ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสีย

1. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 1990)

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 40
5. mixed indicator
   5.1 ชั่ง 0.125 กรัม เมทิลเรด และ 0.082 กรัม เมทิลีนบลูละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   5.2 ชั่ง 0.1 กรัม โปรโมครีซอลารีนละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
   5.3 ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตราส่วนสารข้อ 1 ต่อสารข้อ 2 เท่ากับ 5 ต่อ

วิธีการ

1. ดูดตัวอย่าง 5 – 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยตามปริมาณไนโตรเจนที่คาดว่าจะมี ถ้ามีมากก็ใช้น้อย ถ้ามีน้อยก็ใช้มาก (ทำ blank ทุกครั้ง)
2. ใส่สารช่วยเร่งการย่อย (Catalyst) 1-2 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องดักจับไอกรด
4. ย่อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึง 350 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง
5. เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. นำไปกลั่น

การกลั่นตัวอย่าง

1. ใส่ตัวอย่างในหลอดกลั่น เติมน้ำประมาณ 60-100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อผสมกรด
2. ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่นที่พร้อมจะกลั่นเปิดน้ำหล่อเย็น อัตราการไหล 3-4 ลิตรต่อนาที
3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ลงไปช้าๆ จนได้สารละลายสีดำ
4. เริ่มกลั่นโดยใช้กรดบอริก (2%) ที่มีการเติม mixed indicator ประมาณ 2-3 หยด

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 ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเทรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเทรต blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในน้ำ : Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA and WPCF, 1985 : 448-450)

สารเคมี

1. สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มัล

เตรียมโดยเติมกรดกำมะถันเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 70 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายแอนติโมนีโพแตสเซียมทาเทรท

เตรียมโดยละลายแอนติโมนีโพแตสเซียมทาเทรท ($K(SbO)C_4H_4O_6.1/2H_2O$) 1.3715 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

3. สาราละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท

เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 20 กรัม ในน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายกรดแอสคอร์บิค 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยละลายกรดแอสคอร์บิค 1.76 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารจะอยู่ตัว 1 อาทิตย์ ถ้าเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. น้ำยารวม (Combined reagent) 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- 50 มิลลิลิตร 5 นอร์มอล กรดกำมะถัน

- 5 มิลลิลิตร สารละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาเตรท
- 15 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท
- 30 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสคอร์บิค

น้ำยาเคมีเหล่านี้ผสมกันที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นหลังจากการเติมแอนติโมนีโพแทสเซียมทาเตรท หรือแอมโมเนียมโมลิบเดท ให้เขย่าแล้วทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที น้ำยารวมจะอยู่ตัว 4 ชั่วโมง

6. สารละลายสต็อคฟอสเฟต

เตรียมโดยนำโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต KH_2PO_4 anhydrous 219.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม PO_4-P

7. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

เตรียมโดยนำสารละลายสต็อคฟอสเฟต 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม PO_4-P

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.2 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 2, 6, 10, 16 และ 24 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดที่กำหนด เขย่าให้เข้ากันแล้วเทสารละลายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 นอร์มอล H_2SO_4 ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไป เติมน้ำยารวม (Combine reagent) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที เพื่อให้เกิดสี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 50 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟต
3. การคำนวน

$mg/lP = (mgP \times 1000)/(ml\ Sample)$

$mg/lPO_4 = mg/lP \times 3.06$

3. การคำนวณค่าอัตราส่วน C:N เริ่มต้น

3.1 ค่าอัตราส่วน C:N เริ่มต้นของน้ำเสีย

ค่าพารามิเตอร์ของน้ำเสียเริ่มต้นมีค่าดังนี้

- COD เท่ากับ 85100 mg/l

- ไนโตรเจน เท่ากับ 0.507 g/l
- TOC เท่ากับ 28.4 g/l ดังนั้นจะได้ค่าอัตราส่วนC:N ของน้ำเสียเบื้องต้น เท่ากับ 55.95

3.2 ค่าอัตราส่วน C:N ในการศึกษาผลของการเติมกรด

คาร์บอนในน้ำเสียรวมกับคาร์บอนในกรด propionic และกรด butyric มีค่าเท่ากับ 33.55 g/l

อัตราส่วนC:N มีค่าเท่ากับ 33.55/0.507 = 66.17

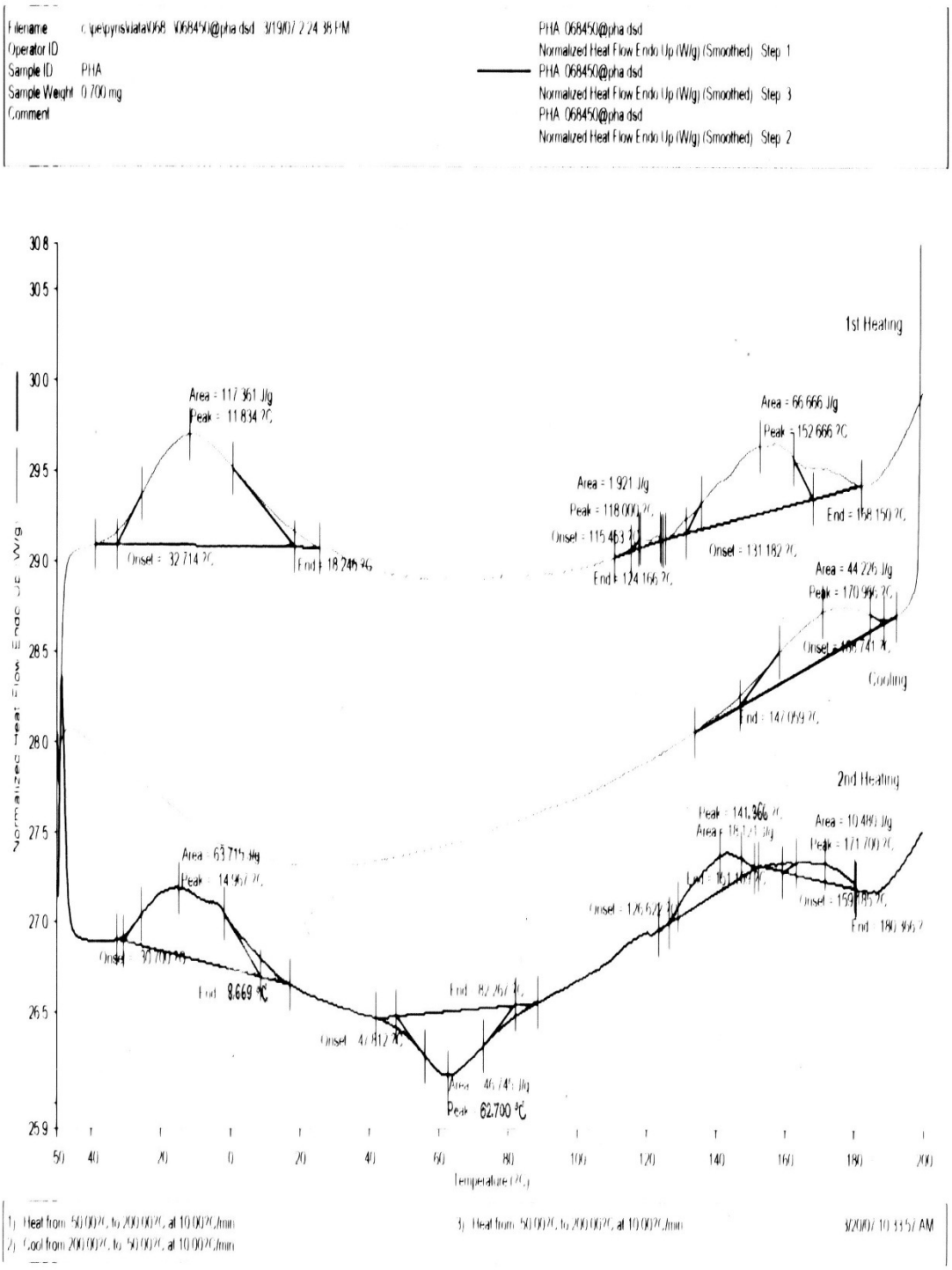
เช่นที่อัตราส่วน C:N เท่ากับ 10 , N= C/10 ดังนั้น N เท่ากับ 3.35

น้ำเสียเดิมมี N เท่ากับ 0.507 g/l ดังนั้นต้องเติม N = 3.35 – 0.507

= 2.84 g/l

ดังนั้นต้องเติม $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ (132.13 x 2.84)/28 = 13.43 g/l

4.ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม PHA ที่ได้



5.แสดงค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อ

5.1 ศึกษาชนิดของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA

	12	24	36	48	60	72
Chalong Latex Industry	8.12	8.36	8.68	8.87	8.91	8.92
Hongyen Chotiwat Industry	8.35	8.45	8.74	8.89	8.71	8.78
Troppical Canning Industry	8.21	8.57	8.85	8.61	8.86	8.65

5.2 ศึกษาผลของการเติมกรด

	12	24	36	48	60	72
control	8.17	8.34	8.57	8.69	8.68	8.95
B5	8.27	8.38	8.65	8.67	8.74	8.95
B10	8.23	8.37	8.57	8.61	8.72	8.91
B15	8.31	8.42	8.53	8.73	8.88	8.97
P5	8.35	8.42	8.51	8.65	8.67	8.64
P10	8.27	8.32	8.64	8.72	8.79	8.77
P15	8.36	8.45	8.59	8.84	8.91	8.87

5.3 ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

	12	24	36	48	60	72
C:N=56	8.36	9.00	8.85	8.83	9.00	8.96
C:N=10	8.11	8.29	8.44	8.33	8.33	8.36
C:N=20	8.13	8.40	8.48	8.43	8.48	8.49
C:N=40	8.21	8.51	8.64	8.61	8.59	8.65
C:N=80	8.30	8.60	8.74	8.70	8.66	8.74

5.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟต

	12	24	36	48	60	72
no acid addition	8.19	8.21	8.56	8.67	8.91	8.96
2.5 g/l	7.91	7.87	8.69	8.75	8.88	8.85
5.0 g/l	8.87	7.56	8.87	8.91	8.85	8.84
10.0 g/l	7.28	7.37	8.64	8.66	8.76	8.70

5.5 ศึกษาอัตราการให้อากาศ

	12	24	36	48	60	72
0 vvm	8.56	8.61	8.74	8.88	8.71	8.62
0.5 vvm	8.24	8.36	8.52	8.88	8.91	8.85
1.0 vvm	8.21	8.44	8.59	8.69	8.79	8.92
2.0 vvm	8.41	8.47	8.67	8.77	8.78	8.67

5.6 ศึกษาอัตราการกวน

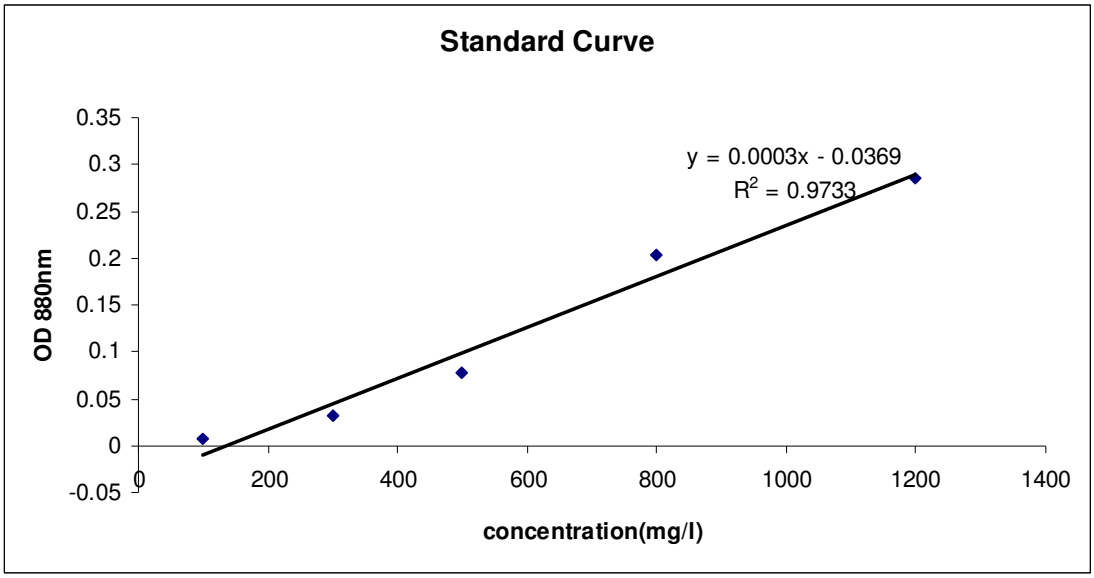
	12	24	36	48	60	72
100 rpm	8.36	8.54	8.73	8.88	8.94	8.91
200 rpm	8.25	8.44	8.59	8.66	8.85	8.74
300 rpm	8.21	8.34	8.71	8.64	8.76	8.65

5.7 ศึกษาการควบคุมพีเอช

	12	24	36	48	60	72
Control pH	7.11	7.14	7.21	7.13	7.15	7.12
uncontrol pH	7.21	7.56	8.47	8.56	8.61	8.72

ภาคผนวก ข

เส้นกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต

Figure 25 Standard curve for phosphate analyze.

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ 9 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาผลของการเติมกรด

Table 9. ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	3.326	7	0.475	5.297	0.016
Within Groups	0.718	8	8.971E-02		
Total	4.044	15			

ตารางที่ 10 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาผลของการเติมกรด

Table 10. ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	2.324E-02	7	3.321E-03	.693	.679
Within Groups	3.835E-02	8	4.794E-03		
Total	6.159E-02	15			

ตารางที่ 11 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

Table 11 . ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	0.775	4	0.194	7.609	0.004
Within Groups	0.255	10	2.545E-02		
Total	1.029	14			

ตารางที่ 12 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

Table 12 . ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	2.237E-02	4	5.593E-03	1.012	0.446
Within Groups	5.527E-02	10	5.527E-03		
Total	7.764E-02	14			

ตารางที่ 13 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัส

Table 13 ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	5.625	3	1.875	7.091	0.012
Within Groups	2.115	8	0.264		
Total	7.740	11			

ตารางที่ 14 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัส

Table14 . ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	0.880	3	0.293	6.358	0.016
Within Groups	0.369	8	4.614E-02		
Total	1.249	11			

ตารางที่ 15 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการให้อากาศในการผลิตPHAในถังหมัก

Table15 . ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	18.33	3	6.111	129.973	0.000
Within Groups	0.376	8	4.702E-02		
Total	18.709	11			

ตารางที่ 16 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการให้อากาศในการผลิตPHAในถังหมัก

Table 16. ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	5.157	3	1.719	2398.771	0.000
Within Groups	5.733E-03	8	7.167E-04		
Total	5.163	11			

ตารางที่ 17 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการกวนในการผลิตPHAในถังหมัก

Table17 . ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	3.851	2	1.926	36.081	0.000
Within Groups	0.320	6	5.337E-02		
Total	4.171	8			

ตารางที่ 18 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการกวนในการผลิตPHAในถังหมัก

Table18 . ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	0.223	2	0.111	3.782	0.087
Within Groups	0.177	6	2.948E-02		
Total	0.400	8			

ตารางที่ 19 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการศึกษาการควบคุมพีเอชในการผลิตPHAในถังหมัก

Table 19. ANOVA for response surface quadratic model on cell growth.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	4.4896	1	4.896	153.082	0.000
Within Groups	0.128	4	3.198E-02		
Total	5.024	5			

ตารางที่ 20 ค่าความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองของแบบหุ่นต่อการผลิต PHAในการศึกษาการควบคุมพีเอชในการผลิตPHAในถังหมัก

Table20 . ANOVA for response surface quadratic model on PHA production.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Between Groups	8.167E-02	1	8.167E-02	0.347	0.587
Within Groups	0.941	4	0.235		
Total	1.022	5			