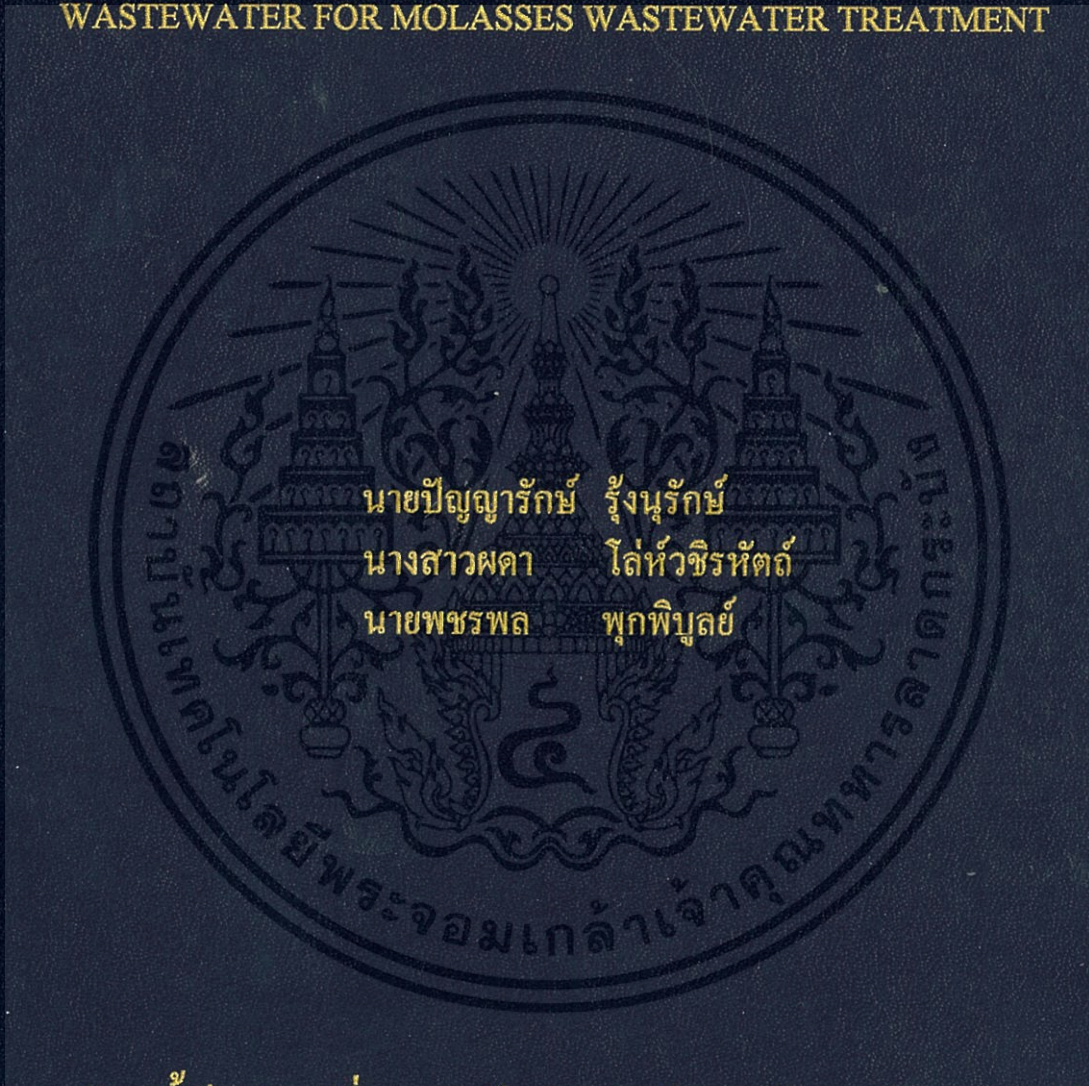


การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อการ
บำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล

ISOLATION OF MICROALGAE FROM ETHANOL PRODUCTION
WASTEWATER FOR MOLASSES WASTEWATER TREATMENT



นายปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์
นางสาวศดา โล่ห้วชิรหัตถ์
นายพชรพล พุกพิบูลย์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อการ
บำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล

ISOLATION OF MICROALGAE FROM ETHANOL PRODUCTION
WASTEWATER FOR MOLASSES WASTEWATER TREATMENT



T148950

นายปัญญารักษ์
นางสาวมดา
นายพรพล

รุ่งนุรักษ์
โล่ห์วิชิตต์
พุกพิบูลย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....148950
วัน,เดือน,ปี.....16 S.A. 2560



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ISOLATION OF MICROALGAE FROM ETHANOL PRODUCTION
WASTEWATER FOR MOLASSES WASTEWATER TREATMENT



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACEDEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอล
เพื่อการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล
Isolation Of Microalgae From Ethanol Production Wastewater For
Molasses Wastewater Treatment

ชื่อนักศึกษา นายปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์ 55050958
นางสาวผดดา โล่หัวชिरหัตถ์ 55050960
นายพชรพล พุกพิบูลย์ 55050961

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ปณิตดา ยอดแสง

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการ
พิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปี
การศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. กรองแก้ว ทิพย์ศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ดร. อธิชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอล เพื่อการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล		
ชื่อนักศึกษา	นายปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์	55050958	
	นางสาวผดตา โล่ห์วีชรหัสต์	55050960	
	นายพชรพล พุกพิบูลย์	55050961	
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์	มณีนีตันรุ่งโรจน์	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปณิตตา	ยอดแสง	

บทคัดย่อ

น้ำเสียสำน้ำตาล เป็นแหล่งน้ำเสียที่ส่งกลิ่น ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ มุ่งเน้นที่จะบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้ระบบสิ่งมีชีวิต ได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจาก แหล่งน้ำเสียสำน้ำตาลจากโรงงานผลิตเอทานอล ราชบุรี ตรวจพบจุลชีพสาหร่ายสองสายพันธุ์ ทำการ จำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยการสังเกตสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เป็น สายพันธุ์ *Bumilieriopsis peterseniana* และ *Chlorella* sp. ได้เลือกสาหร่าย *Bumilieriopsis peterseniana* มาทำการศึกษาการเจริญเติบโตในน้ำเสียสำน้ำตาล พบว่า สาหร่ายไม่สามารถนำน้ำเสีย สำน้ำตาลไปเป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ อีกทั้งการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาล จะยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้งในระบบน้ำกลั่น และ ระบบอาหาร tri-acetate-phosphate (TAP) อย่างไรก็ตาม สาหร่าย *Bumilieriopsis peterseniana* มีความสามารถในการฟอกจางสีของน้ำ เสียสำน้ำตาลที่ถูกเจือจางด้วยน้ำ คิดเป็น 9.37 % อีกทั้งยังมีความสามารถในการลดค่าความต้องการ ออกซิเจนทางเคมี (Chemical Oxygen Demand: COD) และค่าความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand: BOD) ของน้ำเสียสำน้ำตาล ในช่วงเวลา 2 วัน สำหรับค่าความต้องการ ออกซิเจนทางเคมี คิดเป็น 47.83 % และในช่วงเวลา 7 วัน สำหรับค่าความต้องการออกซิเจนของ สารอินทรีย์ คิดเป็น 80.65 % ตามลำดับ งานวิจัยนี้สนับสนุนให้เห็นว่าจุลชีพสาหร่าย *Bumilieriopsis peterseniana* ที่คัดแยกมาได้นั้นมีความสามารถในการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลได้จริง

คำสำคัญ : การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย การบำบัดน้ำเสีย สำน้ำตาล สาหร่าย เอทานอล

Title	Isolation of Microalgae from Ethanol Production Wastewater for Molasses Wastewater Treatment		
Students	Mr. Panyarak	Rungnurak	55050958
	Miss Pada	Lowachirahutt	55050960
	Mr. Phatcharaphol	Phukpiboon	55050961
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Environmental Chemistry		
Acedamic Year	2015		
Advisor	Dr. Cherdsak	Maneeruttanarungroj	
Co-Advisor	Dr. Panulda	Yodsang	

ABSTRACT

Molasses wastewater is the water source that impact to the air pollution in term of bad odor. This study focuses on the molasses wastewater treatment using biological system. Microalgal strains were isolated from molasses wastewater collected from Ratchaburi ethanol production industry. Two microalgal strains were obtained from the isolation procedures and were isolated by morphology observation under light microscope as *Bumileriopsis peterseniana* and *Chlorella* sp. The *Bumileriopsis peterseniana* was chosen for further growth studies. The result showed that this alga could not utilize molasses wastewater as a nutrients source. Moreover, increasing the wastewater concentration showed the increase of algal growth inhibition in both water system and tri-acetate-phosphate (TAP) medium. However, the alga *Bumileriopsis peterseniana* reveals the ability in decolorization of wastewater representing 9.37 %. Furthermore, the alga could reduce the chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD) representing 47.83 % and 80.65 % in the period of 2 days for COD and 7 days for BOD respectively. This study supports that the microalga *Bumileriopsis peterseniana* isolated from wastewater had the ability in molasses wastewater treatment.

Keywords : Isolation of microalgae , Wastewater treatment , Molasses , Algae , Ethanol

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สามารถดำเนินการมาได้สำเร็จลุล่วง เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำติชมที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ และ ดร.ปณิตดา ยอดแสง อาจารย์ที่ปรึกษาพร้อมโครงการพิเศษ สำหรับคำแนะนำ ความรู้ที่เป็นประโยชน์ คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ การตรวจทาน และติชมผลงานในการจัดทำโครงการพิเศษ รวมทั้งคอยเอาใจใส่ และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ.กรองแก้ว ทิพย์ศักดิ์ และ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษ และได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการตรวจทาน รวมไปถึงคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เพื่อแก้ไขให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยจัดจำแนกพันธุ์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากโรงงานราชบุรีเอทานอล

ขอขอบคุณ นายชัชชัย ลีพิทักษ์ และนายสาคร สอนพงษ์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ นางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณา นักศึกษาปริญญาโท สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่มีประโยชน์ในการทำโครงการพิเศษ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยแนะนำให้คำปรึกษาให้ความรักความอบอุ่น กำลังใจที่ดี ตลอดจนความอุปการะและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจในทุกๆเรื่อง จนสามารถทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

นาย ปัญญารักษ์ รุ่งนุรักษ์
นางสาว ผดา โล่ห์วชิรหัตถ์
นาย พชรพล พุกพิบูลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สาหร่าย.....	4
2.2 ชนิดของสาหร่าย.....	4
2.1.1 ดิวิชัน โรโดไฟตา (Division Rhodophyta).....	4
2.1.2 ดิวิชัน แซนโธไฟตา (Division Xanthophyta).....	5
2.1.3 ดิวิชัน คริสโทไฟตา (Division Crhysophyta).....	6
2.1.4 ดิวิชัน ฟีโอไฟตา (Division Phaeophyta).....	7
2.1.5 ดิวิชัน บาซิลลารีโอไฟตา (Division Bacillariophyta).....	8
2.1.6 ดิวิชัน ยูกลีโนไฟตา (Division Euglenophyta).....	9
2.1.7 ดิวิชัน คลอโรไฟตา (Division Chlorophyta).....	10
2.1.8 ดิวิชัน คริปโตไฟตา.....	11
2.1.9 ดิวิชัน ไฟโรไฟตา.....	12
2.3 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายและเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	13
2.3.1 การคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายและการคัดแยกสาหร่าย.....	13
2.3.2 การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	15
2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	17
2.4 น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม.....	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.1 ความหมายของโรงงานอุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม น้ำเสียและน้ำทิ้ง	18
2.4.2 คำนิยามดัชนีคุณภาพน้ำ.....	18
2.4.3.1 ความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (Chemical Oxygen Demand: COD).....	18
2.4.3.2 ความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand: BOD).....	19
2.4.3.3 ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen: DO).....	19
2.5 เอทานอล.....	20
2.6 กระบวนการผลิตเอทานอล.....	21
2.6.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก.....	21
2.6.2 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก.....	21
2.6.3 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์.....	23
2.6.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....	24
2.7 น้ำเสียจากกระบวนการการผลิตเอทานอล.....	27
2.7.1 การใช้ประโยชน์จากน้ำเสียสำน้ำตาล.....	29
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1 จุลชีพสำหรับราย.....	31
3.2 สารเคมี.....	31
3.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ซีไอดี.....	31
3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีไอ.....	32
3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์บีไอดี.....	32
3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับราย.....	33
3.2.5 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris Acetate Phosphate).....	33
3.2.6 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	35
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	35
3.4 การวางแผนการเก็บตัวอย่างน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำ.....	36
3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP).....	38
3.6 การคัดแยกสาหร่ายและการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 วิธีวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และในน้ำกลั่น กับน้ำเสียสำน้ำตาลในอัตราส่วนต่างๆ.....	40
3.8 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียสำน้ำตาล.....	42
3.9 วิธีศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาลในอัตราส่วนต่างๆ.....	43
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	44
4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล	44
4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ.....	48
4.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียสำน้ำตาล.....	52
4.4 ผลการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ.....	55
บทที่ 5 ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	65
5.1 ผลการวิจัย.....	65
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	66
เอกสารอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ก-1.....	70
ภาคผนวก ก-2.....	74
ภาคผนวก ก-3.....	77
ภาคผนวก ข.....	82
ภาคผนวก ค.....	83
ประวัติผู้เขียน.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารเคมีที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	15
2.2 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร.....	27
3.1 อัตราส่วนต่างๆที่ใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสีย สำน้ำตาล และในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ.....	41
4.1 บริเวณของแหล่งน้ำในโรงงานราชบุรีเอทานอลที่พบสาหร่าย และสายพันธุ์ของสาหร่ายสี เขียวขนาดเล็กที่พบในแต่ละแหล่งน้ำ.....	47
4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำภายในโรงงาน ราชบุรีเอทานอล.....	49
4.3 ค่าคุณภาพน้ำเบื้องต้นของน้ำตัวอย่างจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล.....	53
4.4 ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุม ซึ่งไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่าย ในเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ.....	54
4.5 ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดทดสอบ (น้ำเสียสำน้ำตาลที่ผ่านการวัดการเจริญ เติบโตของสาหร่ายที่ความเข้มข้น 20% ในเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ.....	54
4.6 การฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล.....	61
4.7 การฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล.....	63
ก-1 ปริมาตรตัวอย่างน้ำและสารเคมีสำหรับหลอดแก้วชนิดต่างๆ.....	72
ก-2 การเลือกเจือจางน้ำตัวอย่างให้เหมาะสมในการหาค่า BOD.....	81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สาหร่ายสีแดง.....	5
2.2 สาหร่ายสีเหลือง.....	6
2.3 สาหร่ายสีทอง.....	7
2.4 สาหร่ายสีน้ำตาล.....	8
2.5 ไดอะตอม.....	9
2.6 ยูกลีนาอยด์.....	10
2.7 สาหร่ายสีเขียว.....	11
2.8 คลิป์โตโมแนส.....	12
2.9 ไดโนแฟลเจลเลต.....	13
2.10 ถังหมักแบบ Batch.....	22
2.11 ถังหมักแบบต่อเนื่อง.....	23
2.12 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	25
2.13 กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง.....	26
2.14 น้ำเสียสำน้ำตาล.....	28
3.1 พื้นที่โรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี.....	37
3.2 การตากงานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ.....	38
3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายในตู้บ่ม.....	39
4.1 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ ซ้ำที่ 1 (Water: WA1) และซ้ำที่ 2 (Water: WA2).....	44
4.2 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER).....	45
4.3 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ถูกปล่อยออกจากทางออกของบ่อที่มีการบำบัดแล้ว (Exit: EX).....	45
4.4 ตัวอย่างน้ำในบ่อที่มีการปรับสภาพน้ำด้วยปูนขาว (CaO: CA).....	46
4.5 ตัวอย่างน้ำในบ่อที่พื้นที่รอบๆบ่อมีตัวอย่างดินที่มีสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ (Diluted: DIL).....	46
4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Bumilleriopsis peterseniana</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล.....	50
4.7 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Bumilleriopsis peterseniana</i> ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล.....	51
4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า COD กับเวลา ของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า BOD กับเวลา ของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	56
4.10 การฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุมและในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ.....	58
4.11 การฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุมและในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ.....	59



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดจากการหมักพืชเพื่อเปลี่ยนแปลงจากพืชเป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เมื่อทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% โดยการกลั่นจะเรียกว่า เอทานอล (Ethanol) เอทานอลที่นำไปผสมในน้ำมัน เพื่อใช้เติมเครื่องยนต์เป็นแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 99.5% โดยปริมาตร ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้

อุตสาหกรรมเอทานอล เป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญในการสร้างแหล่งพลังงานของประเทศ เพื่อทดแทนพลังงานส่วนหนึ่งที่ต้องนำเข้า ซึ่งจากข้อมูลการใช้พลังงานของประเทศจากกระทรวงพลังงาน ได้แสดงให้เห็นว่า การใช้พลังงานในภาคขนส่งปัจจุบัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 37 ของการใช้พลังงานทั้งหมด โดยมีมูลค่ารวมเท่ากับ 380,000 ล้านบาท ซึ่งส่วนใหญ่เป็นค่าใช้จ่ายด้านน้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากนี้ การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศไทย เช่น อ้อยและมันสำปะหลัง ยังนับว่าเป็นการสร้างเสถียรภาพของราคาผลิตผลทางการเกษตรของประเทศด้วย ซึ่งจะมีส่วนช่วยเสริมสร้างความมั่นคงทางเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกรอีกด้วย

ซึ่งจากกระบวนการผลิตเอทานอล พบว่า จะมีน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตที่เรียกว่า น้ำเสียสำน้ำตาล โดยที่น้ำเสียสำน้ำตาล เป็นน้ำเสียส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการผลิตเอทานอล ลักษณะของน้ำเสียสำน้ำตาล จะอยู่ในรูปของของเหลวสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ มีฤทธิ์เป็นกรด และมีความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยสีน้ำตาลเข้มของน้ำเสียสำน้ำตาล เกิดจากสองสาเหตุด้วยกัน คือ เกิดจากสีของคาราเมล (Caramel) จากน้ำตาลชนิดต่างๆที่มีเหลือในกากน้ำตาลที่ยีสต์ไม่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ เป็นสารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน และ เกิดจากสารเมลานอยด์ดิน (Melanoidin) ซึ่งเป็นสารที่มีธาตุไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบ เกิดจากการรวมตัวระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ภายใต้อุณหภูมิสูง โดยผ่านกระบวนการปฏิกิริยาบราวน์นิง (Browning Reaction) ซึ่งมีผลทำให้กากน้ำตาลและน้ำเสียสำน้ำตาล มีสีน้ำตาลเข้ม สารนี้เป็นสารที่ถูกย่อยสลายได้ยาก จึงเป็นปัญหาในการกำจัดก่อนที่จะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

เนื่องจากน้ำเสียสำน้ำตาลจากกระบวนการผลิตเอทานอล ทำให้เกิดปัญหาหมลภาวะของแม่น้ำลำคลองที่ถูกปนเปื้อน จึงจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสียสำน้ำตาลที่เป็นน้ำทิ้งเสียก่อน โดยการแยกสิ่งสกปรกต่างๆออก ตลอดจนการบำบัดสำน้ำตาลเข้มของน้ำเสียสำน้ำตาล ให้มีปริมาณลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหาหมลภาวะในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชนต่างๆ จะเป็นแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมที่ต้องการบำบัด ตลอดจนสภาพที่จะใช้ในการสร้างระบบ

