขวดบีโอดี 300 มิลลิลิตร}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}}$$

วิธีวิเคราะห์แบบเจือจางที่ต้องเติมหัวเชื้อ (Seeding)

1.วิธีวิเคราะห์

1.1 การเลือกปริมาณตัวอย่าง และวิธีทำเหมือนกับกรณีไม่ต้องเติมหัวเชื้อ เพียงแต่เติมหัวเชื้อปริมาณเท่ากันลงในแต่ละชุด ปริมาตรของหัวเชื้อที่จะใช้ควรมีค่าบีโอดีประมาณ 0.6-1.0 มก./ล เนื่องจากการเติมหัวเชื้อเช่นนี้จะทำให้ปริมาณการใช้ออกซิเจนละลายเพิ่มขึ้น จึงต้องทำการแก้ค่าบีโอดีที่ผิดพลาดเนื่องจากการเติมหัวเชื้อ (Seed correction) ทุกครั้ง เพื่อนำมาคำนวณหาค่าบีโอดีที่แท้จริงของตัวอย่าง

1.2 การแก้ค่าเนื่องจากการเติมหัวเชื้อ กระทำโดยการนำหัวเชื้อมาหาค่าการใช้ออกซิเจน หรือค่าบีโอดี เริ่มด้วยการหาค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้น (B 1) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20^0ซ เป็นเวลา 5 วัน จึงนำมาหาค่าออกซิเจนละลาย (B 2)

2. การคำนวณ

$$\text{ค่าบีโอดี (มก. ออกซิเจน / ลิตร)} = [\,(D1 - D2) - (B1 - B2)\,f\,] \times \text{อัตราเจือจาง}$$

เมื่อ D1 = ค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้นของตัวอย่างที่มีการเติมหัวเชื้อ

D2 = ค่าออกซิเจนละลายที่เวลา 5 วัน ของตัวอย่างที่มีการเติมหัวเชื้อ

B1 = ค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้นของหัวเชื้อ

B 2 = ค่าออกซิเจนละลายที่เวลา 5 วันของหัวเชื้อ

$$f = \frac{\text{ปริมาตรของหัวเชื้อที่เติมลงในขวดบีโอดีตัวอย่าง}}{\text{ปริมาตรของหัวเชื้อที่ใช้ในการทำ Seed correction}}$$

$$\text{อัตราเจือจาง} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำเต็มขวดบีโอดี 300 มิลลิลิตร}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}}$$

ข้อเสนอแนะในการหาค่าบีโอดี

1. เนื่องจากน้ำกลั่นที่ใช้อาจจะมีสารเป็นพิษเจือปนอยู่ โดยเฉพาะทองแดงซึ่งจะทำให้หัวเชื้อประสิทธิภาพลดลง มีผลทำให้ค่าบีโอดีที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ดังนั้นน้ำกลั่นที่ใช้จะต้องมีปริมาณทองแดงน้อยกว่า 0.001 มก./ล

2. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (seed) เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายจำเป็นต้องเลือกหัวเชื้อที่เหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิด โดยทั่วไปใช้น้ำจากน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์

3. การผสมเจือจาง เนื่องจากการวิเคราะห์ค่าบีโอดีอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวกลางในการย่อยสลาย สภาวะแวดล้อมจะมีผลต่อการวิเคราะห์มาก ทำให้ค่าบีโอดีที่ได้มีความผันแปรสูง การวิเคราะห์ตัวอย่างหนึ่งๆ จึงมักจะทำการผสมเจือจางหลายๆ ความเข้มข้น (โดยทั่วไปไม่น้อยกว่า 3 ความเข้มข้น) ส่วนอัตราส่วนการในการผสมเจือจางอาจประมาณจากชนิดตัวอย่าง ตามตาราง ค –2 ที่แสดงการเจือจางและชนิดตัวอย่างน้ำ

ตาราง ค-2 การเจือจางและชนิดตัวอย่างน้ำ

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

4. น้ำสำหรับเจือจาง ควรเตรียมในวันที่จะวิเคราะห์ และต้องแน่ใจว่าน้ำเจือจางอิ่มตัวด้วยออกซิเจน ภาชนะที่ใส่น้ำเจือจางเมื่อใช้เสร็จแล้ว ควรเททิ้ง และล้างให้สะอาดเพื่อป้องกันการเจริญเจริญเติบโตของสาหร่าย

วิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen ,DO)

หลักการ

การหาค่าออกซิเจนละลาย คือการหาปริมาณออกซิเจน ซึ่งละลายในน้ำอันเป็นลักษณะสำคัญที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำและแนวทางการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำว่าเป็นแบบใด ใช้ออกซิเจนอิสระหรือไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ การหาค่าออกซิจนละลาย สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี

1. วัดโดยใช้เครื่อง DO meter (oxygen meter) เป็นเครื่องมือที่สามารถวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเป็น มก / ลิตร ได้โดยตรง

2. วิธีทางเคมี โดยวิธี Azide Modification of Iodometric Method ซึ่งเหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในน้ำที่สกปรก เช่น น้ำทิ้ง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดบีโอดี (BOD bottle) ขนาด 300 มิลลิลิตร
2. ขวดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 200 มิลลิลิตร
3. บิวเรตต์ (Burette)
4. ขวดเออร์เลนเมเยอร์ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต

ละลาย แมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) 480 กรัม หรือ แมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4.2H_2O$) 400 กรัมหรือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$) 364 กรัมในน้ำกลั่น กรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร

2. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (alkali-iodide-azide reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม (หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม) ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ซึ่ง

ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 40 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใช้เติมลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อทำให้เป็นกรดหรือทำให้เจือจาง

3. กรดกำมะถันเข้มข้น

4. น้ำแป้ง

ละลายแป้ง (Soluble Starch) 5 กรัม ในน้ำที่ร้อน 800 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน ใช้แต่น้ำใส และเติมกรด ซาลิไซลิก (Salicylic acid) 1.25 กรัม ต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร การเตรียมน้ำแป้งให้ต้มน้ำบน Hot plate ให้เดือดก่อน จึงเทแป้งที่ชั่งไว้ลงไป และคอยกวนตลอดเวลาจนน้ำแป้งใส หลังจากนั้นก็เติมกรดซาลิไซลิก เพื่อกันบูด

