เอกสารอ้างอิง

คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์ และไพเราะ ทิพย์ทัศน์. "ลักษณะการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของกากน้ำตาล" รายงานผลวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เล่ม 5 (2523): 256-267.

ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. "การแก้ไขปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์และสุรา" การสัมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการพัฒนาการผลิตสุราและแอลกอฮอล์. ศูนย์ส่งเสริมการฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 2524

ธนาคารกรุงเทพ จำกัด. "กากน้ำตาลไทย" วารสารเศรษฐกิจธนาคารกรุงเทพ จำกัด. 14(8) (2525): 265-269

ธนาคารกสิกรไทย. "กากน้ำตาล ..... แนวโน้มสดใส" สรุปข่าวธุรกิจธนาคารกสิกรไทย 10(8) (2525): 1-2

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. "การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลและน้ำอ้อย" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต: ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523.

ปรีชา พลอยภัทธภิญโญ. "การผลิตแก๊สมีเทนจากน้ำกากส่า" การประชุมวิชาการครั้งที่ 4. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 6-7 พฤศจิกายน 2523, ณ ศูนย์สารนิเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2523): 14

ปรัชญา ธัญญาดี. "ปุ๋ยหมักและการใช้ประโยชน์เพื่อปรับปรุงบำรุงดิน" ชุมทางเกษตร 4. (30) (2521): 527-543

ภัทธ มณีธวัช. "กากน้ำตาล" เอกสารเผยแพร่. สำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย, สำนักปลัด กระทรวงอุตสาหกรรม (2521): 32-35

วิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. "จุลินทรีย์โปรตีนจากมันสำปะหลัง โดย Rhizopus และ ยีสต์" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523

เวคิน นพนิตย์. จุลทัศน์อิเลคตรอน. โรงพิมพ์อักษรเจริญทัศน์, กรุงเทพ 2524: 66-104

_____. จุลทัศน์อิเลคตรอนแบบสแกน. การประยุกต์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, ศูนย์-เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 2527: 49-51

สกุณี กุณฑียะ. "การเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำกากส่า" วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต: ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2525

สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย. "กากน้ำตาล" วารสารสภาหอการค้าแห่งประเทศไทย. เล่มปีที่ 19(2524): 205-216

สาขาวิจัยสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. "สรุปผลการทดลองกำจัดน้ำกากส่าในห้องปฏิบัติการ" แนวทางการกำจัดน้ำกากส่าจากโรงงานสุรากรมสรรพสามิต. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2525): 1-73

สุจินต์ พนาปวุฒิกุล. "การใช้น้ำกากส่าจากโรงงานสุราในการผลิตไบโอแก๊สและทำปุ๋ยอินทรีย์ชนบท" จุลสารสภาวะแวดล้อมปีที่ 3. เล่มที่ 2 (2527): 1-4

เสริมพล รัตสุข และไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. การกำจัดน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2524): 280-284

หน่วยวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย และกองช่างสุขาภิบาล กรมอนามัย. วิศวกรรมการจัดการและกำจัดน้ำไฮโดรกจากโรงงานอุตสาหกรรม. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย (2515): 18-70

Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. Introductory Mycology, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York and London, 1979: 534-561.

APHA AWWA and WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 13th edition, American Public Health Association, New York, 1971: 489-495.

Atthasampunna, P. and Ohmomo, S. "Microbial Decolorization of Waste Liquor Attached to Molasses Fermentation "Annual Report of ICME" 4(1981): 364.

Bangkok MIRCEN, List of Culture. Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. 1979: 31-32.

Calam, C.T. "The Evaluation of Mycelia Growth" Methods in Microbiology (Norris, J.R. and Ribbons, D.W.) pp. 593-610 Academic Press, London, 1969.

Chang, T.C. and Yang, W.L. "Study on Feed Yeast Production from Molasses Distillery Stillage. Taiwan Sugar. 20(5), (1973): 422-427.

Chuang, Y.T. and Lai, C.L. "Study on Treatment and Utilization of Molasses Alcohol Slop." Proceedings of the International Conference on Water Pollution Control in Developing Countries. (Quano, E.A.R., Lahani, B.N. and Thank, N.C.) pp. 475-480 Asia Institute of Technology, Bangkok, Thailand, 1978.

Difco Laboratories. Difco Manual of Dehydrated Culture Medium and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. pp. 246. Difco Laboratories Detroil 1, Michigan, USA, 1967.

Frankel, R.J., Ludwing, H.F. and Tonykasume, C. "Case Studies of Agro-industrial Waste Water Pollution Control in Thailand" Proceedings of the International Conference on Water Pollution Control in Developing Countries (Quano, E.A.R., Lohani, B.N. and Thank, N.C.) pp. 513-524. Asia Institute of Technology, Bangkok Thailand, 1978.

Harrigan, W.F. and Mc. Cance, M.E. Laboratory Methods in Food and Diary Microorganism pp. 330. Academic Press, London, 1976.

Itoh, N. and Ueda, K. "Process Development of Continuous Decolorization of Molasses Waste Water by Bioreactor. "Microbial Utilization of Renewable Resource" 3 (1983): 224-230.

Lodder, J. The Yeast: A Taxonomic Study. pp. 39. Amsterdams: North Holland Publishing Compang, 1970.

Nelson, N. "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose" The Journal of Biological Chemistry. 153 (1944): 375-380.

Prapeerapat, S. "Molasses: Additional Income for Planters" Bangkok Bank Monthly Review. 23 (8), (1982): 325-327.

Somogyi, M. "Notes on Sugar Determination" J. Biol. Chem. 195 (19), (1952): 19-23.

Sundstrom, O.W. and Klei, H.E. Waste Water Treatment pp. 241-270 Prentice-Hall, Inc, Englewood. Cliffs, N.J. 1979.

Tozawa, Y., Ohmomo S. and Ueda, K. "Microbial Decolorization of Waste from Fermentation of Molasses" Annual Report of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering. Vol. 2, (1979): 316.

Ueda, K. "Search and Sceening of Microorganisms having Decolorization Activity of Molasses Pigments". Microbial Utilization of Renewable Resource. 1, (1983): 195-198.

_____. and **Atthasampunna**, P. "Microbial decolorization of Molasses Fermentation Residue "Annual Report of ICME" 6 (1983): 288.

Underkofler, L.A. and Hickley, J. "Alcohol Fermentation of Molasses" Industrial Fermentation. Chemical Publishing Company, New York, 1954.

