ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อ (G5 medium)** (Watanabe *et al*., 1981) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร)

Sodium-L-glutamate	4.0
DL-malic acid	3.5
KH_2PO_4	0.12
K_2HPO_4	0.18
Yeast extract	5.0
Peptone	5.0

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มัล กรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสีย

1. ซีโอดี (APHA, AWWA and WEF,1998.)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

- ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องควบแน่น
- เตาให้ความร้อน

2. บิวเรต

1.2 สารเคมี

1.สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.25 นอร์มอล ละลายในโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 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) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตจะละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์มอล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_26H_2O$) จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

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

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_47H_2O$) จำนวน 0.695 กรัมเติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

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

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีกำจัดไนไตรต์เท่านั้น

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1. เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม

2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตรและลูกแก้ว (glass beads) 3-5 เม็ด

4. ค่อยๆเติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับ ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง

7. ทำ blankโดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างข้อ1-6

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

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

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

2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน (Heating mentle)
3. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (Semi-micro distillation apparatus)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ปิเปต
7. บิวเรต
8. ลูกแก้ว
9. กระดาษกรอง

2.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
2. สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย $CuSO_4$ 1 ส่วน และ K_2SO_4 10 ส่วน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 2
5. mixed indicator

5.1 ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรดและ 0.082 กรัม เมทิลีนบลูละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.2 ชั่ง 0.1 กรัม โปรโมครีซอลารีนละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.3 ผสมสารละลายข้อ1และข้อ 2 ในอัตราส่วนสารข้อ1 ต่อสารข้อ 2 เท่ากับ 5 ต่อ

วิธีการ

การย่อยตัวอย่าง

1.ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม หรือ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี ถ้ามีมากก็ใช้น้อย ถ้ามีน้อยก็ใช้มาก (ทำ blank ทุกครั้ง)

2.ใส่สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) 1-2 กรัม

3.เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องจับไอกรด

4.ย่อยที่อุณหภูมิเริ่มต้นประมาณ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

5.เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6.นำไปกลั่น

การกลั่นตัวอย่าง

1.ใส่ตัวอย่างใส่ในหลอดกลั่น เติมน้ำประมาณ 60-100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อผสมกรด

2.ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นที่พร้อมจะกลั่นเปิดน้ำหล่อเย็น อัตราการไหลประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที

3.เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 % ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ

4.เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (2%) ที่มีการเติม mixed indicator (2-3 หยด) ประมาณ 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร รองรับ condensate โดยให้ปลายท่อจมอยู่ใต้กรด

5.กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100–150 มิลลิลิตร ก่อนเสร็จการกลั่นในแต่ละครั้งให้เลื่อนฟลาสก์เก็บตัวอย่างลงให้พ้นของเหลว กลั่นต่อประมาณ 1 นาที เพื่อล้างเครื่องกลั่น

6.ไตเตรทกับ 0.02-0.1 นอร์มอล HCl หรือ H_2SO_4 หักค่า blank ออกเพื่อนำไปคำนวณ

การคำนวณ

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

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

กรณีคิดปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) คูณด้วย 6.25

3.ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA,AWWA, and WEF,1998)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

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

1.2 วิธีการวิเคราะห์

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

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

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้ง

1. การหาน้ำหนักวัตถุแห้ง (Noparatnaraporn *et al*.,1986)

1. วัสดุอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ

2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ 103 องศาเซลเซียส

3. เดซิเคเตอร์

4. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด

5. เครื่องเหวี่ยง

2. วิธีการ

1. นำจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำออกใส่เดซิเคเตอร์ เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้องนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

2. นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งรินส่วนใสทิ้ง

3. นำตะกอนของตัวอย่างที่ได้ใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. นำจานเพาะเชื้อใส่ในเดซิเคเตอร์ ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

$$\text{ปริมาณน้ำหนักวัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักวัตถุแห้ง (กรัม) x 1,000}}{\text{มล.ตัวอย่าง}}$$