บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการ

วัสดุ

1. น้ำทิ้ง

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter effluent) ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ตรังน้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดตรัง และ บริษัท ศรีเจริญปาล์ม จำกัด จังหวัดกระบี่ เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังมีการสกัดน้ำมันปาล์มเต็มกระบวนการผลิต ตัวอย่างน้ำทิ้งเก็บจากท่อน้ำทิ้งของเครื่องดีแคนเตอร์โดยตรงใส่ภาชนะขนาด 40 ลิตร แล้วรีบนำกลับห้องปฏิบัติการภายใน 1 วัน กรองตัวอย่างน้ำทิ้งผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น ก่อนแบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดขนาด 1.5 ลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อรากลุ่มไวท์รอทในสกุล *Lentinus* spp. จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเห็ด มี 3 กลุ่มหลักดังนี้

(1) เห็ดกระด้าง *Lentinus polychrous* **Lev.** จำนวน 6 สายพันธุ์

(2) เห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* **Mont.** จำนวน 2 สายพันธุ์

(3) เห็ดหูกวาง *Lentinus strigosus* **(Schwein.)Fr.** จำนวน 4 สายพันธุ์

โดยใช้ *Phanerochaete chrysosporium* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ (reference strain)

***Lentinus* spp. ที่ใช้ในการทดลองมีแหล่งที่มาต่างๆ ดังนี้**

เชื้อเห็ดจากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่

เห็ดกระด้าง 1(*Lentinus polychrous* LP-P-1)

เห็ดกระด้าง 2 (*Lentinus polychrous* LP-P-2)

เห็ดขอนขาว 3 (*Lentinus squarrosulus* SQ-B-3)

เห็ดขอนขาว 4 (*Lentinus squarrosulus* SQ-B-4)

เห็ดหูกวาง (*Lentinus strigosus* ST-B-1)

เชื้อเห็ดจากความอนุเคราะห์ของ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันณ์ เพชรรัตน์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่

เห็ดหูกวาง (*Lentinus strigosus* ST- K-2)

เห็ดหูกวาง (*Lentinus strigosus* ST-S-3)

เห็ดหูกวาง (*Lentinus strigosus* ST-Y-4)

เชื้อเห็ดจากความอนุเคราะห์ของ ดร. ชริดา ปุกหุต เป็นเห็ดกระด้าง จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่

Lentinus polychrous LP-PT-1

Lentinus polychrous LP-BR-11

Lentinus polychrous LP-WR-13

Lentinus polychrous LP-SW-3

เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดในหลอดอาหารวุ้นเอียงพีดีเอ (Potato Dextrose Agar: PDA) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลองเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย น้ำสกัดมันฝรั่ง (200 กรัม) น้ำตาล dextrose 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ส่วนอาหาร Potato Detrose Broth (PDB) เตรียมเช่นเดียวกับอาหาร พีดีเอ แต่ในสูตรอาหารไม่มีผงวุ้น

K medium เป็นอาหารสำหรับทดสอบกิจกรรมแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้ออย่างหยาบประกอบด้วย

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.1	กรัมต่อลิตร
Ammonium tartrate	0.5	กรัมต่อลิตร
2,2-dimethylsuccinate	2.2	กรัมต่อลิตร
ปรับพีเอช 5.5		
Agar	25	กรัมต่อลิตร

และเติม 2,2’-azino-bis(3-ethlbenzthaizoline)-6-sulphonate (ABTS) 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับจานทดสอบ ABTS ออกซิเดชั่น (แลคเคส และเปอร์ออกซิเดส) หรือ $MnCl_2.4H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร สำหรับ แมงกานีสออกซิเดชั่น (แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส) (Steffen *et al.* , 2000)

4. สารเคมี

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน ฟีนอล สี และซีโอดี แสดงในภาคผนวก สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ และ สารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอน แสดงในวิธีการ

สารเคมีสำหรับตกตะกอนน้ำทิ้ง raw meal ได้รับอนุเคราะห์จากบริษัทปูนซีเมนต์ไทย จำกัด (มหาชน) โดยความเอื้อเฟื้อของคุณบรรจง วิทยถาวรวงศ์

Raw meal เป็นวัตถุดิบในการผลิตปูนซีเมนต์ มีส่วนผสมของ หินปูน ดินเหนียว ทราย และดินลูกรัง ร้อยละ 85, 8, 4 และ 3 กระบวนการผลิตแสดงรายละเอียดในภาคผนวก 11

อุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Model U-2000 พร้อมเครื่องพิมพ์ของบริษัท Hitachi จำกัด
2. ยูวี สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectroquant® NOVA 60 บริษัท Merck
3. ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี
    - เครื่องให้ความร้อน Spectroquant® TR 320 บริษัท Merck
    - เครื่องอ่านค่าซีโอดี Spectroquant® NOVA 60 บริษัท Merck
4. ICP รุ่น Optima 4300 DV บริษัท Perkin Elmer จำกัด
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert จำกัด
6. ชุดเครื่องมือวัดเจดาห์ลไนโตรเจน (Kjeldahl nitrogen)
    - ชุดย่อยโปรตีน 2006 Digester บริษัท Foss Tecator
    - เครื่องกลั่นกลับโปรตีนอัตโนมัติ 2200 Kjeltec Auto Distillation บริษัท Foss Tecator
    - ตู้ระบายควัน SUPER FLOW
7. เครื่องเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitachi จำกัด
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิของบริษัท Lab-Line Instruments Inc.
9. ตู้อบ 105 องศาเซลเซียส (Hot air oven) ULM.500 บริษัท Moment จำกัด
10. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) SS325 บริษัท Tomy
11. เครื่องวัดพีเอช Model HK-7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronic จำกัด
12. ชุดอุปกรณ์ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ air- lift (air-lift type bio-reactor) ขนาด 3 ลิตร และ MDL-6C Control type บริษัท BEM B. E. Marubishi จำกัด

การวิเคราะห์

1. ค่าซีโอดี (APHA AWWA and WPCF, 1998)

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าซีโอดีระหว่าง 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบสำหรับย่อยตัวอย่างขนาด 16100 มิลลิเมตร และเติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตรความเข้มข้น 0.01667 นอร์มอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดกลั่นตัวอย่างใส่เตากลั่นกลับที่อุ่นเครื่องไว้แล้วเป็นเวลา 15 นาที กลั่นกลับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 148 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเตา

นำสารละลายตัวอย่างที่กลั่นกลับเรียบร้อยแล้วไทเทรทกับสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเริ่มจากเทสารละลายในหลอดใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ชะสารละลายที่ตกค้างในหลอดด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ใช้น้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

2. ค่าสี วัดค่าสีที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (APHA AWWA and WEF, 1998)

นำตัวอย่างน้ำทิ้งหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที่ นาน 7 นาที นำส่วนใสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำน้ำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เปรียบเทียบหน่วยสีกับสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทติเนท

3. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) วิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีการของ APHA AWWA และ WEF (1998)

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าฟีนอลระหว่าง 0 - 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 5 มิลลิลิตร เติมโฟลินส์ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร และน้ำยาคาร์บอเนต-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร รอให้เกิดสี 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

4. ของเข็งทั้งหมด (Total solid : TS) APHA AWWA และ WPCF (1998)

ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้งที่ผ่านการกรองแยกเส้นใยออกแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำถ้วยไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ จากนั้นอบถ้วยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 นาที แล้วชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

5. น้ำหนักเส้นใยแห้ง (Mycelia dry weight) (AOAC., 1999)

กรองตัวอย่างน้ำทิ้งและเส้นใยปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผ่านผ้าขาวบางซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยบนผ้าขาวบางวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 45 นาที ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน กรณีหาน้ำหนักเส้นใยแห้งของเชื้อที่ถูกตรึงบนฟองน้ำ ต้องนำน้ำหนักแห้งของฟองน้ำในน้ำทิ้ง (ชุดควบคุมไม่เติมเชื้อ) หักลบออกจากน้ำหนักฟองน้ำรวมกับเส้นใย ซึ่งเป็นน้ำหนักของเส้นใยสุทธิ

6. น้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi- Nelson (Nelson, 1944)

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีน้ำตาลอยู่ระหว่าง 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบขนาดกลาง ตามด้วย Somogyi Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นเติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร blank เติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกัน เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟ มาตรฐาน (ไซโลสหรือกลูโคส)

7. โปรตีนที่ละลายได้วิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที แยกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีโปรตีนความเข้มข้นระหว่าง 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ ตามด้วยสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วจึงทำให้เย็น จากนั้นเติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย Folin- ciocatrus phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

8. เจดาห์ลไนโตรเจนทั้งหมด (AOAC., 1999)
9. ฟอสฟอรัสทั้งหมด ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
10. โลหะ ทองแดง เหล็ก และ แมงกานีส ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การวิเคราะห์ข้อ 1- 10 แสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ 1-10

วิธีการ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ด *Lentinus* spp. ที่สามารถบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.1 คุณลักษณะน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์

วิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์จากทั้งสองโรงงาน โดยวัดค่าซีโอดี หน่วยสี ปริมาณฟีนอล ของแข็งทั้งหมด ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโลหะ เหล็ก ทองแดง และแมงกานีส

1.2 ผลของความเข้มข้นสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

1.2.1 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นน้ำทิ้งในอาหารแข็งน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

เจือจางน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 เติมผงวุ้นร้อยละ 1.5 เพื่อเตรียมเป็นอาหารแข็ง กระตุ้นเชื้อเริ่มต้นโดยการถ่ายเส้นใยเห็ดของแต่ละสายพันธุ์ลงบนจานอาหารพีดีเอ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ตัดเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารพีดีเออายุ 5 วัน บริเวณขอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งระดับความเจือจางต่างๆ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องกระทั่งเส้นใยเจริญ สังเกตและบันทึกการเจริญของเส้นใยและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดที่สามารถเจริญและกำจัดสีน้ำทิ้งที่ระดับความเจือจางต่ำที่สุด ใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

1.2.2 การคัดเลือกระดับความเข้มข้นน้ำทิ้งในอาหารน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์เจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเจือจาง 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3 แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร ตัดเส้นใยเห็ดที่กำลังเจริญบนอาหารพีดีเอ อายุ 5 วัน บริเวณขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำทิ้งดีแคนเตอร์แต่ละความเจือจาง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที สังเกตการเจริญของเส้นใยและบันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีเส้นใยปรากฏ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่าซีโอดีและฟีนอล เลือกระดับน้ำทิ้งที่เชื้อสามารถเจริญได้ในการทดลองต่อไป

1.3 การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดที่ถูกตรึงบนฟองน้ำ

จากผลการทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดจากจานอาหารพีดีเอ อายุ 5 วัน ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ รวมทั้ง *P. chrysosporium* ไม่สามารถเจริญในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของบริษัท ศรีเจริญปาล์ม

จำกัด ซึ่งเลือกใช้ในการทดลอง จึงทดลองบำบัดด้วยเส้นใยที่ถูกตรึงบนฟองน้ำ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เห็ด *Lentinus* spp. ที่สามารถบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์

การตรึงเส้นใยเชื้อราบนฟองน้ำ

เตรียมฟองน้ำโพลียูรีเทนสำหรับตรึงเส้นใยโดยตัดฟองน้ำให้มีขนาด ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นล้างน้ำสะอาด 1 ครั้งเพื่อกำจัดสีและเศษฟองน้ำ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อในน้ำกลั่นที่สภาวะเดียวกับการนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อกำจัดสีส่วนเกินและสารเคมีที่อาจออกมาระหว่างการฆ่าเชื้อ 1 ครั้งก่อนใช้งาน (D' Anninale *et al.* 1998)

การตรึงเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. เริ่มจากการตัดเส้นใยเห็ดบนจานอาหารพีดีเอ อายุ 5 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากบริเวณขอบโคโลนี ถ่ายเชื้อลงในอาหารพีดีบี 100 มิลลิลิตรที่มีชิ้นฟองน้ำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้น ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (วิธีการดัดแปลงจาก D' Anninale *et al.* 1998)

การทดลองบำบัดและกำจัดสีน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์โดยเส้นใยเห็ดที่ถูกตรึง แบ่งน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเส้นใยที่ถูกตรึงบนฟองน้ำอายุ 7 วัน จำนวน 10 ชิ้น บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที สังเกตและบันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีเส้นใยปรากฏ และการเปลี่ยนแปลงของสีที่ปรากฏ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่า ซีโอดี และฟีนอล

คัดเลือกเห็ดสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการกำจัดสีและซีโอดีสูงสุด 4 อันดับแรก เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป หาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ กับค่าสี

1.4 ชนิดของเอนไซม์จากเห็ด *Lentinus* spp.

การทดสอบเชิงคุณภาพของการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติก 2 ชนิด คือ แลคเคส และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส โดยตัดเลี้ยงชิ้นเส้นใยเห็ดบนอาหาร พีดีเอ อายุ 5 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรบริเวณขอบโคโลนี เลี้ยงบนอาหารแข็ง K medium (Steffen *et al*., 2000) โดยเติมสับสเตรต ABTS สำหรับเอนไซม์ แลคเคสและเปอร์ออกซิเดส หรือ $MnCl_2.4H_2O$ สำหรับเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทุกวัน (Steffen *et al*., 2000)

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพ (qualitative)

(1) กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเปอร์ออกซิเดส

เลี้ยงชิ้นเส้นใย (จากจานอาหาร พีดีเอ) บนจานอาหารแข็งสำหรับทดสอบกิจกรรมแลคเคส ซึ่งมีสับสเตรต ABTS สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส สีของอาหารจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียว (Steffen *et al*., 2000)

(2) กิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

เลี้ยงชิ้นเส้นใย (จากจานอาหาร พีดีเอ) บนจานอาหารแข็งสำหรับทดสอบกิจกรรมแมงกานีสเปออร์ออกซิเดส ซึ่งมีสับสเตรตเป็น $MnCl_2$ (Steffen *et al*., 2000) สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส สีของอาหารจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาลดำ

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการลดสีของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เส้นใยเห็ด

2.1 ผลของไนโตรเจน

2.1.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน

บำบัดน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ด้วยเส้นใยเห็ด *Lentinus* spp. ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำอายุ 7 วัน จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ เติมแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต (อย่างใดอย่างหนึ่ง) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน สังเกตและบันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีเส้นใยปรากฏ และการเปลี่ยนแปลงของสีที่ปรากฏ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่าซีโอดี คัดเลือกแหล่งไนโตรเจน 1 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการบำบัดและกำจัดสี น้ำทิ้งดีแคนเตอร์

2.1.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 แต่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้เป็นร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lentinus* sp. 1 สายพันธุ์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ ซึ่งเหมาะสมต่อการบำบัดและกำจัดสีของ น้ำทิ้งดีแคนเตอร์ รายงานผลในรูปอัตราส่วน COD: N

2.2 ผลของอิออนโลหะ

2.2.1 ผลของคอปเปอร์อิออน

เปรียบเทียบผลการบำบัดและกำจัดสีของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ สำหรับชุดการทดลองที่มีการเติมโลหะ และผลการทดลองของการบำบัดโดยไม่มีการเติมโลหะ ใช้เส้นใยเห็ดสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ 2.1) ที่ถูกตรึงบนฟองน้ำ เติมแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 2.1.1 และ 2.1.2) เติมคอบเปอร์ซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของคอบเปอร์อิออนที่เติมเป็น 0, 1.0, 1.5 และ 2.0 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

2.2.2 ผลของเหล็กอิออน

เติมเฟอรัสรัสซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเฟอร์รัสอิออนที่เติมเป็น 0, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

2.2.3 ผลของแมงกานีสอิออน

เติมแมงกานีสซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแมงกานีสอิออนที่เติมเป็น 0, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm

การทดลองข้อ 2.1 และ 2.2 ต้องแยกฆ่าเชื้อสารเคมีที่เติมโดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นแล้วกรองผ่านเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนเติมลงในน้ำทิ้งหลังการนึ่งฆ่าเชื้อน้ำทิ้ง

2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ปรับพีเอชของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0 6.0 และ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮดรอครอริก 6 นอร์มอล โดยใช้พีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้ง (พีเอช 4.5) เป็นชุดเปรียบเทียบ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่า ซีโอดี ฟีนอล และการเจริญของเส้นใย

2.4 ผลของอุณหภูมิ

ทดลอง (เช่นเดียวกับข้อ 2.3) โดยใช้พีเอชของน้ำทิ้งที่คัดเลือกได้ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่า ซีโอดี ฟีนอล และการเจริญของเส้นใย

2.5 ผลของระดับการให้อากาศ

ทดสอบผลการให้อากาศในถังหมักแบบ air - lift ขนาด 3 ลิตร ปริมาตรใช้งานคือ 2.7 ลิตร อัตราส่วนชิ้นฟองน้ำ 1 ชิ้นต่อน้ำทิ้ง 5 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบระดับการให้อากาศที่ระดับการให้อากาศ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร

ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่าซีโอดี ฟีนอล ของแข็งทั้งหมด และการเจริญของเส้นใย

3. ชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสีของน้ำทิ้ง

เลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ air - lift ขนาด 3 ลิตร ปริมาตรใช้งานคือ 2.7 ลิตร อัตราส่วนชิ้นฟองน้ำ 1 ชิ้นต่อน้ำทิ้ง 5 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบระดับการให้อากาศที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสไปวัดพีเอช ค่าสี วิเคราะห์ค่า ซีโอดี ฟีนอล โปรตีนที่ละลาย และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ CMCase, ไซลาเนส, แลคเคส, แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP, MnIP) และลิกนินเปอร์ออกซิเดส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. กิจกรรมเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (carboxymethylcellulase : CMCase) ตามวิธีการของ Mandels และ Weber (1969)

สารละลายเอนไซม์ที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปริมาณน้ำตามรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหาโดยวิธี Nelson – Somogyi (Nelson, 1944) (ภาคผนวก) ชุดควบคุมเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับข้างต้น แต่ไม่บ่ม สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนปริมาตรตัวอย่างและสารละลาย carboxymethylcellulose นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองควบคุมหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละสายเอนไซม์ตัวอย่าง ก่อนคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิต/มล.)} = \frac{CD}{MtV}$$

เมื่อ C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเทียบจากกราฟมาตฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส เท่ากับ 180 กรัม/โมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม

V คือ ปริมาตรเอนไซม์

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโคโมล ภายใน 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2. กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีการของ Tan และคณะ (1987)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหาโดยวิธี Nelson–Somogyi (Nelson, 1944) (ภาคผนวก) ชุดควบคุม เติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับข้างต้น แต่ไม่บ่ม ส่วน blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนปริมาตรตัวอย่างและสารละลายไซโลส นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองควบคุมหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละสายเอนไซม์ตัวอย่าง ก่อนคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/มล.)} = \frac{\bar{X}D}{MtV}$$

เมื่อ X คือ ปริมาณน้ำตาลไซโลส โดยเทียบจากกราฟมาตฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลไซโลส เท่ากับ 150.13กรัม/โมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม

V คือ ปริมาตรเอนไซม์

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโคโมล ภายใน 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3. กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ตามวิธีการของ Leontievsky และคณะ (2001)

ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย 2,2'-azino-bis(3-ethlbenzthaizoline)-6-sulphonate (ABTS) 1 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 0.1 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ABTS เป็น 0.2 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของ ชุดควบคุมออกจากตัวอย่างแล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิต/มล.)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times 10^{6} \times D}{\varepsilon_{436}}$$

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ε_{436} เท่ากับ 29300 $mol^{-1}cm^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

4. กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ตามวิธีการของ Heinfling และคณะ (1998)

วัดกิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส 2 ชนิด คือ Manganese Peroxidase (MnP) และ Manganese Independent Peroxidase (MnIP)

(1) กิจกรรมเอนไซม์ MnP นำสารละลาย 2,6 dimethoxyphenol (2,6 DMP) 5 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร แมงกานีสซัสเฟต 0.01 โมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 0.75 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2,6 DMP เป็น 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ แมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิโมลาร์ และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลตร (ทันทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลืน 469 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของชุดควบคุมออกจากตัวอย่างแล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ MnP (ยูนิต/มล.)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2.5 \times 10^{6} \times D}{\varepsilon_{469}}$$

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ε_{469} เท่ากับ 27500 $mol^{-1}cm^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

(2) กิจกรรมเอนไซม์ MnIP นำสารละลาย 2,6 dimethoxyphenol (2,6 DMP) 5 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2,6 DMP เป็น 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลตร (ทันทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 469 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของชุดควบคุมออกจากตัวอย่างแล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากสูตร

กิจกรรมเอนไซม์ MnIP (ยูนิต/มล.) = $\frac{\Delta A/min \times 2.5 \times 10^6 \times D}{\varepsilon_{469}}$

เมื่อ $\Delta A/min$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ε_{469} เท่ากับ 27500 $mol^{-1}cm^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

5. กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ตามวิธีการของ Buswell และคณะ (1995)

นำสารละลาย veratryl alcohol 10 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ *D*- tartaric acid บัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ พีเอช 3 0.5 มิลลิลิตร เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.75 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ veratryl alcohol เป็น 2 มิลลิโมลาร์ *D*- tartaric acid บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลตร (ทันทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) ปริมาตรรวม 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร นาน 1 นาที ชุดการทดลองควบคุมใช้ตัวอย่างเอนไซม์ต้มแทนเอนไซม์ปกติ หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายใน 1 นาที ของชุดควบคุมออกจากตัวอย่างแล้วจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากสูตร

กิจกรรมเอนไซม์ LiP (ยูนิต/มล.) = $\frac{\Delta A/min \times 2.5 \times 10^6 \times D}{\varepsilon_{310}}$

เมื่อ $\Delta A/min$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นภายในเวลา 1 นาที

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างเอนไซม์

ε_{310} ของ veratraldehyde เท่ากับ 9300 $mol^{-1}cm^{-1}$

1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตเกิดผลิตภัณฑ์ veratraldehyde 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

4. ผลของการใช้สารเคมีช่วยตกตะกอน

นำน้ำทิ้งหลังการบำบัดจากถังหมัก แบบ air – lift ระดับการให้อากาศที่เหมาะสม ซึ่งกรองแยกเส้นใยออกแล้ว และน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดเป็นชุดเปรียบเทียบ เติมสารเคมีโพลีเฟอริกซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 1.0, และ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตร ร่วมกับแคลเซียมออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 1.0, และ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับ การใช้ raw meal จากโรงงานปูน

ซีเมนต์ ลงในน้ำทิ้ง 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 1 นาที แล้วเขย่าช้า 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง (โสภา จันทภาโส, 2542) วัดค่าพีเอช ค่าสี ซีโอดี และ ฟีนอล พร้อมทั้งสังเกตและบันทึกลักษณะและปริมาณตะกอนทุกชั่วโมง

ทุกๆ การทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ ยกเว้น การทดลองในข้อ 1.2 ที่ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และ การทดลองในข้อ 2.5, 3 และ 4 ซึ่งทำการทดลอง 1 ซ้ำ 2 ครั้ง เนื่องจากเป็นการทดลองในถังหมัก วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Rang Test โดยใช้ SPSS for Window version 10.0