Wang, L.H., Kuo, Y.C. and Chang, C.Y. "Studies on the Utilization of Molasses Alcohol Slops I : Production of Feed Yeast by Continuous Cultivation, J. of the Chinese Agricultural Chemical Society. 18 (1-2), (1980): 25-32.

Watanabe, Y., Sugi, R., Tanaka, Y. and Hayashida, S. "Enzymation of Melanoidin by Coriolus sp. No. 20" Agric. Biol. Chem., 46 (6), (1982): 1623-1630.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 (isolation medium 1) : สำหรับแยกเชื้อราที่สามารถฟอกสีกากน้ำตาล

กลูโคส	2.0	กรัม
โซเดียมไนเตรท	0.2	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05	กรัม
วุ้นผง	1.0	กรัม
สารละลายสีกากน้ำตาล (ภาคผนวกหน้า 129)	100	มิลลิลิตร
ความเป็นกรดเป็นด่าง	5.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 (isolation medium 2) : สำหรับแยกเชื้อเห็ดที่มีความสามารถฟอกสีกากน้ำตาล

กลูโคส	5.0	กรัม
เปปโตน	0.5	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05	กรัม
วุ้นผง	1.0	กรัม
สารละลายสีกากน้ำตาล (ภาคผนวกหน้า 129)	100	มิลลิลิตร
ความเป็นกรดเป็นด่าง	6.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (screening medium 3) : สำหรับทดสอบอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลของเชื้อราที่แยกได้

เตรียมเหมือน อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 แต่ไม่เติมวุ้นผง

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (screening medium 4) : สำหรับทดสอบอัตราการฟอกสีกากน้ำตาลของเชื้อเห็ดที่แยกได้

เตรียมเหมือน อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 แต่ไม่เติมวุ้นผง

5. สารละลายสีกากน้ำตาล

เตรียมได้โดยนำน้ำกากส่าสด มาแยกเอาตะกอนออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสไประเหยให้เข้มข้นขึ้น ประมาณ 3-4 เท่า ด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (low-temperature vacuum evaporator) แบบ rotavapor RE 120 ของบริษัท Buchii ประเทศญี่ปุ่น ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด และนำไป ไดอะไลซ์ (dialyze) ด้วยถุงไดอะไลซ์ (dialyzing bag No. 3787-D-10) ของบริษัท Carolina Biological Supply ประเทศคาลิฟอร์เนีย ในน้ำที่กำจัดไอออน (deionized water) เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซนติเกรด เพื่อขจัดแร่ธาตุต่าง ๆ และสารที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 และนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มของสี โดยวัดการดูดกลืนแสง โดยอาศัยความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร เท่ากับ 4 ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบ spectronic 20 ของ Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. โพเตโต เดกซโตรส บรอท (potato dextrose broth) (Bangkok MIRCEN, 1979)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนสุก กรองเอาแต่น้ำ เติมส่วนผสมดังกล่าวข้างต้น และน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

7. โพเตโต เดกซโตรส อการ์ (Potato dextrose agar) : สำหรับเก็บรักษาเชื้อรา

เตรียมเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อ โพเตโต เดกซโตรส บรอท และเติมวุ้นผง 2 เปอร์เซนต์

8. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 7 : เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีการปรับปรุงแล้ว เพื่อความเหมาะสมในการฟอกสีกากน้ำตาล

กลูโคส	2.5	กรัม
แหล่งอาหารไนโตรเจน	0.2	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05	กรัม
สารละลายสีกากน้ำตาล	100	มิลลิลิตร
ความเป็นกรดเป็นด่าง	6.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

9. ยีสต์เอกซแทรก-มอลท์ เอกซแทรก อการ์ (Yeast extract-malt extract agar) (Lodder,1970)

กลูโคส	1.0	กรัม
เปปโตน	0.5	กรัม
ผงมอลท์สกัด (malt extract)	0.3	กรัม
ผงยีสต์สกัด	0.3	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

10. ชาเพค อการ์ (Czapek 's agar) (Harrigan and Mc. Cance, 1976)

ซูโครส (sucrose)	3.0	กรัม
โซเดียมไนเตรท	0.3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.001	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

11. คอร์น มิล อการ์ (Corn meal agar) (Difco, 1967)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำเร็จของ Difco laboratory โดยนำมาละลายน้ำในอัตราส่วน 17 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

12. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.3

12.1 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิค (sodium phosphate monobasic) 0.2 โมลาร์ ละลาย 27.6 กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

12.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตไดเบสิค (sodium phosphate dibasic) 0.2 โมลาร์ ละลาย 28.4 กรัมของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HOP_4) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลายในข้อ 12.1 ผสมกับสารละลายในข้อ 12.2 ในอัตราส่วน 23:77 จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.3

13. น้ำยาดอง คาร์นอว์สกี้ (Karnovsky 's fixative) (เวคิน, 2527)

13.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.3 (ภาคผนวกหน้า 131)

13.2 10% สารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde)

ละลาย 2.0 กรัมของพาราฟอร์มัลดีไฮด์ ลงในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและอุ่นให้ร้อนประมาณ 60-65 องศาเซนติเกรด ค่อย ๆ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลาย 2-3 หยด จนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซนติเกรด)

13.3 25% สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ 10% สารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 25% สารละลายกลูตาราลดีไฮด์และน้ำกลั่น มาผสมกันในอัตราส่วน 5:2:1:2 ซึ่งจะได้น้ำยาดองคาร์-

นอว์สกี้ที่ประกอบด้วย 2% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ และ 2.5% กลูตาราลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอส-เฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.3

14. น้ำยาดอง 1% ออสเมียมเททราออกไซด์ (osmium tetraoxide fixative) (เวคิน, 2524)

ออสเมียมเททราออกไซด์ (OsO_4) เป็นผลึกสีเหลืองอ่อน บรรจุในหลอด (vial) ขนาด 0.5 กรัม หรือ 1.0 กรัม การเตรียมสารละลายออสเมียมเททราออกไซด์ ต้องเตรียมในบริเวณที่มีการถ่ายเทอากาศที่ดีที่สุด หรือในตู้ควัน เพราะไอของออสเมียมเททราออกไซด์ มีพิษทำลายเยื่อบุทางเดินหายใจ เครื่องแก้วที่ใช้ต้องสะอาดปราศจากสารเคมีใด ๆ และจัดไว้เพื่อการนี้โดยเฉพาะ น้ำยานี้จะเตรียมไว้เป็นสารละลายมาตรฐาน มีความเข้มข้น 2% เมื่อต้องการใช้เป็นน้ำยาดอง จึงค่อยเจือจางกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วิธีเตรียมทำได้ดังนี้