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตาไฮเดรต ($Na_2S_2O_3$.$5H_2O$) 6.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ให้ใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ลงไปด้วยเพื่อให้ใช้ได้นานขึ้น

6. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไบไอโอเดต 0.025 นอร์มัล

ละลายโปแตสเซียมไบโอโอเดต ($KH(IO_3)_2$) 0.8124 กรัม ที่อบแห้ง ที่ 105^0 ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนใช้ และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7. สารละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ (Potassium fluoride solution)

ละลายโพแทสเซียมฟลูออไรด์ไดไฮเดรต ($KF.2H_2O$) 40 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : สารละลายนี้ใช้เมื่อน้ำตัวอย่างมีไอออน Fe(III) มากกว่า 1 มก./ล สามารถกำจัดการขัดขวางปฏิกิริยาจากไอออน Fe(III) ได้ถึงความเข้มข้น 200 มก./ล

<u>การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต</u>

1. ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ประมาณ 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 - 150 มิลลิลิตร ในขวดเออร์เลนเมเยอร์

2. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น จำนวน 2-3 หยด

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไบโอโอเดต 20 มิลลิลิตร

4. เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

5. ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ 3 หยดเมื่อถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี

6. คำนวณหาความเข้มข้นและปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.025 นอร์มัล

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1.0 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดบีโอดีที่ใส่น้ำตัวอย่าง โดยให้ปลายปิเปตอยู่เหนือผิวน้ำตัวอย่างเล็กน้อย

หมายเหตุ : ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ โดยค่อย ๆ เอียงจุกลงไปผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง

2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้น้ำใสประมาณ 1/2 ขวด

3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1.0 มิลลิลิตร โดยต้องปิดจุกก่อนตะกอน (Oxidize floc) จะล้นปากขวด เขย่าให้เข้ากันจนตะกอนในขวดหายหมดไป

4. ถ้าใช้ขวดบีโอดี ขนาด 300 มิลลิลิตร จะใช้ตัวอย่างน้ำจากขวดในข้อ 3 เท่ากับ 201 มิลลิลิตร เพื่อนำไปไทเตรต ปริมาตรตัวอย่างนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 200 มิลลิลิตร เนื่องจากมีการสูญเสียตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดี โดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมิลลิลิตรงไปทั้งสิ้น 2 มิลลิลิตร ดังนั้น ปริมาตรตัวอย่าง ซึ่งใช้ในการไทเตรต จึงควรเท่ากับ

$$200\times300 = \frac{201 \text{ มิลลิลิตร}}{(300-2)}$$

5. ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มัล จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม ไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต ตัวอย่างน้ำ 201 มิลลิลิตร

การคำนวณ

สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 1.0 มิลลิลิตร = ออกซิเจนที่ละลาย 1.0 มก./ล

ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี (COD) แบบ Closed reflux

หลักการ

COD (Chemical oxygen demand) เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นสารอินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเสีย โดยการใช้สารเคมีซึ่งมีอำนาจในการออกซิไดซ์สูงในสารละลายที่เป็นกรดออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำเสีย โดยจะคำนวนปริมาณความเข้มข้นสารอินทรีย์ในรูปของออกซิเจนที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่ถูกออกซิไดซ์อาจเป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (Biodegradable) และที่ย่อยสลายไม่ได้โดยจุลินทรีย์ (Non-biodegradable)

ค่าซีโอดีสูง หมายความว่า ในน้ำนั้นมีความสกปรกสูง มีปริมาณสารอินทรีย์มากทำให้ต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์มาก

การหาค่าซีโอดีโดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (Closed reflux) จะทำให้สารอินทรีย์ที่ระเหยสามารถถูกออกซิไดซ์ได้มากกว่าระบบเปิด เพราะมีเวลาในการสัมผัสกับสารออกซิไดซ์ได้นานกว่า ก่อนทำการวิเคราะห์ควรตรวจดูฝาปิดหลอดแก้วว่ามีรอยแตกตรงรอยต่อของ TFE liner หรือไม่ การเลือกขนาดของหลอดแก้วที่ใช้ขึ้นกับความไว (Sensitivity) ที่ต้องการ สำหรับตัวอย่างน้ำที่มีค่าซีโอดีสูง ควรเลือกใช้หลอดแก้วขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร เพราะจะได้ใช้ปริมาตรของน้ำตัวอย่างที่น้อย

ข้อจำกัดและสิ่งรบกวนของการวิเคราะห์คือ สารประกอบพวก Volatile straight-chain aliphatic จะถูกออกซิไดซ์เพียงบางส่วนเท่านั้น เนื่องจากสารระเหยเหล่านี้อยู่ในสภาพที่เป็นไอระเหย ทำให้ไม่สัมผัสโดยตรงกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์ได้ดีขึ้น ถ้ามีซิลเวอร์ซัลเฟตร่วมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ด้วยอย่างไรก็ดี ซิลเวอร์ซัลเฟตเมื่อทำปฏิกิริยากับคลอไรด์ โบรไมด์ และไอโอไดด์ เกิดตะกอนซึ่งจะถูกออกซิไดซ์เป็นบางส่วน แต่สามารถแก้ไขถึงแม้จะไม่สมบูรณ์ได้โดยการผสมเมอคิวริกซัลเฟตก่อนทำการรีฟลักซ์ แม้ว่าเมอคิวริกซัลเฟต 1 กรัม ถูกกำหนดให้ใช้กับตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร สามารถใช้ให้น้อยลงได้ ถ้าปริมาณตัวอย่างคลอไรด์มีปริมาณต่ำกว่า 2000 มก./ล และ หรืออัตราส่วนยังคงเป็น 10:1 ของ $HgC1_4$:C1 ถูกคงรักษาไว้ได้

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย (digestion vessels) ใช้หลอดทดลองที่เป็นบอโรซิลิเคต(Borosilicate) ซึ่งมีขนาด 16×100 มิลลิเมตร หรือ 20×150 มิลลิเมตร หรือ 25×150 มิลลิเมตร พร้อมทั้งฝาสลักเกลียวทีบุด้วย TFE

2. เครื่องให้ความร้อนหรือเตาอบ (block heater or oven) ให้ความร้อนอยู่ในช่วงระหว่าง $150 \pm 2\ ^{0}$ซ.