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้สาหร่ายที่ทำการคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี มาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับตัวอย่างน้ำเสีย ภายใต้สภาวะที่มีความเหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้น เพื่อดูประสิทธิภาพของสาหร่ายที่จะใช้ในการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล และงานวิจัยนี้จะศึกษาถึงประสิทธิภาพในการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้สาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำร่วมด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อค้นหาและคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวชนิดใหม่จากน้ำเสียสำน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
- 2) ใช้สาหร่ายที่คัดแยกได้จากน้ำเสียมาทำการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
- 2) คัดแยกชนิดของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กโดยใช้วิธีการทำให้สาหร่ายบริสุทธิ์ ซึ่งคาดว่าจะได้สาหร่ายขนาดเล็กจำนวนไม่น้อยกว่า 1 สายพันธุ์
- 3) ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากน้ำเสีย ในการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลจากโรงงานราชบุรีเอทานอล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ค้นพบสารห่วยที่สามารถเจริญเติบโตในน้ำเสียสำน้ำตาลจากโรงงานราชบุรีเอทานอลได้
- 2) พัฒนาการบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นผ่านสารห่วยที่คัดแยกได้จากน้ำเสียสำน้ำตาล



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย (Algae)

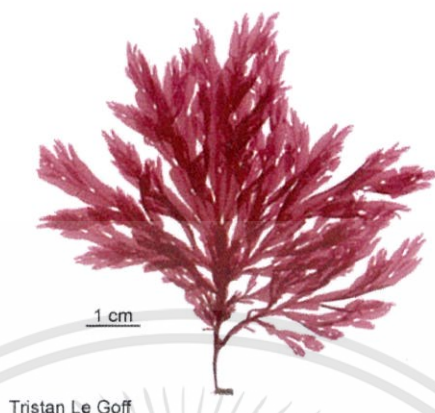
สาหร่าย เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ที่มีคลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll a) ไว้สำหรับการสังเคราะห์แสง มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) สูง ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือหลายเซลล์ มีขนาดตั้งแต่เล็กมากจนมองไม่เห็นด้วยตาเปล่าไปจนถึงมีขนาดใหญ่ ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายพืช (อาภารัตน์ มหาพันธ์, 2553)

2.2 ชนิดของสาหร่าย (Types Of Algae)

ปัจจุบันสาหร่ายจัดอยู่ในอาณาจักรโพรทิสตา (Kingdom Protista) ประกอบด้วย 9 ดิวิชัน แบ่งโดยอาศัยหลักเกณฑ์ต่างๆ คือ ชนิดและคุณสมบัติของสารสี องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสะสม หรือผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง องค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของผนังเซลล์ ลักษณะรูปร่าง และการจัดระเบียบของเซลล์ ตลอดจนถึงวงจรชีวิต โครงสร้าง และวิธีการสืบพันธุ์ โดยสามารถจำแนกสาหร่ายเป็นดิวิชันต่างๆได้ดังนี้

2.2.1 ดิวิชัน โรโดไฟตา (Division Rhodophyta) หรือ สาหร่ายสีแดง

สาหร่ายในกลุ่มนี้เกือบทั้งหมดอาศัยอยู่ในน้ำเค็ม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากไม่มีแฟลเจลลา (Flagella) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ และการแตกเป็นชิ้นส่วน สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะเป็นการผสมกันของแกมมาตของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ เรียกว่า สเปอมาเทียม (Spermatia) และอวัยวะเพศเมีย เรียกว่า คาร์โพโกเนีย (Carpogonia) สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ ไฟโคอิริทริน และ ไฟโคไซยานิน ส่วนอาหารสะสมจะอยู่ในรูปของแป้ง ชนิดฟลอไรเดียน (Floridean Strach) และน้ำมัน

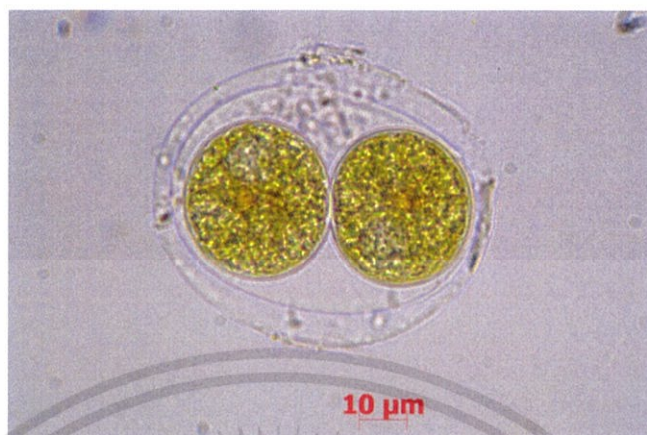


รูปที่ 2.1 สาหร่ายสีแดง

ที่มา : <http://www.marevita.org/index.php?option=classification&path=Algues%20et%20plantes%20marines/Rhodophyta/Florideophycidae/Ceramiales/Delesseriaceae/Membranoptera/Membranoptera%20alata>

2.2.2 ดิวิชัน แซนโทไฟตา (Division Xanthophyta) หรือ สาหร่ายสีเหลือง

สาหร่ายสีเขียวแกมเหลืองนี้ เดิมจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา หรือสาหร่ายสีเขียว (Green Algae) พบได้มากในเขตอบอุ่น ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และดิน ทั้งในรูปเซลล์เดี่ยว โคโลนี เส้นสายที่แตกกิ่งก้านและไม่แตกกิ่งก้าน การสืบพันธุ์มีทั้งแบบไม่อาศัยเพศ และอาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ อาจเป็นการสร้างซุโอสปอร์ (Zoospore) ที่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลเจลลา (Flagella) ซึ่งมีขนาดยาวไม่เท่ากัน เส้นที่ยาวกว่ามักมีขนาดเล็กๆ อยู่ 2 แถว บางชนิดสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ หรือสืบพันธุ์โดยการแตกเป็นชิ้นส่วน หรือการแบ่งสองส่วน ขณะที่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ไม่ค่อยพบมากนัก สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ซี และแคโรทีน ส่วนอาหารสะสม คือ น้ำมัน หรือ คริสโซลามินาริน (Chrysolaminarin)

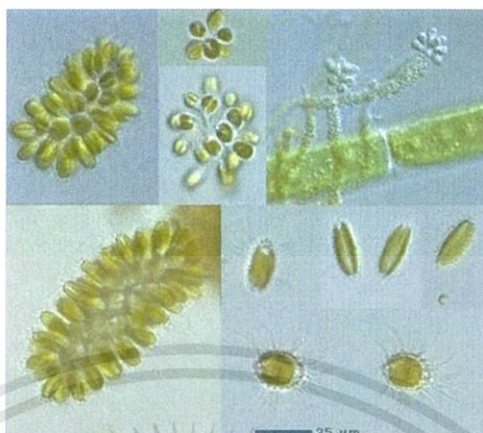


รูปที่ 2.2 สาหร่ายสีเหลือง

ที่มา:[http://natureineu.blob.core.windows.net/natureineu/Chlorobotrys%20regularis%20\(2\)%20\(1024x682\).jpg](http://natureineu.blob.core.windows.net/natureineu/Chlorobotrys%20regularis%20(2)%20(1024x682).jpg)

2.2.3 ดิวซีนคริสโตไฟตา (Division Chrysophyta) หรือ สาหร่ายสีทอง

สาหร่ายในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว แต่อาจมีบางชนิดที่มีลักษณะเป็นโคโลนี หรือมีรูปร่างกลม เป็นเส้นสายที่ไม่เคลื่อนที่ บางชนิดเคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลเจลลา (Flagella) บางชนิดเป็นอะมีบอยด์ที่มีขาเทียม (Pseudopod) ทำให้สามารถกินอาหารด้วยขาเทียมได้ การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ซึ่งสาหร่ายในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งออกเป็นสองส่วน แต่อาจมีการผสมกันของแกมมาตแบบไอโซแกมัส สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ซี แคโรทีน และฟิวโคแซนทีน (Fucoxanthin) ส่วนอาหารสะสมคือ น้ำมัน และ คริสโซลามินาริน (Chrysolaminarin)



รูปที่ 2.3 สาหร่ายสีทอง

ที่มา:<http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/heterokontophyta/chrysophyta/Mallomonadales.html>

2.2.4 ดิวิชันไฟโอไฟตา (Division Phaeophyta) หรือสาหร่ายสีน้ำตาล

สาหร่ายในกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเล และมีอยู่ในน้ำเย็น สาหร่ายสีน้ำตาลนี้มีแฟลเจลลา (Flagella) 2 เส้น ขนาดไม่เท่ากันอยู่ด้านข้างของเซลล์ มีโครงสร้างที่ซับซ้อนหลายชนิด มีส่วนยึดเกาะคล้ายรากพืช (Holdfast) บางชนิดมีถุงอากาศ (Air Bladder) หรือ เคลบ (Kelp) ขนาดใหญ่ ทำให้ลอยตัวอยู่ในน้ำได้ ส่วนการสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเป็นแบบโอโอแกมีส และเฮเทอโรแกมีส ขณะที่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะสร้างซีสโอสปอร์ สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ซี คาโรทีน และฟิวโคแซนทีน ส่วนอาหารสะสม คือ น้ำตาลลามินาริน (Laminarin) คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ และน้ำมัน

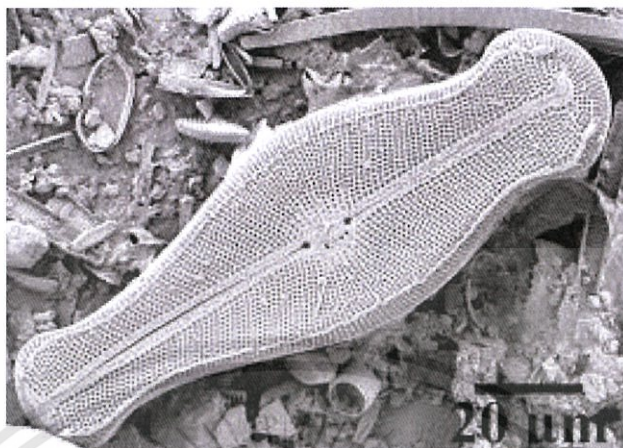


รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีน้ำตาล

ที่มา : <http://imagict.com/en/words/phaeophyta>

2.2.5 ดิวิชัน บาซิลลารีโอไฟตา (Division Bacillariophyta) หรือ ไดอะตอม (Diatom)

สาหร่ายในกลุ่มนี้ มีการเจริญเป็นเซลล์เดี่ยว โคโลนี หรือเส้นสายที่มีรูปร่างแตกต่างกันหลายแบบ เซลล์สี่เหลี่ยมแบน มีแฟลเจลลา (Flagella) หนึ่งเส้นที่ด้านหน้าเซลล์ สาหร่ายในกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ เป็นสารขัดต่าง ๆ เช่น ยาสีฟัน น้ำยาขัดรถ และ น้ำยาขัดโลหะ



รูปที่ 2.5 ไดอะตอม

ที่มา : <https://facepunch.com/showthread.php?t=1150988>

2.2.6 ดิวิชัน ยูกลีโนไฟตา (Division Euglenophyta) หรือยูกลีโนอยด์ (Euglenoid)

สาหร่ายในกลุ่มนี้เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว สีเขียวอ่อน ที่มีลักษณะคล้ายพืชและสัตว์ ลักษณะที่คล้ายเซลล์สัตว์คือ เป็นเซลล์เดี่ยว เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลา (Flagella) ซึ่งอาจมีหนึ่ง สอง หรือสามเส้นที่ปลายด้านบนของเซลล์ ผนังเซลล์ไม่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ มีจุดรับแสง (Eyespot หรือ Stigma) คอนแทรกไทล์แวคิวโอล (Contractile Vacuole) และไฟบริลภายในเซลล์ แต่จะคล้ายพืชตรงที่มี คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ บี และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ส่วนอาหารสะสม จะอยู่ในรูปของแป้งที่ไม่ละลายน้ำ ที่ชื่อพาราไมลอน (Paramylon) และน้ำมัน



รูปที่ 2.6 ยูกลินอยด์

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Euglena>

2.2.7 ดิวิชัน คลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) หรือ สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว ถือเป็นสาหร่ายกลุ่มใหญ่ที่สุดในสาหร่ายทั้งหมด พบอาศัยอยู่ในน้ำจืด น้ำเค็ม และบนบก มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน เช่น รูปถ้วย ตาข่าย และขดดาว เป็นต้น อาศัยอยู่ในลักษณะเซลล์อิสระ อยู่รวมกันเป็นโคโลนี เป็นกลุ่มหรือเป็นสาย มีทั้งที่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลเจลลา ซึ่งอาจมีหนึ่ง สอง หรือมากกว่า และพวกเคลื่อนที่ไม่ได้ สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ โดยวิธีไอโซแกมมัส และเฮเทอโรแกมมัส และแบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างซีสโสปอร์ ตลอดจนการแบ่งสองส่วน สารสีที่พบในสาหร่ายสีเขียว ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีน ส่วนอาหารสะสมจะอยู่ในรูปของแป้ง และน้ำมัน

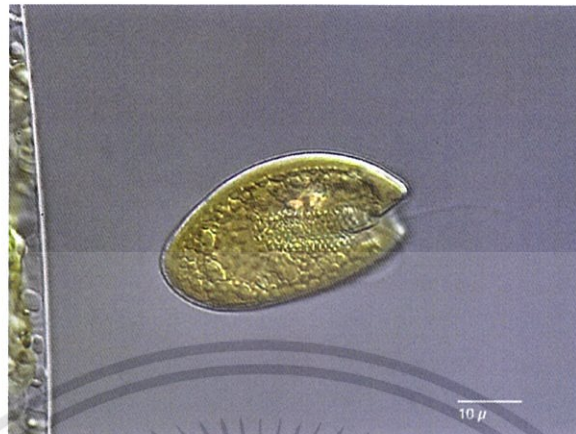


รูปที่ 2.7 สาหร่ายสีเขียว

ที่มา : <http://algalweb.net/Millportalgae1007b.htm>

2.2.8 ดิวซัน คริปโตไฟตา (Division Cryptophyta) หรือ คลิปโตโมแนส

สาหร่ายกลุ่มนี้ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างแบนทั้งด้านบนและล่างคล้ายรองเท้าแตะ อาจมีผนังเซลล์ หรือไม่มีก็ได้ขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด มีแฟลเจลลาสองเส้นออกจากฐานร่อง (Groove) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างซูโอสปอร์ ซีสต์ หรือแบ่งสองส่วนตามยาว สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ซี แคโรทีน ไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานิน ส่วนอาหารสะสมจะอยู่ในรูปของแป้ง และน้ำมัน

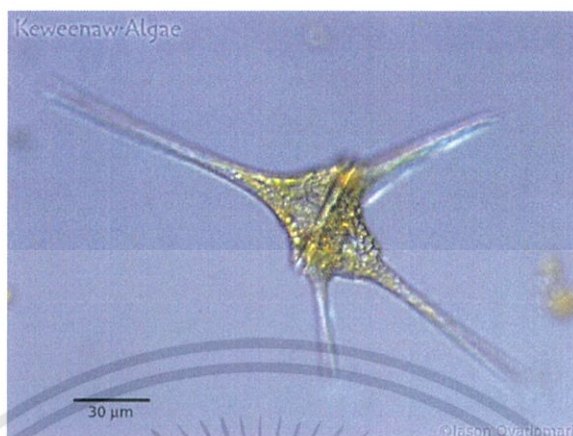


รูปที่ 2.8 คลิปโตโมแนส

ที่มา: <http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Algen/AndereAlgen/Source/Cryptomonas%20erosa.html>

2.2.9 ดิวิชันไฟโรไฟตา (Division Psilophyta) หรือ ไดโนแฟลเจลเลต (Dinoflagellate)

สาหร่ายกลุ่มนี้ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว พบทั้งในน้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำจืด ส่วนมากไม่มีผนังเซลล์ บางชนิดอาจมีแผ่นเซลลูโลส (Cellulose Plate) ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายเกราะ เรียกว่า ทีคัลเพลท (Thecal Plates) ไดโนแฟลเจลเลต มีลักษณะรูปร่างแบน มีร่องตามขวางและตามยาว และมีแฟลเจลลาสองเส้นอยู่ในร่องทั้งสองนี้ สารสีที่พบในสาหร่ายกลุ่มนี้ ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ซี และแคโรทีน ส่วนอาหารสะสมจะอยู่ในรูปของแป้ง และน้ำมัน



รูปที่ 2.9 ไดโนแฟลเจลเลต

ที่มา : http://www.keweenawalgae.mtu.edu/gallery_pages/dinoflagellates.htm

2.3 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.3.1 การคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ผู้เพาะเลี้ยงจำเป็นต้องทำการเก็บสาหร่ายจากแหล่งธรรมชาติและคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นหรือแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ และที่สำคัญเชื้อสาหร่ายที่ทำการคัดแยกได้จะต้องอยู่ในสภาพบริสุทธิ์ (Axenic Culture) เพื่อนำสาหร่ายที่ทำการคัดแยกนำไปทำเป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป ซึ่งเทคนิคในการคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายและการทำให้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์มีหลายวิธี การที่จะเลือกเทคนิคใดนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด และรูปร่างของสาหร่าย และสิ่งที่สำคัญที่สุด ก็คือ อุปกรณ์ที่จะใช้ในการคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายและเพาะเลี้ยงสาหร่ายทุกอย่างต้องปราศจากเชื้อ (Sterile) (ยิวติและฉมาภรณ์, 2546)

โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงและเจริญอยู่ในอาหาร มีหลายลักษณะ ดังนี้

1. Unialgal Culture สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียว (อาจมีแบคทีเรียปนเปื้อน)
2. Axenic Culture สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียว ไม่มีสิ่งมีชีวิตอื่นปะปน (ปลอดแบคทีเรีย) ซึ่งอาจเจริญมาจากหลายเซลล์ซึ่งเป็นชนิดเดียวกัน
3. Monoxenic Culture สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีสิ่งมีชีวิตอื่นอีก 1 ชนิดปะปนอยู่ด้วย

4. Pure Culture สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียว (ปลอดแบคทีเรีย) ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว นับเป็น Genetic Purity
5. Stock Culture การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทราบชนิด เพาะเอาไว้เพื่อใช้ในการศึกษาทดลองหรือการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ

วิธีการคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่าย (Isolation Method) แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้

1. Enrichment Method วิธีนี้ทำให้สภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อสาหร่ายชนิดที่ต้องการ เช่น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายชนิดที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะทำให้สาหร่ายชนิดอื่นไม่เจริญ หรือเจริญเติบโตได้น้อย
2. Manipulative Method วิธีการแยกสาหร่ายชนิดที่ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นๆโดยวิธีกลหรือวิธีการทางฟิสิกส์ เช่น การปั่น การใช้ปิเปต การเขี่ยเชื่อบนอาหารวุ้น เป็นต้น
3. Antibiotic Method วิธีใช้ยาปฏิชีวนะฆ่าสาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่เราไม่ต้องการ ซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ คือ
 - เพนนิซิลิน (Penicillin) ใช้ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี โดยไปห้ามการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียแกรมบวก
 - สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ใช้ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซม (Ribosome) ชนิด 70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น
 - คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) ใช้ฆ่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซม (Ribosome) ชนิด 70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. การเพาะเลี้ยงระยะสั้น เหมาะสำหรับการศึกษาสาหร่ายเป็นครั้งคราว อาหารที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับว่าจะใช้สาหร่ายในด้านใด และต้องเลือกอาหารให้เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละชนิด
2. การเพาะเลี้ยงระยะยาว วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงระยะยาว ก็เพื่อเก็บหัวเชื้อสาหร่ายไว้สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป

2.3.2 การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย คือ อาหารหรือสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจำเป็นจะต้องทราบว่าสาหร่ายชนิดที่เพาะเลี้ยงมีความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดมากน้อยเพียงใด ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย

ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณมากเพื่อการเจริญเติบโต เช่น คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) ซัลเฟอร์ (S) โซเดียม (Na) โพแทสเซียม (K) แมกนีเซียม (Mg) และแคลเซียม (Ca)
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrients หรือ Trace Metals) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณค่อนข้างน้อย ซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารจะช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่ถ้าไม่มีการเติมลงไปในการอาหาร การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะช้าลงเล็กน้อย

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ทั่วไปมี 2 ลักษณะ คือ

1. อาหารเหลว (Liquid Media : Broth)
2. อาหารแข็งหรืออาหารร่วน (Solid or Agar Media) เตรียมได้จากการเติมวุ้น (Bacto-Agar) ลงไปในอาหารเหลวประมาณ 1-1.5%

โดยปกติสูตรอาหารที่ดี และเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ควรประกอบไปด้วยธาตุอาหารทั้ง 2 ประเภท ซึ่งส่วนใหญ่สารเคมีที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมี ดังนี้

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (อาภารัตน์ , 2549)

ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients)	ธาตุอาหารรอง (Micronutrients)
NaCl	H ₃ BO ₃
KCl	MnCl ₂ .4H ₂ O
CaCl ₂ .2H ₂ O	MnSO ₄ .7H ₂ O
MgCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O
Na ₂ SO ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O
K ₂ SO ₄	CoCl ₂ .6H ₂ O
MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O
NaNO ₃	CuSO ₄ .5H ₂ O
KNO ₃	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Vitamins
NH ₄ NO ₃	Vitamins B ₁₂
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Biotin
KH ₂ PO ₄	Nicotinic Acid
K ₂ HPO ₄	Calcium Panthothenate
Na ₂ CO ₃	p-Aminobenzoic Acid
Na ₂ HCO ₃	Thymine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีอาหารลักษณะอื่นๆ ได้แก่

- Semisolid Media อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เตรียมได้โดยเติมวุ้นปริมาณน้อยๆ ประมาณ 0.5% ลงไปในอาหารเหลว
- Differential Media อาหารที่ใช้เพาะเชื้อสาหร่ายแล้วเห็นความแตกต่างของเชื้อที่ขึ้นได้โดยชัดเจน
- Selective Media อาหารที่คัดเลือกชนิดสาหร่ายซึ่งจะมีเพียงสาหร่ายบางชนิดเท่านั้นที่ขึ้นได้
- Enrichment Media อาหารที่ส่งเสริมหรือเกื้อหนุนให้สาหร่ายบางชนิดเจริญดีกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆทำให้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายชนิดที่ต้องการได้
- Complete Media อาหารที่นำมาจากธรรมชาติโดยไม่รู้สัดส่วนที่แน่นอน
- Synthetic Media อาหารสังเคราะห์ที่ทราบชนิดและปริมาณขององค์ประกอบที่แน่นอน

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยทางกายภาพ และ ปัจจัยทางเคมี

ปัจจัยทางกายภาพ เช่น

1. การให้แสง (Light) ควรวางสาหร่ายไว้ใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีแสงสีขาวและไม่ร้อน ซึ่งความเข้มของแสงจะต้องสูงประมาณ 1000-8000 ลักซ์ เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต
2. อุณหภูมิ (Temperature) การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่นั้นเหมาะสมในการทำให้สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายหลายชนิดจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิห้องและจะทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในช่วง 10 องศาเซลเซียส การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ มีผลทำให้กิจกรรมในเซลล์และการเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมากจนเกินช่วงที่สาหร่ายทนได้ จะส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงและการเติบโตลดลงและตายในที่สุด แต่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลงแต่จะไม่ทำให้สาหร่ายตาย
3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการในระดับที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปสาหร่ายส่วนมาก จะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นด่าง

4. ความเค็ม (Salinity) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสาหร่าย โดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็ม

นอกจากปัจจัยข้างต้นแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอีก เช่น ก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความกระด้างของน้ำ เป็นต้น ซึ่งมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสาหร่าย (ลัดดา, 2539)

ปัจจัยทางเคมี เช่น

1. อาหารและธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) คือ ธาตุอาหารที่ประกอบเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างมาก และ ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) คือ ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย โดยที่ธาตุอาหารรอง เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็น เช่น เอนไซม์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต หรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด

2.4 น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

2.4.1 ความหมายของโรงงานอุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม น้ำเสีย และน้ำทิ้ง

จากประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539)

โรงงานอุตสาหกรรม หมายความว่า โรงงานตามกฎหมายว่าด้วยโรงงาน

นิคมอุตสาหกรรม หมายความว่า นิคมอุตสาหกรรมตามกฎหมายว่าด้วยนิคมอุตสาหกรรม หรือโครงการที่จัดไว้สำหรับการประกอบการอุตสาหกรรมที่มีการจัดการระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อมร่วมกัน

น้ำเสีย หมายความว่า ของเสียที่อยู่ในสภาพเป็นของเหลว รวมทั้งมลสารที่ปะปน หรือปนเปื้อนอยู่ในของเหลวนั้น

น้ำทิ้ง หมายความว่า น้ำเสียที่เกิดจากการประกอบกิจการโรงงานอุตสาหกรรม หรือนิคมอุตสาหกรรม ที่จะระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อมและให้ความหมายรวมถึงน้ำเสียจากการใช้น้ำของคนงานรวมทั้งกิจกรรมอื่นในโรงงานอุตสาหกรรมหรือนิคมอุตสาหกรรมด้วย

2.4.2 คำนิยามดัชนีคุณภาพน้ำ

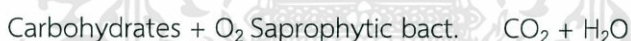
2.4.2.1 ความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (Chemical Oxygen Demand : COD)

การหาค่า COD เป็นการวิเคราะห์ค่าความสกปรกของน้ำ โดยคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ซึ่งใช้สารเคมีที่มีอำนาจในการออกซิไดซ์สูง (Strong Chemical Oxidant) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ค่า COD จึงแสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์เกือบทั้งหมดในน้ำที่แบคทีเรียย่อยสลายได้ หลักการวิเคราะห์ COD คล้ายกับ BOD คือ สารอินทรีย์ในน้ำจะถูกออกซิไดซ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับน้ำ (H_2O) ต่างกันที่ BOD ต้องใช้แบคทีเรียในการย่อยสลาย ส่วน COD ใช้ตัวเติมออกซิเจน (Oxidizing Agent)

2.4.2.2 ความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand : BOD)

BOD คือ ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดที่ย่อยสลายได้ (Decomposable Organic Matter) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จากขบวนการนี้ แบคทีเรียจะได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการออกซิไดซ์สารอาหารเหล่านี้อาจเป็น CO_2 , H_2O หรือ NH_3 ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหาร การใช้ออกซิเจนของแบคทีเรานั้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะ

ระยะที่ 1 เป็นการออกซิไดซ์ของสารประกอบคาร์บอน ดังสมการ



ค่าของ O_2 ในตัวอย่างที่ลดลง เนื่องจากถูกแบคทีเรียใช้ไปคือ ค่า BOD ที่หาได้

ระยะที่ 2 เป็นการออกซิไดซ์ของ NH_3 , NO_2^- , NO_3^- ตามลำดับ โดยพวก Autotrophic Bacteria ซึ่งมีชื่อว่า Nitrifying Bacteria และมีอยู่น้อยใน Raw Sewage ที่ 20°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการหาค่า BOD และการแบ่งตัวของ Nitrifying Bacteria จะน้อยมาก ดังนั้น ในช่วงระยะเวลา 5 วัน ที่ใช้ในการหาค่า BOD ปริมาณ O_2 ในการออกซิไดซ์สาร NH_3 สังเกตได้จากปริมาณของ NO_3^- ในตัวอย่างซึ่งจะเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก

ค่า BOD จะบ่งบอกถึงความสกปรกของน้ำเสียต่างๆ ในเทอมของออกซิเจนที่ต้องการใช้เมื่อปล่อยน้ำเสียนั้นลงสู่น้ำลำคลอง ใช้ในการควบคุมความสกปรกของลำธารและแม่น้ำต่างๆ เพราะจากค่า BOD จะบอกถึงองศาของความสกปรกของแหล่งน้ำนั้นได้ทันที นอกจากนี้ยังใช้ในการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสีย

2.4.2.3 ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen : DO)

การหาค่าออกซิเจนละลายน้ำ คือ การหาปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำอันเป็นลักษณะที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และแนวการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำว่าเป็นแบบใช้ออกซิเจนอิสระ (Aerobic) หรือไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (Anaerobic) การหาค่าออกซิเจนละลาย สามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การวัดโดยใช้เครื่องมือดีอิมิตอร์ (DO meter) หรือออกซิเจนมิเตอร์ (Oxygen meter) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายได้โดยตรง หรือจะใช้วิธีทางเคมี เช่น วิธีเอไซด์โมดิฟิเคชันของไอโอโดเมตริก (Azide Modification of Iodometric Method) ซึ่งเหมาะสมสำหรับ ใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในน้ำที่สกปรก เช่น น้ำทิ้ง น้ำในแม่น้ำลำคลอง

2.5 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จำพวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) สามารถละลายได้ทั้งในน้ำ และสารละลายอินทรีย์อื่นๆ เป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถนำมาบริโภคได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปเอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous Ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำ (Hydrous Ethanol)

การนำเอาเอทานอลไปใช้นั้น สามารถนำไปใช้ได้หลายทางดังนี้

1. แอลกอฮอล์ที่เข้ารับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุรา เครื่องสำอาง และยา
2. แอลกอฮอล์ที่ไม่เข้ารับประทานโดยตรง (Industrial Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยและโลหะ

3. แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงมีความบริสุทธิ์ สูง 95% หรือ 99.5-99.6% แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้ทำเป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังต่อไปนี้

3.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% - ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซินหรือดีเซล ใช้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

3.2 แอลกอฮอล์ 99.5% - 99.6% - เมื่อผสมกับน้ำมันเบนซิน จะเรียกกันว่า แก๊ซโซฮอล์ (Gasohol) โดยที่ แก๊ซโซฮอล์ 95 หมายถึง การผสมน้ำมันเบนซิน 95 กับเอทานอล ในสัดส่วน 9:1 โดยที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม สัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้น มีใช้กันอยู่หลายประเภท ในหลากหลายประเทศ E85 เป็นชื่อที่เรียกเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมันกับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึง 85% และมีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบบราซิล อเมริกา และยุโรป อย่างไรก็ตาม

กิติ น้ำมันชนิดนี้ไม่สามารถใช้ได้กับรถยนต์รุ่นส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในประเทศไทย เนื่องจากต้องเป็นรถยนต์ที่มีเครื่องยนต์ที่ทนต่อการกัดกร่อนสูงกว่าปกติ ดังนั้น ในการใช้น้ำมันชนิดนี้ จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์ และ รวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันที่ต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิต และขั้นตอนการจัดจำหน่าย (Electricity and Industry Magazine)

3.3 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันโดยการเปลี่ยนรูปเอทานอล เป็น ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้ เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศ ที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่น

2.6 กระบวนการผลิตเอทานอล

ปัจจุบัน การผลิตเอทานอลในประเทศไทย จะใช้วัตถุดิบทั้งประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง และ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และ กากน้ำตาล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อย เป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในกระบวนการผลิต

ขั้นตอนการผลิตหลักๆ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

2.6.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก จะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าเป็นวัตถุดิบที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้อย่างง่ายดาย การจัดเตรียมก็ทำได้ง่าย เช่น กากน้ำตาล เพียงเจือจางวัตถุดิบด้วยน้ำเพื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์แล้วก็สามารถนำไปหมักได้ แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าเป็นวัตถุดิบที่ใช้อย่างยาก เช่น หัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทแป้ง หรือ ชานอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทเส้นใยเซลลูโลส จะต้องนำวัตถุดิบไปผ่านกระบวนการลดขนาดเชิงกลด้วยการหั่น ตัด หรือ บด ด้วยเครื่องจักร และอาจมีการใช้ความร้อนร่วมด้วย เพื่อเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะต่อการนำไปย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ แล้วเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

กระบวนการทางเคมีและชีวเคมี เพื่อเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือกลูโคส ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ประกอบด้วย 2 วิธีการ คือ

- Acid Hydrolysis เป็นวิธีการใช้กรดย่อยแป้ง
- Enzymatic Hydrolysis เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง

วิธีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งจะเป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและประหยัดในเรื่องของต้นทุน รวมทั้งไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม

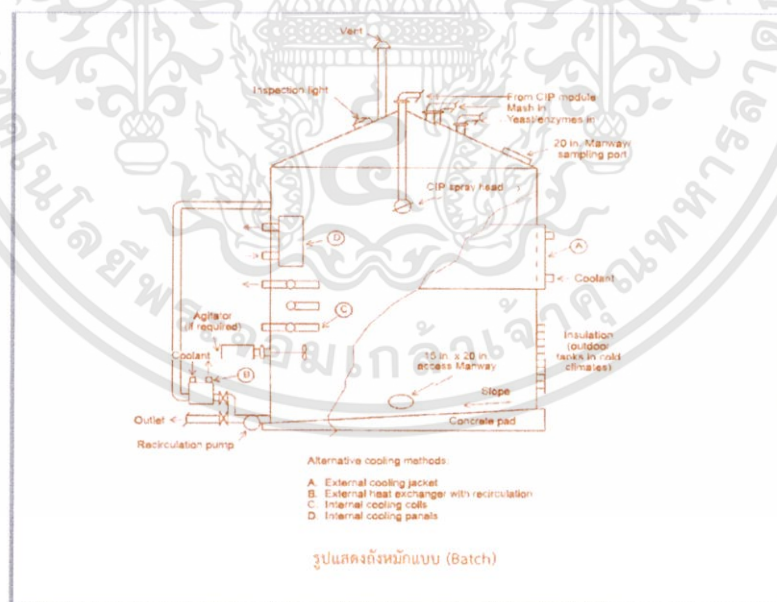
2.6.2 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) และการหมัก (Fermentation)

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้ว จึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ (Aeration Rate) อัตราการกวน (Agitation Rate) ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และอุณหภูมิ (Temperature) ในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของจุลินทรีย์

ขั้นตอนการหมัก เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยในทางปฏิบัติ น้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้น ที่จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ได้นอกจากนั้น ยีสต์จะใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตของตัวเองและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ

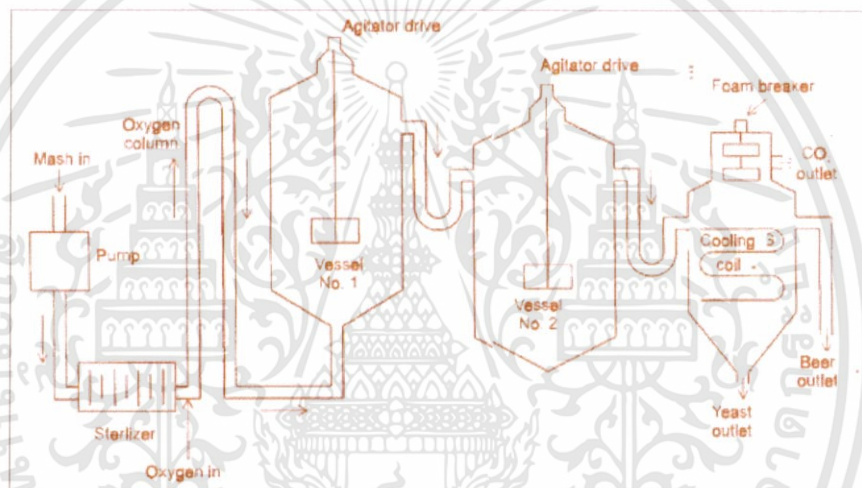
การหมักแอลกอฮอล์นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

- การหมักแบบครั้งคราว (Batch Fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และหัวเชื้อลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก



รูปที่ 2.10 ถังหมักแบบ Batch

- การหมักแบบเฟด แบท (Fed- batch Fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปจนถึงหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณที่สูงขึ้น
- การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ขณะเดียวกัน ก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลาเช่นกัน ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองชนิดข้างต้น



รูปแสดงถึงหมักแบบต่อเนื่อง (แสดงรูปแบบเพียง 2 ถัง)

รูปที่ 2.11 ถังหมักแบบต่อเนื่อง

2.6.3 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์

เป็นขั้นตอนในการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลออกจากน้ำหมักหรือน้ำสำ โดยใช้กระบวนการทางเคมี ได้แก่ กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร (ในทางปฏิบัติ จะเรียกว่า เอทานอลร้อยละ 95) แต่สำหรับการนำไปใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อเป็นเชื้อเพลิง จะต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นที่ระดับไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร มีชื่อเรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous หรือ Absolute Ethanol) แต่อย่างไรก็ตาม การกลั่นที่ความดันบรรยากาศ จะไม่สามารถผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้ได้ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นๆ มาช่วยแยกน้ำออกจากแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร

กรรมวิธีหรือเทคโนโลยีในการแยกน้ำเพื่อผลิตเอทานอลไร้น้ำที่นิยมใช้ มีอยู่ 3 แบบ คือ

- การแยกด้วยวิธีการสกัดแยกกับสารตัวที่สาม (Extractive distillation with the third component)

วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมานาน ปัจจุบันก็ยังใช้กันในเชิงพาณิชย์อยู่ แต่ได้มีการปรับเปลี่ยนสารตัวที่สามจากเดิมที่ใช้สารเบนซีน (Benzene) มาใช้สารไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) ซึ่งมีความอันตรายน้อยกว่าแทน

- กระบวนการแยกด้วยวิธีเมมเบรน (Membrane Pervaporation)

จะใช้เยื่อหุ้มบางๆ มาเป็นตัวซึมผ่าน และระเหยกลายเป็นไอ เพื่อแยกน้ำออกจากเอทานอล

- กระบวนการแยกด้วยวิธีโมเลกุลซีฟ (Molecular Sieve Separation)

ทำได้โดยการให้เอทานอลมีน้ำ (Hydrous Ethanol) ผ่านวัสดุที่มีรูพรุนสูง เช่น Zeolite เพื่อให้รูพรุนนั้นดักเอาน้ำออก

2.6.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร สามารถแบ่งตามกลุ่มพืชผลการเกษตรที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

- การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล (Sugar)

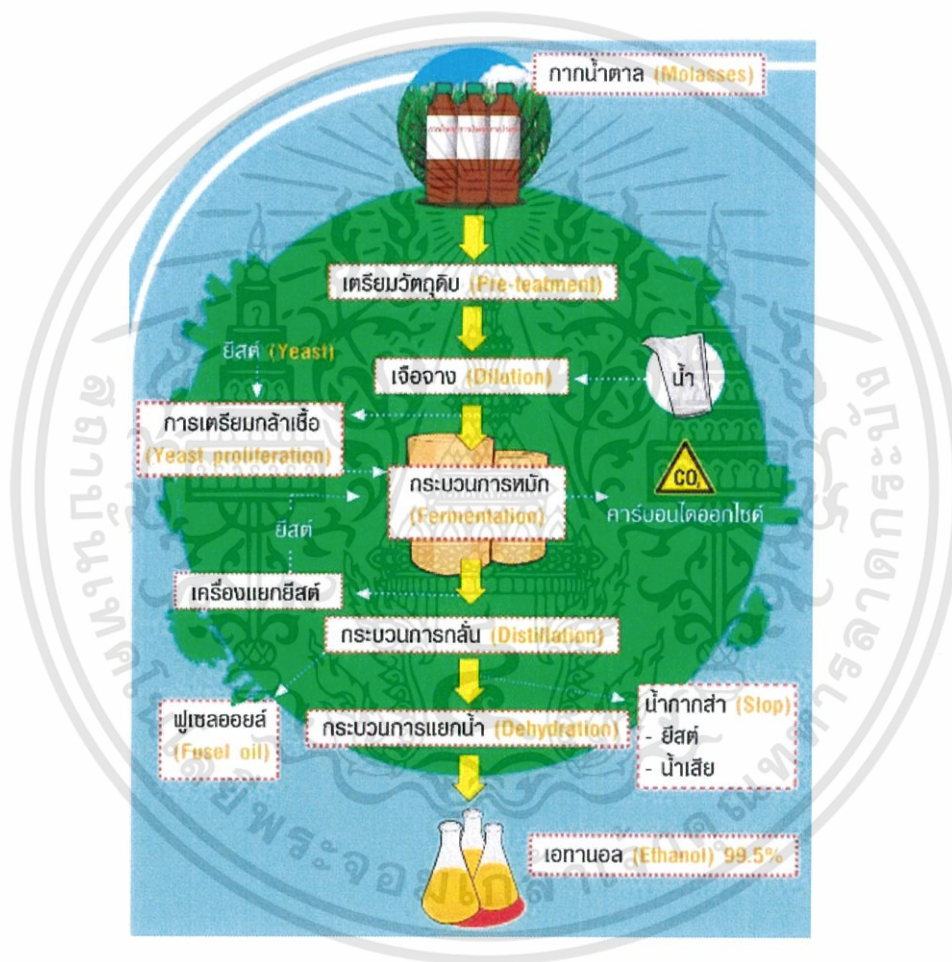
ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และหัวผักกาดหวาน ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้เลยโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆ วัตถุดิบเหล่านี้จะมีน้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นองค์ประกอบหลัก (รูปที่ 2.12)

- การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง (Starch)

ได้แก่ มันสำปะหลัง ธัญพืช และมันฝรั่ง โดยแป้งจะเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำมาผ่านกระบวนการย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมัก ในกระบวนการผลิตเอทานอล แป้งในวัตถุดิบ จะต้องถูกย่อยให้ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน ยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ (รูปที่ 2.13)

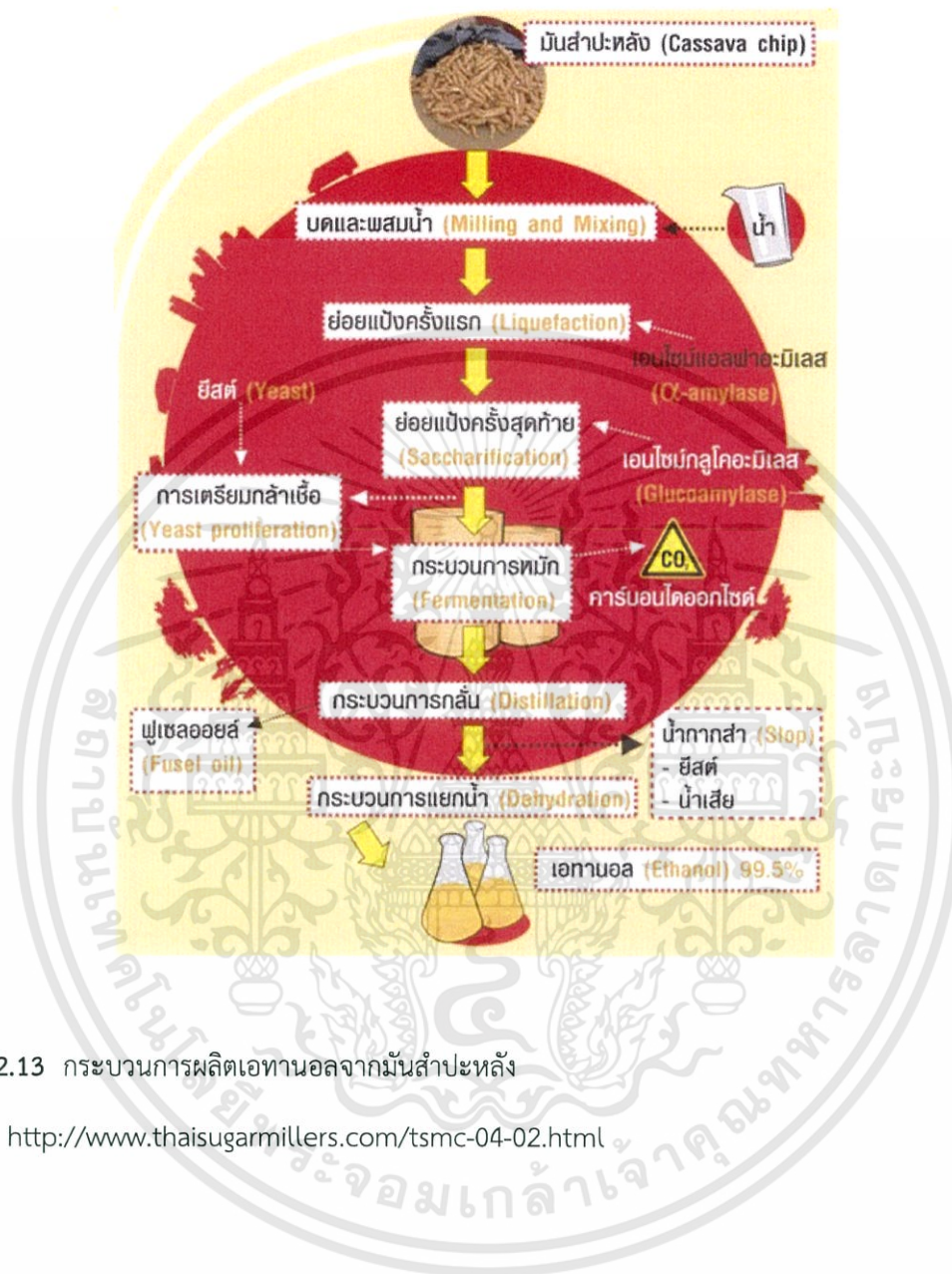
- การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

ส่วนมากวัตถุดิบกลุ่มนี้จะเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบไปด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ลิกนิน (Lignin) และสารประกอบอื่นๆ



รูปที่ 2.12 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ที่มา : <http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-04-02.html>



รูปที่ 2.13 กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

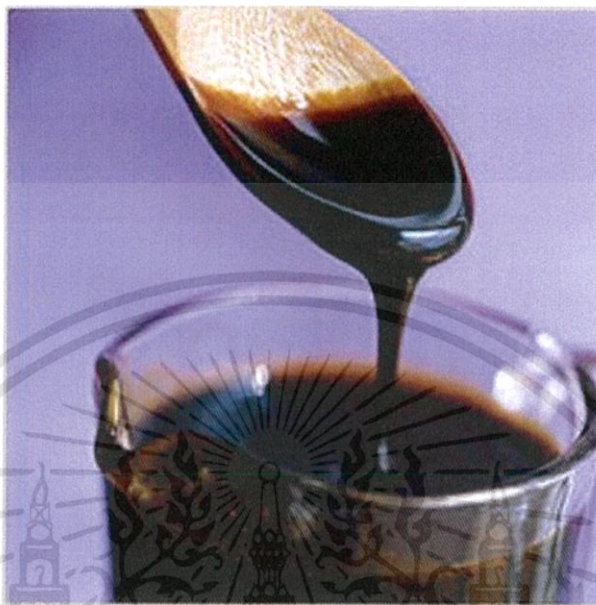
ที่มา : <http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-04-02.html>

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร

ชนิดของวัตถุดิบ	ปริมาณวัตถุดิบ (ก.ก./เอทานอล 1 ลิตร)
อ้อย (Sugar Cane)	12.7 – 14.3
กากน้ำตาล (Molasses)	4 – 6
ข้าวฟ่างหวาน (Sweet Sorghum)	14
หัวบีท (Sugar Beet)	10.30
มันสำปะหลัง (Cassava)	5.45 – 6.50
มันฝรั่ง (Potatoes)	8.50
ข้าวโพดโดยกระบวนการไม่เปียก	3.68
ข้าวโพดโดยกระบวนการไม่แห้ง	2.58
ข้าวสาลี (Wheat)	2.60
ข้าวฟ่าง (Millet)	2.30
ข้าวเปลือก (Paddy Rice)	2.25
ไม้ (Wood)	3.85

2.7 น้ำเสียจากกระบวนการการผลิตเอทานอล

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตเอทานอล หรือ น้ำเสียสำน้ำตาล (Molass Wastewater) เป็นน้ำทิ้งที่เกิดจากการผลิตเอทานอล โดยวัตถุดิบหลักที่ทำให้เกิดน้ำเสียสำน้ำตาล ก็คือ กากน้ำตาล (Sugar Cane Molasses) จากการศึกษาพบว่า มีปริมาณความเข้มข้นของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ ยังมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งเกิดจากสาร คาราเมล (Caramel) ในน้ำเสียสำน้ำตาล สารคาราเมลนี้เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ในกระบวนการผลิตน้ำตาล ดังนั้นสารคาราเมล จึงเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ไม่สามารถทราบโครงสร้างที่แน่นอน โดยทั่วไปจะเรียกสารประกอบพวกนี้ว่า “เมลานอยด์ดิน” (Melanoidin) โดยที่สารเมลานอยด์ดิน จะอยู่ในสภาพคอลลอยด์และมีประจุลบ เมลานอยด์ดิน จะเกิดจากการที่น้ำตาล (Sugar) และกรดอะมิโน (Amino Acids) เกิดการรวมตัวกัน (Kato and Shushida, 1981)



รูปที่ 2.14 กากน้ำตาล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่จะทำให้เกิดน้ำเสียน้ำตาลจากกระบวนการผลิต
ที่มา: <http://www.motherearthnews.com/organic-gardening/milk-and-molasses-magic-zbcz1402.aspx>

การบำบัดน้ำเสียที่เรียกว่า “น้ำเสียน้ำตาล” ในปัจจุบัน จะใช้กระบวนการบำบัดทางเคมี-กายภาพ (Physio-chemical Process) เช่น การตกตะกอน การโคแอกกูเลชัน-ฟล็อกกูเลชัน (Coagulation-Flocculation) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการต่างๆเหล่านี้ไม่สามารถแก้ปัญหาน้ำเสียที่มีน้ำเสียน้ำตาลเจือปนได้เพียงพอ นอกจากนี้ ยังเริ่มมีการนำกระบวนการทางชีวภาพมาใช้ เช่น ระบบโปรยกรอง และระบบตะกอนเร่ง เป็นต้น โดยกระบวนการทางชีวภาพเริ่มเป็นที่นิยม เพราะสามารถรับภาระได้สูง และสามารถปรับเปลี่ยนสภาวะได้ดี แต่ก็ยังมีข้อเสียอยู่ คือ แบคทีเรียยังไม่สามารถกำจัดสีของน้ำเสียน้ำตาลได้เพียงพอ ทำให้ยังเหลือสีของน้ำเสียน้ำตาลอยู่ในน้ำทิ้ง

2.7.1 การใช้ประโยชน์จากน้ำเสียสำน้ำตาล

ในปัจจุบันการนำน้ำเสียสำน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของน้ำเสียสำน้ำตาล จะพบว่าน้ำเสียสำน้ำตาล มีองค์ประกอบต่างๆที่ซับซ้อน เพราะฉะนั้น การที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านจุลชีววิทยา จะต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถเฉพาะตัว อย่างไรก็ตาม มีการนำน้ำเสียสำน้ำตาลมาใช้ประโยชน์บ้าง ดังต่อไปนี้

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลมาใช้ประโยชน์ในรูปของปุ๋ย

โดยใช้หลักการ Incineration ซึ่งกระทำได้โดยการใช้เครื่อง Evaporator

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลมาใช้ทำปุ๋ยหมัก

โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งปัจจุบันได้มีการค้นพบว่าจุลินทรีย์บางชนิด สามารถนำมาใช้สลายน้ำเสียสำน้ำตาลได้ ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 เดือนเท่านั้น

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลมารดถนนลูกรังเพื่อลดฝุ่น

วิธีนี้แม้จะเป็นการลดฝุ่นของถนนลูกรังแต่ก็สามารถใช้ได้ในทุกแห่งที่นั่น เพราะในช่วงฤดูฝนน้ำเสียสำน้ำตาลเหล่านั้นจะถูกน้ำฝนชะล้างไป

- การใช้น้ำเสียสำน้ำตาลในการเลี้ยงปลา

ใช้ได้ผลแต่ต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด เนื่องจากหากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปแล้ว จะเป็นอันตรายต่อปลาได้ ทั้งนี้เพราะจะทำให้ระดับออกซิเจนในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) ลดลง

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลมาเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

เนื่องจากในน้ำเสียสำน้ำตาล มีน้ำตาลฟรุคโตสเหลืออยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งพบว่ามียีสต์หลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดี เพราะฉะนั้นในการนำน้ำเสียสำน้ำตาลมาเลี้ยงยีสต์ดังกล่าว เพียงแค่เติมแหล่งไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลไปใช้ในการหมักก๊าซมีเทน (CH₄)

- การนำน้ำเสียสำน้ำตาลไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งเพื่อปรับสภาพน้ำ

มีอัตราส่วนการใช้น้อย เพราะอาจจะทำให้กุ้งตายได้ง่าย แต่ผลจากการใช้น้ำเสียสำน้ำตาลนี้จะให้อัตรการรอดของลูกกุ้งสูงขึ้นและกินอาหารได้ดี มีการเติบโตที่รวดเร็ว

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Suntud , Prapa and Sadahiro (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้เชื้อ *Citeromyces* sp. WR-43-6 จากการศึกษ พบว่า เชื้อ *Citeromyces* sp. WR-43-6 มีประสิทธิภาพในการฟอกจางสีน้ำเสียสำน้ำตาลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน ในสารละลายที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 2% โซเดียมไนเตรต 0.1% และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% โดยในสารละลายนี้จะมีการปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6 โดยใช้ *Citeromyces* sp. WR-43-6 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดความเข้มของสี ประสิทธิภาพในการกำจัดความต้องการออกซิเจนของสารเคมี และประสิทธิภาพในการกำจัดความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ เท่ากับ 75% 100% และ 76% ตามลำดับ

Tusanee , Suntud and Sadahiro (2007) ศึกษาเกี่ยวกับการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 จากการศึกษ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถใช้ในการฟอกจางสีน้ำเสียสำน้ำตาลได้ ในอาหารเหลว MYGP ซึ่งจะประกอบไปด้วยเม็ดสีเมลานอยด์ดิน ที่มีการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในระยะเวลา 7 วัน สามารถทำการฟอกจางสีน้ำเสียสำน้ำตาลได้ถึง 60.2% และจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเม็ดสีเมลานอยด์ดิน ประสิทธิภาพในการกำจัดความต้องการออกซิเจนของสารเคมี และประสิทธิภาพในการกำจัดความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ เท่ากับ 91.2% 80% และ 77.4% ตามลำดับ

Tusanee and Suntud (2008) ศึกษาเกี่ยวกับการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 จากการศึกษ พบว่า *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 ที่คัดแยกได้จากของดองในประเทศไทย มีประสิทธิภาพสูงที่จะสามารถใช้ในการฟอกจางสีน้ำเสียสำน้ำตาล โดยการทดลองจะทำภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ และภายใต้สภาวะที่คงที่ จากการศึกษ พบว่า เชื้อสายพันธุ์นี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการฟอกจางเม็ดสีเมลานอยด์ดินได้สูงถึง 68.12% ในสารละลายเมลานอยด์ดิน ซึ่งจะประกอบไปด้วย 2% กลูโคส 0.4% ยีสต์ที่ถูกสกัดได้ 0.1% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ 0.05% แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ที่มี pH ของสารละลายเริ่มต้นเท่ากับ 6 ภายใต้สภาวะที่คงที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยพบว่าภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ เชื้อสายพันธุ์นี้จะมีการเจริญเติบโต และมีความสามารถในการฟอกจางเม็ดสีเมลานอยด์ดินได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับในสภาวะที่คงที่

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลชีพสาหร่าย

1. สาหร่ายที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากโรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ.2558

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD)
(ภาคผนวก ก : ก-1)

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
2. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท POCH S.A. ประเทศโปแลนด์
3. โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
4. 1,10-ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_{18}N_2 \cdot H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
5. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
6. ไอร์ออน(II)ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ
7. ไอร์ออน(II)แอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีไอ (Dissolved Oxygen: DO) (ภาคผนวก ก : ก-2)

1. กรดซาลิซิลิก
2. โซเดียมไฮโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
3. โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
4. โซเดียมไอโอดัด (NaI) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
6. แป้งมัน
7. โพแทสเซียมไอโอดัด (KI) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
8. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
9. แมงกานีสซัลเฟตเทตระไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
10. แมงกานีสซัลเฟตโมนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
11. สารละลายมาตรฐานปทุมภูมิไบโอไอเดต ($\text{KH}(\text{IO}_3)_2$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์บีโอดี (Biological Oxygen Demand: BOD) (ภาคผนวก ก : ก-3)

1. กรดกลูตามิก เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
2. กลูโคส เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
3. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

5. โดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

6. โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

7. เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

9. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris Acetate Phosphate Medium)

3.2.5 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris Acetate Phosphate Medium) (ภาคผนวก ข)

1. กรดบอริก (H_3BO_3) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

2. เกลืออะซิติกแอซิด (Glacial Acetic Acid) GR Grade บริษัท Duksan Pure Chemical ประเทศเกาหลี

3. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

5. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
6. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
7. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
8. ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมีโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl-aminomethane)) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
12. แมงกานีสคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
13. วุ้น (Agar-Agar Bacto) เกรดวิเคราะห์ บริษัท S.D. Fine-Chem Limited ประเทศอินเดีย
14. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
15. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
16. ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

3.2.6 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1. กานามัยซิน (Kanamycin)
2. คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)
3. สเตรปโตรมัยซิน (Streptomycin)
4. แอมพิซิลลิน (Ampicillin)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) บริษัท Olympus รุ่น CH30 ประเทศญี่ปุ่น
2. ขวดบีโอดี (BOD Bottle) ขนาด 300 มิลลิลิตร บริษัท Wheaton ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. คิวเวต (พลาสติก)
4. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ บริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมันนี
5. เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination Orbital Shaker) ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์จากภาควิชาวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ช่วยออกแบบและสร้างเครื่องเขย่าแบบใช้แสงให้
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท JS Research INC ประเทศเกาหลี
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo Centrifuge) ยี่ห้อ Thermo-Scientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Genesys 10S
10. เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (DO Meter) บริษัท YSI รุ่น YSI 5000 ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว (Petri Dish)
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์

13. ตู้ดูดควัน (Hood) บริษัท Flexlab รุ่น FH5-11-13/FB
14. ตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (ตู้บ่มบีโอดี) บริษัท JSR รุ่น JSBI-150C ประเทศเกาหลี
15. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astec รุ่น Astecair 3000E
16. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UN55 ประเทศเยอรมันนี
17. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาดต่างๆ บริษัท Mettler Toledo รุ่น Pipet-Lite XLS
18. หลอดย่อยสลาย (Digestion Vessels) ยี่ห้อ Pyrex

3.4 การวางแผนการเก็บตัวอย่างน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำ

การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำภายในบริเวณโรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยที่โรงงานราชบุรีเอทานอล เป็นโรงงานที่ทำการผลิตเอทานอล 99.5% เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงยานยนต์ พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการต่างๆภายในโรงงานแล้ว มีน้ำเสียที่เรียกว่า “น้ำเสียน้ำตาล” ที่เกิดขึ้นจากสำน้ำตาลที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอล

ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเป็นจำนวน 6 ตัวอย่าง และจากดินที่มีสาหร่ายสีเขียวปกคลุมอยู่อีก 1 ตัวอย่าง ดังนี้

1. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ (ซ้ำที่ 1) (Water: WA1)
2. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ (ซ้ำที่ 2) (Water: WA2)
3. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER)
4. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ถูกปล่อยออกจากทางออกของบ่อที่มีการบำบัดแล้ว (Exit: EX)
5. ตัวอย่างน้ำในบ่อที่มีการปรับสภาพน้ำด้วยปูนขาว (CaO: CA)
6. ตัวอย่างน้ำในบ่อที่พื้นที่รอบๆบ่อมีตัวอย่างดินที่มีสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ (Dilute: DIL)
7. ตัวอย่างดินรอบๆบ่อที่ 6 พบว่า รอบๆบ่อน้ำจะมีสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างดินด้วย เป็นจำนวน 1 ตัวอย่าง (Green Soil: GS)



รูปที่ 3.1 พื้นที่โรงงานราชบุรีเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP)

การคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง เราจะทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนอาหารวุ้นชนิด Tris Acetate Phosphate (TAP) เตรียมได้โดยทำการผสมสารเคมีตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เข้าด้วยกัน (ภาคผนวก ข) ซึ่งในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (Sterile) ซึ่งสามารถทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้ง 2 แบบ คือ อาหารเหลว (Liquid Media) และอาหารวุ้น (Agar Media) โดยการที่จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพของอาหารวุ้น ในขั้นตอนการเตรียม ต้องผสมผงวุ้น (Agar) ลงไป ถ้าหากว่ากลัวอาหารเลี้ยงเชื้อปนเปื้อน ควรใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียลงไปด้วย โดยเราจะทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใส่ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) ในการเท ควรใช้ความระมัดระวังให้ผงวุ้นที่ผิวหน้าของจานเลี้ยงเชื้อมีความสม่ำเสมอ กัน จากนั้น รอเวลาให้ผงวุ้นแห้งสนิท โดยทำการตากจานเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)



รูปที่ 3.2 การตากจานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

3.6 การคัดแยกสาหร่ายและการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากแหล่งน้ำที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำมา จะใช้ไมโครปิเปต ปิเปต ตัวอย่างน้ำที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างดิน จำนวน 1 ตัวอย่าง ใส่ลงในอาหารรูน Tris Acetate Phosphate (TAP) และใช้ที่เขี่ยเชื้อแบบสามเหลี่ยม ทำการเกลี่ยตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างดินให้กระจายไปทั่วผิวหน้าของอาหารรูน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

สำหรับในอาหารเหลว ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์



รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายในตู้บ่ม

3.7 วิธีวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ

นำสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอด โดยจะทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และในแต่ละรอบของการปั่นเหวี่ยง เมื่อพบว่าสาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือสาหร่ายที่ก้นหลอดอยู่ประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 40 มิลลิลิตร เพื่อทำการกลั่นเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงโดยวิธีนี้ 3 ครั้ง จากนั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างจากหลอดเซนตริฟิวจ์มา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวตปิเปตน้ำกลั่นตามลงไปอีก 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ประมาณ 0.03 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงไปในแต่ละฟลาสก์ในขั้นตอนของการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เหตุผลที่เราเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 730 นาโนเมตร แทนค่าการเจริญเติบโตของของสาหร่าย เนื่องจาก ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวัดค่าความหนาแน่นทางแสง (Optical Density: OD) ของสารละลาย พบว่า เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากขึ้น จะส่งผลให้ภายในสารละลายมีปริมาณสารแขวนลอยเพิ่มขึ้น ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ภายในสารละลายเพิ่มขึ้นตาม จึงส่งผลให้ค่า OD730 ที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่น้อยลง จะส่งผลให้ภายในสารละลายมีปริมาณสารแขวนลอยลดลง ทำให้ความหนาแน่นภายในสารละลายลดลงตาม จึงส่งผลให้ค่า OD730 ที่วัดได้มีค่าลดลง

ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำเสียสำน้ำตาล จะทำการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆกันใน 6 ความเข้มข้น ดังนี้

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนต่างๆที่ใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับ น้ำเสียสาหร่ายน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่น กับน้ำเสียสาหร่ายน้ำตาล (DW+Molasses)

ความเข้มข้น (Molasses)	TAP+Molasses	DW+Molasses
0%	TAP 50 ml	DW 50 ml.
1%	TAP 49.5 ml. + Molasses 0.5 ml.	DW 49.5 ml. + Molasses 0.5 ml.
5%	TAP 47.5 ml. + Molasses 2.5 ml.	DW 47.5 ml. + Molasses 2.5 ml.
10%	TAP 45 ml. + Molasses 5 ml.	DW 45 ml. + Molasses 5 ml.
15%	TAP 42.5ml. + Molasses 7.5 ml.	DW 42.5ml. + Molasses 7.5 ml.
20%	TAP 40 ml. + Molasses 10 ml.	DW 40 ml. + Molasses 10 ml.

หลังจากเตรียมสาหร่าย และสารต่างๆดังตารางที่ 3.1 ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปเขย่าในตุ้มปั่น โดยเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มข้นแสง 1,500 ลักซ์ และนำออกไปวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยใช้ไมโครปิเปต ปิเปตสารละลายภายในฟลาสก์มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทำการวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกๆ 6 ชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก เมื่อวัดแล้ว ไม่มีการเทกลับคืนลงไปในฟลาสก์ เพื่อใช้ในการทำการทดลองต่อ หลังจากนั้น ทำการวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เป็นเวลา 3-4 วัน

3.8 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียสำน้ำตาล

ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาจากภาคสนาม และตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่ได้ผ่านการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำเสียสำน้ำตาลจากข้อ 3.7 โดยเลือกน้ำเสียสำน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยในตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่มีสาหร่ายอยู่ ก่อนนำมาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ควรปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์สาหร่ายออกก่อน แล้วนำเฉพาะส่วนใสมาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้น ใน 3 พารามิเตอร์ คือ

1. ความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (Chemical Oxygen Demand: COD)

ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการออกซิไดซ์ในการสลายสารอินทรีย์ด้วยสารเคมี โดยใช้สารละลาย เช่น โพแทสเซียมไดโครเมตในปริมาณที่มากเกินไป ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ซึ่งสารอินทรีย์ในน้ำทั้งหมดที่จุลินทรีย์ย่อยสลายได้และย่อยสลายไม่ได้จะถูกออกซิไดซ์ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและมีการให้ความร้อน

2. ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen: DO)

แบคทีเรียที่เป็นสารอินทรีย์ในน้ำ ต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ความต้องการออกซิเจนของแบคทีเรียนี้ จะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง ดังนั้น ในน้ำที่สะอาด จะมีค่า DO สูง และในน้ำเสีย จะมีค่า DO ต่ำ

3. ความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand: BOD)

เป็นปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ การหาค่า BOD หาได้โดยใช้แบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งจะเป็นไปช้าๆ ดังนั้น จึงต้องใช้ระยะเวลาตามหลักสากลใช้ระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

สาเหตุที่ทำการเลือกวิเคราะห์คุณภาพน้ำใน 3 พารามิเตอร์ข้างต้น ก็คือ ทั้ง 3 พารามิเตอร์ข้างต้น เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ และเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถใช้บ่งบอกถึงความสะอาดและความสกปรกของคุณภาพน้ำได้อย่างชัดเจน

3.9 วิธีศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ

ในการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล จะทำการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล เทียบกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆกัน 6 ความเข้มข้น ดังตารางที่ 3.1 เหมือนกับในขั้นตอนการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับ น้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่น กับ น้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ

หลังจากเตรียมสาหร่าย และสารต่างๆดังตารางที่ 3.1 ลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปเขย่าในตู้บ่ม โดยเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และนำออกไปวัดค่าการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล โดยทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์สาหร่ายออก เพื่อทำการวัดสี ทุกๆ 6 ชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นทำการวัดค่าทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลา 2-4 วัน

เหตุผลที่เราใช้ความยาวคลื่นที่ 475 นาโนเมตร แทนค่าการฟอกจางสี เนื่องจาก สัดส่วนของการฟอกจางสี สามารถหาได้จาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ที่จุดสุดท้ายของการทดลองที่มีค่าลดลงจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ที่จุดเริ่มต้นของการทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล

จากการได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล เป็นจำนวน 6 ตัวอย่าง ดังนี้

1. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ (ซ้ำที่ 1) (Water: WA1)
2. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ (ซ้ำที่ 2) (Water: WA2)



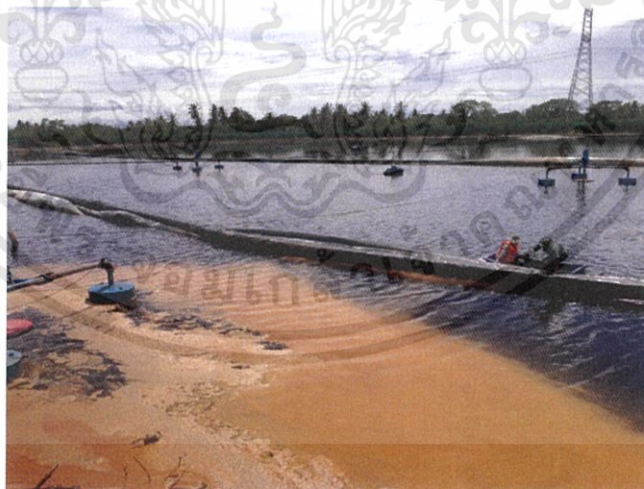
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ไม่มีการเติมอากาศ ซ้ำที่ 1 (Water: WA1) และซ้ำที่ 2 (Water: WA2)

3. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER)



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER)

4. ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ถูกปล่อยออกจากทางออกของบ่อที่มีการบำบัดแล้ว (Exit: EX)



รูปที่ 4.3 ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่ถูกปล่อยออกจากทางออกของบ่อที่มีการบำบัดแล้ว (Exit: EX)

5. ตัวอย่างน้ำในบ่อที่มีการปรับสภาพน้ำด้วยปูนขาว (CaO: CA)



รูปที่ 4.4 ตัวอย่างน้ำในบ่อที่มีการปรับสภาพน้ำด้วยปูนขาว (CaO: CA)

6. ตัวอย่างน้ำในบ่อที่พื้นที่รอบๆบ่อมีตัวอย่างดินที่มีสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ (Diluted: DIL)



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างน้ำในบ่อที่พื้นที่รอบๆบ่อมีตัวอย่างดินที่มีสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ (Diluted: DIL)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และได้ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบๆบ่อที่ 6 มาด้วย จำนวน 1 ตัวอย่าง (Green Soil: GS)

นำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน มาทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงบนอาหารรุ่นชนิด Tris Acetate Phosphate (TAP) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อพบว่าเกิดเซลล์สาหร่ายขึ้นบนอาหารรุ่น ทำการ Restreak เพื่อให้สาหร่ายบริสุทธิ์ จากนั้น ส่งสาหร่ายไปจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่าย ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ด้วยวิธีส่องกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) จากผลการส่องกล้อง พบว่า พบสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก จำนวน 2 สายพันธุ์ ในตัวอย่างน้ำ 1 ชนิด และในตัวอย่างดิน 1 ชนิด ได้แก่ พบสาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* (AER-01) ในตัวอย่างน้ำตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER) และพบสาหร่าย *Chlorella sp.* (GS-04) ในตัวอย่างดิน (Green Soil: GS) (ตารางที่ 4.1) ส่วนตัวอย่างน้ำจากตำแหน่งอื่นๆ ตรวจไม่พบสาหร่าย จึงได้ทำการเลือกสาหร่าย AER-01 ที่ค้นพบมาทำการทดลองต่อ เนื่องจาก สาหร่าย AER-01 เป็นสาหร่ายที่ทำการคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาล ซึ่งคาดว่าสาหร่ายชนิดนี้จะสามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำเสียสำน้ำตาล และสามารถทำการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลได้ตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

ตารางที่ 4.1 บริเวณของแหล่งน้ำในโรงงานราชบุรีเอทานอลที่พบสาหร่าย และสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่พบในแต่ละแหล่งน้ำ

บริเวณ	สายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ถูกค้นพบ
ตัวอย่างน้ำในตำแหน่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER)	<i>Bumilleriopsis peterseniana</i>
ตัวอย่างดิน (Green Soil: GS)	<i>Chlorella sp.</i>

จากการได้ทำการหาข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์สาหร่ายทั้ง 2 ชนิดที่ถูกค้นพบจากแหล่งน้ำภายใน
โรงงานราชบุรีเอทานอลแล้ว สรุปได้ว่า

สาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* สาหร่ายสายพันธุ์นี้ ถูกค้นพบขึ้นโดย Vischer and
Pascher ที่เมืองบาเซล ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และเมื่อทำการจัดจำแนกสาหร่าย *Bumilleriopsis*
peterseniana ตามหลักอนุกรมวิธานแล้ว พบว่าสาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* จัดอยู่ใน

Domain Eukaryota

Kingdom Stramenopiles

Division PX Clade

Class Xanthophyceae

Order Mischococcales

Family Centritrataceae

Genus *Bumilleriopsis*

Species *Peterseniana*

เมื่อทำการจัดจำแนกสาหร่าย *Chlorella* sp. ตามหลักอนุกรมวิธานแล้ว พบว่าสาหร่าย
Chlorella sp. จัดอยู่ใน

Domain Eukaryota

Kingdom Viridiplantae

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

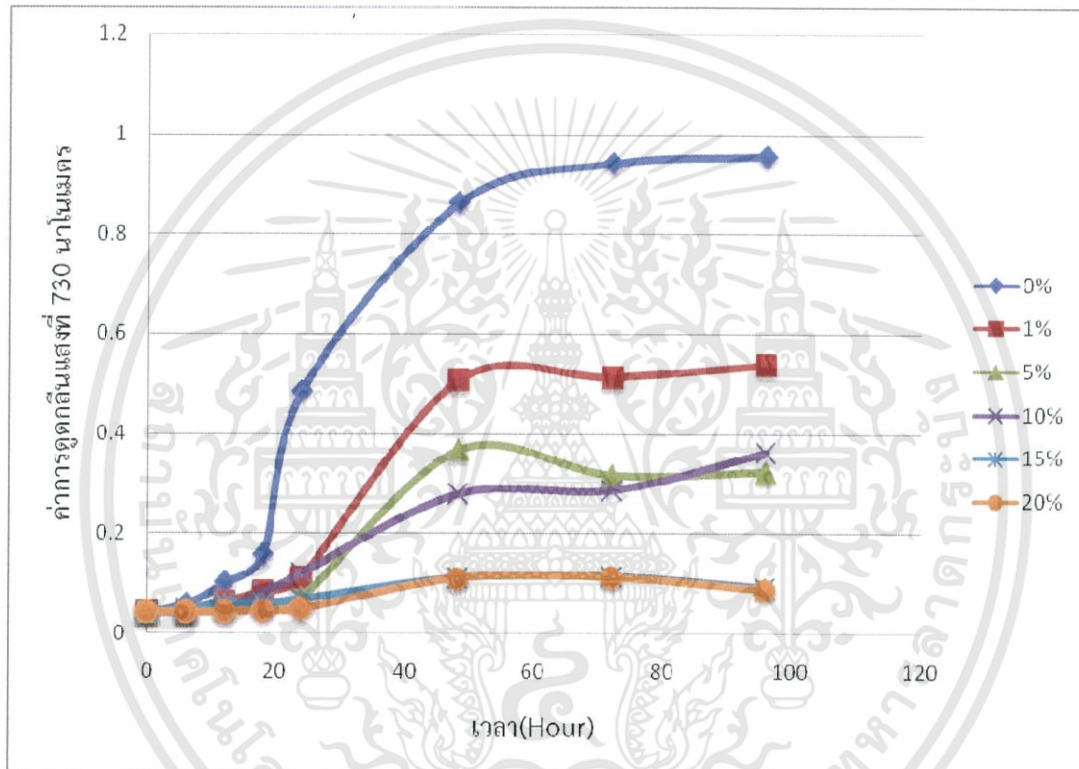
ตารางที่ 4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำภายในโรงงาน
ราชบุรีเอทานอล (กำลังขยายภาพ 1000X)

บริเวณที่คัดแยก	ภาพถ่าย
ตัวอย่างน้ำค้ำแห่งที่มีการเติมอากาศภายในบ่อ (Aerated: AER)	
ตัวอย่างดิน (Green Soil: GS)	

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำ น้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ

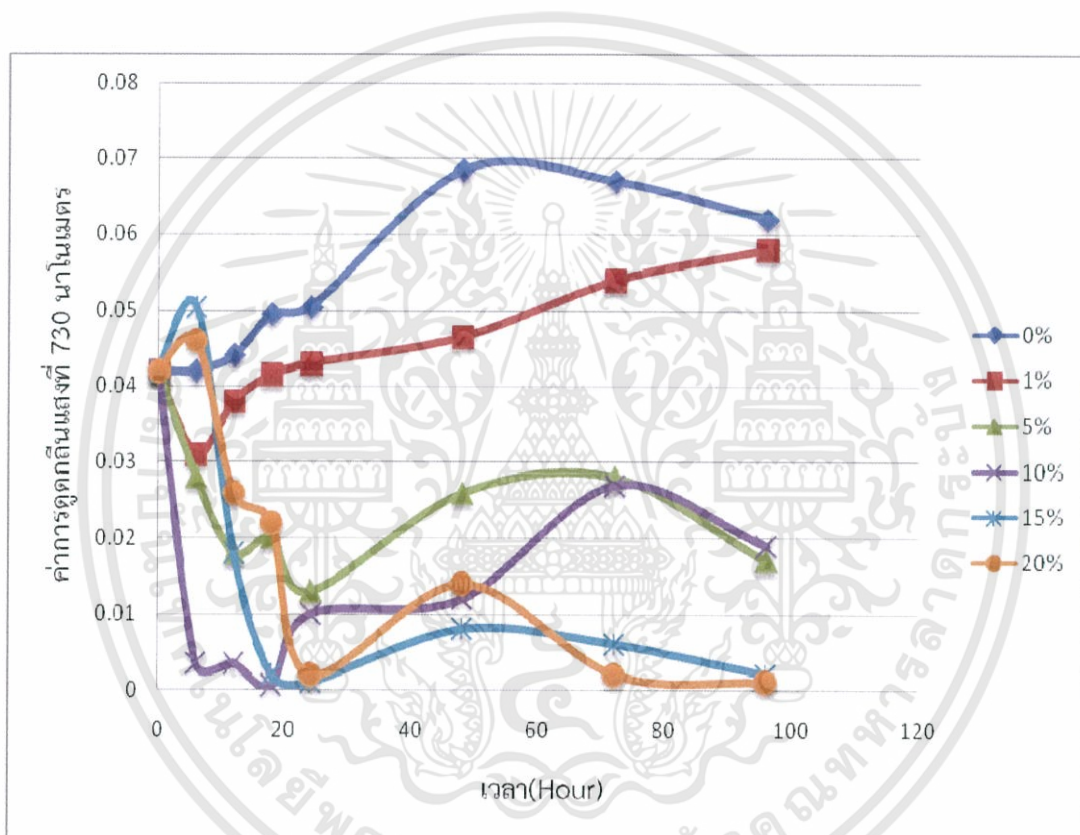
นำสาหร่ายสีเขียว *Bumilleriopsis peterseniana* มาศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายใน
อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล
(DW+Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ โดยเฉพาะเลี้ยง
สาหร่ายสีเขียวลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้ม
แสงที่ 1,500 ลักซ์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อสาหร่ายพร้อมต่อการทำการ
ทดลองแล้ว ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP น้ำเสียสำน้ำตาล และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนต่างๆที่จะใช้ใน
การทำการทดลองดังตารางที่ 3.1 ลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ไปเขย่าในตู้บ่ม โดยเขย่า
ที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ แล้ว
ทำการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกๆ 6 ชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้น ทำการวัดค่า
ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เป็นเวลา 2-4 วัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า สาหร่ายที่ถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0% (TAP 50 มิลลิลิตร) จะมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่ความเข้มข้นอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลเพิ่มขึ้น ที่ 1% 5% 10% 15% และ 20% การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะค่อยๆลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Bumilleriopsis peterseniana* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำกลั่นและน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+ Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่า สาหร่ายที่ถูกเลี้ยงที่ 0% และ 1% จะมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงที่ความเข้มข้นอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวยังไม่มีปริมาณน้ำเสียสำน้ำตาลหรือมีปริมาณน้ำเสียสำน้ำตาลในปริมาณที่น้อยอยู่ แต่ที่ความเข้มข้นอื่นๆ คือที่ 5% 10% 15% และ 20% จะมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวค่อยๆลดลงตามลำดับ ตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Bumilleriopsis peterseniana* ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล

โดยสรุปแล้ว พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP น้ำเสียสำน้ำตาล และน้ำกลั่น มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้งสี่ โดยในชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0% จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.956 และที่ความเข้มข้น 20% จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.112 ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ซึ่งทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เช่นเดียวกัน ปรากฏว่าที่ความเข้มข้น 0% จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.0685 และที่ความเข้มข้น 20% จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.046 เท่านั้น

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายจากการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลอง จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) มาก เนื่องจากในชุดการทดลองชุดแรก สาหร่ายจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีประสิทธิภาพที่จะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้มากกว่าในน้ำกลั่น และจากการทดลอง ก็พบว่า น้ำเสียสำน้ำตาล มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลงทั้ง 2 ชุดการทดลอง ทั้งในชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และในชุดการทดลองที่ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses)

4.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเสียสำน้ำตาล

นำตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล มาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้น โดยจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้น ใน 3 พารามิเตอร์ คือ

1. ความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (Chemical Oxygen Demand: COD)
2. ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen: DO)
3. ความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand: BOD)

ตารางที่ 4.3 ค่าคุณภาพน้ำเบื้องต้นของน้ำตัวอย่างจากแหล่งน้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล

บริเวณที่คัดแยก	COD	DO	BOD
ตัวอย่างน้ำเสียสำ น้ำตาลในตำแหน่งที่ไม่มี การเติมอากาศ (ซ้ำที่ 1) (WA1)	35,008.8 mg/L	0.49 mg/L	94,200 mg/L
ตัวอย่างน้ำเสียสำ น้ำตาลในตำแหน่งที่ไม่มี การเติมอากาศ (ซ้ำที่ 2) (WA2)	33,801.6 mg/L	0.42 mg/L	96,600 mg/L
ตัวอย่างน้ำเสียสำ น้ำตาลในตำแหน่งที่มี การเติมอากาศภายใน บ่อ (AER)	31,387.2 mg/L	0.64 mg/L	95,600 mg/L
ตัวอย่างน้ำเสียสำ น้ำตาลในตำแหน่งที่ถูก ปล่อยออกจากทางออก ของบ่อที่มีการบำบัด แล้ว (EX)	30,180 mg/L	0.50 mg/L	93,800 mg/L
ตัวอย่างน้ำในบ่อที่มีการ ปรับสภาพน้ำด้วยปูน ขาว (CA)	1,207.2 mg/L	6.88 mg/L	223 mg/L
ตัวอย่างน้ำในบ่อที่พื้นที่ รอบๆบ่อมีตัวอย่างดินที่ มีสาหร่ายเจริญเติบโต อยู่ (DIL)	2,414.4 mg/L	1.3 mg/L	954 mg/L

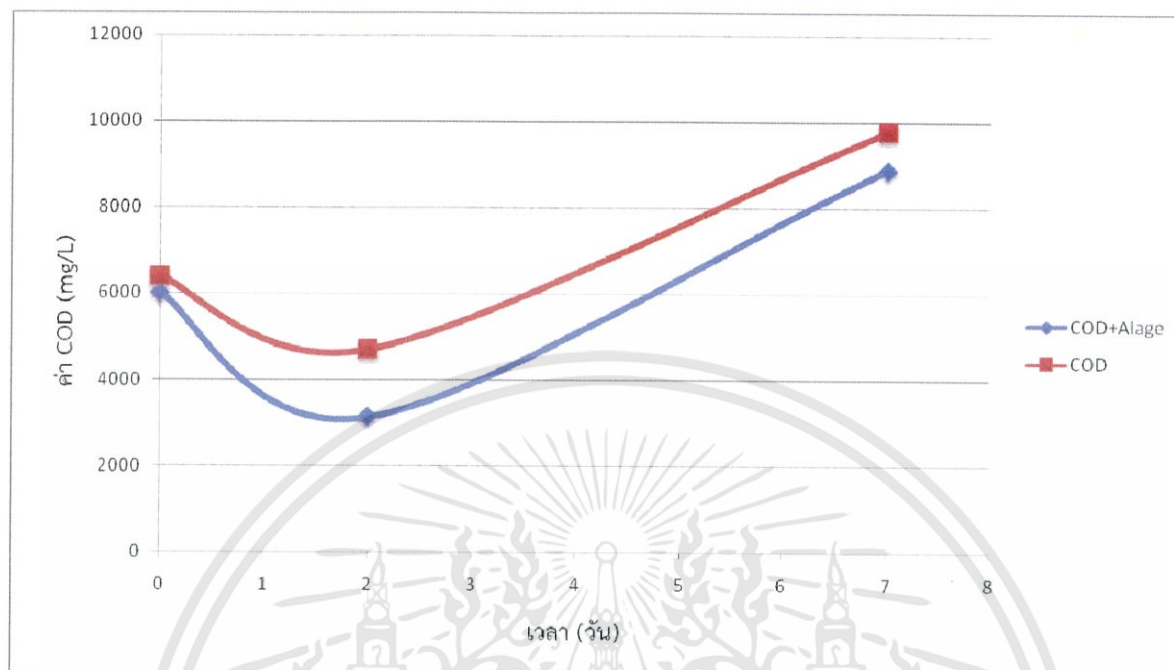
โดยจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาล เปรียบเทียบกันระหว่าง 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม (Control) และชุดทดสอบ (Sample) ซึ่งชุดควบคุม จะเป็นชุดการทดลองที่ไม่ใส่สาหร่ายในน้ำเสียสำน้ำตาล ส่วนชุดทดสอบ จะใช้ตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่ผ่านขั้นตอนการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายมาแล้ว โดยจะเลือกใช้ตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่ความเข้มข้น 20% (TAP 40 ml. + Molasses 10 ml.) มาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาล เพื่อเปรียบเทียบว่าสาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* ที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเสียสำน้ำตาล สามารถทำการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลได้จริง

ตารางที่ 4.4 ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุม ซึ่งไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่าย ในเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

พารามิเตอร์ต่างๆ	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 7
COD	6,399.36 mg/L	4,704 mg/L	9,768 mg/L
BOD	13,360 mg/L	5,862.5 mg/L	5,437.5 mg/L

ตารางที่ 4.5 ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดทดสอบ (น้ำเสียสำน้ำตาลที่ผ่านการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ความเข้มข้น 20%) ในเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

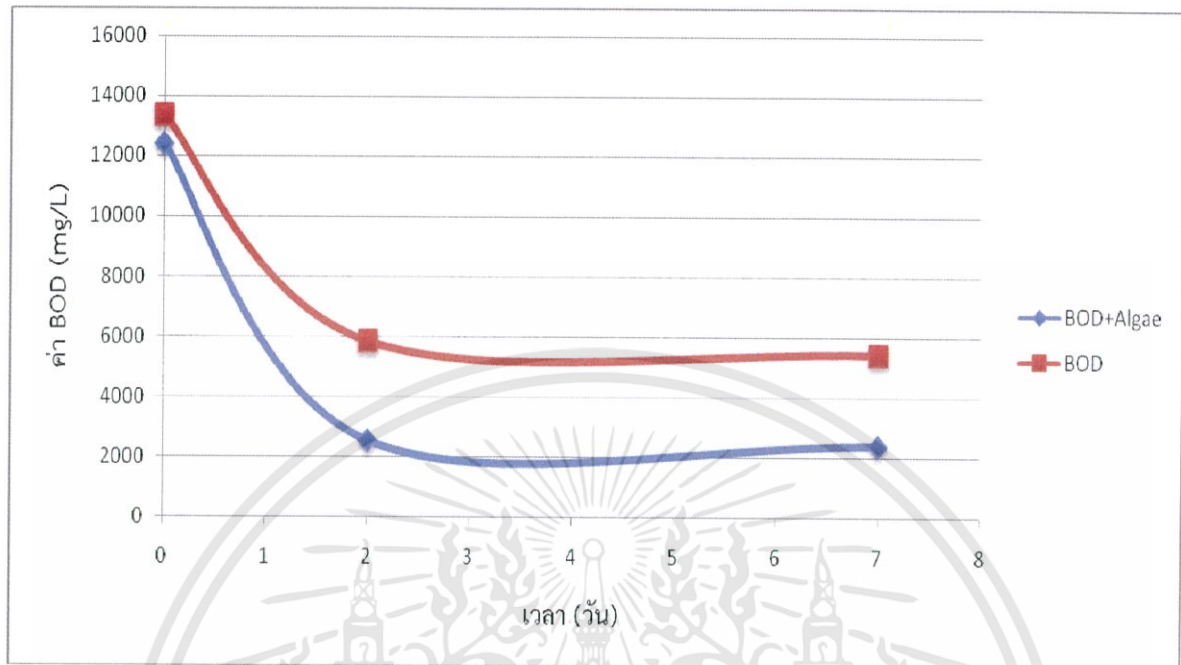
พารามิเตอร์ต่างๆ	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 7
COD	6,011.52 mg/L	3,136 mg/L	8,880 mg/L
BOD	12,400 mg/L	2,550 mg/L	2,400 mg/L



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า COD กับเวลา ของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พบว่าค่าซีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลของชุดควบคุม (Control) กับค่าซีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลของชุดทดสอบ (Sample) นั้น ในช่วงระยะเวลา 0 วัน และ 2 วัน ค่าซีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลของทั้งสองชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่า ในช่วงวันที่ 7 ค่าซีโอดีจะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยทั้งสองชุดการทดลอง ค่าซีโอดี มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

อย่างไรก็ตาม ที่ค่า COD ในวันที่ 7 มีค่าเพิ่มขึ้นนั้น สาเหตุอาจเกิดได้จากการที่ระยะเวลาในวันที่ 7 เป็นช่วงระยะเวลาที่เกินช่วงที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยลง และอาจจะเป็นช่วงเวลาที่ยาฆ่าเชื้อที่อยู่ในเซลล์สาหร่ายออกมา จึงทำให้มีปริมาณสารเคมีในระบบเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ค่าซีโอดีมีค่าที่เพิ่มสูงขึ้น ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า BOD กับเวลา ของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พบว่าค่าบีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลของชุดควบคุม (Control) กับค่าบีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลของชุดทดสอบ (Sample) นั้น ในช่วงระยะเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ค่าบีโอดีของน้ำเสียสำน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตามลำดับ โดยทั้งสองชุดการทดลอง มีแนวโน้มของค่าบีโอดี เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

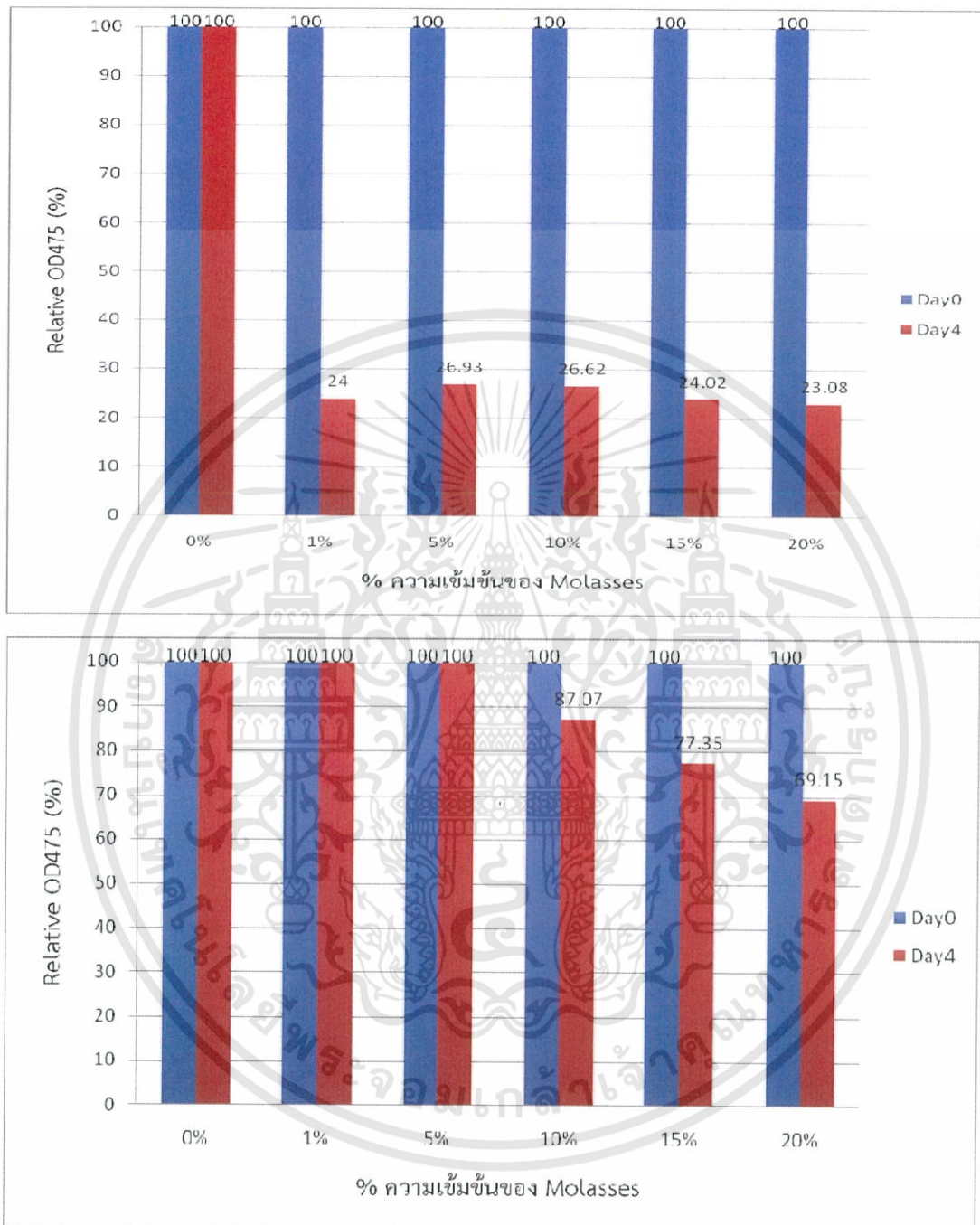
จากการทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาล ซึ่งจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาล เปรียบเทียบกันระหว่างน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใส่สาหร่าย (ชุดทดสอบ) และน้ำเสียสำน้ำตาลที่ไม่ใส่สาหร่าย (ชุดควบคุม) โดยจะทำการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำกันที่ระยะเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ พบว่า ในการทดลองทั้งสองชุดการทดลอง ค่าซีโอดีและค่าบีโอดี มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ก็คือ ค่าซีโอดีจะลดลง ในระยะเวลา 0 วัน และ 2 วัน แต่จะมีค่าเพิ่มขึ้น ในช่วงวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ ค่าบีโอดี จะมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงระยะเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

สามารถสรุปได้ว่า ในชุดการทดลองของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ไม่ได้ใส่สาหร่าย (ชุดควบคุม) ที่ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุม มีค่าลดลง เนื่องจาก เมื่อนำน้ำเสียสำน้ำตาลไปทำการบ่มในตู้บ่ม โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที พร้อมกับให้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ โมเลกุลภายในน้ำเสียสำน้ำตาลอาจมีการเปลี่ยนแปลงไป พร้อมกับการที่พบว่าเมื่อทำการบ่มในตู้บ่มโดยใช้ระยะเวลาไปเรื่อยๆ พบว่าน้ำเสียสำน้ำตาลมีสีที่จางลงอย่างเห็นได้ชัด เลยอาจสันนิษฐานได้ว่า อาจจะส่งผลให้ค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลมีค่าลดลงด้วย

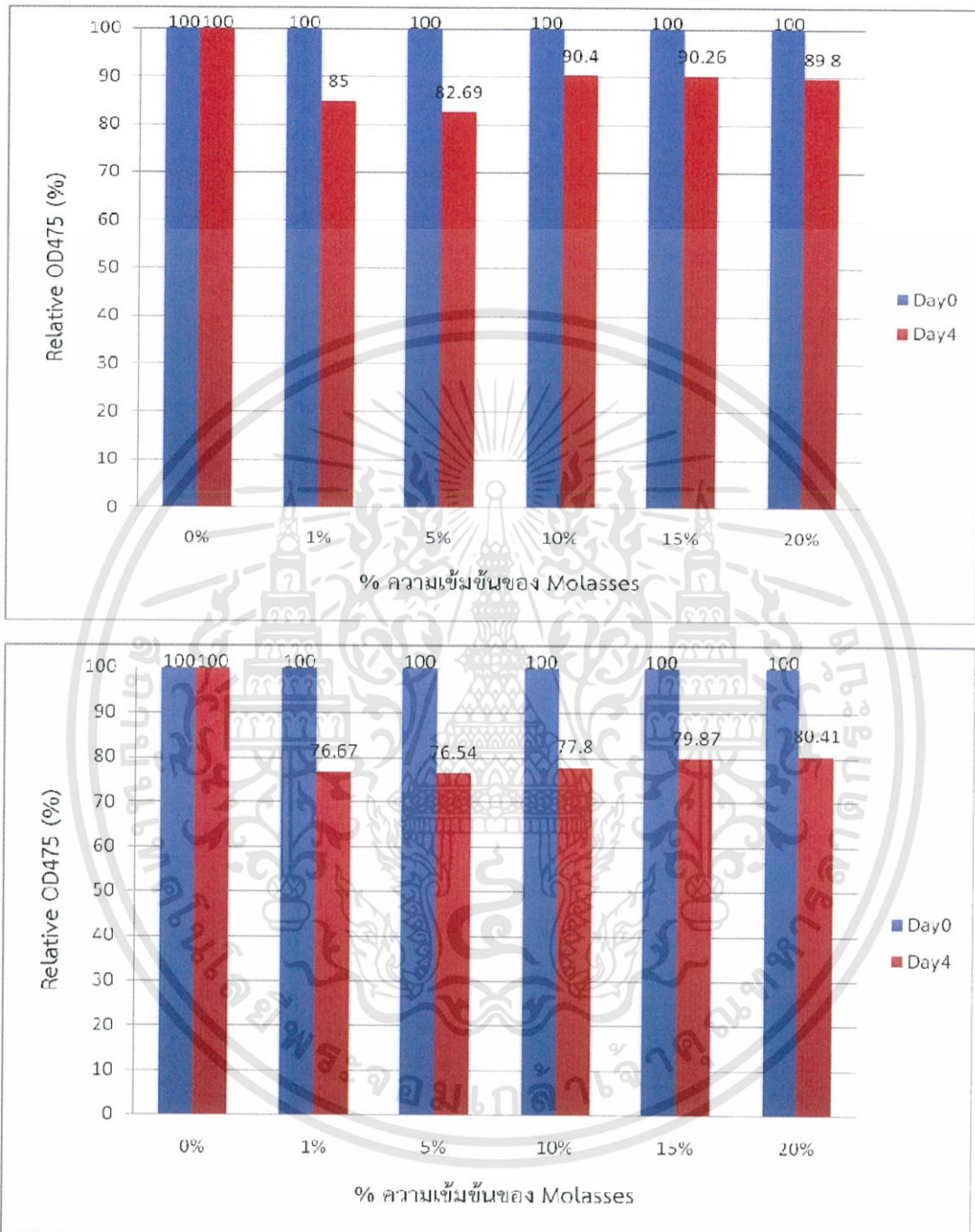
และในชุดการทดลองของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ใส่สาหร่าย (ชุดทดสอบ) เมื่อนำน้ำเสียสำน้ำตาลที่มีตัวอย่างของสาหร่ายไปทำการบ่มในตู้บ่ม โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที พร้อมกับให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เช่นเดียวกัน พบว่า สาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* สามารถทำการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลได้จริง สังเกตได้จากค่าคุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาลที่ ค่าซีไอดีและค่าบีไอดีมีค่าลดลง

4.4 ผลการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ

ศึกษาการฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+ Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน จะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวที่มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 2-4 วัน เมื่อสาหร่ายพร้อมต่อการทำการทดลองแล้ว ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP น้ำเสียสำน้ำตาล และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนต่างๆที่จะใช้ในการทำการทดลอง ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ไปเขย่าในตู้บ่ม โดยเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 36 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ แล้วทำการวัดค่าการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล ทุกๆ 6 ชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้น ทำการวัดค่าทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลา 2-4 วัน โดยทั้งสองชุดการทดลอง เราจะทำการเตรียมชุดควบคุม (ชุดที่ไม่ใส่สาหร่าย) ในทั้งสองชุดการทดลอง เพื่อใช้ผลจากชุดทดลองมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลรวมด้วย



รูปที่ 4.10 การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุม (บน) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) (ล่าง) ในอัตราส่วนต่างๆ

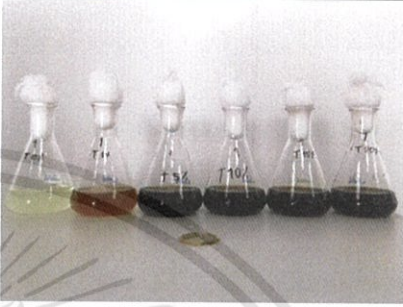





รูปที่ 4.11 การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในชุดควบคุม (บน) และในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) (ล่าง) ในอัตราส่วนต่างๆ

จากการศึกษาการฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ พบว่า ในชุดการทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses) ค่าการฟอกจางสีที่ได้ นั้น มีค่าการฟอกจางสีที่น้อยกว่าชุดควบคุม (ชุดที่ไม่ใส่สาหร่าย) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับน้ำเสียสำน้ำตาลและอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดี เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีแล้วทำให้เซลล์ของสาหร่ายเต่งและมีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ตัวเซลล์ไปบดบังแสงที่จะส่องผ่านลงมา และทำให้ค่าการฟอกจางสีมีค่าน้อยลง โดยที่ความเข้มข้น 1% 5% และ 10% นั้น สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญเติบโตในปริมาณที่สูง ทำให้เซลล์ของสาหร่ายไปบดบังการส่องผ่านของแสง และทำให้ค่าการฟอกจางสีมีค่าน้อย แต่ที่ความเข้มข้นที่ 15% และ 20% สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำลงตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำกากสำที่สูงขึ้น ทำให้มีจำนวนเซลล์ของสาหร่ายน้อยลง ส่งผลให้มีเซลล์ของสาหร่ายมาบดบังการส่องผ่านของแสงในปริมาณที่น้อยลง ทำให้ค่าการฟอกจางสีที่ได้ จะมีค่ามากกว่าค่าการฟอกจางสีที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาลต่ำๆ

จากการศึกษาการฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาล ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+ Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ พบว่าผลการทดลองจะกลับทิศทางการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+ Molasses) โดยที่ในชุดการทดลองของน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+ Molasses) ค่าการฟอกจางสีที่ได้มีค่าสูง สาเหตุเกิดจากการที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับน้ำเสียสำน้ำตาลและน้ำกลั่นนั้น ในน้ำกลั่น สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตได้น้อยมาก เนื่องจากไม่มีสารอาหารเป็นตัวกระตุ้นให้สาหร่ายเจริญเติบโต จึงทำให้เซลล์ของสาหร่ายมีปริมาณน้อย ทำให้ไม่ค่อยมีเซลล์ของสาหร่ายมาบดบังการดูดกลืนแสง อีกทั้งค่าการฟอกจางสีในชุดตัวอย่าง ก็มีค่ามากกว่าชุดควบคุม (ชุดที่ไม่ใส่สาหร่าย) ดังนั้น จึงเหมาะที่จะใช้สาหร่ายชนิดนี้ฟอกจางสีน้ำเสียสำน้ำตาลในน้ำกลั่น นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า ประสิทธิภาพในการฟอกจางสีจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำเสียสำน้ำตาล

ตารางที่ 4.6 การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses)

จำนวนชั่วโมง	TAP+Molasses
0 ชั่วโมง	
6 ชั่วโมง	
12 ชั่วโมง	
18 ชั่วโมง	

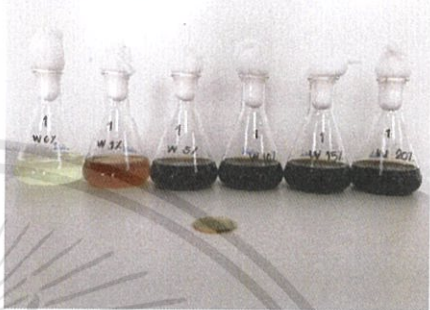



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses)

จำนวนชั่วโมง	TAP+Molasses
24 ชั่วโมง	
48 ชั่วโมง	
72 ชั่วโมง	
96 ชั่วโมง	

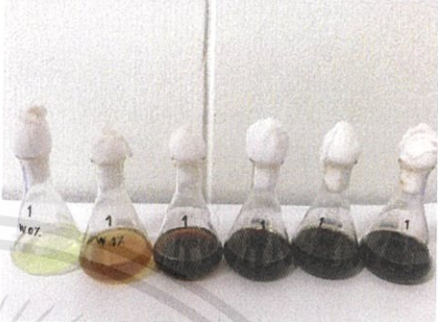



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในกับน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses)

จำนวนชั่วโมง	DW+Molasses
0 ชั่วโมง	
6 ชั่วโมง	
12 ชั่วโมง	
18 ชั่วโมง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) การฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในกับน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses)

24 ชั่วโมง	
48 ชั่วโมง	
72 ชั่วโมง	
96 ชั่วโมง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อการบำบัดน้ำเสียสำ
น้ำตาล จากการวิจัย ได้ค้นพบสาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียสำน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากโรงงานราชบุรี
เอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งสาหร่ายที่ค้นพบ มีชื่อสายพันธุ์ว่า *Bumilleriopsis*
peterseniana และ *Chlorella* sp. ทำการเลือกสาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* เพื่อใช้ใน
การศึกษาต่อ ต่อมา ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำ
น้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่
ความเข้มข้น 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ พบว่า สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ดีมากในชุด
การทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) แต่ในชุดการ
ทดลองที่เพาะเลี้ยงในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตที่น้อย
มาก จึงสามารถสรุปได้ว่า น้ำเสียสำน้ำตาลไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของสาหร่าย
Bumilleriopsis peterseniana

การศึกษาการฟอกจางสี (Decolorization) ของน้ำเสียสำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำ
เสียสำน้ำตาล (TAP+Molasses) และ ในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses) ในอัตราส่วน
ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0% 1% 5% 10% 15% และ 20% ตามลำดับ พบว่า ผลจะเป็นตรงกันข้ามกับการ
วัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP กับน้ำเสีย
สำน้ำตาล (TAP+Molasses) เมื่อสาหร่ายถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สาหร่ายมีสารอาหารที่จะใช้ใน
การเจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้มีจำนวนสาหร่ายในระบบมาก เลยส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายไปกีด
กันการส่องผ่านของแสง ทำให้ค่าการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม (ชุดที่ไม่ใส่
สาหร่าย) ในขณะที่ในชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในน้ำกลั่นกับน้ำเสียสำน้ำตาล (DW+Molasses)
จะมีจำนวนสาหร่ายในระบบน้อย ทำให้ไม่มีเซลล์ของสาหร่ายมากีดกันการส่องผ่านของแสง จึงทำให้ชุด
การทดลองนี้ มีค่าการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาลมากกว่า จึงสามารถสรุปได้ว่า สาหร่าย
Bumilleriopsis peterseniana สามารถฟอกจางสีในน้ำกลั่นได้ดีกว่าในน้ำเสียสำน้ำตาล

นำน้ำเสียสำน้ำตาลที่ผ่านการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำ
การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ พบว่า สาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* ที่ทำการคัดแยกได้จากแหล่ง
น้ำภายในโรงงานราชบุรีเอทานอล สามารถทำการบำบัดน้ำเสียสำน้ำตาลได้จริง พิจารณาจากค่าซีโอดี
และค่าบีโอดีที่มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงระยะเวลา 0 วัน 2 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการทำการทดลองเกี่ยวกับสาหร่าย ซึ่งสาหร่าย ถือเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะไม่ปกติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว ในการทำการทดลอง จึงควรที่จะทำในที่ปลอดภัย และระมัดระวังการปนเปื้อน เนื่องจากถ้าตัวอย่าง เกิดการปนเปื้อน จะส่งผลให้การทดลองผิดพลาดและทำให้ผลการทดลองที่ได้ มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumilleriopsis peterseniana* พบว่าผลการศึกษากการเจริญเติบโตของสาหร่าย มีความชัดเจนตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง แต่อาจเกิดความผิดพลาดจากการทดลองขึ้นได้ จากเหตุผลดังต่อไปนี้ เช่น ในขั้นตอนของการปิดตัวอย่างน้ำจากฟลาสก์ เพื่อนำมาทำการวัดค่าการเจริญเติบโต ควรเขย่าตัวอย่างในฟลาสก์ให้มีความสม่ำเสมอ เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่แท้จริงที่จะใช้ในการวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย และในขั้นตอนของการวัด ควรใช้เวลาให้น้อยที่สุด เพื่อป้องกันไม่ไห้สาหร่ายตกตะกอน ซึ่งจะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

ในการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล พบว่าผลการศึกษากการเจริญเติบโตของสาหร่าย มีความชัดเจนตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง โดยในขั้นตอนของการศึกษาการฟอกจางสีของน้ำเสียสำน้ำตาล อาจเกิดความผิดพลาดจากการทดลองขึ้นได้ จากเหตุผลดังต่อไปนี้ เช่น ในขั้นตอนของการวัดค่าการดูดกลืนแสง ควรใช้เวลาในการทำการทดลองให้น้อยที่สุด เพื่อป้องกันไม่ไห้สาหร่ายตกตะกอน ซึ่งจะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

ในการทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของน้ำเสียสำน้ำตาล ในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (COD) และค่าความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (BOD) ควรทำการประกันคุณภาพในการวิเคราะห์ เพื่อตรวจสอบว่าผลการทดลองที่ได้มีความถูกต้องมากน้อยแค่ไหน โดยในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของสารเคมี จะใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP) เป็นตัวประกันคุณภาพ ส่วนในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ จะใช้กลูโคสและกลูตามิค (Glucose+Glutamic) เป็นตัวประกันคุณภาพ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Tusanee Tondee , Suntud Sirianuntapiboon. 2008. “Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 ”
- [2] Tusanee Tondee , Suntud Sirianuntapiboon , Sadahiro Ohmomo. 2007. “Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246”
- [3] Suntud Sirianuntapiboon , Prapa Zohsalam , Sadahiro Ohmomo. 2003. “Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6”
- [4] กรมควบคุมมลพิษ. 2548. มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม.
[Online]. Available : http://www.pcd.go.th/Info_serv/reg_std_water04.html
- [5] กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. เอทานอล.
[Online]. Available : <http://webkc.dede.go.th/webmax/sites/default/files.pdf>
- [6] ธาณุวัฒน์ ลากตันศุภผล. 2550. การศึกษาประสิทธิภาพของพืชน้ำในการบำบัดน้ำเสีย. คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
- [7] ประวิทย์ สูงสุด. 2550. การใช้น้ำจากโรงงานเอทานอลเพื่อประโยชน์ทางการเกษตร. วารสารวิจัย ฉบับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- [8] สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า.
- [9] [Online]. Available : http://www4.dede.go.th/dede/fileadmin/usr/bers/gasohol_documents/Executive_summary_value_added_to_ethanol_waste.pdf
- [10] [Online]. Available : <http://www.marevita.org/index.php?option=classification&path=Algues>
- [11] [Online]. Available : [http://natureineu.blob.core.windows.net/natureineu/Chlorobotrys%20regularis%20\(2\)%20\(1024x682\).jpg](http://natureineu.blob.core.windows.net/natureineu/Chlorobotrys%20regularis%20(2)%20(1024x682).jpg)

- [12] [Online]. Available :
<http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/heterokontophyta/chrysophyta/Mallomonadales.html>
- [13] [Online]. Available : <http://imagict.com/en/words/phaeophyta>
- [14] [Online]. Available : <https://facepunch.com/showthread.php?t=1150988>
- [15] [Online]. Available : <https://en.wikipedia.org/wiki/Euglena>
- [16] [Online]. Available : <http://algalweb.net/Millportalgae1007b.htm>
- [17] [Online]. Available :
<http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Algen/AndereAlgen/Source/Cryptomonas%20erosa.html>
- [18] [Online]. Available :
http://www.keweenawalgae.mtu.edu/gallery_pages/dinoflagellates.htm
- [19] [Online]. Available : <http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-04-02.html>
- [20] [Online]. Available : <http://www.motherearthnews.com/organic-gardening/milk-and-molasses-magic-zbcz1402.aspx>
- [21] [Online]. Available : www2.diw.go.th/sura/.../DIW/chapter%201.doc
- [22] [Online]. Available : <http://ccala.butbn.cas.cz/en/bumilleriopsis-peterseniana-vischer>
- [23] [Online]. Available : <http://www.uniprot.org/taxonomy/240379>
- [24] [Online]. Available : <https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorella>



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำและการเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ก-1: การวิเคราะห์ค่าความต้องการออกซิเจนของสารเคมี (Chemical Oxygen Demand : COD) ด้วยวิธีการรีฟลักซ์แบบปิด (Closed Reflux Titrimetric Method)

1. หลักการ (Principle)

การวัดความสกปรกของน้ำ คิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยใช้สารเคมีซึ่งมีอำนาจในการออกซิไดซ์สูง (โพแทสเซียมไดโครเมต, $K_2Cr_2O_7$) ไปออกซิไดซ์สารอินทรีย์คาร์บอนในสภาวะที่เป็นกรดอย่างแรง ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$) และใช้การ Reflux แบบปิดเพื่อป้องกันการสูญหายไของสารที่ระเหยได้

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เตาให้ความร้อน (heating Block) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $150 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. ตู้อบร้อน (hot air oven)
3. เครื่องชั่ง (balance analytical) ละเอียด 4-5 ตำแหน่ง
4. บิวเรต (burette) พร้อมขาตั้ง
5. หลอดทดลองฝาเกลียวด้วย TFE ขนาด 15×100 มิลลิเมตร หรือ 16×150 มิลลิเมตร
6. ตะแกรงสำหรับตั้งหลอดทดลอง
7. ลูกแก้วกันกระเด็น
8. ปิเปตอัตโนมัติ (micro pipette) ขนาด 1- 10 มิลลิลิตร และ ขนาด 100 – 1,000 ไมโครลิตร

3. สารเคมี (Reagents)

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ย่อยสลาย (Standard Potassium dichromate digestion solution) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

ซึ่งโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$) ชนิดสารมาตรฐานปฐมภูมิ (Primary standard grade) (อบที่อุณหภูมิ $150^\circ C$ เป็นเวลา 2 ชม.) 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. Sulfuric acid, conc. H_2SO_4) ปริมาตร 167 มิลลิลิตร เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต (Mercury sulfate, $HgSO_4$) จำนวน 33.3 กรัม ทั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

2. สารละลายกรดซัลฟิวริกที่เติมซิลเวอร์ซัลเฟต (Sulfuric acid with silver sulfate)

ซึ่ง ซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver sulfate, Ag_2SO_4) 25.3 กรัม (Ag_2SO_4 5.5 g / 1.0 kg H_2SO_4) เติมลงใน conc. H_2SO_4 ปริมาตร 2.5 ลิตร (H_2SO_4 1 L = 1.84 kg) ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย

3. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ (Ferroun indicator solution)

ซึ่ง 1-10 ฟีนานโทโรลีนโมโนไฮเดรต (1-10 Phenanthroline monohydrate, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) 1.485 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.1 นอร์มอล 1 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

ซึ่ง เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต (Ferrous ammonium sulfate hexahydrate, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 19.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติม conc. H_2SO_4 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (สารละลายนี้จะต่อนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardize) ทุกครั้งกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต)

5. สารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต (Potassium hydrogen phthalate Standard, KHP)

ซึ่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, $HOOC_6H_4COOK$) 0.425 กรัม (อบที่อุณหภูมิ $103^\circ C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (สารละลายนี้จะให้ค่า COD = 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร)

6. น้ำกลั่น (Distilled Water : DW)

4. ขั้นตอนการทดสอบ

การหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization)

หาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardize) สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ด้วยสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้อยู่สลาย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้อยู่สลาย 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในขวดรูปกรวย
2. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
3. ค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตรและตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. หยดสารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด
5. ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) โดยจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดง

ตารางที่ ก-1 ปริมาตรตัวอย่างน้ำและสารเคมีสำหรับหลอดแก้วชนิดต่างๆ

ขนาดของหลอดย่อยสลาย	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย โพแทสเซียมไดโคร เมตสำหรับย่อยสลาย (มิลลิลิตร)	สารละลาย กรดซัลฟิวริก (มิลลิลิตร)	ปริมาตร รวม (มิลลิลิตร)
หลอดแก้ว 16x100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20x150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25x150 มม.	10.0	6.0	14.0	30.0
หลอดมาตรฐาน 10 มล.	2.5	1.5	3.5	7.5

การทดสอบตัวอย่าง (Sample Analysis)

1. ล้างหลอดแก้วและฝาด้วยกรดซัลฟิวริก 20% ก่อนใช้ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
2. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้อยู่สลาย 0.1 นอร์มอล จำนวน 1.5 มิลลิลิตรทุกๆหลอดทดลองและเขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟิวริกที่ผสมซิลเวอร์ซัลเฟต จำนวน 3.5 มิลลิลิตร ลงในทุกๆหลอดทดลอง โดยค่อยๆใส่ให้กรดไหลลงตามด้านข้างของหลอด
4. ปิดฝาหลอดให้สนิท ค่อยๆเขย่าเพื่อให้สารเคมีภายในหลอดผสมเข้ากัน (ควรสวมถุงมือเพื่อป้องกันความร้อนขณะเขย่า)
5. นำหลอดทดลองใส่ลงในเตาให้ความร้อน (Heating Block) หรือ ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ตั้งอุณหภูมิ 150 °C แล้วทำการย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำหลอดทดลองออกจากเตาให้ความร้อน (Heating Block) หรือตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
7. เทสารละลายจากหลอดทดลองลงในขวดรูปกรวย เพื่อความสะดวกในการไทเทรต
8. หยดสารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด แล้วไทเทรตโดยใช้สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.05 นอร์มัล เป็น Titrant และเมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลแดง
9. ทุกครั้งต้องทำ Blank โดยทำเหมือนตัวอย่าง แต่ให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่าง
10. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ที่ใช้ใน การไทเทรต

ภาคผนวก ก-2: การวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen : DO ด้วยวิธีการอัลคาไลน์ ไอโอดีน เอไซด์ (Alkaline Iodide Azide Method)

1. หลักการ

การตรวจวิเคราะห์ออกซิเจนละลายโดยวิธี Azide Modification of Iodometric Method เป็นวิธีการตรวจวัดทางอ้อมโดยใช้หลักการที่ว่า ออกซิเจนละลายสามารถออกซิไดซ์ Mn^{2+} เป็น Mn^{4+} ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง และ Mn^{4+} จะออกซิไดซ์ไอโอดด์ (I^-) ไปเป็นไอโอดีน (I_2) ในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งปริมาณไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะสมมูลกับปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ดังนั้น จึงตรวจวัดปริมาณไอโอดีนโดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับปริมาณออกซิเจนละลาย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดบีโอดีขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมจุกแก้ว
2. ขวดปรับปริมาตรขนาด 200 และ 1,000 มิลลิลิตร
3. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

3. สารเคมี

1. สารละลายอัลคาไลน์ ไอโอดด์ โซเดียมเอไซด์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม หรือ ใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโซเดียมไอโอดด์ (NaI) หรือ โพแทสเซียมไอโอดด์ (KI) 150 กรัม เจือจางให้ได้ 950 มิลลิลิตร และทำให้เย็น ค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัมที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรอย่างช้าๆ เจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่มีฝาหรือจุกยาง (สารละลายนี้ต้องไม่มีสี เมื่อหยดน้ำแอมโมเนียไปทดสอบ ถ้าน้ำแอมโมเนียเปลี่ยนสีต้องเตรียมใหม่

2. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเทตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) จำนวน 400 กรัม หรือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) จำนวน 364 กรัมลงในน้ำกลั่น กรองส่วนที่ไม่ละลายออก และเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร (เมื่อตรวจสอบต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้ง ถ้าเติมลงในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด)

3. สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$)

ละลาย $KH(IO_3)_2$ 0.0813 กรัม ในน้ำ ใส่ขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานสต็อกโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) จำนวน 24.82 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 กรัม หรือคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เพื่อการเก็บไว้ใช้นานๆ แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เมื่อใช้งานให้เจือจางเป็น 0.025 นอร์มัล และทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardize) กับสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$)

5. อินดิเคเตอร์ น้ำแป้ง

ละลายแป้งมัน (Soluble Strach) 2 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 2-3 นาที เติมกรดซาลิซิลิก 0.2 กรัม เพื่อช่วยในการเก็บรักษาไว้ใช้นานๆ และเก็บไว้ที่มีอุณหภูมิต่ำ

4. ขั้นตอนการทดสอบ

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานสต็อกโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)

Standardize สารละลายมาตรฐานสต็อกโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) ด้วยสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$) ที่ใช้อยู่สลาย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร คนให้ละลาย
3. เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1-2 หยด
4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$) 20 มิลลิลิตร
5. นำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตจนได้สีเหลืองฟางข้าว
6. เติมน้ำแป้งลงไป 2 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีฟ้าคราม

7. ไทเทรตต่อจนได้สารละลายใส
8. บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน

การทดสอบตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างน้ำตามวิธีปฏิบัติที่เหมาะสมลงในขวดปิโอดี ต้องไม่มีฟองอากาศหรือช่องว่างเมื่อปิดฝาขวด
2. ปิเปตสารละลายแมงกานีสซัลเฟต (MnSO_4) 1 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลน์ ไอโอไดด์ เอไซด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกอย่างระมัดระวัง ไม่ให้เกิดฟองอากาศ เขย่าขึ้นๆ ลงๆ หลายๆ ครั้ง ให้สารผสมให้เข้ากันแล้วปล่อยให้เกิดการตกตะกอนของฟลอค
3. เมื่อตกตะกอนได้ส่วนใสมากกว่า 100 มิลลิลิตร เปิดจุกและค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 2 มิลลิลิตร ให้ไหลรินตามคอขวดปิโอดี
4. ปิดจุกและทำการเขย่า จนเห็นไอโอดีนกระจายทั่วและตะกอนภายในขวดละลายหมด
5. ปิเปตใส่ขวดรูปชมพู่จำนวน 201 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.025 นอร์มอล เมื่อสารละลายได้สีเหลืองฟางข้าว จึงเติมน้ำแบ่งที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ลงไป 2 มิลลิลิตร ไทเทรตต่อไปจนได้สารละลายใส
6. บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ที่ใช้ไปแล้วนำมาทำการคำนวณหาค่า DO

ภาคผนวก ก-3: การวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand : BOD)

1. หลักการ

บีโอดี (BOD) เป็นการวัดความสกปรกของน้ำคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจน (O_2) ที่ลดลงเนื่องจากจุลชีพจำพวกแบคทีเรีย (Bacteria) นำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Organic) โดยการหาค่าความต่างของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในตัวอย่างน้ำที่วัดได้วันแรก (DO_0) กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในตัวอย่างน้ำเดียวกันที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) $20 \pm 1^\circ C$ เป็นเวลา 5 วัน (DO_5)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดบีโอดีขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมจุกแก้วและฝาพลาสติกที่ปิดได้สนิท
2. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
3. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ 500 มิลลิลิตร
5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $20 \pm 1^\circ C$
6. ปีเปตขนาดต่างๆ
7. กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร
8. อุปกรณ์เติมอากาศ
9. ขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร (ปรับปริมาตรเป็น 201 มิลลิลิตร)

3. สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distilled Water : DW)
2. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

เตรียมโดยละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3)

เตรียมโดยละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.50 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)

เตรียมโดยละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.5 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.2

เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.50 กรัม , ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 21.75 กรัม , โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 33.40 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.70 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

7. สารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 1 นอร์มอล

เติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 28 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

8. สารละลายกลูโคสและกลูตามิก

นำกลูโคสและกลูตามิกไปอบแห้งที่ 105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปใส่ในโถดูดความชื้น จากนั้น ชั่งกลูโคสและกลูตามิก อย่างละ 150 มิลลิกรัม นำไปละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

9. สารละลายอัลคาไลน์ ไอโอไดด์ เอไซด์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม หรือ ใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) หรือ โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 150 กรัม เจือจางให้ได้ 950 มิลลิลิตร และทำให้เย็น ค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัมที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรอย่างช้าๆ เจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่มีฝาหรือจุกยาง (สารละลายนี้ต้องไม่มีสี เมื่อหยดน้ำแป้งลงไปทดสอบ ถ้าน้ำแป้งเปลี่ยนสีต้องเตรียมใหม่)

10. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเทตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) จำนวน 400 กรัม หรือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) จำนวน 364 กรัมลงในน้ำกลั่น กรองส่วนที่ไม่ละลายออก และเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร (เมื่อตรวจสอบต้องไม่เกิดสีกับน้ำแ่่ง ถ้าเติมลงในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด)

11. สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$)

ละลาย $KH(IO_3)_2$ 0.0813 กรัม ในน้ำ ใส่ขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

12. สารละลายมาตรฐานสต็อกโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) จำนวน 24.82 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 กรัม หรือคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เพื่อการเก็บไว้ใช้นานๆ แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เมื่อใช้งานให้เจือจางเป็น 0.025 นอร์มัล และทำการหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardize) กับสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิไบโอไอโอดีต ($KH(IO_3)_2$)

13. อินดิเคเตอร์ น้ำแ่่ง

ละลายแ่่งมัน (Soluble Strach) 2 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 2-3 นาที เติมกรดซาลิซิลิก 0.2 กรัม เพื่อช่วยในการเก็บรักษาไว้ใช้นานๆและเก็บไว้ที่มีอุณหภูมิต่ำ

4. ขั้นตอนการทดสอบ

น้ำที่ใช้ในการเจือจาง ชุดควบคุม (Blank Set)

1. บรรจุน้ำที่ใช้ในการเจือจางลงขวดปิโอดี 3 ขวดให้เต็มขวดด้วยวิธีกลักน้ำและให้ค่อยๆไหลรินลงตามคอขวด ระวังไม่ให้มีฟองอากาศตกค้างภายในขวด แล้วปิดจุกแก้ว
2. ขวดที่ 1 ทำการวัดค่าดีไอทันทันที เป็นค่า DO_0
3. ขวดที่ 2 นำไปบ่มที่ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดค่า DO เป็นค่า DO_5 ขณะที่บ่มต้องมีน้ำหล่อบนฝาจุกแก้วและปิดจุกพลาสติกครอบที่จุกแก้วอีกครั้ง เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำที่หล่อเหนือจุกแก้ว
4. ค่า $DO_0 - DO_5$ ต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้ามีค่ามากกว่าแสดงว่า น้ำที่ใช้ในการเจือจางมีผลต่อความถูกต้องในการวัด

สารละลายมาตรฐานกลูโคสและกรดกลูตามิก

1. ใช้วิธีการเจือจางโดยตรง ปิเปตสารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิกมา 5 มิลลิลิตรลงในขวดปิโอดี เติมน้ำที่ใช้ในการเจือจางลงไป 3 ขวด ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศภายใน เช่นเดียวกับการบรรจุน้ำที่ใช้ในการเจือจาง
2. คว่ำขวดสลับนางขวดให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันทั่วทั้งขวด เติมน้ำที่ใช้สำหรับการเจือจางหล่อไว้ที่จุกแก้วด้วย
3. ขวดที่ 1 ทำการวัดค่าดีไอทันที เป็นค่า DO_0
4. ขวดที่ 2 และ 3 นำไปบ่มที่ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดค่า DO เป็นค่า DO_5
5. คำนวณหาค่า BOD

น้ำตัวอย่าง

1. เก็บน้ำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หำยงห้องปฏิบัติการ แล้วบันทึกข้อมูลแหล่งน้ำที่เก็บมาอย่างละเอียด
2. ตรวจสอบคุณภาพน้ำทางกายภาพ เช่น สี, ความขุ่น, กลิ่น, ค่าพีเอช, ข้อมูลของแหล่งน้ำ เพื่อใช้ตัดสินใจในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจือจางว่าควรเจือจางเท่าไร
3. เตรียมตัวอย่างน้ำตามทฤษฎี เช่น การปรับพีเอช การกำจัดคลอรีนตกค้าง การเจือจาง หรืออื่นๆ จากนั้นจึงถ่ายน้ำลงขวดปิโอดีตามวิธีชุดละ 3 ขวด โดยขวดที่ 1 หาค่า DO ทันที เป็นค่า DO_0 อีก 2 ขวด นำไปบ่มที่ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดค่า DO เป็นค่า DO_5 กรณีที่ไม่ต้องเจือจาง กรณีที่ต้องเจือจาง จะต้องทำ 3 ชุดของความเข้มข้น ดูได้จากตารางที่ ก-2

ตารางที่ ก-2 การเลือกเจือจางน้ำตัวอย่างให้เหมาะสมในการหาค่า BOD

เปอร์เซ็นต์การเจือจางตัวอย่างน้ำ (%)	ช่วงค่า COD (mg/L)
0.01	20,000 – 70,000
0.02	10,000 – 35,000
0.05	4,000 – 14,000
0.1	2,000 – 7,000
0.2	1,000 – 3,500
0.5	400 – 1,400
1	200 – 700
2	100 – 350
5	40 – 140
10	20 – 70
20	10 – 35
50	4 – 14
100	0 - 7

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด

Tris Acetate Phosphate (TAP)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP)

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1. กรดบอริก (H_3BO_3)	0.0114 กรัม/ลิตร
2. เกล็ดเชียวอะซิติกแอซิด (Glacial Acetic Acid)	1 มิลลิลิตร/ลิตร
3. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.008 กรัม/ลิตร
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.05 กรัม/ลิตร
5. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.0085 กรัม/ลิตร
6. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.0272 กรัม/ลิตร
7. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.0375 กรัม/ลิตร
8. ทริส-เบส (Tris-Base)	2.42 กรัม/ลิตร
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.1 กรัม/ลิตร
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.05 กรัม/ลิตร
11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 กรัม/ลิตร
12. แมงกานีสคลอไรด์เทตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.00675 กรัม/ลิตร
13. เอทิลีนไดเอมีนเทตระอะซิติกแอซิด (EDTA)	0.05 กรัม/ลิตร
14. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.4 กรัม/ลิตร
15. ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.0056 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานอุตสาหกรรม

ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2539) ออกตามความในพระราชบัญญัติ
โรงงาน พ.ศ. 2535 กำหนดค่ามาตรฐานน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงาน ต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. ความเป็นกรดและด่าง (pH) มีค่าไม่เกิน 5.5 – 9.0
2. ทิตีเอส (TDS หรือ Total Dissolved Solids) ต้องมีค่าดังนี้
 - 2.1 ค่า TDS ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรหรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นกับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรมแต่ต้องไม่มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 2.2 น้ำทิ้ง ซึ่งระบายออกจากโรงงานลงสู่แหล่งน้ำที่มีค่าความเค็ม (Salinity) มากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า TDS จะมีค่ามากกว่าค่า TDS ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำได้ไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. สารแขวนลอย (Suspended Solids) ไม่มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นกับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรม แต่ต้องไม่มากกว่า 150 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. โลหะหนัก มีค่าดังนี้
 - 4.1 ปรอท (Mercury) ไม่มากกว่า 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.2 เซเลเนียม (Selenium) ไม่มากกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.3 แคดเมียม (Cadmium) ไม่มากกว่า 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.4 ตะกั่ว (Lead) ไม่มากกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.5 อาร์เซนิก (Arsenic) ไม่มากกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.6 โครเมียม (Chromium)
 - 4.6.1 Hexavalent Chromium ไม่มากกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
 - 4.6.2 Trivalent Chromium ไม่มากกว่า 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

- | | | |
|------|----------------------|---------------------------------|
| 4.7 | บาเรียม (Barium) | ไม่มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 4.8 | นิกเกิล (Nickel) | ไม่มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 4.9 | ทองแดง (Copper) | ไม่มากกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 4.10 | สังกะสี (Zinc) | ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 4.11 | แมงกานีส (Manganese) | ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร |
5. ซัลไฟด์ (Sulfide) ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 6. ไซยาไนด์ (Cyanide) ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 7. ฟอรัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 8. สารประกอบฟีนอล ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 9. คลอรีนอิสระ (Free Chlorine) ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 10. เพสตีไซด์ (Pesticide) ไม่มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 11. อุณหภูมิ (Temperature)
 12. สี (Colour) ต้องไม่เป็นที่พึงรังเกียจ
 13. กลิ่น (Odor) ต้องไม่เป็นที่พึงรังเกียจ
 14. น้ำมันและไขมัน (Oil And Greases) ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรม แต่ต้องไม่มากกว่า 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
 15. บีโอดี (Biological Oxygen Demand) ไม่มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรม ตามที่กรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนด แต่ต้องไม่มากกว่า 60 มิลลิกรัมต่อลิตร
 16. ทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen) ไม่มากกว่า 120 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรม แต่ต้องไม่มากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
 17. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) ไม่มากกว่า 120 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจแตกต่างจากที่กำหนดไว้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำทิ้ง แหล่งรองรับน้ำทิ้ง หรือประเภทโรงงานอุตสาหกรรม ตามที่กรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนด แต่ต้องไม่มากกว่า 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ : นายปัญญารักษ์ รุ่งนรกิจ

วัน-เดือน-ปีเกิด : 26 กุมภาพันธ์ 2537

ที่อยู่ปัจจุบัน : 105 ถนนเอกชัย ซอยเอกชัย 46 แขวงบางบอน เขตบางบอน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10150

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ.2554 : มัธยมศึกษาตอนปลาย แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โรงเรียนมัธยมวัดสิงห์ เกรดเฉลี่ย 3.52

พ.ศ.2558 : ปริญญาตรี วท.บ. (เคมีสิ่งแวดล้อม) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ : นางสาวมดา โล่ห์วีชรหัสดี

วัน-เดือน-ปีเกิด : 24 พฤศจิกายน 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน : 40/79 หมู่ 5 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ แขวงโคกแฝด เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10530

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ.2554 : มัธยมศึกษาตอนปลาย แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบวิทยาลัย ปทุมธานี เกรดเฉลี่ย 3.43

พ.ศ.2558 : ปริญญาตรี วท.บ. (เคมีสิ่งแวดล้อม) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติผู้เขียน (ต่อ)

ชื่อ : นายพรพล พุกพิบูลย์

วัน-เดือน-ปีเกิด : 28 มีนาคม 2537

ที่อยู่ปัจจุบัน : 129/104 หมู่ 3 หมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส ซอย 7 ถนนรัตนธิเบศร์ ตำบลบางรักน้อย อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2554 : มัธยมศึกษาตอนปลาย แผนกสองภาษา แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์
โรงเรียนสารสาสน์วิเทศบางบัวทองเกรดเฉลี่ย 3.45

พ.ศ.2558 : ปริญญาตรี วท.บ. (เคมีสิ่งแวดล้อม) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง