ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

1. **Modified Chu 13** (Largeau *et al*.,1980)

KNO_3	0.2	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.1	กรัม
$CaCl_2$.$2H_2O$	0.054	กรัม
Fe citrate	0.01	กรัม
citric acid	0.1	กรัม
micro element ประกอบด้วย		
H_3BO_3	2.85	กรัม
$MnCl_2$.$4H_2O$	1.8	กรัม
$ZnSO_4$.$7H_2O$	0.02	กรัม
$CuSo_4$.$5H_2O$	0.08	กรัม
CoCl2.$6H_2O$	0.08	กรัม
Na_2MoO_4.$2H_2O$	0.05	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.7 (เท่ากับค่ากรด-เบสของน้ำในอ่างน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ด้วย KOH 0.1 N

2. **Kratz and Myers media** (Gelpi *et al*., 1970 อ้างโดย Vongprasert, 1986)

KNO_3	4.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.25	กรัม
Na citrate	0.165	กรัม
$Ca(NO_3)_2$.$4H_2O$	0.025	กรัม
$Fe(SO_4)_3$.$6H_2O$	0.004	กรัม
A-5 microelement	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.7 (เท่ากับค่ากรด-เบสในอ่างน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ด้วย KOH 0.1 N

A-5 microelement ประกอบด้วย

H_3BO_3	2.86	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.81	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.079	กรัม
MoO_3 (85%)	0.0177	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.
วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้ง

1. ซีโอดี (APHA, AWWA, AND WPCF, 1995)

1.1 สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์แมล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) 0.12 กรัม แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นบรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์แมล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต $[Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2.6H_2O]$ จำนวน 39 กรัมในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.25 นอร์แมล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์แมล)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl^-) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl^- =10 : 1

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตรท์เท่านั้น

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1. เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม
2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass beads) 3-5 เม็ด
4. ค่อย ๆ เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)
5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับ ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น
6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินไปเป็นสีน้ำตาลปนแดง
7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ 1-6)

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1,000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (มล.)}}$$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์แมล)

2. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C.,1990)

2.1 สารเคมี

1. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
2. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$)
   - ละลายผงเมอร์คิวรีออกไซด์จำนวน 10 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 12 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 92 มิลลิลิตร
3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 60

- ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมล
7. อินดิเคเตอร์

- ละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม และเมทิลีบลู 0.1 กรัม และในเอทธานอล (95%) 100 มิลลิลิตร

2.2 <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.5 – 1.0 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัม และเมอร์คิวรีซัลเฟต 5 มิลลิลิตร
3. ใส่ลูกแก้ว
4. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
5. ย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส
6. ปล่อยทิ้งให้เย็น
7. ล้างบริเวณคอขวดด้วยน้ำกลั่นที่ต้มร้อนจนทั่ว
8. ย่อยต่อจนกระทั้งหมดควัน
9. ทิ้งให้เย็นแล้วถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
10. จัดอุปกรณ์กลั่นรวมทั้งเปิดสวิทซ์ไฟ และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
11 นำขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 1-2 หยดเรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้
11. เติมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง
12. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60 โดยโซเดียมไธโอซัลเฟตปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง
13. กลั่นนานประมาณ 10 นาที
14. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์แมลสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง
15. ทำ blank ตามข้อ 1-14 โดยไม่ใส่ตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 14}{W}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์แมล)

กรณีคิดปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) คูณด้วย 6.25

3. ปริมาณฟอสเฟตโดยวิธี Ascorbic Method (APHA, AWWA, AND WPCF, 1995)

3.1 สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. ฟีนอฟทาลีน (phenolphalein indicator)

   เตรียมโดยละลาย 0.5 กรัม ของ phenolphalein ใน 50 มิลลิลิตรของ 95 % ethyl alcohol แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และหยด NaOH จนเกิดสีชมพู
3. กรดกำมะถัน (sulfuric acid solution , H_2SO_4 , 5N) เติม 70 มิลลิลิตร ของ H_2SO_4 (conc.) ลงในน้ำกลั่น ทำปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร
4. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท (Ammonium molybdate solution , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$) ละลาย 20 กรัมของ $(NH_4)Mo_7O_{24}$, $4H_2O$) ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดแก้วและแช่ในตู้เย็น
5. สารละลายโพแทสเซียมแอนทิโมนีลทาเทรท (Potassium antimonyl tatrate solution , $K(SbO)C_4H_4O_6$. 1 / $2H_2O$) ละลาย 1.3715 กรัมของ K $(SbO)C_4H_4O_6$. 1 / $2H_2O$ ทำให้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
6. สารละลายกรดแอสคอบิก (Ascorbic acid solution)

   ละลาย 1.76 กรัม ของ Ascorbic acid ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 อาทิตย์)
7. Mixed reagent

   เติม 5 มิลลิลิตร ของ Potassium antimony tatrate solution ลงใน 50 มิลลิลิตร ของ H_2SO_4 (5N) ผสมให้เข้ากันเติม Ascorbic acid 30 มิลลิลิตร แล้วผสมเช่นเดิม (สารนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่วิเคราะห์ และไม่ควรผสมทิ้งไว้เกิน 4 ชั่วโมง)

8. Stock phosphorus solution

ละลาย 0.2197 กรัม KH_2PO_4 (โดยอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แล้วเติม 1 มิลลิลิตรคลอโรฟอร์ม สารละลายนี้จะต้องเก็บไว้ในตู้เย็น และจะเก็บไว้ใช้ได้นาน (1 มิลลิลิตร = 50 ไมโครกรัม)

9. Standard phosphorus

น้ำ Standard phosphorus 50 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (1 มิลลิลิตร = 2.5 ไมโครกรัม)

3.2 วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร เติม Phenolpthaline 1 หยด ถ้ามีสีปรับให้ไม่มีสีด้วย 5 N H_2SO_4

2. เติม 8 มิลลิลิตร mixed reagent ลงในน้ำตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน ถ้ามีฟอสฟอรัส ก็จะเกิดสีฟ้า ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) โดยใช้ mixred reagent เป็นสารอ้างอิงแล้วกำหนดหาค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐาน

4. ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite) โดยวิธี Colorimetric Method (APHA, AWWA, AND WPCF, 1995)

4.1 สารเคมี

1. น้ำที่ปราศจากอิออน (de – ionization water)
2. สารละลายสี (Color reagent)

น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรด Phosphoric 100 มิลลิลิตร (Phosphoric acid 85 %) และเติม 10 กรัม ของ sulfanilamide หลังจากละลาย Sulfanilamide จนสมบูรณ์ เติม 1 กรัม ของ N – (1 - naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ผสมสารละลายให้เข้ากันดี ทำปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร (สารละลายนี้สามารถเก็บได้ 1 เดือน ถ้าเก็บในขวดสีชาในตู้เย็น)

3. Stock Nitrite Solution

ละลาย $NaNO_2$ 1.232 กรัม ในน้ำกลั่นทำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร (สารละลายมีความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร = 250 ไมโครกรัม)

4. Standard Nitrite

นำ Stock 10 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นในไนไตรท์ 1 มิลลิลิตร = 2.5 ไมโครกรัม

4.2 วิธีการวิเคราะห์

1. ถ้าตัวอย่างน้ำมีความขุ่น นำมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ขนาดตา 0.45 ไมโครเมตร ถ้า pH ของน้ำที่นำมาวิเคราะห์มีค่า pH ไม่อยู่ในช่วง 7-9 ให้ปรับ pH ด้วย 1 N ของ HCl (ถ้า pH มากกว่า 9) หรือ NH_4OH (ถ้า pH น้อยกว่า 7)
2. นำน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร เติม color reagent 2 มิลลิลิตรผสมสารให้เข้ากัน
3. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer (ให้วัดสีภายใน 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง จะเกิดสีชมพูหลังจากเติม color reagent)
4. การหาความเข้มข้น โดยนำสารละลายมาตรฐาน เติม color reagent มาวัดสีและเขียนกราฟ ทำการอ่านความเข้มข้นของน้ำตัวอย่างเช่นเดียวกัน

5. ปริมาณไนเตรท (Nitrate) โดยวิธี Cadmium reduction method (APHA, AWWA, AND WPCF, 1995)

5.1 สารเคมี

1. น้ำที่ปราศจากอิออน (de – ionization water)
2. สารละลาย NH_4Cl-EDTA : ละลาย 13 กรัมของ NH_4Cl และ 1.7 กรัม ของ disodium ethylenediamine tetracetate (EDTA) ในน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 8.5 โดยการเติม NH_4OH หลังจากนั้นทำปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
3. Dilute ammonioum Chloride – EDTA solution ตวงปริมาตรสารละลาย NH_4Cl-EDTA 300 มิลลิลิตร และทำให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
4. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) : 6 Nนำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมกับน้ำอัตราส่วน 1 : 1
5. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 % ($CuSO_4$)ละลาย 20 กรัม ของ $CuSO_4$ ในน้ำ 500 มิลลิลิตร และทำปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
6. Color reagent : เตรียมเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์
7. Copper – Cadmium granules

   ชั่ง 25 กรัม ของ Cd granule ใหม่ (สำหรับ 1 columm) ล้างด้วยกรด HCl 6 N เทกรดทิ้ง ล้าง Cd granule ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งน้ำที่มี Cd granule มี pH มากกว่า 5 จากนั้นเทน้ำทิ้ง เติม 100 มิลลิลิตรของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 % ($CuSO_4$) คน Cd granule ด้วยแท่งแก้วคน ประมาณ 5 นาที หรือจนกระทั่งเกิดตะกอนคอลลอยด์สี

น้ำตาลแดง (ถ้ายังไม่เกิดคน Cd จนสารละลาย $CuSO_4$ สีจาง เททิ้งและเติมสารละลาย $CuSO_4$ ลงไปใหม่ จนกระทั่งเกิดคอลลอยด์สีน้ำตาล เทน้ำทิ้งเบา ๆ โดยเทตะกอนคอลลอยด์สีน้ำตาลทิ้ง โดยที่ Cd granule มีน้ำอยู่ตลอดเวลา ห้ามให้แห้ง) ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งตะกอนคอลลอยด์หมด ถ้าแห้งเติมน้ำ

8. Stock Nitrate Solution

   อบ KNO_3 ในตู้อบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desicator ชั่ง KNO_3 ที่อบแล้ว 0.7218 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลาย 1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัม)

9. Standard Nitrate

   นำ Stock 100 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของไนไตรท์ 1 มิลลิลิตร = 10 ไมโครกรัม

<u>5.2 วิธีวิเคราะห์</u>

1. ถ้าตัวอย่างน้ำมีความขุ่น นำมากรองด้วยกระดาษ GF/C ขนาดตา 0.45 ไมโครเมตร และวัด pH ต้องปรับ pH ของน้ำตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 7 – 9 ด้วย HCl หรือ NH_4OH
2. การเตรียม Reduction Column

   เติม glass wool ลงไปที่ก้นของ Reduction Column และเติมน้ำให้เต็ม เติม Cd granule ที่เตรียมไว้ โดยค่อย ๆ เติม อย่าให้ช้ามากนัก จนได้ความยาวของ Cd ใน column 18.5 เซนติเมตร ต้องมีน้ำอยู่เหนือ Cd granule ตลอดเวลา อย่าให้ เติม Cd granule สัมผัสกับอากาศ ล้าง column ด้วยการเติม dilute NH_4Cl-EDTA ใน column ผ่าน dilute NH_4Cl-EDTA solution ประมาณ 200 มิลลิลิตร และความเร็วของน้ำไหลผ่าน column จะอยู่ระหว่าง 7 – 10 มิลลิลิตร ต่อนาที
3. นำน้ำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย dilute NH_4Cl-EDTA 75 มิลลิลิตร (ได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร) ผสมกันเติมสารละลายลงไปใน column รองรับน้ำที่ออกจากปลาย column โดยนำตัวอย่างที่ผ่าน column 25 มิลลิลิตร แรกให้เททิ้ง รองรับน้ำตัวอย่างอีก 50 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาไนไตรท์ต่อไป ที่เหลืออีก 25 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้ง สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันก็ทำทำนองเดียวกัน ผ่าน column และรองรับน้ำที่ผ่าน column 50 มิลลิลิตร โดยให้ผ่านความเข้มข้นน้อยๆ ก่อน
4. หลังจากรองรับน้ำตัวอย่างที่ผ่าน column 50 มิลลิลิตร เติม color reagent 2 มิลลิลิตร ทันที (อย่าทิ้งไว้นานเกิน 15 นาที) ตั้งไว้ประมาณ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ส่วนสารละลายมาตรฐาน ก็ทำในทำนองเดียวกัน

5. การคำนวณ เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้น แล้วนำไปหักลบกับปริมาณ nitrite ในน้ำตัวอย่างก่อน (ดังนั้นควรจะหาปริมาณ nitrite ก่อน แล้วเก็บตัวอย่างน้ำแช่ตู้เย็นเพื่อมาหาไนเตรทถ้าไม่สามารถทำเสร็จภายในวันเดียวกัน) จึงจะเป็นปริมาณ NO_3 จริง ๆ

6. ปริมาณแอมโมเนีย (Ammonia) โดยวิธี Phenate Method (APHA, AWWA, AND WPCF, 1995)

6.1 สารเคมี

1. น้ำที่ปราศจากอิออน (de – ionization water)
2. สารละลายฟีนอล (phenol solution)
   ผสมสารละลายฟีนอล 11.1 มิลลิลิตร กับเอธิลแอลกอฮอล์ 95% 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บได้ประมาณ 1 อาทิตย์
3. โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 0.5 % (sodium nitroprusside 0.5%)
   ละลายไนโตรปรัสไซด์ 0.5 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาได้ ประมาณ 1 เดือน
4. อัลคาไลด์ซิเตรท (alkaline citrate)
   ละลายไตรโซเดียมซิเตรท (trisodium citrate) 200 กรัม กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) 10 กรัมในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
5. โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% (Sodium hypochlorite 5%)
6. Oxidizing solution
   ผสมสารละลายอัลคาไลด์ซิเตรท 100 มิลลิลิตร กับโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 5% 25 มิลลิลิตร
7. สารละลายบอเรทบัฟเฟอร์
   เติม 88 มิลลิลิตร 0.1 นอร์มัล NaOH ลงใน 500 มิลลิลิตร 0.025 โมลาร์โซเดียมเตตราบอเรท ($Na_2B_4O_7$) (5 กรัม $Na_2B_4O_7$ หรือ 9.5 กรัม $Na_2B_4O_7$, $10H_2O$ ต่อสารละลาย 1 ลิตร) แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มัล (NaOH 6 N)
   ละลาย NaOH 240 กรัม ในน้ำจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

9. Stock Ammonium Solution

   ละลาย 0.3819 กรัม ของ NH_4Cl (อบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง) และทำปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัม = 122 ไมโครกรัม NH_3)

10. Standard Ammonium

    น้ำ Stock Ammonium 5 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของไนไตรท์ 1 มิลลิลิตร = 0.5 ไมโครกรัม

6.2 วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำตัวอย่างมาปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 ด้วย NaOH 6 นอร์มัล
2. นำตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร เติมบอเรทบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วย NaOH 6 นอร์มัล เติมเม็ดแก้ว 2 – 3 เม็ด นำไปกลั่น
3. การกลั่น เพื่อลดความสกปรกจากสิ่งภายนอก ให้มากที่สุด ปล่อยเครื่องมือให้อยู่ในสภาพเดิมหลังจากกลั่นเสร็จแล้วจนกว่าจะเริ่มทำการกลั่นตัวอย่างจึงจะถอดขวดกลั่นออกและเปลี่ยนขวดกลั่นที่ใส่ตัวอย่างแทนที่ กลั่นด้วยอัตรา 6 – 10 มิลลิลิตรต่อนาที โดยให้ปลายหลอดที่ต่อนำไอน้ำและแอมโมเนียที่กลั่นออกมาจุ่มใต้สารละลายกรดบอริค เก็บ distillate อย่างน้อย 200 มิลลิลิตร แล้วจึงดึงปลายหลอดให้พ้นผิวสารละลาย ทำการกลั่นต่อประมาณ 2 นาที เพื่อทำความสะอาด condenser และหลอด นำ distillate ออกมาเจือจางจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากอิออน
4. นำน้ำที่กลั่นแล้ว 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 1 มิลลิลิตร แล้วเติม oxidizing solution 2.5 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร (เก็บได้ 24 ชั่วโมง)

7. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1995)

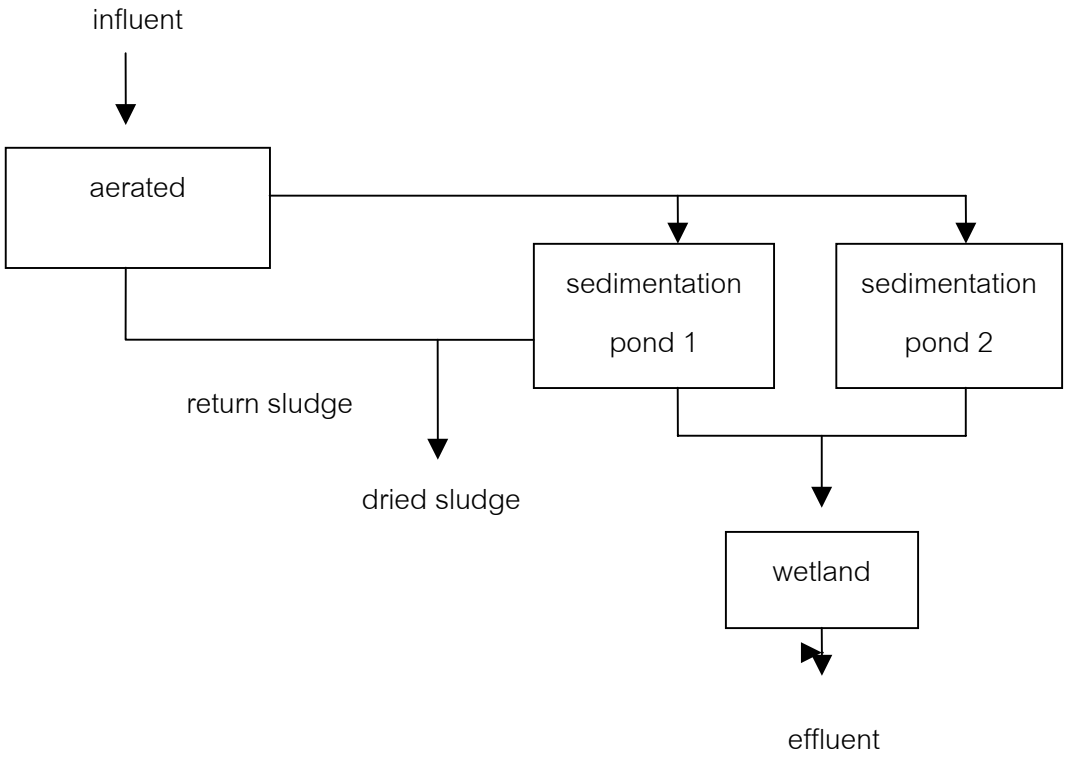
4.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. เดซิกเคเตอร์
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด

4.2 วิธีการวิเคราะห์

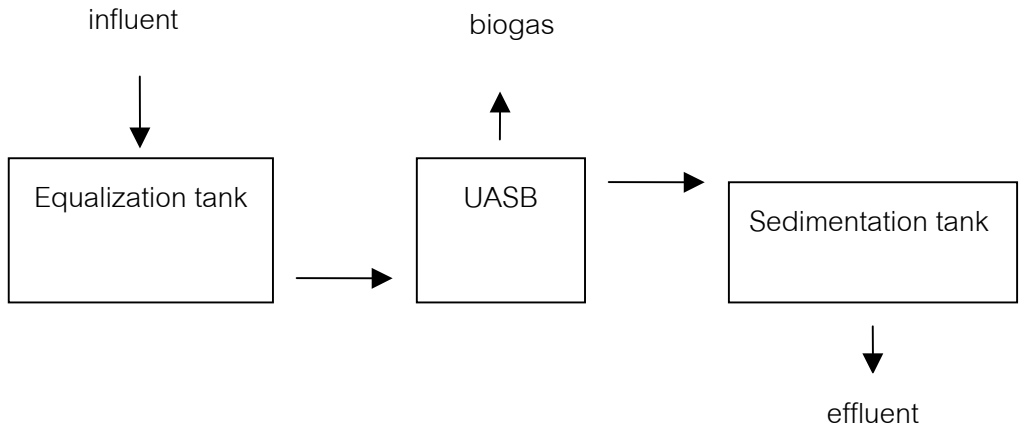
1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ประมาณ 45 นาที
6. ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มก.)} \times 1{,}000}{\text{มล. ตัวอย่าง}}$$



ภาพผนวกที่ ข1 แผนภูมิแสดงบ่อบำบัดน้ำทิ้งของโรงงานทรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน)

Figure-Appendix B1 Flow chart of water treatment of Tropical canning company



ภาพผนวกที่ ข2 แผนภูมิแสดงบ่อบำบัดน้ำทิ้งของบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์ จำกัด (มหาชน)

Figure-Appendix B2 Flow chart of water treatment of Chotiwat frozen company

ภาคผนวก ค.
การวิเคราะห์การเติบโตของสาหร่าย

1. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (Vonshak and Borowitzka, 1991)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 70 องศาเซลเซียส
3. เดซิกเคเตอร์
4. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด
5. เครื่องกรองเซลล์
6. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
7. กระดาษกรองเซลล์ GF/C

1.2 วิธีการ

1. นำจานเพาะเชื้ออบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำออกใส่ในเดซิกเดเตอร์ เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

2. เลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ใช้ทดลอง จนเซลล์เจริญสูงสุดนำเซลล์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 435 นาโมเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 ส่วน blank ใช้น้ำกลั่น

3. นำเซลล์ที่ระดับความขุ่นต่าง ๆ ประมาณ 20 มิลลิลิตร กรองด้วยเครื่องกรองเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น

4. นำกระดาษกรองซึ่งมีเซลล์สาหร่ายติดอยู่ ใส่ในจานเพราะเชื้อแล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. นำจานเพราะเชื้อใส่ในในเดซิกเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

6. บันทึกค่าความขุ่น กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ (กรัมต่อลิตร) และพล้อตกราฟของค่าที่ได้เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง

2. การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคาโรทีนอยด์ (Borowitzka and Borowitzka, 1988)

2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
2. คิวเวต (cuvettes)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
4. เครื่องบด (tissue grinder)
5. เครื่องกรองแบบสุญญากาศ
6. หลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตรพร้อมฝาเกลียว
7. กระดาษกรอง ขนาดตา 0.45 ไมโครมิเตอร์
8. สารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนต
9. สารละลายอะซิโตน 90 เปอร์เซนต์

2.2 วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตรมากรองด้วยกระดาษกรองขนาดตา 0.45 ไมโครมิเตอร์ เติมสารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนตลงไปเล็กน้อยก่อนกรอง เพื่อเคลือบกระดาษกรองช่วยให้ประสิทธิภาพการกรองดีขึ้น

2. ม้วนกระดาษกรองให้แพลงก์ตอนพืชอยู่ด้านในใส่ในหลอดแก้วความจุประมาณ 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะซีโตน 90% ลงไป 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง

3. นำมาบดนาน 1 นาทีด้วยเครื่องบด เทสารละลายลงในหลอดปั่น นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที รินน้ำใสวัดปริมาตรแล้วนำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750, 664, 647 และ 452 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 เป็นค่าความขุ่น นำค่านี้ไปลบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664, 647 และ 452 นาโนเมตร

4. คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ a และคาโรทีนอยด์ จากสูตรต่อไปนี้ อ่านค่าเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คลอโรฟิลล์ a (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $= (11.93 \times E_{664}) - (1.93 \times E_{647})$

คาโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $= E_{452} \times 3.86 \times \frac{\text{ปริมาตรอะซิโตนที่สกัดได้}}{\text{ปริมาตรอะซิโตนที่นำมาสกัด}}$

E = ค่าการดูดกลืนแสง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ค่าความหนาแน่นสาหร่ายและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Botryococcus braunii* เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 (MC13) และ Kratz and Myers (K&M)

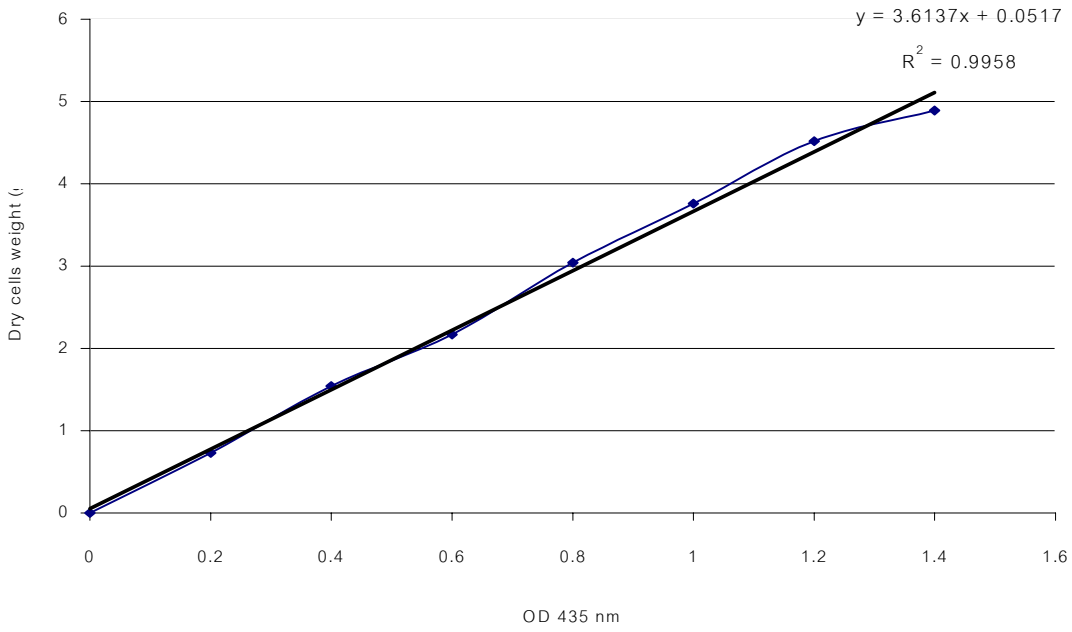
Table-Appendix C1 Optical density and dried cells weight of *Botryococcus braunii* in Modified Chu 13 (MC13) และ Kratz and Myers (K&M)

Optical Density	Dried cells weight (g/l)	
(OD_{435})	MC13	K&M
0.2	0.73	0.28
0.4	1.54	0.55
0.6	2.17	0.77
0.8	3.04	0.96
1.0	3.76	1.18
1.2	4.52	-
1.4	4.89	-

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ค่าความหนาแน่นสาหร่ายและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Botryococcus braunii* เลี้ยงในน้ำทิ้งค่ากรด-เบส 6.7 และน้ำทิ้งที่ปรับปริมาณสารอาหารค่ากรด-เบส 6.7

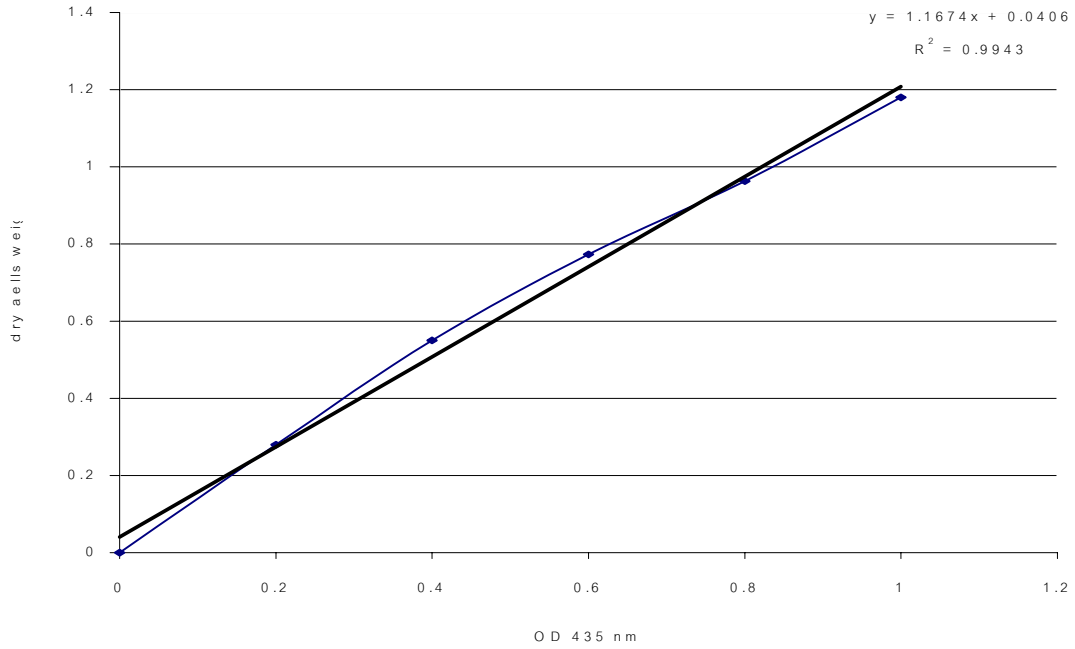
Table-Appendix C2 Optical density and dried cells weight of *Botryococcus braunii* in effluent (pH 6.7) and and effluent adjusted nitrate (pH 6.7)

Optical Density	Dried cells weight (g/l)	
(OD_{435})	Effluent (pH 6.7)	Effluent adjusted nitrate (pH 6.7)
0.2	0.64	0.45
0.4	1.41	0.91
0.6	2.04	1.32
0.8	2.74	1.71
1.0	3.38	2.18
1.2	4.12	2.55
1.4	4.76	3.01



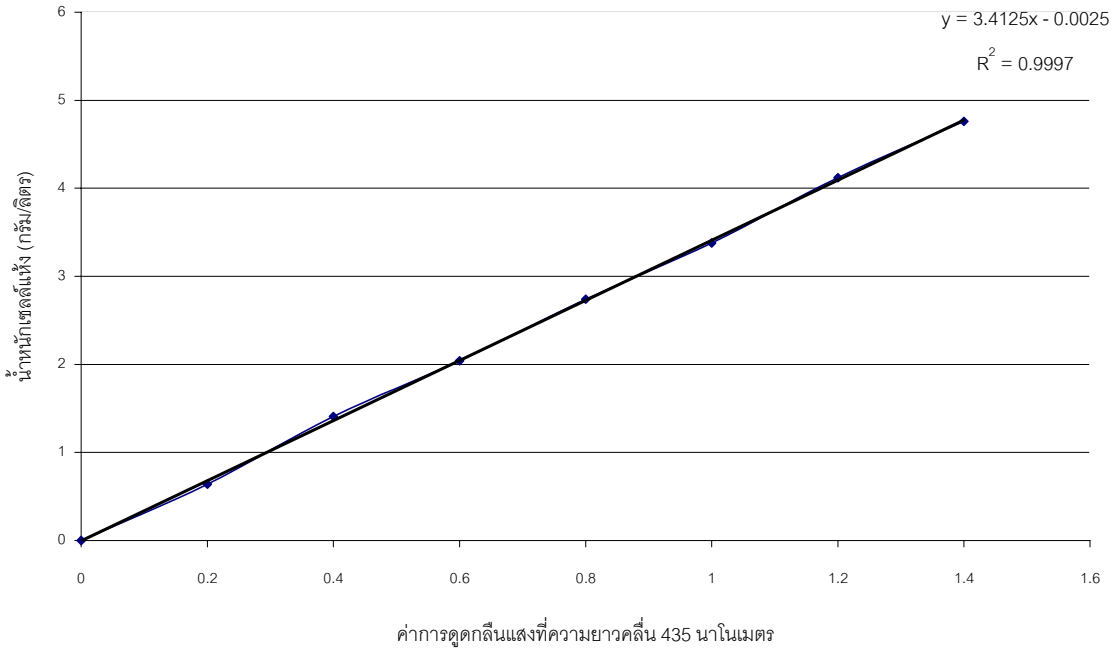
ภาพภาคผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Botryococcus braunii* ในอาหาร Modified Chu 13

Figure-Appendix C1 Standard curve of dry cells weight of *Botryococcus braunii* in Modified Chu 13 medium