14.1 เตรียม 2% สารละลายออสเมียมเททราออกไซด์

ล้างหลอดบรรจุออสเมียมเททราออกไซด์ ขนาด 0.5 กรัม ให้สะอาด เช็ดให้แห้งและห่อหลอดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ (Lens paper) ทุบหลอดที่ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์นี้ให้แตก แล้วจึงเทลงในขวดแก้ว เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เขย่าหรือทิ้งไว้ค้างคืนในตู้ควันจนได้สารละลายออสเมียมเททราออกไซด์มีสีเหลืองอ่อน ฟางข้าว กรองบรรจุขวดใหม่ ปิดจุกขวดด้วยกระดาษฟา-ราฟิล์ม (parafilm) และเก็บไว้ในที่ที่มีอุปกรณ์ดูดควัน ตัวน้ำยาเปลี่ยนสีไปเป็นสีเขียวอ่อนจนถึงเทาดำ แสดงว่าน้ำยาเสื่อมคุณภาพ

14.2 เตรียม 1% ออสเมียมเททราออกไซด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ตวง 2% สารละลายออสเมียมเททราออกไซด์ 1 ส่วน และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.3 (ภาคผนวกหน้า 131) 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จะได้น้ำยาดอง 1% ออสเมียมเททราออกไซด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

15. พลาสติกที่ใช้ฝังตัวอย่าง (เวคิน, 2524)

พลาสติกที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับทำให้ตัวอย่างแข็ง และใช้ทำเบ้าตัวอย่างเพื่อตัด (embedding medium) ที่ใช้จัดเป็นสารสังเคราะห์ประเภทเรซิน (resin) เรียกว่า อีปอกซีโพลีเอสเตอร์ (epoxy polyester) ที่มีชื่อเฉพาะว่า อีปอน 812 (epon 812) โดยในสภาวะ

ปกติเป็นของเหลว และจะแข็งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีบางอย่างหรือความร้อน การเตรียมพลาสติกดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

15.1 ใช้ของผสม A 7 ส่วนโดยน้ำหนัก ซึ่งของผสม A นี้ประกอบด้วย

อีปอน 812	62	มิลลิลิตร
ดี.ดี.เอส.เอ. (D.D.S.A. : dodecenyl succinic anhydride)	100	มิลลิลิตร

15.2 ใช้ของผสม B 3 ส่วนโดยน้ำหนัก ซึ่งของผสม B นี้ประกอบด้วย

อีปอน 812	100	มิลลิลิตร
เอ็น.เอ็ม.เอ. (N.M.A. : nadic methyl anhydride)	89	มิลลิลิตร

15.3 ผสมส่วนผสม A และ B ให้เข้ากันดี คนด้วยแท่งแก้ว และพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศ

15.4 ค่อย ๆ เติม ดี.เอ็ม.พี.-30 (D.M.P.-30 : tridimethylamino methyl phenol) ลงในส่วนผสมของ A และ B ในอัตราส่วน 1 หยดของ ดี.เอ็ม.พี.-30 ต่อ 1 มิลลิลิตรของส่วนผสม A และ B ผสมให้เข้ากันดี และนำไปใช้ทันที

16. 5% ยูเรนิล อะซีเตท (uranyl acetate)

ยูเรนิล อะซิเตท	2	กรัม
น้ำกลั่นที่ต้มและกรองแล้ว	40	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันดี และกรองสารนี้อีกครั้ง เติมในขวดทึบแสง เช่นขวดสีน้ำตาลเข้ม

17. สารละลาย เลด ซีเตรท (lead citrate)

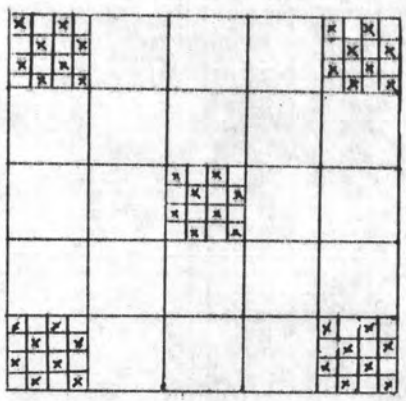
เตรียมโดย ละลาย 1.33 กรัม เลด ซิเตรท กับ 1.76 กรัมโซเดียมซีเตรท (sodium citrate) ในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติม 8 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป เขย่าต่อไปจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นจนปริมาณเป็น 50 มิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

1. พวกเชื้อราที่สร้างสปอร์ (spore)

เตรียมเชื้อเริ่มต้นในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อโพเตโต เดกซโตรส อการ์ (potato dextrose agar) (ภาคผนวกหน้า 129) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลานาน 5-7 วัน นำน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาละลายสปอร์ของเชื้อราดังกล่าว ปรับความเข้มข้นของสปอร์ เท่ากับ 1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ซึ่งนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

การหาจำนวนสปอร์โดยใช้ ฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนสปอร์ในช่องใหญ่ 5 ช่อง และในแต่ละช่องใหญ่นั้นนับอีก 8 ช่อง โดยนับช่องเว้นช่อง ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



จำนวนสปอร์/มิลลิลิตร = จำนวนสปอร์เฉลี่ยในช่องเล็ก $\times 16 \times 10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร

2. พวกเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นในรูปของสารแขวนลอยเส้นใย (mycelium suspension) โดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โพเตโต เดกซโตรส อการ์ (potato dextose agar) (ภาคผนวกหน้า 129) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรดเป็นเวลานาน 5-7 วัน ถ่ายเชื้อราดังกล่าวลงใน 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โพเตโต เดกซโตรส บรอท ที่บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 300 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลานาน 10-14 วัน เชื้อราดังกล่าวจะเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนของเส้นใยมาปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 20 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยเส้นใย 20 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณเชื้อ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง

การวิเคราะห์

1. การหาเปอร์เซนต์การฟอกสี (Ueda, 1983)

เครื่องมือ

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบ spectronic 20 ของ Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี

สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 5

1. สารละลายกรดอะซิติค 0.1 โมลาร์

ละลาย 116 มิลลิลิตรกรดอะซิติค (CH_3COOH) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. สารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.1 โมลาร์

ละลาย 16.4 กรัม โซเดียมอะซิเตทในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 ผสมกันในอัตราส่วน 14.8:35.2

วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกเอาตะกอนออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใส 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 9 มิลลิลิตร วัดความเข้มของสี โดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร

การคำนวน

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

A = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างก่อนการฟอกสี

B = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังการฟอกสี

C = อัตราการเจือจางตัวอย่าง ซึ่งมีค่า 10 เท่า

2. การหาน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธีโซโมจิ และเนลสัน (Somogyi and Nelson method) (Nelson, 1944, Somogyi, 1952)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (copper reagent : somogyi's reagent)

1.1 สารละลาย ก (copper reagent A)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 anhydrous) 25 กรัม โซเดียม-โปแตสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 25 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 20 กรัม และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4 anhydrous) 200 กรัม ในน้ำกลั่น ประมาณ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2 สารละลาย ข (copper reagent B)

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หยดกรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ประมาณ 1-2 หยด

นำสารละลาย ข 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย ก 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

2. สารละลายเนลสัน (nelson's reagent : arsenomolybdate color reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม โซเดียมอะซิเนต (Na_2HAsO_4) 3 กรัม ซึ่งละลายอยู่ในน้ำ 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซนติเกรด เป็นเวลานาน 2 วัน สารละลายนี้ควรเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 100 มิลลิลิตร (ถ้ามีตะกอนควรปั่นแยกเอาตะกอนออกก่อน) เติมสารละลายคอปเปอร์ลงไป 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลานาน 20 นาที ทำให้เย็นโดยการผ่านน้ำไหล เติมสารละลายเนลสัน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นอีก 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืน-แสง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยอาศัยความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

3. การหาค่า บี.โอ.ดี. (B.O.D. : biochemical orygen demand) (APHA AWWA and WPCR, 1971)

กราฟที่ 45 กราฟมาตรฐาน การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี ไซโนลิ และเนลสัน

เครื่องมือ

1. ขวดอินคิวเบท (incubation bottle) หรือขวด บี.โอ.ดี. ขนาด 200-300 มิลลิลิตร

2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซนติเกรด

3. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บิวเรท ขวดรูปกรวย กระบอกตวง เป็นต้น

สารเคมี

1. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ คุณภาพสูง ปราศจากคลอรีน คลอรามีน อัลคาไลนิตี้ กรด และสารอินทรีย์ มีทองแดงไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.5 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HOP_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HOP_4.7H_2O$) 33.4 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ควรมีความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 7.2

3. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่อบแห้ง 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น และเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลายเฟอริคคลอไรด์ ละลายเฟอริคคลอไรด์ ($Fecl_3.6H_2O$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.025 นอร์มอล ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ที่อบแห้ง 1.575 กรัมในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้สลายตัวได้ง่าย จึงควรเตรียมเฉพาะเวลาใช้เท่านั้น

7. สารละลายกรดหรือด่าง 1 นอร์มอล สำหรับใช้ปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็นกลาง

8. การเติมน้ำเชื้อ (seeding) การเติมน้ำเชื้อก็เพื่อต้องการให้มีจำนวนบักเตรีเพียงพอในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย น้ำเสียประเภทสารอินทรีย์ เช่น น้ำใสโครกจาก

บ้านเรือน ซึ่งมีปักเตรียอยู่เป็นจำนวนมากแล้วก็ไม่จำเป็นต้องเติมน้ำเชื้อลงไปอีก ส่วนตัวอย่างที่มีเชื้อปักเตรียอยู่น้อยหรือไม่มีเลย จะต้องเติมเชื้อลงในน้ำที่ใช้เจือจาง น้ำเชื้อมาตรฐานเตรียมได้จากน้ำโสโครกจากบ้านเรือน แล้วปล่อยให้ตกตะกอนแล้วนำไปอบเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซนติเกรด เป็นเวลานาน 24-36 ชั่วโมง จึงดูดเอาส่วนบนมาใช้ทั่วไปแล้วใช้น้ำเชื้อมาตรฐาน 1-2 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่เจือจาง 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาณที่ต้องการใช้ 1 ลิตร ใส่ลงในภาชนะที่สะอาด เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยใช้สารละลายแต่ละชนิดอย่างละ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร พ่นอากาศที่สะอาดเพื่อเพิ่มปริมาณสารละลายออกซิเจนให้กับน้ำเจือจาง เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เติมน้ำเชื้อ 2 มิลลิลิตรต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร ในกรณีที่จำเป็นต้องใช้

2. วิธีเจือจาง นำน้ำตัวอย่างมาเจือจางในระดับต่าง ๆ ซึ่งจะทำให้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด จึงเลือกตัวอย่างเพื่อเจือจางในขั้นที่สูง และต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 ขั้น ค่อย ๆ รินน้ำตัวอย่าง 300-500 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ เติมตัวอย่างน้ำที่ต้องการหาค่า บี.โอ.ดี. จำนวนที่ต้องการแล้ว เติมน้ำเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันอย่าให้เกิดฟองอากาศ ค่อย ๆ รินใส่ขวด บี.โอ.ดี. 3 ขวด ปิดจุก นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซนติเกรด 2 ขวด ขวดที่เหลือนำไปหาค่าสารละลายออกซิเจน (dissolved oxygen : D.O.) ทันทีเพื่อทราบค่าสารละลายออกซิเจน ที่จุดเริ่มต้น (D_0) สำหรับอีก 2 ขวด นำมาหาค่า สารละลายออกซิเจนเมื่อครบ 5 วัน (D_5)

4. การหาปริมาณสารละลายออกซิเจน (dissolved oxygen : D.O.) โดยวิธี Azide Modification of the Iodometric Method (APHA AWWA and WPCF, 1971)

เครื่องมือ

1. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) 480 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-อาไซด์ ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมจนเป็น 1 ลิตร เสร็จแล้ว

เติมโซเดียมอาไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิกรัม

3. กรดซัลฟูริค เข้มข้น

4. น้ำแป้ง ละลายแป้งมัน 5 กรัมในน้ำกลั่น ประมาณ 50 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทลงในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือด และคนจนเป็นเนื้อเดียว เติมน้ำอีกจนเป็น 1 ลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที ปล่อยทิ้งให้เย็น เติมกรดซาลิไซลิค (salicylic acid) 1.25 กรัม หรือใช้โทลูอิน (toluene) 2-3 หยด ลงในสารละลายน้ำแป้ง เพื่อกันบูด

5. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มอล ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดและปล่อยให้เย็นลง แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้โดยเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์