3. ฮีตติงบล็อค (Heating block) เป็นอะลูมิเนียมหล่อ (Cast-aluminium) มีช่องหลายๆ ช่องซึ่งมีความลึก 45-50 มิลลิเมตร เป็นช่องที่จะให้หลอดทดลองตั้งอยู่ได้พอดี

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 0.0167 โมลาร์

ชั่งสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard) โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 4.913 กรัม ซึ่งอบให้แห้งในเตาอบอุณหภูมิ 103 ^{0}ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง ใส่ไปในน้ำกลั่นประมาณ 500 มล ค่อย ๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 98% ประมาณ 167 มล แล้วเติมเมอร์คิวริคซัลเฟต ($HgSO_4$) 33.33 กรัมคนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. กรดกำมะถันรีเอเจนต์ ($HgSO_4 - AgSO_4$)

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22.0 กรัม ลงในกรดกำมะถันเข้มข้น 98% ซึ่งมีน้ำหนัก 4.0 กิโลกรัม (ในการละลายค่อยๆเติมซิลเวอร์ซัลเฟต ลงไปในสารละลายกรดทีละน้อยจนกว่าจะละลายหมดต้องใช้เวลาในการละลาย 1-2 วัน)

3. สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ (ferroin indicator solution)

ละลายไอร์ออน (II) ซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต ($FeSo_4 7H_2O$) 0.695 กรัม และ 1.10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต [1.10 phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2H_2O$)] 1.485 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต [$Fe(NH_4)_2 6H_2O$] 39.2 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายทุกครั้งที่นำมาใช้เติมสารเคมีตามตาราง ง-1

ในภาชนะย่อยสลายแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วไทเทรตด้วยเอฟเอเอสใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 0.05-0.1 มิลลิลิตร ทำประมาณ 1-2 หลอด ไทเทรตจนถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)

$$\text{โมลาริตีของเอฟเอเอส} = \frac{\text{ปริมาตรของ } 0.0167M\ K_2Cr_2O_7 \text{ที่ใช้} \times 0.0167}{\text{ปริมาตรของเอฟเอเอสที่ใช้ไตเทรต}}$$

5. กรดซัลฟามิกชนิดเออาร์ (sulfamic acid, analytical grade)

สารในข้อนี้ใช้ในการกำจัดไนไตรท์ (nitrite) เนื่องจากไนไทรต์-ไนโตรเจน (nitritenitrogen) จะมีค่าซีโอดี 1.1 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิกรัม ของไนไตรท์-ไนโตรเจน ดังนั้นจึงควรเติมกรดซัลฟามิกจำนวน 10 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิกรัม ของไนไทรต์-ไนโตรเจน ที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำ ซึ่งอาจเติมกรดซัลฟามิกจำนวน 0.12 กรัม ลงในสารละลายไดโครเมต จำนวน 1,000 มิลลิลิตร จะสามารถกำจัดไนไทรต์ที่มีอยู่ในตัวอย่างจำนวน 20.0 มก./ล ในกรณีที่มีความเข้มข้นของ ไนไทรต์ไนโตรเจนมากกว่า 6.0 มก./ล จะต้องทำให้ตัวอย่างนั้นเจือจางก่อน การที่เราเติมกรดซัลฟามิกลงในสารละลายมาตรฐานไดโครเมตนี้เป็นการสะดวกและจะไม่ทำให้ค่าซีโอดีผิดไป เนื่องจากต้องทำแบลงค์จากน้ำกลั่นอยู่แล้ว

6. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท ($HOOCC_6H_4COOK$) ซึ่งอบที่ 120 ^{0}ซ จนมีน้ำหนักคงที่จำนวน 0.425 กรัม ในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตารางที่ ง-1 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่าง ๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย

ขนาดของภาชนะย่อยสลาย	ตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)	สารละลายในการย่อยสลาย	กรดกำมะถันรีเอเจนต์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
16 × 100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20 × 150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25 × 150 มม.	10.0	6.0	14.0	30.0

จาก Standard Methods for the Examination of Water and Waste water 18th Edition, 1992

วิธีการวิเคราะห์

1. ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจุกด้วยกรดกำมะถันร้อยละ 20 ก่อนนำไปใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์

2. เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม ตามตาราง ง-1

3. นำตัวอย่างน้ำมาใส่หลอดย่อยสลายเติมน้ำยาย่อยสลายซึ่งได้แก่สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต

4. ค่อย ๆ เทกรดกำมะถันรีเอเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นตัวอย่างน้ำและน้ำยาย่อยสลาย ปิดฝาให้แน่น แล้วแกว่งไปมาหลายครั้งเพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง

5. ทำแบลงค์ (Blank) พร้อมกับตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นจำนวนเท่ากับตัวอย่างน้ำ ดังตาราง ข -1 เติมรีเอเจนต์ต่าง ๆ ที่ใช้ และทำการรีฟลักซ์ เช่นเดียวกับตัวอย่างทุกประการ

6. นำหลอดทดลองเหล่านี้ไปใส่ในเตาอบ ซึ่งได้ทำให้ร้อนถึงอุณหภูมิ 150 ^{0}ซ ใช้เวลารีฟลักซ์ 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยนำหลอดทดลองมาวางไว้ในที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)

7. เปิดฝาจุก แล้วจึงใส่แท่งแม่เหล็กที่หุ้มด้วยทีเอฟอี (TFE covered Magnetic bar) ถ้าใช้แอมพูลให้เทของผสมลงไปในภาชนะที่ใหญ่กว่าเพื่อนำไปไทเทรต เติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ประมาณ 0.05-0.1 มิลลิลิตร (1 หรือ 2 หยด) คนอย่างเร็วในขณะที่ไทเทรตด้วย 0.1 โมลาร์ เอฟเอเอส จุดยุติจะเปลี่ยนอย่างรวดเร็วจากฟ้าอมเขียวเป็นน้ำตาลแดง ถึงแม้บางครั้งสีฟ้าอมเขียวอาจจะกลับมาปรากฏอีกในหลายนาทีถัดมา และในลักษณะเดียวกันให้ทำรีฟลักซ์และไทเทรตแบลงค์ที่มีรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างน้ำด้วย

การคำนวณ

$$\text{ค่าซีโอดี (มก./ล)} = \frac{(A-B)M \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตร ของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้ไทเทรตสำหรับแบลงค์

B = มิลลิลิตร ของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้ไทเทรตสำหรับตัวอย่างน้ำ

M = โมลาร์ของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (เอฟเอเอส)

ข้อเสนอแนะและข้อควรระวัง

1. ในขณะที่ผสมในภาชนะให้ใส่หน้ากากป้องกัน (face shield) และให้ใส่ถุงมือเพื่อกันความร้อนด้วย

2. ต้องผสมของผสมให้เข้ากันให้ดีก่อนนำไปรีฟลักซ์ เพื่อกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่เฉพาะที่ก้นหลอด เพราะอาจทำให้ระเบิดได้

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างมาตรฐาน เพื่อที่จะตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์และคุณภาพของรีเจนต์ที่ใช้ โดยตรวจสอบกับสารละลายกลูโคสหรือโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (potassium hydrogen phthalate) ซึ่งในทางทฤษฎีเมื่อละลายกลูโคสจำนวน 468.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร จะให้ค่าซีโอดี 500 มก./ล (กลูโคส 1 กรัม มีค่าซีโอดี 1.067 กรัม) ส่วนโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทซึ่งอบที่ 120 ^{0}ซ จนมีน้ำหนักคงที่จำนวน 0.425 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร จะให้ค่าซีโอดี 500 มก./ล (โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท 1 กรัม มีค่าซีโอดี 1.176 กรัม)

4. การเลือกปริมาณตัวอย่าง ควรเลือกให้เหมาะสมเพื่อให้มีโพแทสเซียมไดโครเมตมากเกินพอสำหรับออกซิไดซ์สารอินทรีย์ การเลือกปริมาณตัวอย่างควรพิจารณาจากลักษณะน้ำ ที่มาของตัวอย่างน้ำ ประกอบกับการสังเกตสีของสารละลายก่อนนำไปรีฟลักซ์ ถ้าเป็นสีเขียว ให้ทำใหม่โดยลดปริมาณตัวอย่างน้ำลง แต่ถ้าสีของสารละลายเป็นสีเหลืองเข้มมาก ควรจะเพิ่มปริมาณตัวอย่างน้ำขึ้น (สีที่เหมาะสมควรเป็นสีเหลืองอมเขียวอ่อนๆ) จะได้ไม่เสียเวลาในการรีฟลักซ์ และเริ่มทำใหม่อีกครั้ง

5. ต้องทำแบลงค์พร้อมกับตัวอย่างทุกครั้ง เพื่อให้อยู่ในสภาวะเดียวกันทุกครั้ง ผลวิเคราะห์จะได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

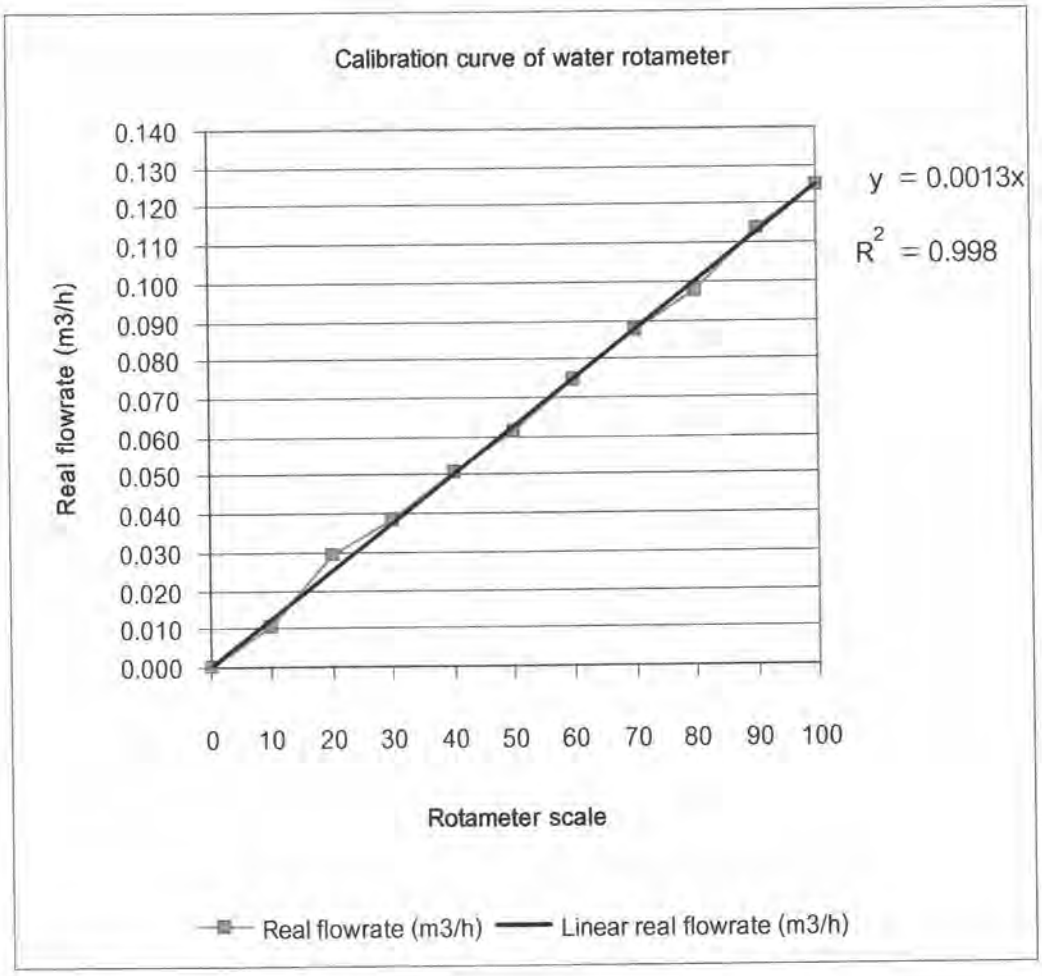
ภาคผนวก จ

การเทียบมาตรฐาน (Calibration)

1. การเทียบมาตรฐานของมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการไหลของน้ำเสีย

ตาราง จ-1 ข้อมูลการเทียบมาตรฐานของมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการไหลของน้ำเสีย

มาตราส่วนของ Rotameter	อัตราการไหลของน้ำที่วัดได้ (m^3 / h)	อัตราการไหลจริง (m^3 / h)
0	0.0000	0.000
10	0.0108	0.012
20	0.0294	0.024
30	0.0387	0.036
40	0.0510	0.048
50	0.0612	0.060
60	0.0750	0.072
70	0.0876	0.084
80	0.0978	0.096
90	0.1140	0.108
100	0.1248	0.120



รูป จ-1 กราฟมาตรฐานของการเทียบมาตรฐานมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการไหลของน้ำเสีย

จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณอัตราการไหลของน้ำเสียได้ดังสูตร

อัตราการไหลของน้ำเสีย (ลบ.ม./ชั่วโมง) = 0.0013 x มาตราส่วนของ Rotameter

2. การเทียบมาตรฐานของมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการเติมอากาศ

อุปกรณ์

Wet Type Laboratory Gas flow meters

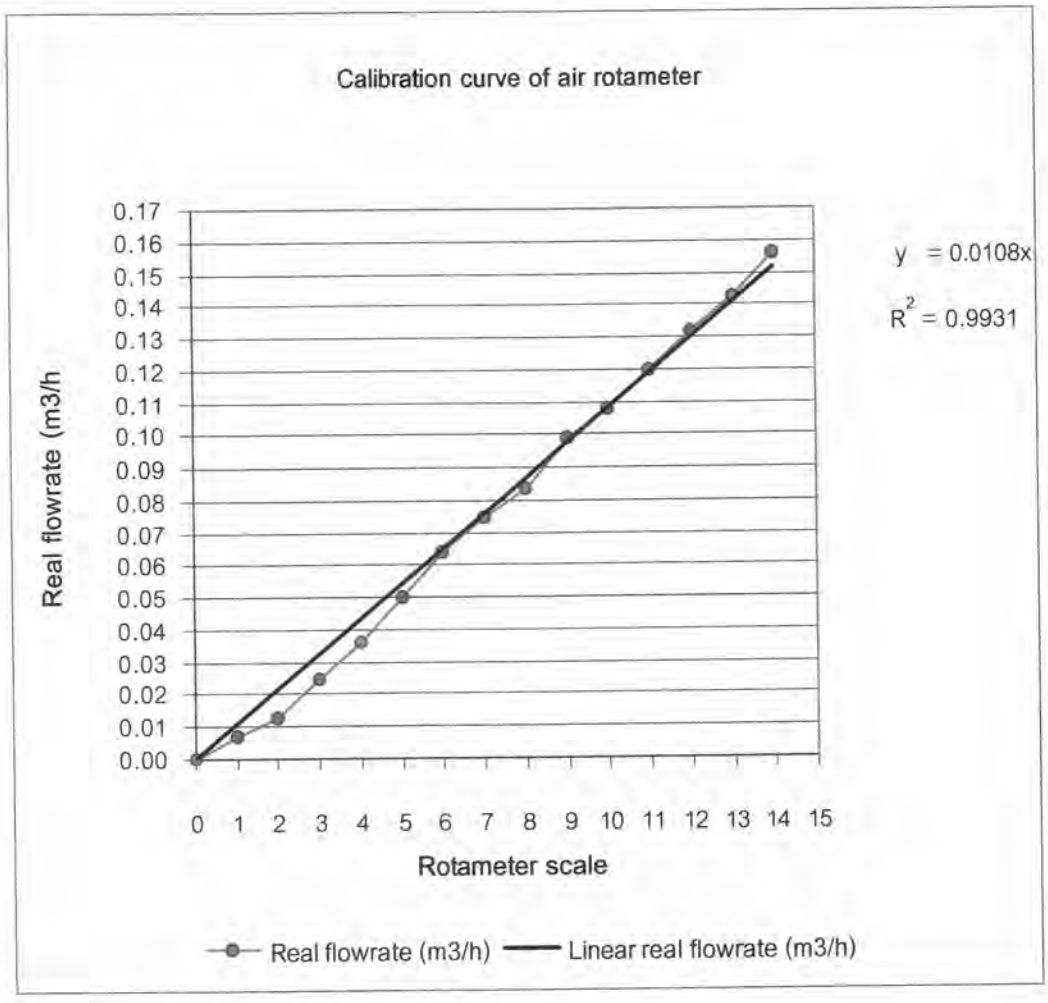
Model-Serial No : DM3B – 047240/1

Filling medium : Water

Temperature : 30^{0}ซ

ตาราง จ-2 ข้อมูลการเทียบมาตรฐานของมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการเติมอากาศ

มาตราส่วนของ Rotameter	อัตราการเติมอากาศที่วัดได้ (m^3 / h)	อัตราการเติมอากาศจริง (m^3 / h)
0	0.000	0.000
1	0.007	0.011
2	0.013	0.022
3	0.025	0.032
4	0.036	0.043
5	0.050	0.054
6	0.064	0.065
7	0.075	0.076
8	0.084	0.086
9	0.099	0.097
10	0.108	0.108
11	0.012	0.119
12	0.132	0.130
13	0.143	0.140
14	0.156	0.151



รูป จ-2 กราฟมาตรฐานของการเทียบมาตรฐานมาตรอัตราการไหลแบบลูกลอย (Rotameter) สำหรับวัดอัตราการเติมอากาศ

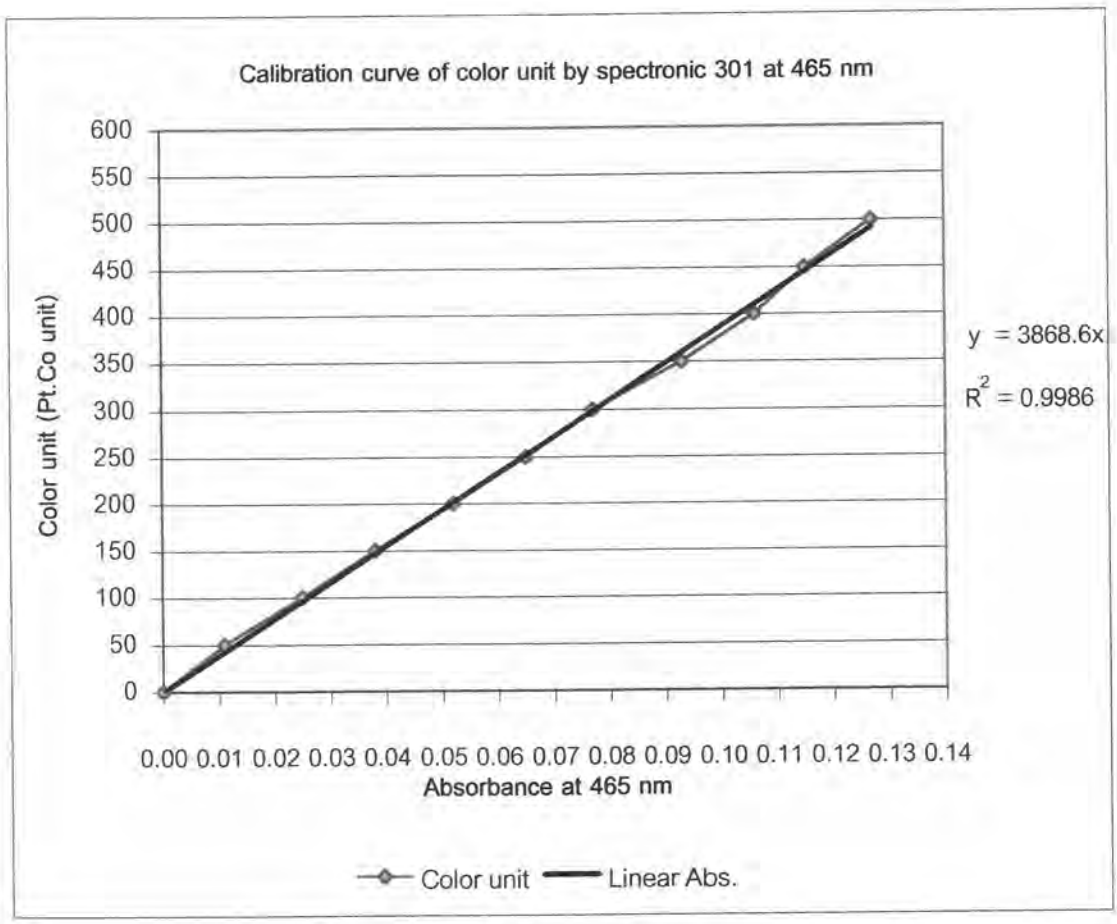
จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณอัตราการเติมอากาศได้ดังสูตร

อัตราการเติมอากาศ (ลบ.ม./ชั่วโมง) = 0.0108 x มาตราส่วนของ Rotameter

3. การเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณค่าหน่วยสี (Color unit , Pt.Co unit)

ตาราง จ-3 ข้อมูลการเทียบมาตรฐานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้ในการคำนวณค่าหน่วยสี (Color unit , Pt.Co unit)

ค่าหน่วยสี (Color unit, Pt.Co unit)	แอบซอร์แบนซ์ที่ 465 นาโนเมตร
0	0.000
50	0.011
100	0.025
150	0.038
200	0.052
250	0.065
300	0.077
350	0.093
400	0.106
450	0.115
500	0.127



รูป จ-3 กราฟมาตรฐานของการเทียบมาตรฐานเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อใช้คำนวณค่า หน่วยสี (Color unit , Pt.Co unit)

จากกราฟมาตรฐานจะสามารถคำนวณค่าหน่วยสีได้ดังนี้

ค่าหน่วยสี (Color unit, Pt.Co unit) = 3868.6 x ค่าแอบซอร์แบนซ์ที่วัดได้

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลการทดลองการลดสีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ

ตาราง ฉ-1 ข้อมูลการทดลองการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *P.chrysosporium* เปรียบเทียบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth **และ** Synthetic growth medium

อุณหภูมิ	37	องศาเซลเซียส
พีเอช	4.5	
ปริมาตรอาหารเหลว	100	มิลลิลิตร
เวลาทำการทดลอง	10	วัน
ปั่มเชื้อในสภาวะเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว	150	รอบต่อนาที

Time (Days)	Dry weight (mg / 100 ml)	
	Synthetic growth medium	Potato dextrose broth
1	15.4	140.8
2	50.3	160.0
3	74.3	248.4
4	117.2	285.8
5	132.4	343.0
6	178.6	478.1
7	186.8	589.6
8	186.5	587.4
9	185.3	584.5
10	183.1	580.0

ตาราง ฉ–2 **ข้อมูลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีของน้ำเสียเมื่อไม่ใช้และใช้เซลล์ตรึง *P. chrysosporium* ในระดับขวดเขย่า**

อุณหภูมิ	37	องศาเซลเซียส
พีเอช	4.5	
ปริมาตรเซลล์ตรึง	10	มิลลิลิตร
ปริมาตรน้ำเสีย	50	มิลลิลิตร
ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	50	มิลลิลิตร
บ่มเชื้อในสภาวะเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว	150	รอบต่อนาที

Waste water	Time (Hr)	Average absorbance at 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
Control	0	0.357	1,381	0
	3	0.356	1,377	0.3
	6	0.354	1,369	0.9
	9	0.350	1,354	2.0
	12	0.348	1,346	2.5
	24	0.346	1,339	3.0
	36	0.345	1,335	3.3
	48	0.340	1,315	4.8
	72	0.336	1,300	5.9

ตาราง ฉ-2 (ต่อ)

Waste water	Time (Hr)	Average absorbance at 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
Cell free	0	0.357	1,381	0
	3	0.312	1,206	12.7
	6	0.314	1,215	2.1
	9	0.316	1,222	11.5
	12	0.318	1,230	11.0
	24	0.322	1,246	9.8
	36	0.327	1,265	8.4
	48	0.330	1,277	7.5
	72	0.334	1,292	6.4
Immobilized cell 12 % w / v	0	0.357	1,381	0
	3	0.181	700	49.3
	6	0.179	693	50.0
	9	0.175	677	51.0
	12	0.155	600	56.6
	24	0.157	607	56.1
	36	0.152	588	57.4
	48	0.129	499	63.9
	72	0.123	476	65.6

ตาราง ฉ-3 ข้อมูลการทดลองการหาอัตราส่วนของเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการลดสีของน้ำเสียในระดับขวดเขย่า

อุณหภูมิ	37	องศาเซลเซียส
พีเอช	4.5	
ปริมาตรเซลล์ตรึง	10	มิลลิลิตร
ปริมาตรน้ำเสีย	50	มิลลิลิตร
ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	50	มิลลิลิตร
บ่มเชื้อในสภาวะเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว	150	รอบต่อนาที

% Cell weight (g / ml Na-alginate solution)	Time (Hr)	Average absorbance at 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color remval
3 %	0	0.237	917	0
	3	0.167	646	29.5
	6	0.161	623	32.1
	9	0.152	588	35.9
	12	0.143	553	39.7
	24	0.139	538	41.3
	36	0.137	530	42.2

ตาราง ฉ-3 (ต่อ)

% Cell weight (g / ml Na-alginate solution)	Time (Hr)	Average absorbance At 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
3 %	48	0.135	522	43.1
	72	0.133	514	43.9
6%	0	0.235	909	0
	3	0.118	457	49.7
	6	0.110	426	53.2
	9	0.095	368	59.5
	12	0.091	352	61.3
	24	0.085	329	63.8
	36	0.084	325	64.2
	48	0.083	321	64.7
	72	0.080	309	66.0
12 %	0	0.357	1,381	0
	3	0.181	700	49.3
	6	0.179	693	50.0
	9	0.175	677	51.0
	12	0.155	600	56.6

ตาราง ฉ-3 (ต่อ)

% Cell weight (g / ml Na-alginate solution)	Time (Hr)	Average absorbance At 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
12 %	24	0.157	607	56.1
	36	0.152	588	57.4
	48	0.129	499	63.9
	72	0.123	476	65.6

ตาราง ฉ-4 ข้อมูลการทดลองการหาเวลาที่เหมาะสมในการใช้เซลล์ตรึงเชื้อรา *P.chrysosporium* 6 % (กรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายโซเดียมอัลจิเนต) ในการลดสีของน้ำเสียในระดับขวดเขย่า

อุณหภูมิ	37	องศาเซลเซียส
พีเอช	4.5	
ปริมาตรเซลล์ตรึง	10	มิลลิลิตร
ปริมาตรน้ำเสีย	50	มิลลิลิตร
ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	50	มิลลิลิตร
ปั่มเชื้อในสภาวะเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว	150	รอบต่อนาที

% Cell weight (g / ml Na-alginate solution)	Time (Hr)	Average absorbance at 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color remval
6 %	0	0.195	754	0
	1	0.057	220	70.8
	2	0.051	197	73.8
	3	0.049	189	75.0
	4	0.046	178	76.4
	5	0.045	174	76.9
	6	0.043	166	77.9

ตาราง ฉ-4 (ต่อ)

% Cell weight (g / ml Na-alginate solution)	Time (min)	Average absorbance at 465 nm	Average effluent color unit (Pt.Co unit)	% Color remval
6 %	0	0.217	840	0
	15	0.059	228	72.8
	30	0.057	220	73.8
	45	0.055	213	74.6
	60	0.054	209	75.1
	75	0.054	209	75.1
	90	0.053	206	75.5

ตาราง ฉ-5 ข้อมูลการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการลดสีของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษโดยใช้เซลล์ตรึง *P.chrysosporium* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด

อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

พีเอช 4.5

อัตราส่วนเซลล์ต่อแคลเซียมอัลจิเนต 6 % (กรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต)

ปริมาตรเซลล์ตรึง 1 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ลิตร

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.012	0.054	0 (inlet)	0.254	ND	ND	ND	ND	983	0
		50 (sampling point # 2)	0.133	ND	ND	ND	ND	515	47.6
		145 (sampling point # 3)	0.144	ND	ND	ND	ND	557	43.3
		200 (outlet)	0.138	ND	ND	ND	ND	534	45.7
	0.065	0 (inlet)	0.447	233.3	0	2,880	0	1,729	0
		50 (sampling point # 2)	0.320	ND	ND	ND	ND	1,238	28.4
		145 (sampling point # 3)	0.260	ND	ND	ND	ND	1,006	41.8
		200 (outlet)	0.230	203.8	12.7	2,582	10.4	890	48.6

หมายเหตุ : " ND " **หมายถึง** Non-detect

ตาราง ฉ-5 (ต่อ)

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.012	0.075	0 (inlet)	0.329	272	0	3,025	0	1,273	0
		50 (sampling point # 2)	0.230	ND	ND	ND	ND	890	30.1
		145 (sampling point # 3)	0.200	ND	ND	ND	ND	774	39.2
		200 (outlet)	0.154	219	19.5	2,880	4.8	596	53.2
	0.086	0 (inlet)	0.303	318	0	2,690	0	1,172	0
		50 (sampling point # 2)	0.176	ND	ND	ND	ND	681	41.9
		145 (sampling point # 3)	0.140	ND	ND	ND	ND	542	53.8
		200 (outlet)	0.125	250	21.4	2450	9.0	484	58.8
0.020	0.033	0 (inlet)	0.410	382.6	0	3,090	0	1,586	0
		50 (sampling point # 2)	0.254	ND	ND	ND	ND	983	38.1
		145 (sampling point # 3)	0.262	ND	ND	ND	ND	1,014	36.1
		200 (outlet)	0.245	354.6	7.3	2,793	9.6	948	40.3
	0.043	0 (inlet)	0.421	333.3	0	ND	ND	1,629	0
		50 (sampling point # 2)	0.226	ND	ND	ND	ND	874	46.3
		145 (sampling point # 3)	0.204	ND	ND	ND	ND	789	51.6
		200 (outlet)	0.197	252.3	24.3	ND	ND	762	53.2

หมายเหตุ : " ND " **หมายถึง** Non-detect

ตาราง ฉ-5 (ต่อ)

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.020	0.054	0 (inlet)	0.328	270.5	0	ND	ND	1,269	0
		50 (sampling point # 2)	0.169	ND	ND	ND	ND	654	48.5
		145 (sampling point # 3)	0.148	ND	ND	ND	ND	573	54.9
		200 (outlet)	0.131	263.5	2.6	ND	ND	502	60.0
	0.065	0 (inlet)	0.464	343.5	0	ND	ND	1,795	0
		50 (sampling point # 2)	0.244	ND	ND	ND	ND	944	47.4
		145 (sampling point # 3)	0.210	ND	ND	ND	ND	812	54.8
		200 (outlet)	0,207	299.5	13.0	ND	ND	801	55.4
0.025	0.033	0 (inlet)	0.253	ND	ND	ND	ND	979	0
		50 (sampling point # 2)	0.192	ND	ND	ND	ND	743	24.1
		145 (sampling point # 3)	0.162	ND	ND	ND	ND	627	36.0
		200 (outlet)	0.145	ND	ND	ND	ND	561	42.7
	0.054	0 (inlet)	0.297	ND	ND	3,444	0	1,149	0
		50 (sampling point # 2)	0.221	ND	ND	ND	ND	855	25.6
		145 (sampling point # 3)	0.198	ND	ND	ND	ND	766	33.4
		200 (outlet)	0.174	ND	ND	3,001	13.0	673	41.4

หมายเหตุ : " ND " **หมายถึง** Non-detect

ตาราง ฉ-5 (ต่อ)

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.025	0.065	0 (inlet)	0.397	ND	ND	2,809	0	1,536	0
		50 (sampling point # 2)	0.271	ND	ND	ND	ND	1,048	31.8
		145 (sampling point # 3)	0.253	ND	ND	ND	ND	978	36.3
		200 (outlet)	0.228	ND	ND	2,389	15.0	882	42.6
	0.075	0 (inlet)	0.398	ND	ND	3,544	0	1,540	0
		50 (sampling point # 2)	0.267	ND	ND	ND	ND	1,033	32.9
		145 (sampling point # 3)	0.243	ND	ND	ND	ND	940	38.9
		200 (outlet)	0.235	ND	ND	3,240	8.6	909	41.0
0.030	0.043	0 (inlet)	0.334	497.5	0	2,875	0	1,291	0
		50 (sampling point # 2)	0.156	ND	ND	ND	ND	604	53.3
		145 (sampling point # 3)	0.144	ND	ND	ND	ND	557	56.9
		200 (outlet)	0.130	453.5	8.8	2,555	11.2	503	61.1
	0.054	0 (inlet)	0.369	488.6	0	3,185	0	1,428	0
		50 (sampling point # 2)	0.295	ND	ND	ND	ND	1,141	20.1
		145 (sampling point # 3)	0.284	ND	ND	ND	ND	1,099	23.1
		200 (outlet)	0.249	393.6	19.5	2,930	8.0	963	32.5

หมายเหตุ : " ND " หมายถึง Non-detect

ตาราง ฉ-5 (ต่อ)

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.030	0.065	0 (inlet)	0.374	589.8	0	2,580	0	1,324	0
		50 (sampling point # 2)	0.270	ND	ND	ND	ND	1,045	27.8
		145 (sampling point # 3)	0.267	ND	ND	ND	ND	1,033	28.6
		200 (outlet)	0.252	537.8	8.8	2320	10.1	975	32.6
	0.075	0 (inlet)	0.379	467.3	0	ND	ND	1,466	0
		50 (sampling point # 2)	0.234	ND	ND	ND	ND	905	38.3
		145 (sampling point # 3)	0.212	ND	ND	ND	ND	820	44.1
		200 (outlet)	0.204	431.3	7.7	ND	ND	789	46.2
0.036	0.043	0 (inlet)	0.316	768	0	2,885	0	1,223	0
		50 (sampling point # 2)	0.235	ND	ND	ND	ND	909	25.7
		145 (sampling point # 3)	0.183	ND	ND	ND	ND	708	42.1
		200 (outlet)	0.158	423	44.9	2,714	6.0	611	50.0
	0.054	0 (inlet)	0.427	406	0	3,000	0	1,652	0
		50 (sampling point # 2)	0.269	ND	ND	ND	ND	1,041	37.0
		145 (sampling point # 3)	0.218	ND	ND	ND	ND	843	49.0
		200 (outlet)	0.194	308	24.1	2,767	7.8	751	54.6

หมายเหตุ : " ND " **หมายถึง** Non-detect

ตาราง ฉ-5 (ต่อ)

Inlet waste water flowrate (m^3 / h)	Inlet air flowrate (m^3 / h)	Height of column (cm)	Absorbance at 465 nm	BOD (mg / l)	% BOD reduction	COD (mg / l)	% COD reduction	Color unit (Pt.Co unit)	% Color removal
0.036	0.065	0 (inlet)	0.301	ND	ND	2,560	0	1,164	0
		50 (sampling point # 2)	0.161	ND	ND	ND	ND	623	46.5
		145 (sampling point # 3)	0.143	ND	ND	ND	ND	553	52.5
		200 (outlet)	0.131	ND	ND	2,380	7.0	507	56.5
	0.075	0 (inlet)	0.302	ND	ND	1,833	0	1,168	0
		50 (sampling point # 2)	0.174	ND	ND	ND	ND	673	42.4
		145 (sampling point # 3)	0.160	ND	ND	ND	ND	619	47.1
		200 (outlet)	0.120	ND	ND	1,626	11.3	464	60.3

หมายเหตุ : " ND " **หมายถึง** Non-detect

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุลวรรณ์ จึงสุวัฒนานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539