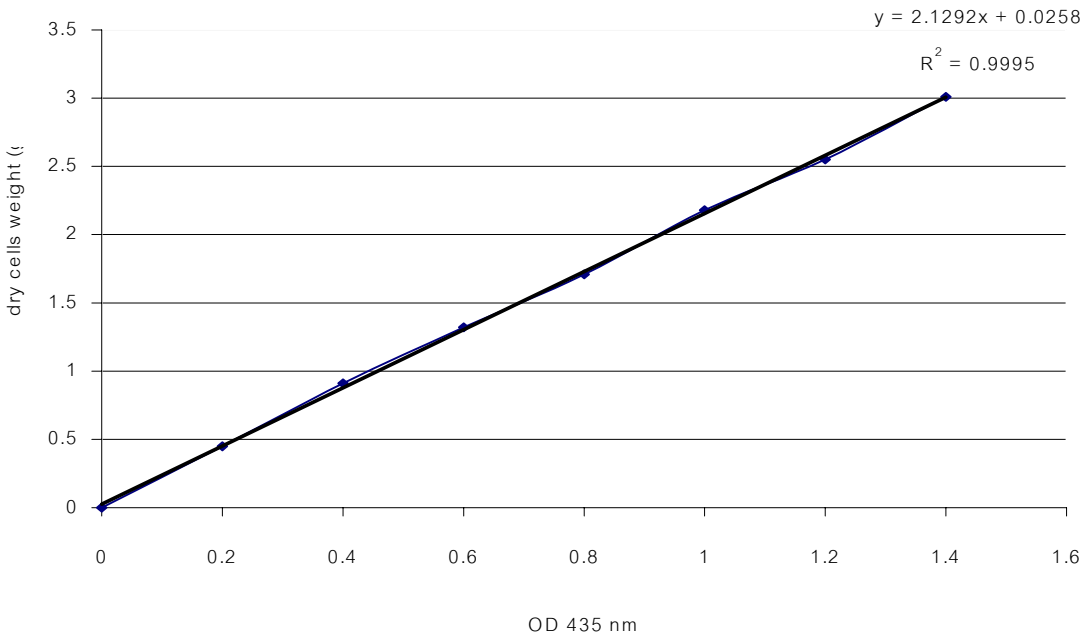
ภาพภาคผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Botryococcus braunii* ในอาหาร Kratz and Myers

Figure-Appendix C2 Standard curve of dry cells weight of *Botryococcus braunii* in Kratz and Myers medium



ภาพภาคผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Botryococcus braunii* ในน้ำทิ้งค่ากรด-เบส 6.7

Figure-Appendix C3 Standard curve of dry cells weight of *Botryococcus braunii* in effluent pH 6.7



ภาพภาคผนวกที่ ค4 กราฟมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Botryococcus braunii* ในน้ำทิ้งที่ปรับปริมาณสารอาหารค่ากรด-เบส 6.7

Figure-Appendix C4 Standard curve of dry cells weight of *Botryococcus braunii* in effluent adjusted nitrate pH 6.7

ภาคผนวก ง.
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ง1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณคาโรทีนอยด์ในน้ำทิ้งโดยใช้ Tukey (HSD) comparision of means

Table-Appendix D1 Comparision of carotenoid average in effluent by Tukey (HSD) comparision of means

(I) MEDIA	(J) MEDIA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.21856667	6.8905217E-02	.044*	-.42998757	-7.14576434E-03
	3	-.25576667	6.8905217E-02	.023*	-.46718757	-4.43457643E-02
2	1	.21856667	6.8905217E-02	.044*	7.1457643E-03	.42998757
	3	-3.72000000E-02	6.8905217E-02	.855	-.24862090	.17422090
3	1	.25576667	6.8905217E-02	.023*	4.4345764E-02	.46718757
	2	3.7200000E-02	6.8905217E-02	.855	-.17422090	.24862090

1 Modified Chu 13 pH 6.7

2 Effluent pH 6.7

3 Effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7

$P<0.05$ Significantly different

ตารางภาคผนวกที่ ง2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไฮโดรคาร์บอนในน้ำทิ้งโดยใช้ Tukey (HSD) comparision of means

Table-Appendix D2 Comparision of hydrocarbon average in effluent by Tukey (HSD) comparision of means

(I) MEDIA	(J) MEDIA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.7900	1.4428	.851	-5.2171	3.6371
	3	-.7867	1.4428	.853	-5.2137	3.6404
2	1	.7900	1.4428	.851	-3.6371	5.2171
	3	3.333E-03	1.4428	1.000	-4.4237	4.4304
3	1	.7867	1.4428	.853	-3.6404	5.2137
	2	-3.3333E-03	1.4428	1.000	-4.4304	4.4237

1 Modified Chu 13 pH 6.7

2 Effluent pH 6.7

3 Effluent in which nitrate adjusted nearly equivalence to the Modified Chu 13 pH 6.7

$P<0.05$ Significantly different

ตารางภาคผนวกที่ ง3 การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรคาร์บอนระหว่างความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น 0.2 และ 0.4 (ทำแห้งสาหร่ายด้วยวิธีอบแห้ง) โดยใช้ Tukey (HSD) comparision of means

Table-Appendix D3 Comparision of hydrocarbon average between initial algal density of 0.2 and 0.4 (dried in the oven) by Tukey (HSD) comparision of means

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.620	1	13.620	1.444	.296
Within Groups	37.720	4	9.430		
Total	51.340	5			

P<0.05 Significantly different

ตารางภาคผนวกที่ ง4 การเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรคาร์บอนระหว่างวิธีทำแห้งสาหร่ายด้วยการอบแห้งและการ freeze drying โดยใช้ Tukey (HSD) comparision of means

Table-Appendix D4 Comparision of hydrocarbon average between dried cells in the oven and freeze drying by Tukey (HSD) comparision of means

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	311.472	1	311.472	281.036	.000*
Within Groups	4.433	4	1.108		
Total	315.905	5			

P<0.05 Significantly different