จากตัวอย่างน้ำที่เก็บไว้ในขวดปริมาตร 250-300 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานีส-ซัลเฟต 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย อัลคาไล-ไอโอไดด์-อาไซด์ ตามลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ให้ปลายหลอดจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ ปิดจุกระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จับขวดคว่ำลงแบบพลิกข้อมืออย่างน้อย 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนที่เกิดขึ้นนอนก้น รอจนได้น้ำใสส่วนบนประมาณ 100 มิลลิลิตร เปิดจุกแล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ปิดจุกค่อย ๆ เขย่าจนกระทั่งตะกอนละลายหมด ตวงสารละลายที่ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปไตเตรท ด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มอล จนได้สีเหลืองฟางข้าว เติมน้ำแป้ง 1-2 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป

การคำนวน

$$\text{บี.ไอ.ดี.} = \frac{D_1 - D_5}{P} \quad \text{มิลลิลิตร/ลิตร}$$

D_1 = DO ของตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาที

D_5 = DO ของตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางแล้วเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 5 วัน

P = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้

5. การหาค่า ซี.ไอ.ดี. (C.O.D. : chemical oxygen demand) โดยวิธี Dichromate reflux method ปรับปรุงวิธีการ โดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524)

เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบไหลกลับคืน (reflux apparatus) ประกอบด้วย

1. ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร

2. เครื่องควบแน่น (condensors) ความยาว 45 เซนติเมตร

3. เครื่องให้ความร้อน (hot plate หรือ heating mantle) ซึ่งสามารถให้กำลังอย่างน้อย 9 วัตต์ต่อตารางนิ้ว ต่อพื้นที่ผิวของขวดก้นกลม

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.25 นอร์มอล ละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่อบแห้งดีแล้ว หนัก 12.259 กรัม ในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟามิค (sulfamic acid) 0.12 กรัม แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. สารละลายกรดซัลฟูริค ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 9 ปอนด์ (2.25 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟต ละลายยาก อาจต้องใช้เวลานาน 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตไตแตรนต์ (standard ferrous ammonium sulfate titrant) 0.1 นอร์มอล ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็น แล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายเฟอโรอิน อินดิเคเตอร์ (ferroin indicator solution) ละลาย 1,10 - phamonthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) หนัก 1.485 กรัม พร้อมกับเฟอรัสซัลเฟต หนัก 0.695 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

5. เมอร์คิวริคซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดเป็นผลึกบริสุทธิ์

วิธีการวิเคราะห์

ใส่เมอร์คิวริคซัลเฟต หนัก 0.4 กรัม และลูกแก้ว 5-10 เม็ด (อบที่อุณหภูมิ 600 องศา-

เซนดิเกรด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ลงในขวดกลั่น เติมตัวอย่างน้ำซึ่งเจือจางพอเหมาะแล้ว 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.250 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลายกรดซัลฟูริคลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าสารผสมให้เข้ากันดี กลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนถอดขวดกลั่นออก เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ส่วนผสมมีปริมาตรเป็น 140 มิลลิลิตร โดยประมาณ ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ไตเตรทสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ด้วยสารละลายมาตรฐาน เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จนกระทั่งส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินแกมเขียว เป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

สำหรับตัวเทียบศูนย์ (blank) ใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ

การคำนวน

$$\text{ซี.โอ.ดี.} = \frac{(a-b) \times c \times 8000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}} \quad \text{มิลลิกรัม/ลิตร}$$

a = มิลลิลิตรของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวเทียบศูนย์

b = มิลลิลิตรของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตใช้กับน้ำตัวอย่าง

c = ความเข้มข้นเป็นนอร์มอลของเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

6. การหาค่าแอมโมเนียมไนโตรเจนโดยวิธีกลั่น ปรับปรุงวิธีการโดยเสริมพลและไชยยุทธ (2524)

เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่น ซึ่งประกอบด้วย ขวดกลั่น (kjeldahl flasks) เครื่องควบแน่น (condensers) และเครื่องให้ความร้อน (heater)

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.3 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 68.8 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย แล้วเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายกรดบอริค ละลายกรดบอริค (H_3BO_3) 20 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายสเตบิไลเซอร์ (stabilizer solution)

4.1 สารละลาย อี.ดี.ที.เอ. (E.D.T.A.) ละลายไดโซเดียม-ไดไฮโดรเจน-เอทธีลีน-ไดอามีน-เทตราอาซีเดท-ไดไฮเดรท 50 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 60 มิลลิลิตร ซึ่งมีโซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายอยู่ 10 กรัม ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายเกลือรอคเชลล์ (rochelle salt) ละลายโปแตสเซียมโซเดียมทราเดรท ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย แล้วเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายใช้ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง

5.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย และเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.2 สารละลายกรดซัลฟูริค 1 นอร์มอล ละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 28 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 0.5 ลิตร ปล่อยให้เย็นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. อินดิเคเตอร์ผสม (mix indicator) ผสมสารละลาย 0.2% เมทธีลีนเรด (methylene red) ในแอลกอฮอล์ 95% 2 ส่วนกับสารละลาย 0.2% เมทธีลีนบูล (methylene blue) ในแอลกอฮอล์ 95% 1 ส่วน สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ ๆ ทุก 20 วัน

7. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค 0.02 นอร์มอล สำหรับใช้ไตเตรท

การวิเคราะห์

ตวงตัวอย่างน้ำ 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดกลั่นขนาด 800 มิลลิลิตร และปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็นกลาง เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร ซึ่งจะช่วยรักษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้อยู่ที่ 7.4 ในระหว่างการกลั่น ถ้าตัวอย่างน้ำมีแคลเซียมมากกว่า 250 มิลลิกรัม/ลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไปก่อน 40 มิลลิลิตร แล้วจึงค่อยปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เท่ากับ 7 ด้วยกรดหรือด่างแล้วแต่กรณี เจือจางให้เป็น 400 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริคมาตรฐาน 0.02 นอร์มอล จนอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีม่วง

การคำนวน

$$\text{แอมโมเนียไนโตรเจน} = \frac{\text{มิลลิลิตรกรดซัลฟูริค} \times 280}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}} \quad \text{มิลลิกรัม/ลิตร}$$

7. การหาค่าออร์แกนนิคไนโตรเจน โดยวิธี kjeldahl method ปรับปรุงวิธีการ โดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524)

เครื่องมือ

1. เครื่องมือในการเคี่ยว จะต้องมีเครื่องดูดอากาศเพื่อดูดไอน้ำและไอควัน ซัลเฟอร์-ไดรออกไซด์ออกทิ้ง

2. เครื่องกลั่น ชุดเดียวกับที่ใช้หาแอมโมเนียไนโตรเจน

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.3 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 68.8 กรัมในน้ำกลั่น และเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายเมอร์คิวริคซัลเฟต ละลายเมอร์คิวริคออกไซด์ (HgO) 8 กรัม ในกรดซัลฟูริค (1 + 5) 50 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายกรดซัลฟูริค-เมอร์คิวริคซัลเฟต-โปแตสเซียมซัลเฟต ละลาย โปแตส-เซียมซัลเฟต 267 กรัม ในน้ำกลั่น 1,300 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 400 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเมอร์คิวริค 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 2 ลิตร

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต 25 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์

7. อินดิเคเตอร์ผสม เช่นเดียวกับในการหาค่าแอมโมเนียไนโตรเจน

วิธีการวิเคราะห์

ส่วนที่เหลือจากการหาแอมโมเนียไนโตรเจน นำมาหาออร์แกนนิคไนโตรเจนต่อได้โดย เติมสารละลายกรดซัลฟูริค 50 มิลลิลิตร เคี่ยวสารละลายผสมที่จุดเดือด จนได้สารละลายใส

เดี่ยวต่อไปอีก 20-30 นาที ปล่อยให้เย็น และเติมน้ำกลั่นลงไป 300 มิลลิลิตร ทำให้เป็นด่างด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์-ไธโอซัลเฟต โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ กลั่นลงในสารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 200 มิลลิลิตร ทำให้เย็นและนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน กรดซัลฟูริค 0.02 นอร์มอล โดยใช้อินดิเคเตอร์ผสม 2-3 หยด

การคำนวน

$$\text{ออร์แกนนิคไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times 280}{C} \quad \text{มิลลิกรัม/ลิตร}$$

A = มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ไตเตรทตัวเทียบศูนย์

C = มิลลิลิตรตัวอย่างที่ใช้กลั่น

ตัวเทียบศูนย์ = สารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร

6. การหาค่าไนเตรทโดยวิธีบรูซีน ปรับปรุงวิธีการ โดย เสริมพลและไชยยุทธ (2524)

เครื่องมือ

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร และทางเดินแสง 1 เซนติเมตร

2. ไปเปตชนิดพิเศษ (safety pipet)

สารเคมี

1. สารละลายตั้งต้นไนเตรท (stock nitrate solution) ละลายโปแตสเซียมไนเตรท 721.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้มีไนโตรเจน 100 มิลลิกรัม/ลิตร

2. สารละลายไนเตรทมาตรฐาน เจือจางสารละลายตั้งต้นไนเตรท 100 มิลลิลิตร ให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐาน ซึ่ง 1 มิลลิลิตร มีไนโตรเจน 10 ไมโครกรัม

3. สารละลายโซเดียมอาร์เซไนท์ ละลายโซเดียมอาร์เซไนท์ ($NaASO_2$) 5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารนี้เป็นพิษ ระวังอย่าให้เข้าปาก

4. น้ำยาบรูซีน-กรดซัลฟานิลิค ละลายบรูซีนซัลเฟต 1 กรัม และกรดซัลฟานิค 0.1 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 70 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มจนเดือด แล้วเติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้สามารถคงตัวอยู่ได้หลายเดือน ถึงแม้ว่าจะมีสีชมพูเกิดขึ้น แต่ไม่มีผลกระทบกระเทือนปฏิกริยาของมัน

5. สารละลายกรดซัลฟูริค ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริคเข้มข้น 100 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวังลงในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องก่อนจะใช้ปิดจุกให้แน่น เพื่อป้องกันการดูดความชื้นจากอากาศภายนอก

วิธีการวิเคราะห์

1. การหาเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curve) เตรียมสารละลายไนเตรทมาตรฐานให้มีปริมาตรของไนโตรเจน อยู่ในช่วง 0.0-10.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการเจือจางสารละลายไนเตรทมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยปริมาตรของสารละลายไนเตรทมาตรฐานที่ใช้เป็น 0 5 15 25 35 50 75 และ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายแต่ละความเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตร ไปทำให้เกิดสีตามหัวข้อ 3 แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วย

2. การเตรียมตัวอย่างขั้นต้น ถ้าตัวอย่างน้ำมีคลอรีนปนอยู่ ต้องกำจัดออกโดยเติมโซเดียมอาร์เซไนท์ 1 หยด (0.05 มิลลิลิตร) ต่อคลอรีน 0.10 มิลลิกรัม แล้วหยดให้มากเกินพออีก 1 หยด สำหรับตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร

3. การทำให้เกิดสี

3.1 ใช้ไปเปต ดูดตัวอย่างน้ำ 2 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2 เติมน้ำยากรดบรูซีน ซัลฟานิลิค 1 มิลลิลิตร

3.3 ตวงกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะขนาด 50 มิลลิลิตร ใบที่สอง

3.4 ค่อย ๆ เทตัวอย่างน้ำที่ผสมกับน้ำยากรดบรูซีน-ซัลฟานิลิค ที่ได้ในข้อ 3.2 ลงในภาชนะที่บรรจุกรดซัลฟูริคเข้มข้นในข้อ 3.3 แล้วเทกลับไปกลับมา 4-6 หน เพื่อให้แน่ใจว่าผสมกันเป็นเนื้อเดียว

3.5 นำสารผสมที่ได้ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 ± 1 นาที

3.6 ตวงน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะใบที่สาม

3.7 พอครบ 10 นาที ค่อย ๆ เทน้ำกลั่นลงในสารผสม แล้วเทกลับไปกลับมา เพื่อให้ผสมกันดี เช่นเดียวกับในข้อ 3.4

3.8 ปล่อยให้เย็นลงโดยตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20-30 นาที

3.9 ตั้งสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร ให้เข็มชี้ที่ 100 เปอร์เซนต์ การยอมให้แสงผ่านได้ (100% transmittant) สำหรับค่าของตัวเทียบศูนย์

การคำนวน

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร ไนเตรทไนโตรเจน} = \frac{\text{มิลลิกรัมไนเตรทไนโตรเจน} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร ไนเตรท} = \text{มิลลิกรัม/ลิตร ไนเตรทไนโตรเจน} \times 4.43$$

9. การหาฟอสเฟตโดยวิธีอะมิโนแนฟโธธัลโฟนิค แอซิด ปรับปรุงวิธีการโดยเสริมพลและไชยยุทธ (2524)

เครื่องมือ

1. ตู้อบไฟฟ้า อุณหภูมิสูง

2. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบสเปคโตรนิค 20

3. เครื่องมือใช้ในการกรอง และกระดาษกรองที่ล้างด้วยน้ำกรดเจือจางได้

4. เครื่องแก้วที่ล้างสะอาดด้วยกรด และน้ำกลั่น เช่น

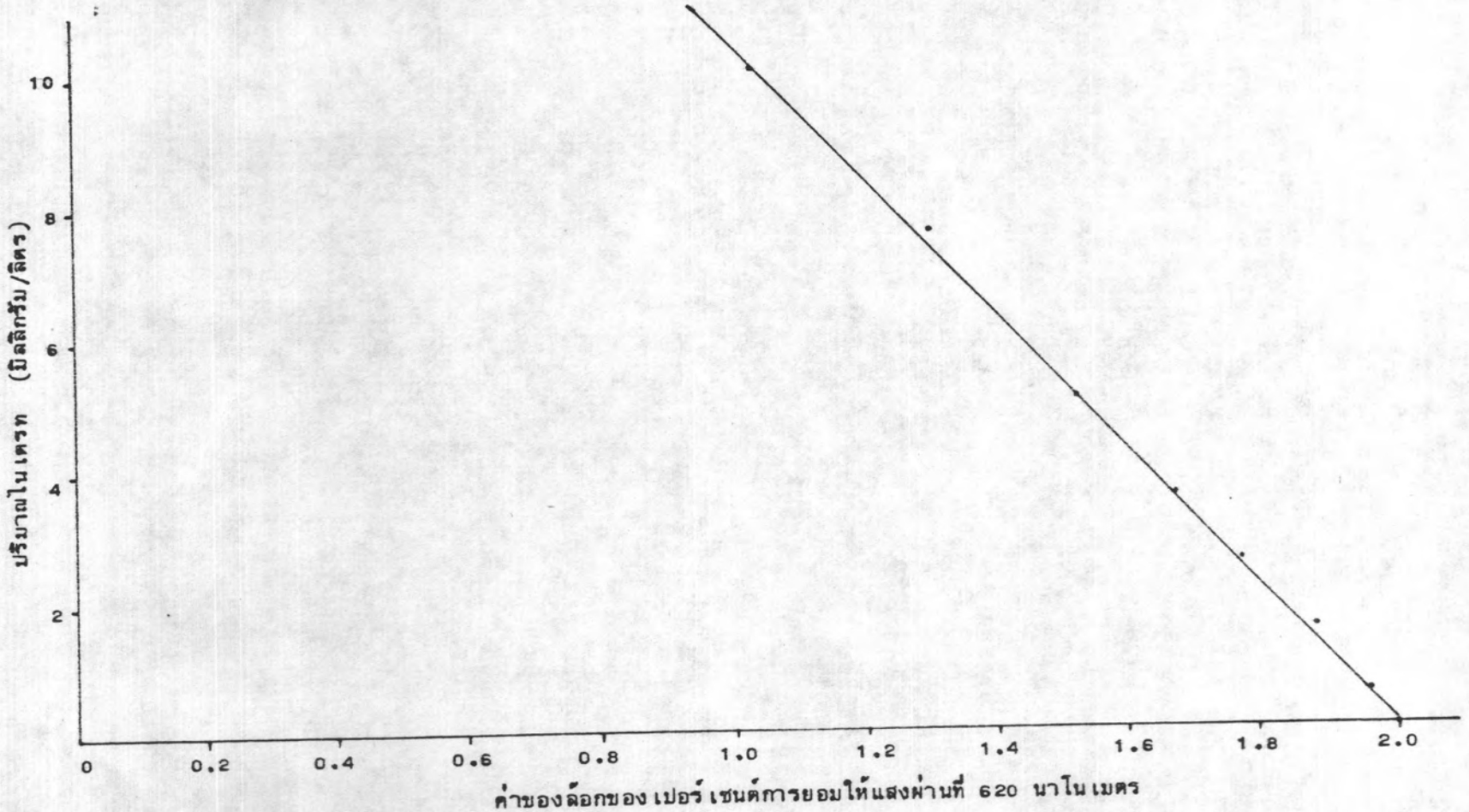
4.1 ขวดรูปกรวย ขนาด 125 มิลลิลิตร

4.2 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. ฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ ใช้ได้ทั้งชนิดละลายในน้ำและละลายในแอลกอฮอล์

2. สารละลายกรดเข้มข้น ค่อย ๆ รินกรดซัลฟูริคเข้มข้น 300 มิลลิลิตร ลงในน้ำประมาณ 600 มิลลิลิตร ทำให้เย็น เติมกรดไนตริคเข้มข้น (HNO_3 conc) 4 มิลลิลิตร แล้วเจือจางจนเป็น 1 ลิตร



กราฟที่ 46 กราฟมาตรฐาน การหาปริมาณไนเตรท โดยวิธี บรูซีน

3. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 31.4 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 400 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ทำให้เย็น เติมกรดไนตริคเข้มข้น 3.4 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโมลิบเดทลงไป เสร็จแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายอะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค ซึ่งอะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิด (ชนิดผงที่มีสีชมชู-อ่อน) 0.75 กรัม โซเดียมไธโอซัลเฟต 42 กรัม และโซเดียมไธโอซัลไฟต์ 70 กรัม บดอะมิโนแนฟ-โธซัลโฟลิค แอซิด ด้วยโซเดียมไธโอซัลไฟต์ เล็กน้อยในครกที่สะอาด นำเกลือส่วนที่เหลือ คือ โซเดียมไธโอซัลเฟต และ โซเดียมไธโอซัลไฟต์ ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เทอะมิโนแนฟโธ-ซัลโฟนิค แอซิด ที่บดละเอียดลงไป คนให้ละลายแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีน้ำตาลปิดจุกสนิท อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซนติเกรด สารละลายนี้เมื่อเก็บไว้นานสีจะจางลง แต่ถ้าไม่มีสารอื่นลงไปเจือปนก็สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 4 เดือน หรือมากกว่านั้น

5. สารละลายฟอสเฟตมาตรฐาน ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 219.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ 1 มิลลิลิตร มี ฟอสฟอรัสในรูปของเฟสเฟตอยู่ 50 ไมโครกรัม

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดน้ำตัวอย่างที่คนเข้ากันดีแล้ว 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า แล้วเติมน้ำกลั่นจนเป็น 50 มิลลิลิตร ใส่ถ้วยกระเบื้อง (cucible)

2. เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ มากพอที่จะทำปฏิกริยากับโปแตสเซียมเพนตอกไซด์ (P_2P_5) เพื่อให้เกิดตะกอน แมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต ($Mg_2P_2O_7$)

3. นำไปต้มบนเตาไฟฟ้า จนสารละลายงวดแห้ง

4. นำไปเผาในตู้อบไฟฟ้า อุณหภูมิ 700 องศาเซนติเกรด นาน 15 นาที

5. นำเถ้าที่ได้มาเติมสารละลายกรดเข้มข้น

6. ต้มให้เดือดอย่างน้อย 90 นาที คอยเติมน้ำกลั่น เพื่อให้ปริมาตรอยู่ระหว่าง 10-20 มิลลิลิตร

7. ปล่อยให้เย็น กรองถ้ามีตะกอนขุ่นขาว ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล โดยใช้สารละลายฟีนอล์ฟธาลีน เป็น อินดิเคเตอร์ จะได้สารละลายสีชมพูอ่อน แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เท่ากับตอนแรก

8. เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

9. เติมสารละลายอะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิด 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

10. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดเปอร์เซนต์การยอมให้แสงผ่าน โดยเทียบกับ ตัวเทียบ-ศูนย์ ซึ่งวัดค่าเปอร์เซนต์การยอมให้แสงผ่านได้เป็น 100 เปอร์เซนต์ ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตร-มิเตอร์ หาปริมาณฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน

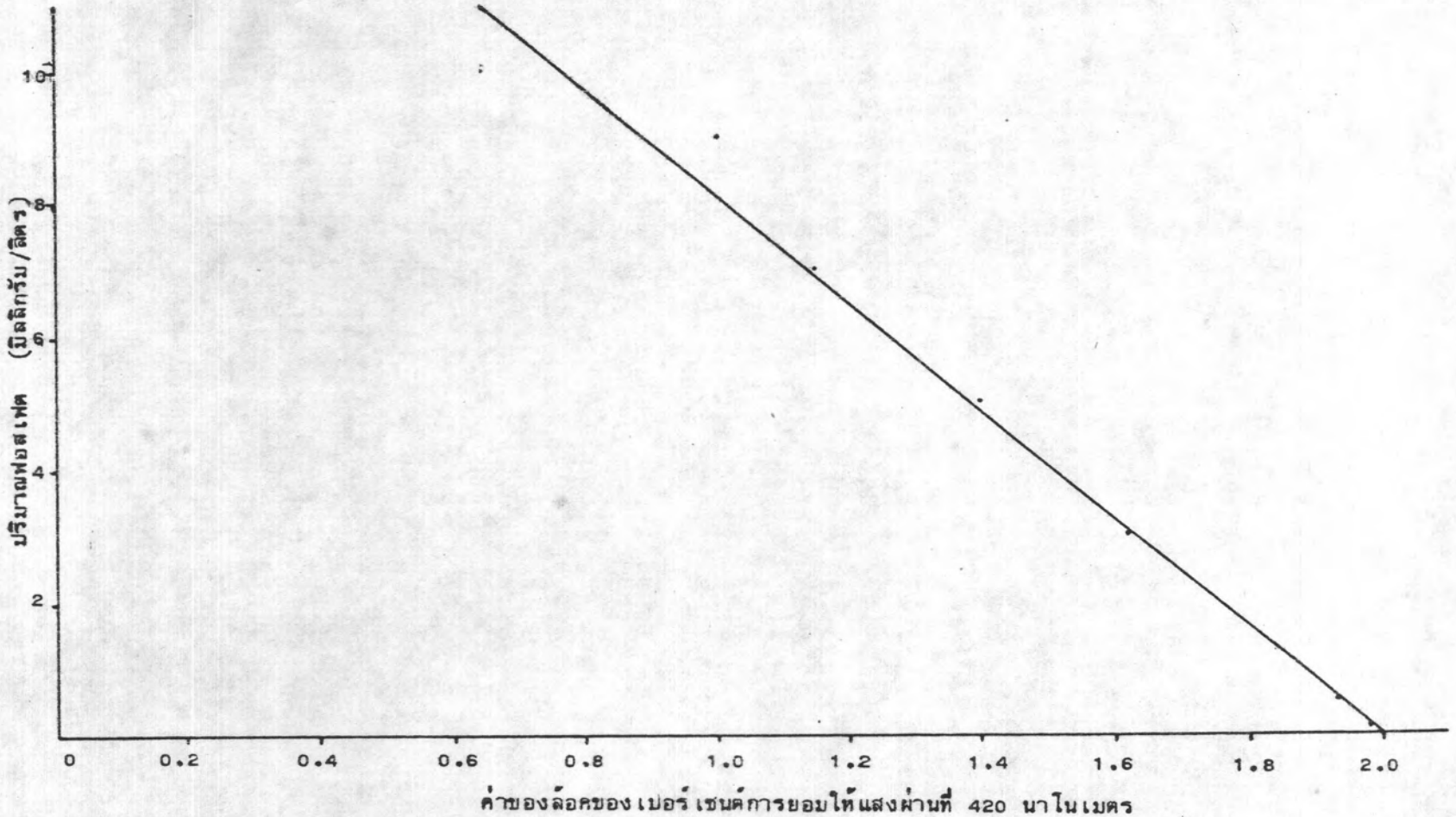
จะต้องทำเส้นกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายฟอสเฟตมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้น 0.1-30 มิลลิกรัม/ลิตร

การคำนวน

$$\text{ปริมาตรฟอสเฟต} = \frac{\text{มิลลิกรัมฟอสเฟต} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

10. การหาน้ำหนักแห้ง (Calam, 1969)

นำจานอะลูมิเนียมมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซนติเกรด นาน 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccator) ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งมาเข้าเครื่องเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วใส่ในจานอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ นำไปอบแห้งอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซนติเกรด นาน 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักจานอะลูมิเนียมที่เพิ่มขึ้น คือน้ำหนักของเซลล์แห้งต่อปริมาตรตัวอย่างที่ใช้



กราฟที่ 47 กราฟมาตรฐาน การหาปริมาณฟอสเฟต โดยวิธี อะมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิด

ประวัติผู้เขียน

นายสันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ เกิดวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2501 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2522 ปัจจุบันปฏิบัติงานในตำแหน่ง นักวิชาการ 4 ประจำห้องปฏิบัติการ เทคโนโลยีการหมัก สาขาวิจัยอุตสาหกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย