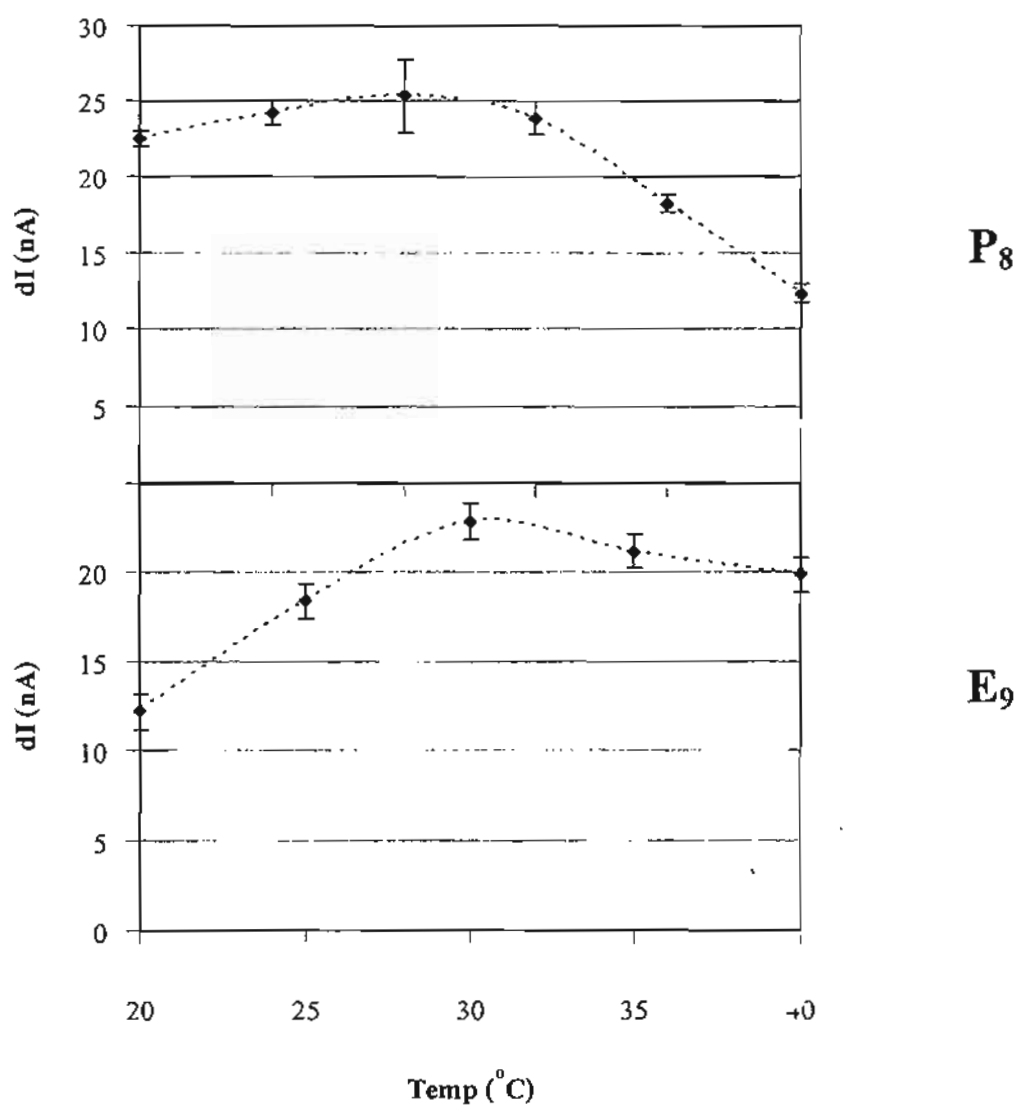
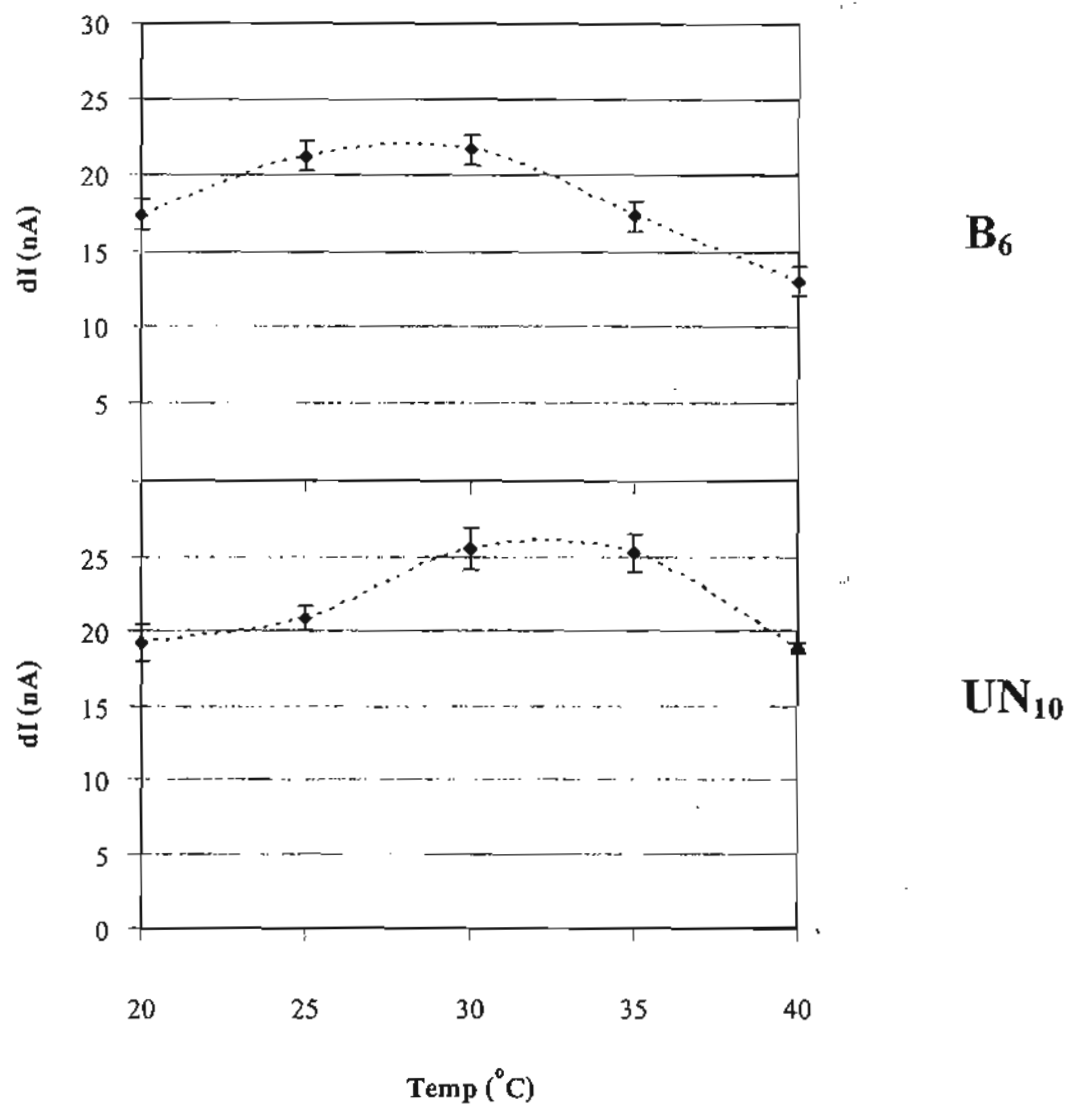




รูปที่ 3.6 การตอบสนองของ *Pseudomonas* sp. P₈ และ Enteric bacteria E₉ ที่อุณหภูมิต่างๆ



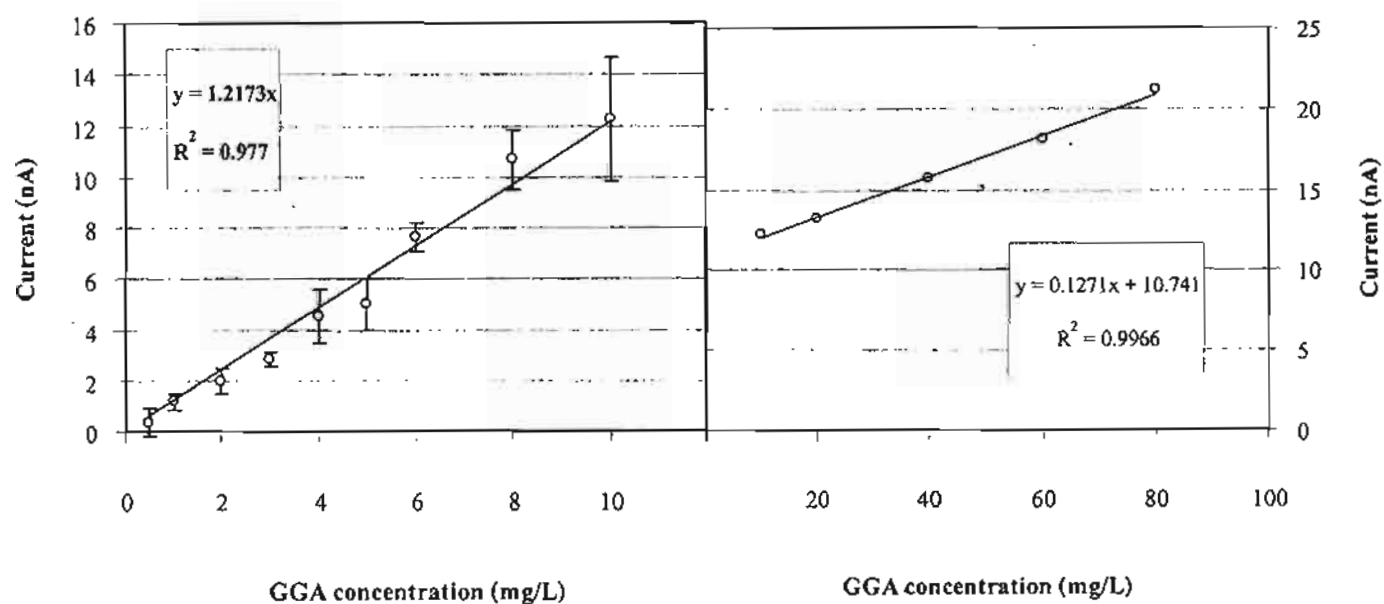
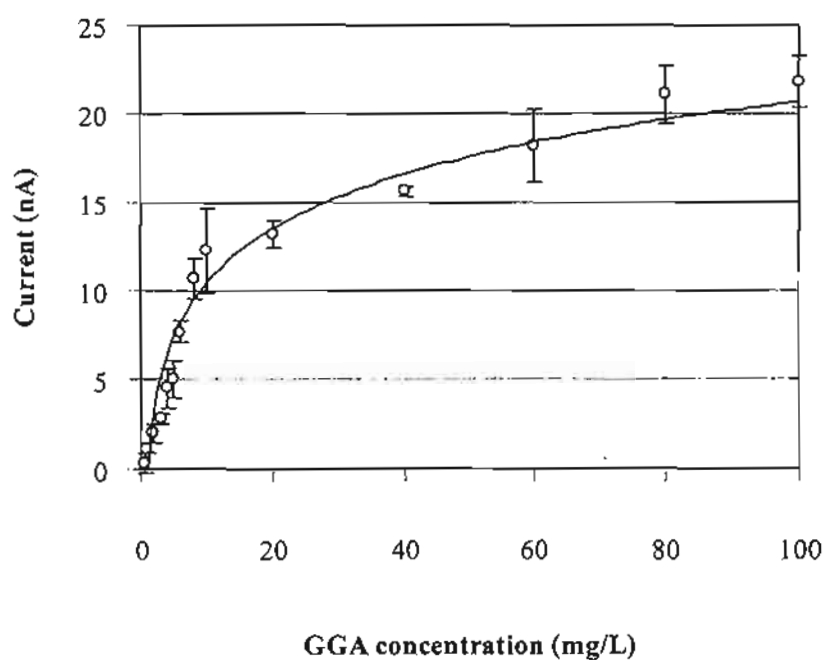
รูปที่ 3.7 การตอบสนองของ *Bacillus* sp.B₆ และ Unidentified bacteria UN₁₀ ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากผลการศึกษาที่แสดงในรูปที่ 3.6 และ 3.7 จะเห็นว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถตอบสนองต่อสารละลายกลูโคส - กรดกลูตามิกได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียส และพบว่า enteric bacteria E₉ ยังคงตอบสนองต่อสารอาหารได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการศึกษาได้เลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิต่างกล่าวใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทย รวมทั้งเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถตอบสนองต่อสารอาหารได้ดีเช่นกัน

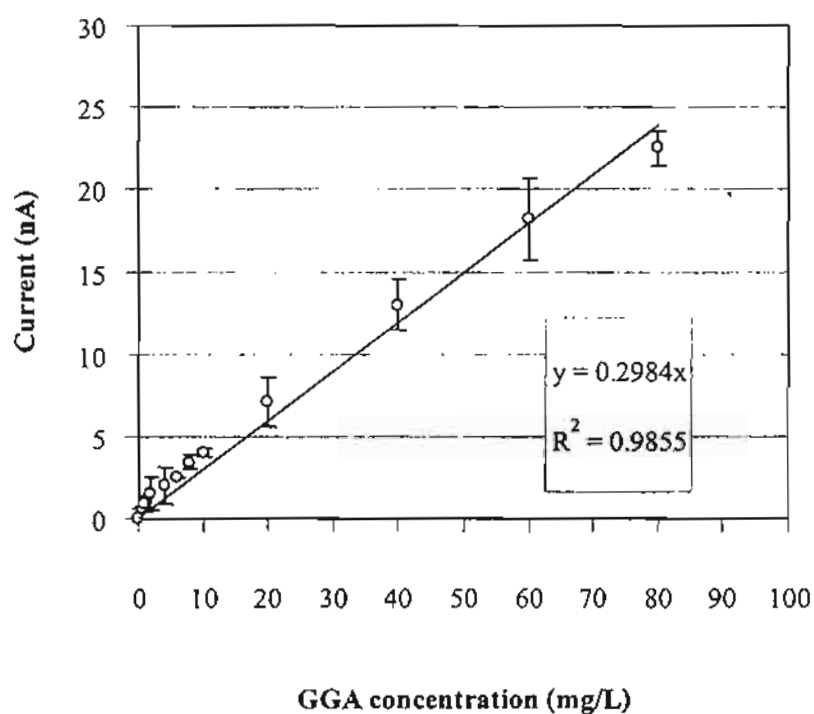
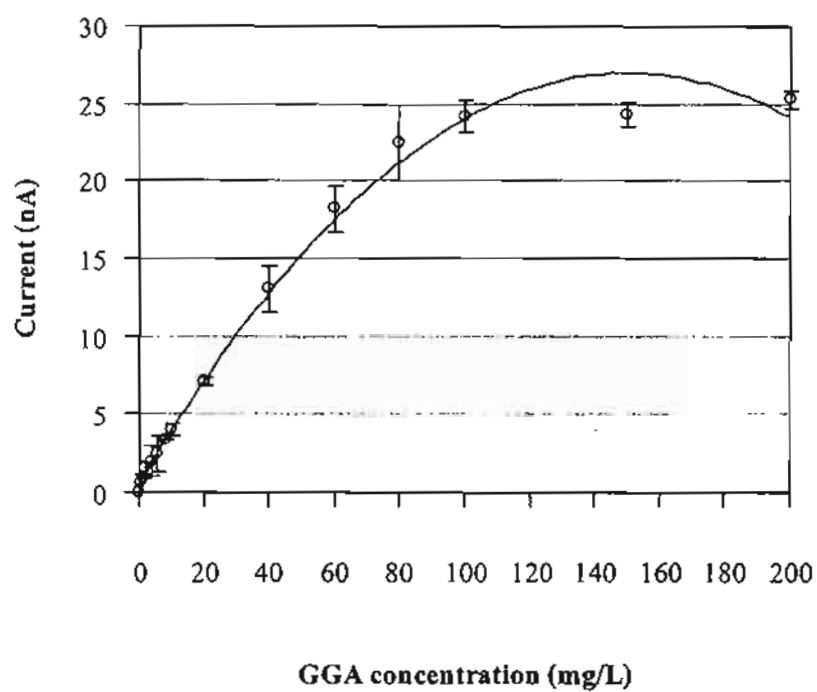
3.6 การศึกษาสมบัติของเซนเซอร์ที่ใช้จุลินทรีย์ไอโซเลทต่าง ๆ เป็นไบโอคะตะลิสต์

การศึกษาส่วนนี้เริ่มจากการนำเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดเลือก มาตรึงลงบนเมมเบรนในปริมาณที่เหมาะสมได้แก่ enteric bacteria E₉, *Bacillus* sp. B₆ และ *Pseudomonas* sp. P₉ ใช้ปริมาณเซลล์ที่ 1×10^7 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ขณะที่ unidentified bacteria UN₁₀ ใช้ปริมาณเซลล์ที่ 1×10^6 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่นเมมเบรนดังกล่าวมาทดสอบสมบัติของเซนเซอร์ โดยใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิกซึ่งมีค่าบีโอดีเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารทดสอบ ระหว่างการศึกษาควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทคือ enteric bacteria E₉ และ *Pseudomonas* sp. P₉ ควบคุมที่ 7.0 ขณะที่ unidentified bacteria UN₁₀ และ *Bacillus* sp. B₆ ควบคุมที่ 6.5 โดยสมบัติของเซนเซอร์ที่ทำการศึกษาประกอบด้วย

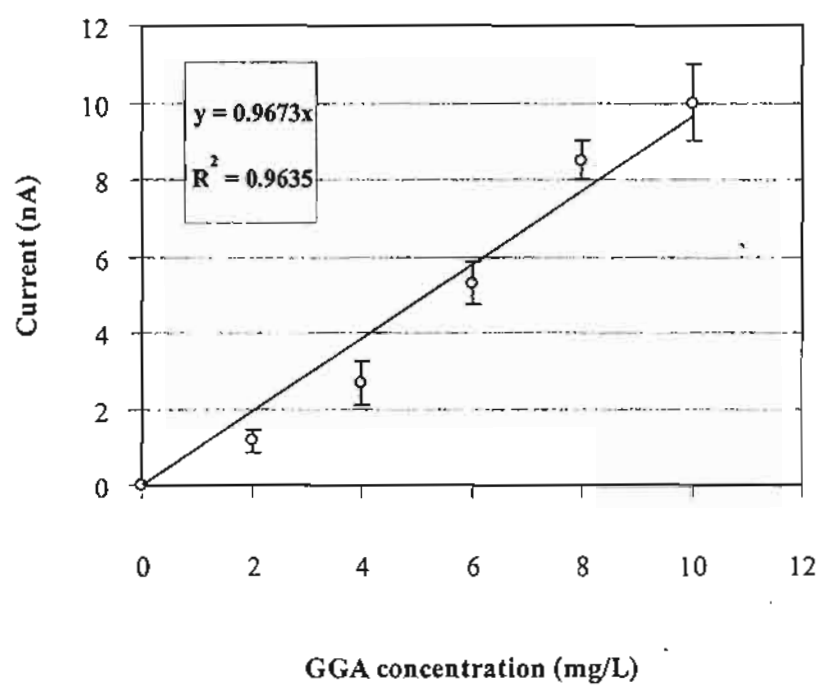
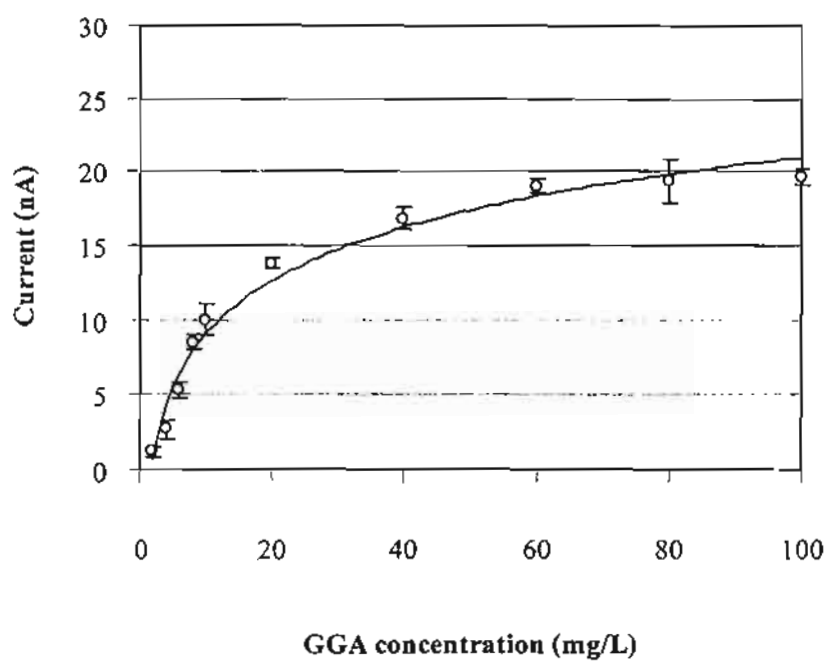
- 1) ค่าพิสัยเชิงเส้น
- 2) ความไวต่อการตอบสนอง
- 3) ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้
- 4) เวลาในการตอบสนอง
- 5) ความคงตัวต่อการใช้งาน



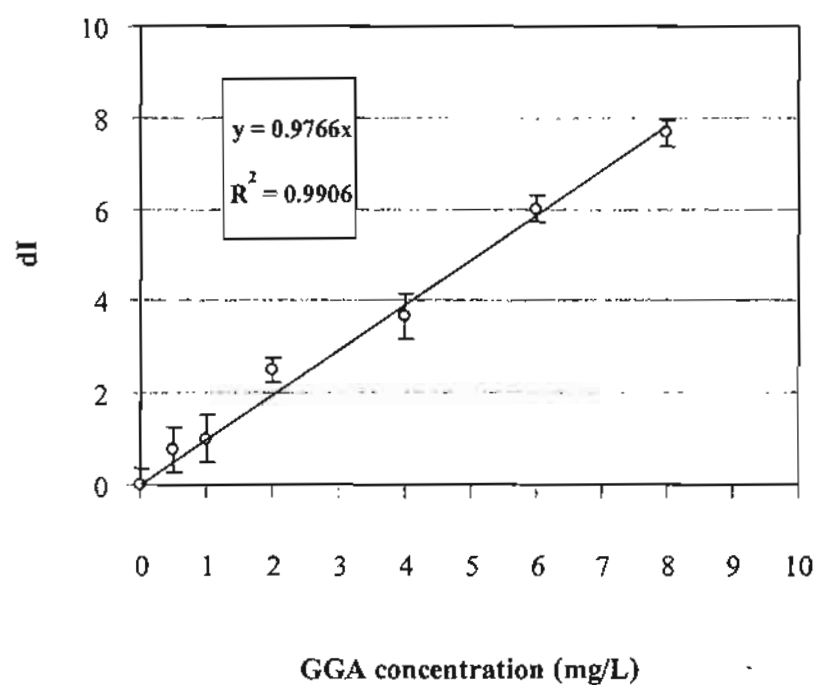
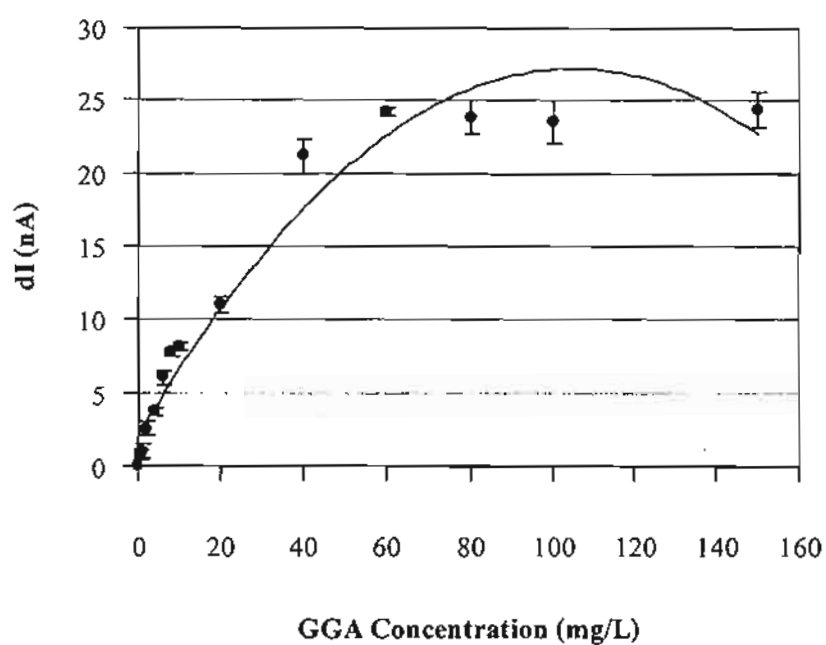
รูปที่ 3.8 กราฟมาตรฐานหัววัดจุลินทรีย์ที่ติดตั้งด้วยจุลินทรีย์ B_6 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายกลูโคส และกรดกลูตามิก



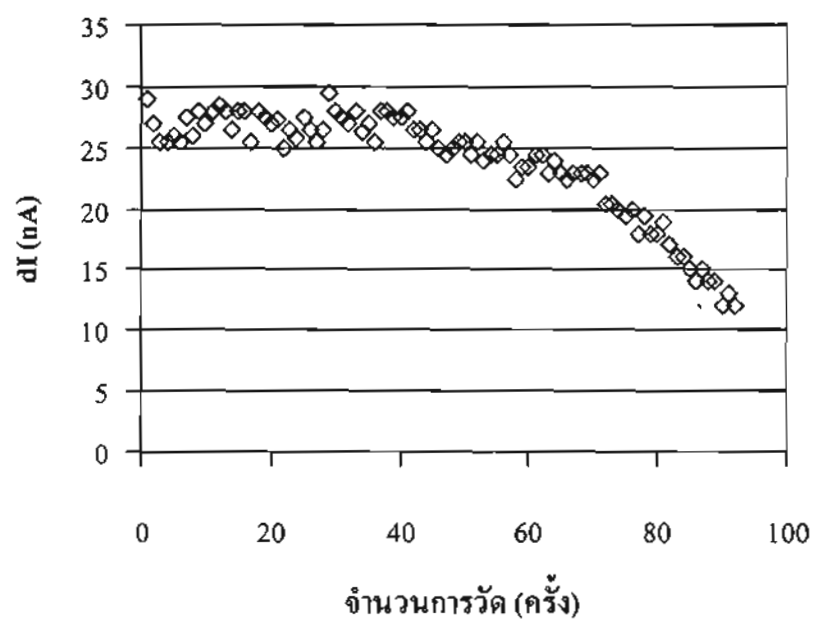
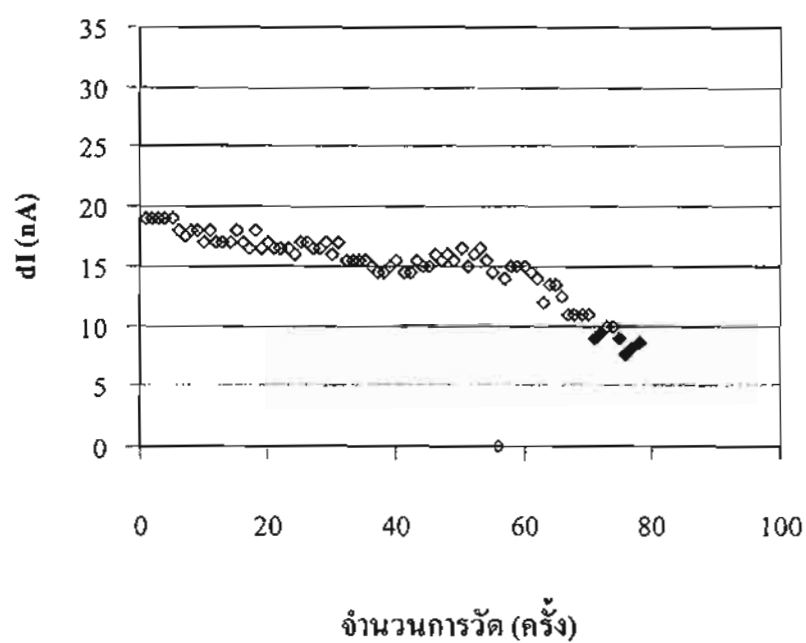
รูปที่ 3.9 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตึงด้วยจุลินทรีย์ E_9 เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย กลูโคส-กรดกลูตามิก



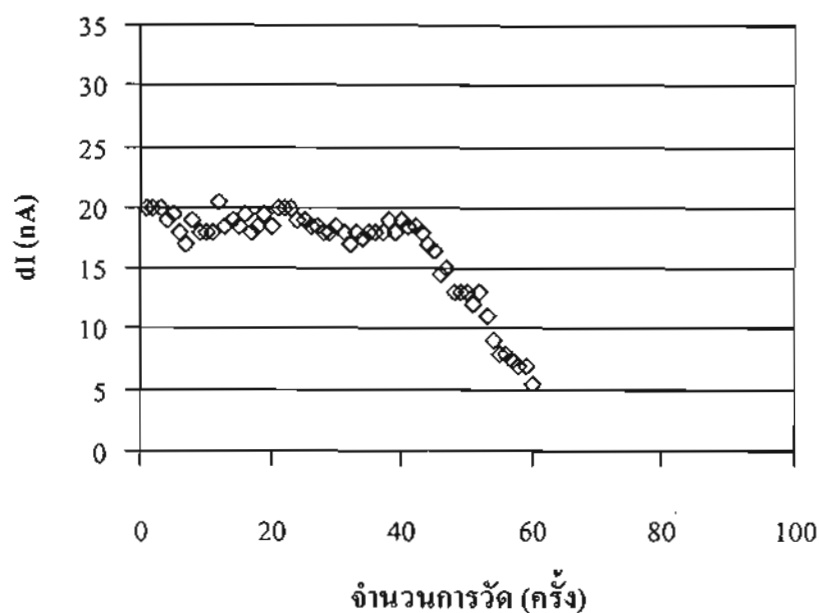
รูปที่ 3.10 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* sp. P₈ เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย กลูโคส-กรดกลูตามิก



รูปที่ 3.11 กราฟมาตรฐานของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย Unidentified bacteria UN₁₀ เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย กลูโคส-กรดกลูตามิก



รูปที่ 3.12 กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ติดตั้งด้วยจุลินทรีย์ B₆ และจุลินทรีย์ E, ที่ระยะเวลาการใช้งานต่างๆ



รูปที่ 3.13 กระแสของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรึงด้วย *Pseudomonas* sp. P₈ ที่ระยะเวลาการใช้งานต่างๆ

การตอบสนองต่อสารละลายมาตรฐานกลูโคส-กรดกลูตามิกของหัววัดไบโอดีที่ตรึงด้วยเชื้อไอโซเลตต่างๆ แสดงในรูปที่ 3.8 ถึง 3.13 และตารางที่ 3.5 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่า จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดี ได้แก่ *Bacillus* sp. B₈ ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้น 2 ช่วง และ enteric bacteria E₉ ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้นยาวที่สุดถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี จุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลตมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 3.5 สมบัติของหัววัดจุลินทรีย์ที่ตรงด้วยจุลินทรีย์อีโคโนเลทต่างๆ

	<i>Bacillus</i> sp. B ₆	Enteric bacteria E ₉	<i>Pseudomonas</i> sp. P ₈	Unidentified bacteria UN ₁₀
Cell loading	1 x 10 ⁷ cfu/cm ²	5 x 10 ⁷ cfu/cm ²	1 x 10 ⁷ cfu/cm ²	5 x 10 ⁷ cfu/cm ²
Optimal temperature	30°C	30°C	30°C	30°C
Optimal pH	6.5	7.0	7.0	6.5
Sensitivity	1.2173 nA/ppm (r ² = 0.977)	0.2984 nA/ppm (r ² = 0.9855)	0.9673 nA/ppm (r ² = 0.9635)	0.9766 nA/ppm (r ² = 0.9953)
Linear range	0 - 10 ppm	0 - 80 ppm	0 - 10 ppm	0 - 8 ppm
Limit of detection	0.5 ppm	0.5 ppm	2 ppm	0.5 ppm
Response time	3.5 - 17.25 minutes	7.16 - 16.23 minutes	6.5 - 10.085 minutes	10.78 - 15.22 minutes
Sensitivity	10.8748 nA/ppm (r ² = 0.9968)			
Linear range	10 - 80 ppm			
Response time	4.11 - 14.56 minutes			

Bacillus sp. B₈ คัดแยกจากดินสวนยาง จังหวัดระยอง มีความสามารถในการตอบสนองต่อสารอาหารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีช่วงการตอบสนอง 2 ช่วง คือในช่วงของความเข้มข้นของสารต่ำๆ (0-10 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี) มีความไวต่อการตอบสนองเท่ากับ 1.2173 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตร บีโอดี ค่าความเข้มข้นบีโอดีต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ใช้เวลาในการตอบสนองในช่วง 3.50-17.25 นาที ในช่วงความเข้มข้นสูง (10-80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี) มีความไวต่อการตอบสนอง 11.036 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี เวลาในการตอบสนองในช่วง 5.09-14.56 นาที สภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 โดยใช้ปริมาณเซลล์ 1×10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สามารถใช้งานได้ประมาณ 60 ครั้ง (RSD = 2.1001%)

Enteric bacteria E₉ คัดแยกได้จากดินในสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าหัววัดค่าบีโอดีที่ตรึงด้วยเชื่อดังกล่าว สามารถตอบสนองต่อสารอาหารได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลฟรุกโทสและกรดอินทรีย์ซึ่งมีอยู่มากในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้บรรจุกระป๋อง และเมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน สารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก พบว่าเชื่อดังกล่าวมีความไวต่อการตอบสนอง 0.2984 นาโนแอมแปร์ต่อมิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ค่าพิสัยเชิงเส้น 0-80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ค่าความเข้มข้นบีโอดีต่ำสุดที่วัดได้ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี ใช้เวลาในการตอบสนองในช่วง 7.11- 16.23 นาที มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 โดยใช้ปริมาณเซลล์ 5×10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และมีอายุการใช้งานประมาณ 56 ครั้ง (RSD = 2.3111%)

ส่วนจุลินทรีย์อีก 2 ไอโซเลทได้แก่ *Pseudomonas* sp. P₉ และ unidentified bacteria UN₁₀ มีสมบัติทางเซนเซอร์ไม่เหมาะสม เนื่องจากมีค่าพิสัยเชิงเส้นที่ค่อนข้างต่ำคือ 2-10 และ 0.5-8 ตามลำดับ จึงไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มและเบียร์ ตามจุดประสงค์ของโครงการนี้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ 2 ไอโซเลทนี้อาจเหมาะกับการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีสำหรับน้ำทิ้ง หรือแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีค่าบีโอดีต่ำ ต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบหัววัดค่าบีโอดีที่ตรึงด้วย *Bacillus* sp. B₈ หรือ enteric bacteria E₉ กับหัววัดจุลินทรีย์จากรายงานอื่นที่ใช้ระบบการวัดแบบกะ (batch measurement) และใช้สารละลายกลูโคส-กรดกลูตามิกเป็นสารทดสอบ (ตารางที่ 3.6) พบว่าหัววัดทั้งสองมีสมบัติทางเซนเซอร์ไม่ด้อยไปกว่าจุลินทรีย์ที่มีการรายงานมา ทั้งทางด้านพิสัยเชิงเส้น ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้ เวลาในการตอบสนอง และความคงตัวต่อการใช้งาน อย่างไรก็ตาม ต้องนำหัววัดทั้งสองไปทดสอบการวัดโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงาน รวมถึงการเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (BOD₅) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำและความน่าเชื่อถือต่อไป

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบหัววัดจุลินทรีย์วัดค่าบีโอดีที่ได้จากวิธีที่ได้กับรายงานอื่นที่ใช้ระบบการวัดแบบกะ (Batch measurement) และใช้สารละลายยาปฏิชีวนะ-การดักจับ
เป็นสารทดสอบ

Immobilized microbes	Measuring range (mg/L BOD)	Response time (min)	Operational stability (times)	References
<i>Trichosporon cutaneum</i>	< 60	< 18	17	1
	4 – 100	5	48	2
	0 – 110	3 – 10	7 – 30	3
	0.2 – 18	7 – 20	disposable sensor	4
<i>Klebsiella oxytoca</i> AS1	< 44	2.5	-	5
<i>Hansenula anomala</i>	1 – 45	13 – 20	-	6
<i>Serratia marcescens</i> LSY4	44	15	-	7
<i>B. Subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	< 70	4 – 15	22	8
<i>Citrobacter</i> sp. + <i>Enterobacter</i> sp.	6 – 18	8	-	9
Bacteria isolate from soil	< 22	10 – 15	10	10
Bacteria isolate from activated sludge	3.3 – 32.8	6	48	11
	2 – 22	< 10	20	12
BODSEED	0 – 45	45 – 60	20	13
<i>Bacillus</i> sp. B ₆	0.5 – 10	4 – 17	60	Our research
	10 – 80	5 – 15	60	Our research
Enteric bacteria E ₉	0.5 – 80	7 – 16	56	Our research

กล่าวโดยสรุป จุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทมีสมบัติในเชิงเซนเซอร์ต่างกัน จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นหัววัดค่าบีโอดีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ *Bacillus* sp. B₆ ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้น 2 ช่วง และ enteric bacteria E₉ ซึ่งมีค่าพิสัยเชิงเส้นยาวที่สุดถึง 80 มิลลิกรัม ทั้งนี้จึงจะได้นำจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลทไปทดสอบกับน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มและเบียร์ และเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (BOD₅) ต่อไป

3.7 การวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมด้วยหัววัดจุลินทรีย์

จากการศึกษาในหัวข้อ 3.6 สรุปได้ว่า enteric bacteria E₉ ให้การตอบสนองในเชิงเซนเซอร์ต่อสารอินทรีย์ได้อย่างหลากหลายด้วยระยะเวลาค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการทดสอบการวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมจึงเลือกใช้ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าว ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ BOD₅ โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังที่ได้ทำการศึกษาในขั้นต้น

ตัวอย่างน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งได้แก่ โรงงานผลิต เบียร์ ผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มปราศจากแอลกอฮอล์ และน้ำอัดลม รวมทั้งสิ้น 7 โรงงาน 20 ตัวอย่าง ถูกเก็บจากจุดต่างๆ ได้แก่ น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิต น้ำเสียจากบ่อรวม บ่อเติมอากาศ และบ่อพักน้ำเพื่อปล่อยทิ้ง การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์รวมทั้งการวิเคราะห์ค่า BOD₅ (ใช้วิธีมาตรฐาน APHA) จะทำทันทีในห้องปฏิบัติการหลังการเก็บตัวอย่างน้ำ ค่าบีโอดีจากหัววัดจุลินทรีย์ได้จากการสอบเทียบหัววัด (calibration) ด้วยสารละลายมาตรฐานบีโอดีซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกรดกลูตามิก

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมโดยห้ววัดจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับวิธี BOD₅

ตัวอย่าง	BOD sensor			BOD5 (mg/L)	% ความแตกต่าง
	% sample	BOD (mg/L)	±SD		
<u>โรงงานผลิตเบียร์ 1</u>					
บ่อรวมน้ำเสีย	10.0	517.2	14.0	809.0	56.5
	4.0	527.9	23.0		53.2
	2.0	520.3	53.0		55.6
บ่อเติมอากาศ A	10.0	560.0	71.7	916.0	63.6
	4.0	543.2	13.3		68.7
	2.0	596.8	45.9		53.4
บ่อเติมอากาศ B	10.0	563.1	10.6	923.0	63.9
	4.0	512.6	13.3		79.9
	2.0	596.8	45.9		54.6
บ่อเติมอากาศ B (ครั้งที่ 2)	2.0	1316.0	53.0	2337.0	77.6
<u>โรงงานผลิตเบียร์ 2</u>					
บ่อรวมน้ำเสีย	100.0	140.8	10.6	290.0	105.7
<u>โรงงานผลิตสุรา</u>					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	0.5	10160.4	212.0	19750.0	94.4
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	1.0	4100.9	106.0	9840.0	139.9
<u>โรงงานผลไม้มักระป๋อง 1</u>					
น้ำจากการผลิต	10.0	584.7	14.0	2125.0	263.2
น้ำบ่อเติมอากาศ	10.0	162.2	10.6	580.0	258.0
น้ำจากบ่อรอปล่อยทิ้ง	100.0	23.0	23.0	87.0	278.3
<u>โรงงานผลไม้มักระป๋อง 2</u>					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	4.0	1998.4	679.5	3463.0	73.3
	2.0	1089.5	74.3		217.9
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	4.0	1245.7	185.5	2950.0	136.8
	2.0	1622.0	53.0		81.9
น้ำบ่อเติมอากาศ (ครั้งที่ 1)	10.0	82.6	9.2	122.0	47.0
	4.0	91.8			32.6
น้ำบ่อเติมอากาศ (ครั้งที่ 2)	10.0	193.4	9.2	340.0	75.8
	4.0	208.1	23.1		63.4

ตารางที่ 3.7(ต่อ) ผลการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรมโดยหัตถ์จุลินทรีย์
เปรียบเทียบกับวิธี BOD₅

ตัวอย่าง	BOD sensor			BOD5(mg/L)	% ความแตกต่าง
	% sample	BOD (mg/L)	±SD		
<u>โรงงานเครื่องดื่ม(ชาเขียว)</u>					
น้ำจากการผลิต	10.0	416.2	10.6	2280.0	448.1
	4.0	474.3	26.5		381.0
น้ำจากบ่อเดิมอากาศ	100.0	10.4	1.1	51.0	410
<u>โรงงานน้ำอัดลม</u>					
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 1)	10.0	202.0	9.2	610.0	202.0
	4.0	206.5	23.0		194.7
น้ำจากการผลิต (ครั้งที่ 2)	10.0	153.0	10.6	316.0	106.5
	4.0	191.2	35.1		64.6
น้ำจากบ่อเดิมอากาศ(ครั้งที่ 1)	100.0	10.4	1.1	40.0	300.0
น้ำจากบ่อเดิมอากาศ(ครั้งที่ 2)	100.0	14.1	1.1	54.0	285.7

ผลการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากน้ำตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.7 จะเห็นความแตกต่างระหว่างปริมาณบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัตถ์จุลินทรีย์และด้วยวิธี APHA โดยค่าที่ได้จากหัตถ์จุลินทรีย์ต่ำกว่าที่ได้จากวิธี APHA เสมอ เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์จากโรงงานผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั้ง 3 โรงงาน พบว่าค่าบีโอดีจากหัตถ์จุลินทรีย์จะแปรตามค่าบีโอดีจากวิธี APHA อย่างค่อนข้างคงที่ กล่าวคืออัตราส่วนระหว่างหัตถ์จุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่าประมาณ 0.5-0.6 แม้ว่าจะมีการเจือจางตัวอย่างน้ำในปริมาณร้อยละ 2-10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผลการทดลองในทำนองเดียวกันได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำโรงงานผลิตผลไม้กระป๋องและน้ำชาเขียว แต่อัตราส่วนของค่าบีโอดีระหว่างหัตถ์จุลินทรีย์และวิธี APHA แตกต่างไปจาก 3 โรงงานข้างต้น คือมีค่าเท่ากับ 0.3 และ 0.2 ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ให้ค่าที่แตกต่างไปจากโรงงานประเภทแรก โดยที่อัตราส่วนค่าบีโอดีระหว่างหัตถ์จุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่า 0.2 – 0.8 และจะเห็นได้ว่าการเจือจางตัวอย่างน้ำมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าบีโอดีโดยหัตถ์จุลินทรีย์ค่อนข้างมาก ส่วนโรงงานผลิตน้ำอัดลมให้ผลที่แตกต่างออกไป กล่าวคือการเจือจางตัวอย่างน้ำไม่มีผลต่อค่าบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัตถ์จุลินทรีย์ แต่ผลการตรวจวัดบีโอดีของน้ำแต่ละตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนระหว่างหัตถ์จุลินทรีย์กับวิธี APHA ที่แตกต่าง จะเห็นได้ว่าการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากโรงงานทั้ง 7 แห่งมิได้ให้ผลในทำนองเดียวกันทั้งหมด เนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดหลายประการ ได้แก่ ตัวอย่างน้ำจากแต่ละแหล่งมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่แตกต่าง ซึ่งจะสัมพันธ์กับความสามารถในการใช้หรือการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลาสำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์บนหัตถ์ และการเทียบค่าบีโอดีจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายกลูโคสและกรดกลูตามิก ผลของปัจจัยดังกล่าวสามารถอธิบายได้ดังนี้

1) นำจากโรงงานอุตสาหกรรมแต่ละประเภทมีความหลากหลายของสารอินทรีย์ เป็นที่ทราบว่าคุณสมบัติของจุลินทรีย์ย่อยสลายหรือใช้สารอาหาร (assimilation) แต่ละชนิดด้วยวิถีเมตาบอลิก (metabolic pathway) ที่แตกต่างกันตามชนิดของสารอินทรีย์ อัตราการหายใจ (respiration rate) รวมถึงอัตราการใช้ออกซิเจน (ซึ่งในที่นี้ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ค่าบีโอดี) แปรไปตามวิถีเมตาบอลิกดังกล่าว ดังนั้นตัวอย่างน้ำที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนในระดับที่ต่างกัน เมื่อตรวจวิเคราะห์ค่าบีโอดีของตัวอย่างน้ำต่างชนิดด้วยหัววัดจุลินทรีย์ จะพบว่าค่าที่วัดได้มีความแตกต่าง แม้ว่าปริมาณรวมของสารอินทรีย์ในน้ำ (loading) มีค่าเท่ากัน

นอกจากนี้การเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วนต่างๆ ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลง วิถีเมตาบอลิกและอัตราการหายใจของจุลินทรีย์จึงมีค่าแตกต่างกันไป แม้ว่าจะเป็นตัวอย่างน้ำชนิดเดียวกันก็ตาม ตัวอย่างจากการศึกษานี้ได้แก่การวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้โรงที่ 2 (เก็บตัวอย่างน้ำขณะผลิตน้ำผลไม้ผสมสับปะรดและแครอท) จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่ำลง ค่าบีโอดีจะสูงขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าสารอินทรีย์ปริมาณสูง สามารถลดหรือยับยั้งวิถีเมตาบอลิก การใช้สารอาหารจึงเกิดได้ต่ำลง เช่นเดียวกับปรากฏการณ์ "substrate inhibition" การศึกษา 3 ใน 4 ตัวอย่างให้ผลในทางเดียวกัน ยกเว้นตัวอย่างน้ำจากการผลิตครั้งที่ 1 ให้ผลในทางตรงข้าม ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากความผิดพลาดของการวัดโดยหัววัดจุลินทรีย์ขึ้น

2) จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงบนหัววัดไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ได้ทันทีในระยะเวลา 10-15 นาทีดังที่ใช้ในการทดลอง ในขณะที่วิธี APHA ใช้เวลาในการบ่มตัวอย่างน้ำถึง 5 วัน ซึ่งเพียงพอต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ค่าบีโอดีที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทั้งสองจึงมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

3) ความแตกต่างของการวัดระหว่างวิธีทั้งสอง เกิดจากการใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคส - กรดกลูตามิกสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานเทียบค่าบีโอดี เนื่องจากสารละลายดังกล่าวประกอบด้วยสารเพียง 2 ชนิด และทั้งกลูโคสและกลูตามิกเป็นสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ใช้ได้ง่ายและรวดเร็ว เมื่อตรวจวัดตัวอย่างน้ำที่มีสารอินทรีย์หลายชนิดด้วยหัววัดที่เทียบค่าจากสารละลายดังกล่าว ค่าบีโอดีจึงมีความคลาดเคลื่อนจากค่าจริง วิธีแก้ไขอาจทำได้โดยใช้สารละลายสำหรับเทียบมาตรฐานที่มีสมบัติใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำ ซึ่งจะต้องทราบว่าน้ำทิ้งที่จะทำการวิเคราะห์มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์เป็นอย่างไร และมีในปริมาณเท่าใด ด้วยวิธีการนี้ปริมาณบีโอดีที่วิเคราะห์ด้วยหัววัดจุลินทรีย์จะมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง อย่างไรก็ตามกระบวนการวิเคราะห์จะยุ่งยากมากขึ้น เนื่องจากต้องใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับตัวอย่างน้ำจากโรงงานแต่ละประเภท

ด้วยปัจจัยดังกล่าว การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งจึงมีข้อจำกัด คือไม่สามารถใช้ตรวจวัดตัวอย่างน้ำทุกประเภทได้ ชนิดของจุลินทรีย์จะเป็นตัวกำหนดชนิดตัวอย่าง การใช้จุลินทรีย์ผสมอาจช่วยขยายขอบเขตของการวิเคราะห์ตัวอย่างให้มีความหลากหลายมากขึ้น อย่างไรก็ตามหัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดอาจทำให้ควบคุมลักษณะสมบัติของหัววัดได้ยากขึ้น และมีความซับซ้อนในการสร้างมากขึ้น [26]

บทที่ 4

บทสรุป

4.1 สรุปผลการศึกษา

ห้ววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นภายใต้โครงการ “การวิจัยและพัฒนาเซนเซอร์วัดค่าบีโอดีโดยห้ววัดจุลินทรีย์” สร้างจากการตรึงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์ประเภทต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางบนออกซิเจนอิเล็กโทรด การวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีทำได้โดยตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงภายหลังจุลินทรีย์ได้ใช้หรือย่อยสลายสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ตรวจวัดได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าบีโอดี

การวิจัยและพัฒนาเริ่มต้นจากการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน น้ำ และน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศ การคัดแยกใช้วิธีเฉพาะสำหรับ enteric bacteria, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และยีสต์ จากขั้นตอนนี้สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ได้รวมทั้งสิ้น 64 ไอโซเลท เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารอาหารต่ำ เช่นในน้ำทิ้งบางชนิด จึงได้ทดสอบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าวบนอาหารแข็งที่มีสารอาหารต่ำ จากการศึกษพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีมากบน nutrient agar ทั้งที่เจือจาง 10 และ 100 เท่า มีจุลินทรีย์เพียง 6 ไอโซเลทที่เจริญได้ปานกลางบนอาหารแข็งจากน้ำธรรมชาติ เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 64 ไอโซเลททดสอบความสามารถในการใช้สารอาหาร 4 กลุ่มหลัก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ รวม 30 ชนิดโดยบ่มจุลินทรีย์ในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้แตกต่างกัน บางไอโซเลทสามารถใช้สารอาหารได้หลายชนิดและมีการเจริญค่อนข้างสูง บางไอโซเลทอาจตอบสนองต่อสารอาหารได้กว้างเช่นกัน แต่มีการเจริญในระดับต่ำ สรุปคือมีจุลินทรีย์เพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถใช้อาหารได้อย่างหลากหลาย และมีการเจริญในระดับปานกลางถึงมาก จุลินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วย enteric bacteria E_9 , *Bacillus* sp. B_6 , *Pseudomonas* sp. P_8 และยีสต์ Y_1 อย่างละ 1 ไอโซเลท ส่วนอีก 2 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่ยังไม่จำแนกชนิดคือ UN_{10} และ UN_{11} จุลินทรีย์ 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกสามารถใช้และเจริญได้ดีในคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน แต่เจริญได้ไม่สูงนักในแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ มีเพียง P_8 ที่เติบโตได้ดีในแอลกอฮอล์ และ Y_1 ที่สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ

การตรึงจุลินทรีย์บนเมมเบรนเพื่อสร้างเป็นห้ววัดจุลินทรีย์ต้องคำนึงถึงปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดของสัญญาณ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนอง ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนเซลล์ูโลสอะซิเตทคือ 1×10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับ UN_{11} , *Bacillus* sp. B_6 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ส่วน UN_{10} , enteric bacteria E_9 และยีสต์ Y_1 มีปริมาณเซลล์เหมาะสมที่ 1×10^6 , 5×10^7 และ 5×10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ เวลาที่ใช้ในการวัดมีช่วงค่อนข้างกว้างระหว่าง 6-33 นาทีขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ซึ่งในที่นี้ได้แก่สารละลายบีโอดีมาตรฐานกลูโคสและกลูตามิก เมื่อห้ววัดจุลินทรีย์ที่ใช้ปริมาณเซลล์ขนาดดังกล่าวมาทดสอบการตอบสนองต่อสารอาหารประเภทต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานอาหารกระป๋องและเครื่องดื่มพบว่าห้ววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ UN_{10} , *Bacillus* sp. B_6 , enteric bacteria E_9 และ *Pseudomonas* sp. P_8 ตอบสนองต่อสารอาหารเหล่านั้นได้ดี ในขณะที่ยีสต์ Y_1 ตอบสนองได้ค่อนข้างต่ำ และ UN_{11} ใช้เวลาในการตอบสนองนานกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติในเชิงเซนเซอร์ซึ่งเป็นขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลทข้างต้นเท่านั้น

หัววัดจุลินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลทสามารถคงกิจกรรมในการใช้หรือย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีเมื่อสารละลายมีพีเอชเป็นกลางคือ 6.5 – 7.0 อุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส แต่เพื่อความสะดวกในการใช้งานจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเนื่องจากมีความใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทย การเลือกใช้อุณหภูมิดังกล่าวจะทำให้การสร้างเครื่องมือวัดแบบอัตโนมัติหรือกึ่งอัตโนมัติซึ่งจะดำเนินงานในขั้นต่อไปมีความซับซ้อนน้อยลง และลดค่าใช้จ่ายลงได้เนื่องจากไม่ต้องมีอุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิเพิ่มขึ้น จากการศึกษาสมบัติเชิงเซนเซอร์ของหัววัดจุลินทรีย์สรุปได้ว่า หัววัดที่สร้างจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. B₆ และ enteric bacteria E₉ มีสมบัติเชิงเซนเซอร์เหมาะสมกว่าโดยเฉพาะพิสัยเชิงเส้นที่สูงกว่า *Pseudomonas* P₈ และ UN₁₀ อย่างชัดเจน หัววัดจากจุลินทรีย์ทั้งสองมีพิสัยเชิงเส้นในช่วง 0 – 80 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี และมีความไวรวมทั้งระยะเวลาตอบสนองที่ดีกว่าคือประมาณ 4 – 17 นาที ในขณะที่ P₈ และ UN₁₀ มีพิสัยเชิงเส้นในช่วงที่แคบมากคือ 10 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตรบีโอดี อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติเชิงเซนเซอร์อื่นเช่น ความเข้มข้นสารต่ำสุดที่วัดได้ (detection limit) ระหว่าง B₆ และ E₉ จะเห็นได้ว่า E₉ สามารถตอบสนองต่อสารอินทรีย์ในปริมาณต่ำกว่า B₆ ดังนั้นหากนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งอาจมีปริมาณบีโอดีในช่วงกว้างตั้งแต่ค่าบีโอดีต่ำจากน้ำที่ผ่านการบำบัดและปล่อยสู่สาธารณะ จนถึงตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณบีโอดีสูงเช่นน้ำจากกระบวนการผลิต การเลือกใช้ E₉ จึงมีความเหมาะสมมากกว่า ส่วนจุลินทรีย์ P₈ และ UN₁₀ ไม่มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวัดบีโอดีจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่มีปริมาณบีโอดีสูง แต่อาจเหมาะต่อการพัฒนาเป็นหัววัดจุลินทรีย์วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณบีโอดีต่ำเช่น แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดและปล่อยทิ้ง เป็นต้น

การทดสอบประสิทธิภาพของหัววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนา ทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำโรงงานสุรา เบียร์ ผลไม้กระป๋อง และน้ำอัดลม รวมทั้งสิ้น 7 แห่ง 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ดังกล่าวกับวิธีมาตรฐาน (BOD₅, APHA) จากการศึกษาสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีโดยหัววัดจุลินทรีย์ขึ้นกับปัจจัย 2 ประการได้แก่ i) ชนิดของตัวอย่างน้ำที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้สารแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ขึ้นกับวิถีเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะสำหรับสารแต่ละประเภท กระบวนการดังกล่าวสัมพันธ์กับอัตราการใช้ออกซิเจนในการคะตะไลต์สารและอัตราการหายใจของจุลินทรีย์ และ ii) การใช้สารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความแตกต่างจากองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำโรงงานประเภทต่างๆ ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ปริมาณ อย่างไรก็ตามอัตราส่วนหรือความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์บีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์และวิธี APHA มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตเบียร์และสุรา รวมถึงโรงงานผลิตเครื่องดื่มชาเขียวและโรงงานผลิตผลไม้กระป๋อง แม้ว่าเจ้าจ้างตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วนต่างๆ

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าหัววัดจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นมีการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ประเภทต่างๆ ได้ดี ประโยชน์ที่เห็นได้ชัดเจนคือการตรวจวัดทำได้อย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิมที่ใช้เวลาถึง 5 วัน แม้ว่าปริมาณที่ตรวจวัดได้จากหัววัดจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างไปจากวิธีมาตรฐาน APHA แต่ความแตกต่างดังกล่าวมีอัตราส่วนคงที่แปรตามชนิดหรือองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำแต่ละประเภท ซึ่งกรณีนี้สามารถใช้วิธีชดเชยความแตกต่าง (compensation) โดยใช้ correction factor ที่จำเพาะสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานแต่ละกลุ่มเพื่อปรับค่าการวิเคราะห์ให้มีความใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด

การปรับปรุงกระบวนการวิเคราะห์บีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์อาจใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมแต่ละกลุ่ม โดยใช้สารละลายมาตรฐานสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบและสมบัติใกล้เคียงกับน้ำทิ้งจากโรงงานประเภทนั้นๆ ด้วยวิธีการดังกล่าวการวิเคราะห์ปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์จะมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยการปรับค่ากราฟมาตรฐานโดย correction factor

4.2 โปรโตคอล “การวัดปริมาณบีโอดีด้วยหัววัดจุลินทรีย์”

1. การสร้างหัววัดจุลินทรีย์

การเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ทั่วไป ขั้นตอนมีดังนี้

- 1) ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแข็ง (nutrient agar) จำนวน 3 ลูบ ลงในอาหารเหลว (nutrient broth) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 2) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บเซลล์จุลินทรีย์ในช่วงปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ประมาณชั่วโมงที่ 10 หลังการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว
- 3) นับจำนวนเซลล์มีชีวิตโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง
- 4) ปั่นแยกเซลล์จุลินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 5) ตูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 เขย่าเพื่อล้างเซลล์ จากนั้นนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงเพื่อแยกเซลล์อีกครั้ง
- 6) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5
- 7) เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดที่มีเซลล์จุลินทรีย์ เขย่าเพื่อให้เซลล์แขวนลอยก่อนนำไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ เพื่อให้ได้เซลล์จุลินทรีย์สำหรับตรึงบนเมมเบรนในจำนวนที่ต้องการ

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

- 1) คำนวณปริมาณเซลล์ทั้งหมดจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง
- 2) เจือจางเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ต่อปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรึงบนเมมเบรน
- 3) กรองเซลล์จุลินทรีย์บนเมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร ผ่านไซริงค์สำหรับกรอง จากนั้นตั้งทิ้งไว้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปประกอบเป็นหัววัดจุลินทรีย์

การประกอบหัววัดจุลินทรีย์

- 1) นำเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตตวางประกบบนเมมเบรนที่มีเซลล์จุลินทรีย์ แล้วใช้ผ้าไนลอนหรือผ้าก๊อซประกบเมมเบรนอีกชั้น จากนั้นนำไปประกอบเป็นเมมเบรนโมดูล โดยใช้ท่อเทฟลอนกลวง 2 ชั้นเป็นวัสดุยึดเมมเบรนให้อยู่ในตำแหน่งคงที่
- 2) นำเมมเบรนโมดูลสามทับออกซิเจนอิเล็กโทรดชนิดคลอไรด์ (Clark-type oxygen electrode) ให้ผิวหน้าของอิเล็กโทรดสัมผัสปลายเมมเบรนโมดูล

2. วิธีวัด

- 1) ระบบวัดประกอบด้วยอ่างน้ำชนิดหมุนเวียนควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส น้ำที่ควบคุมอุณหภูมิจะไหลเวียนผ่านชั้นนอก (water jacket) ของเซลล์เคมีไฟฟ้าภายในบรรจุฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0) ที่อิ่มตัวด้วยอากาศจากปั๊มฟลัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกวนด้วยแท่งแม่เหล็กขนาดเล็กตลอดระยะเวลาทำการทดลอง จุ่มหัววัดจุลินทรีย์ในเซลล์เคมีไฟฟ้า และให้ศักย์ไฟฟ้าขนาด -800 มิลลิโวลต์กับขั้วไฟฟ้าทำงาน (เทียบกับขั้วอ้างอิง)
- 2) วัดกระแสที่เกิดขึ้น สัญญาณที่เกิดขึ้นแสดงโดยเครื่องบันทึก (chart recorder) เมื่อกระแสพื้นหลัง (background current) มีค่าคงที่ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 นาที จึงเติมตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรในเซลล์เคมีไฟฟ้า จุลินทรีย์ที่ตรึงบนเมมเบรนจะเริ่มใช้สารอินทรีย์ในตัวอย่างควบคู่กับการใช้ออกซิเจนในสารละลาย ผลคือปริมาณออกซิเจนลดลง ค่ากระแสที่เกิดจากรีดักชันของออกซิเจนจึงลดลง และคงที่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ระยะหนึ่ง ใช้เวลาประมาณ 7-15 นาที ความแตกต่างของกระแสก่อนและหลังการเติมตัวอย่างสัมพันธ์กับปริมาณตัวอย่างโดยตรง
- 3) ทำความสะอาดหัววัดจุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์และดำเนินการตามข้อ 2) เพื่อตรวจวัดบีโอดีจากตัวอย่างใหม่ ระยะเวลาที่ใช้ในการกลับเข้าสู่กระแสพื้นหลังประมาณ 5 นาที

3. Correlation Factor

ประเภทโรงงาน	Correlation Factor
โรงงานเบียร์	1.63
โรงงานสุรา	2.17
โรงงานผลไม้กระป๋อง	3.67
โรงงานเครื่องดื่ม (ชาเขียว)	5.13
โรงงานน้ำอัดลม	2.92

4. การเก็บรักษา

หัววัดจุลินทรีย์มีอายุการเก็บและการใช้งานได้ค่อนข้างนาน หากมีการเก็บรักษาดังต่อไปนี้

- 1) หลังการใช้งานต้องทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง ถอดโมดูลหัววัดจุลินทรีย์จากออกซิเจนอิเล็กโทรด แซ่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 2) เมมเบรนที่ยังไม่ได้ประกอบเป็นเมมเบรนโมดูลสามารถเก็บแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้งานให้ประกอบกับโมดูล และแซ่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พร้อมให้อากาศประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในกรณีที่ประกอบเป็นโมดูลและผ่านการใช้งานแล้ว หลังเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก็จะต้องมีการให้อากาศเพื่อกระตุ้นกิจกรรมเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. APHA (1992). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, Section 5210, 18th ed., American Public Health Association Water Works Association, American Water Environment Federation, Washington DC, pp 5.1-5.6
2. Karube I, Matsunaga T, Mitsuda S and Suzuki S (1977) Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnology and Bioengineering* 19:1535-1547.
3. Hikuma M, Suzuki H, Yasuda T, Karube I and Suzuki S (1979) Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeasts. *European Journal Applied Microbiology* 8:289-297.
4. Riedel K, Lange KP, Stein HJ, Kuhn M, Ott P and Scheller F (1990) A microbial sensor for BOD. *Water Research* 24:883-887.
5. Praet E, Reuter V, Gillard T and Vassel JL (1995) Bioreactors and biomembranes for biochemical oxygen demand estimation. *Trends in Analytical Chemistry* 14:371-378.
6. Yang Z, Suzuki H, Sasaki S and Karube I (1996) Disposable sensor for biochemical oxygen demand. *Applied Microbiology Biotechnology* 46:10-14.
7. Yang Z, Suzuki H, Sasaki S, McNiven S and Karube I (1997) Comparison of the dynamic transient- and steady state measuring methods in a batch type BOD sensing system. *Sensors and Actuators B* 45:217-222.
8. Reiss M, Heibges A, Metzger S and Hartmeier W (1998) Determination of BOD values of starch-containing wastewater by a BOD biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 13:1083-1090.
9. Riedel K, Renneberg R, Kuhn M and Scheller F (1988) A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors. *Applied Microbiology Biotechnology* 28:316-318.
10. Tan TC and Qian Z (1997) Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of water and wastewater. *Sensors and Actuators B* 40:65-70.
11. Karube I, Matsunaga T and Suzuki S (1997) A new microbial electrode for BOD estimation. *Journal of Solid-Phase Biochemical* 2:97-104.
12. Kulys J and Kadziauskiene K (1980) Yeast BOD sensor. *Biotechnology and Bioengineering* 22:221-226.
13. Sangeetha S, Sugandhi G, Murugesan M, Murali MV, Berchmans S, Rajasekar R, Rajasekar S, Jeyakumar D and Prabhakara RG (1996) *Torulopsis candida* based sensor

for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation. *Electroanalysis* 8:698-701.

14. Chan C, Lehmann M, Tag K, Lung M, Kunze G, Riedel K, Gruendig B and Renneberg R (1999) Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS) Part I: Construction and characterization of the microbial sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 14:131-138.

15. Ohki A, Shinohara K, Ito O, Naka K, Maeda S, Sato T, Akano H, Kato N and Kawamura Y (1994) A BOD sensor using *Klebsiella oxytoca* AS1. *International Journal of Environment Analytical Chemistry* 56:261-269.

16. Kim NM and Kwon HS (1999) Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia mercescens* LSY4. *Biosensors and Bioelectronics* 14:1-7.

17. Chee GJ, Nomura Y and Karube I (1999) Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. *Analytica Chimica Acta* 379:185-191.

18. Chee GJ, Nomura Y, Ikebukuro K and Karube I (1999) Development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation. *Analytica Chimica Acta* 394:65-71.

19. Tan TC, Li F and Neoh KG (1992) Microbial membrane modified dissolved oxygen probe for rapid biochemical oxygen demand measurement. *Sensors and Actuators* B8:167-172.

20. Tan TC, Li F and Neoh KG (1993) Measurement of BOD by initial rate of response of a microbial sensor. *Sensors and Actuators* B10:137-142.

21. Li F and Tan TC (1994) Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly(4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 9:445-455.

22. Li F, Tan TC and Lee YK (1994) Effect of precondition and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 9:197-205.

23. Galido E, Garcis JL, Torres LG and Quintero R (1992) Characterization of microbial membranes used for the estimation of biochemical oxygen demand with a biosensor. *Biotechnology Techniques* 6:399-404

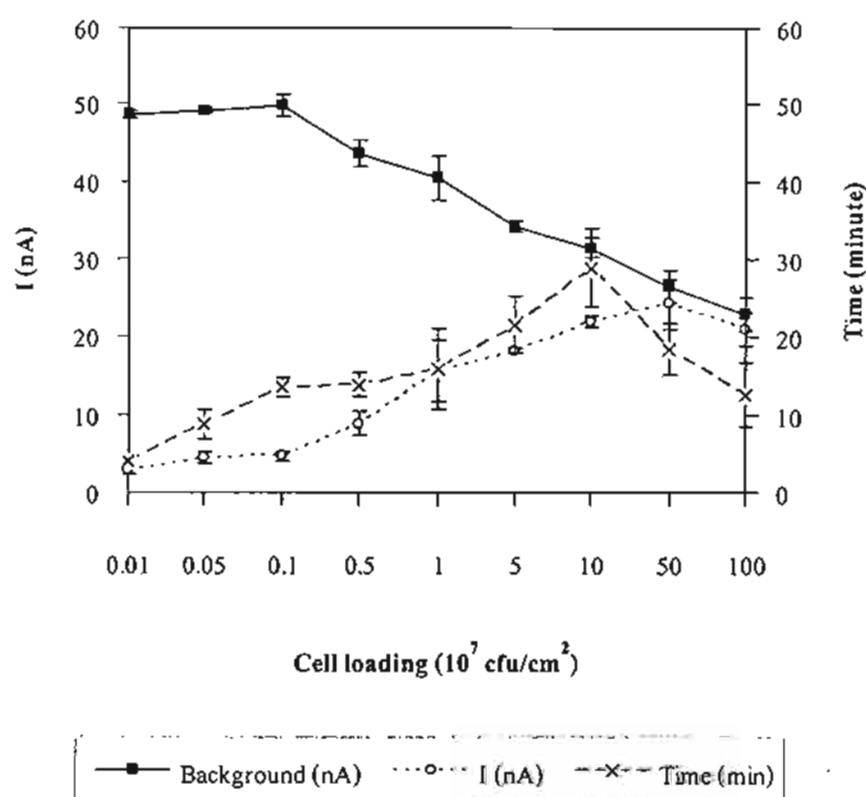
24. Heim S, Schnieder I, Binz D, Vogel A and Bilitewski U (1999) Development of an automated microbial sensor system. *Biosensors and Bioelectronics* 14:187-193

25. Lui J, Bjornsson L and Mattiasson B (2000) Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement. *Biosensors and Bioelectronics* 14:883-893

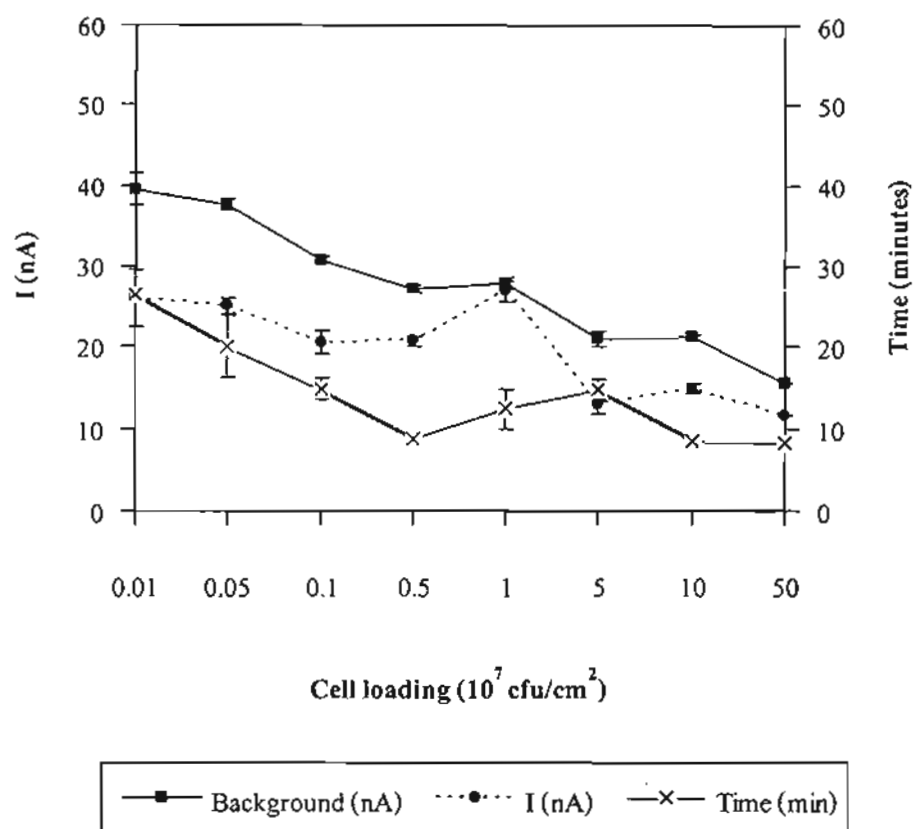
26. Suriyawattanakul L, Surareungchai W, Sritongkam P, Tanticharoen M and Kirtikara K (2002) The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor. *Applied Microbiology Biotechnology* 59:40-44.
27. Atlas, R.M. and Batha, R. (1993). *Microbial Ecology*. 3rd Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. USA. pp.563.
28. Morita R.Y. (1997). *Bacteria in oligotrophic environments*. Chapman and Hall, New York. pp.529.

ภาคผนวก

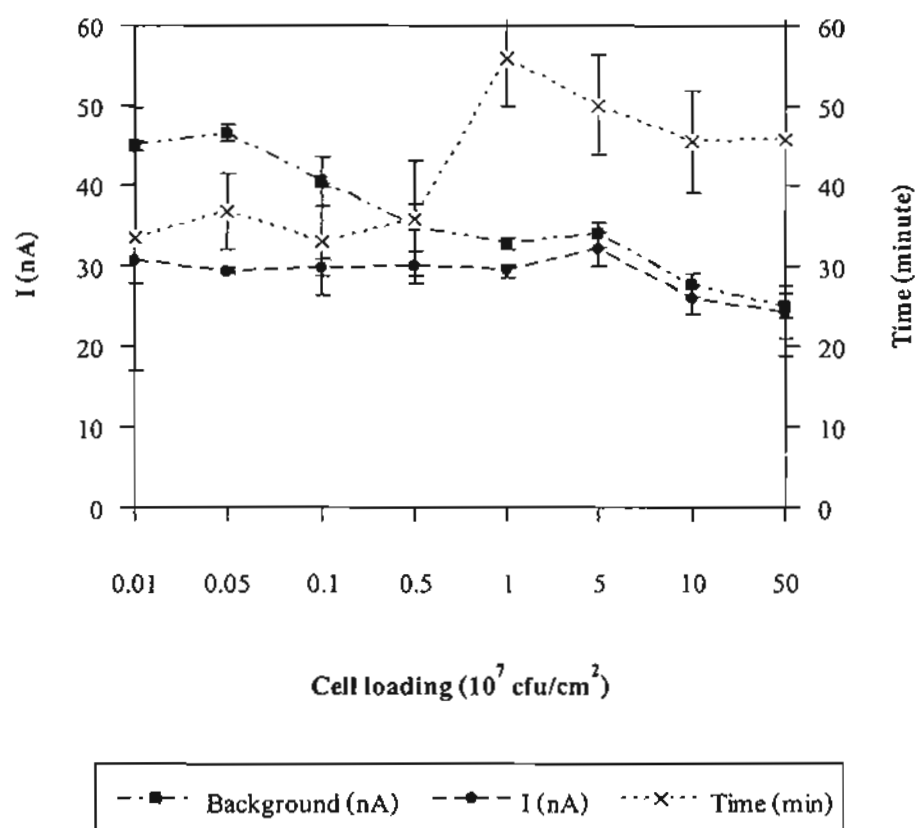
ผนวก 1 ผลการศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม



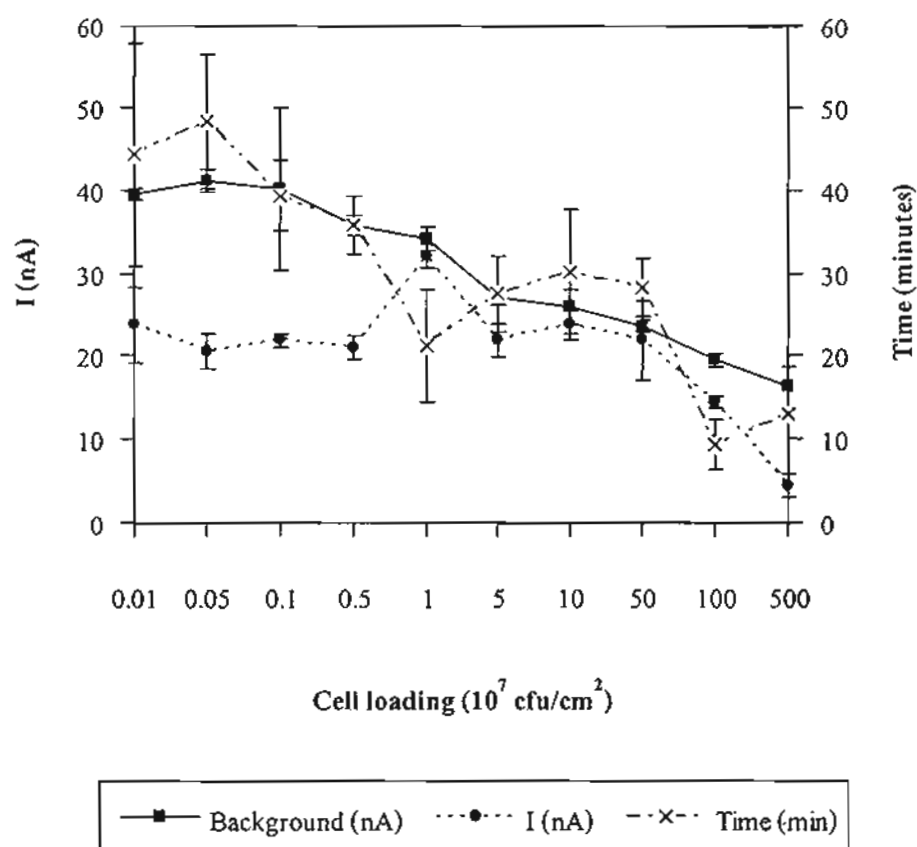
รูปที่ ผ.1 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์ *Pseudomonas* sp.P₈ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร



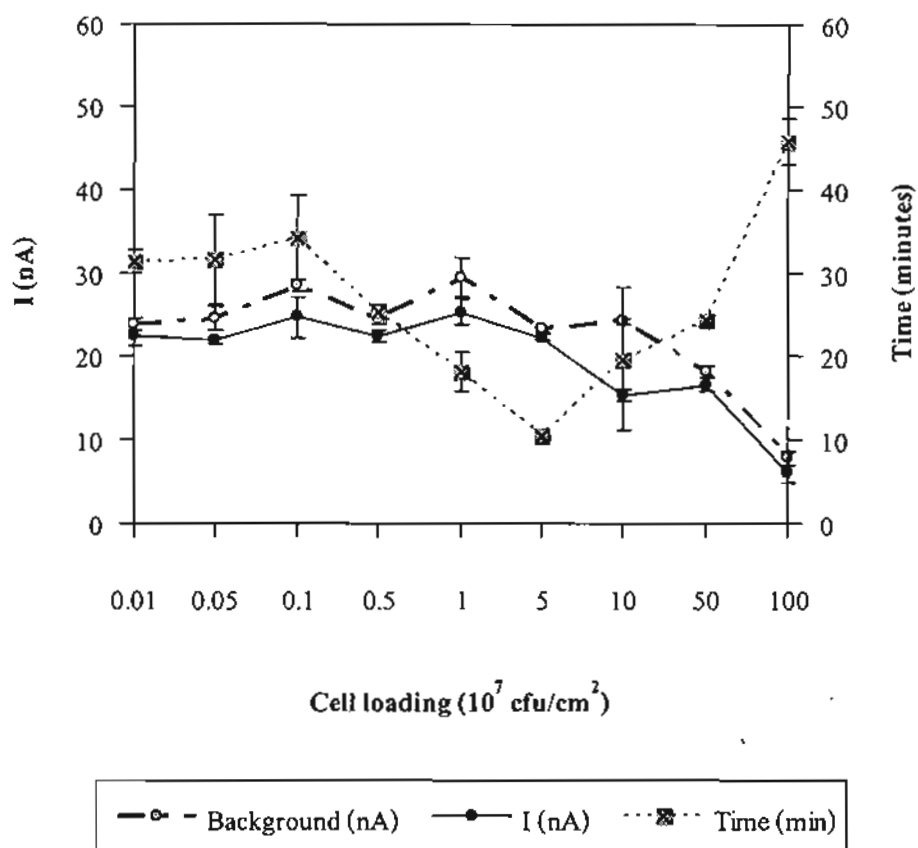
รูปที่ ๓.2 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์ *Bacillus* sp.B₆ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร



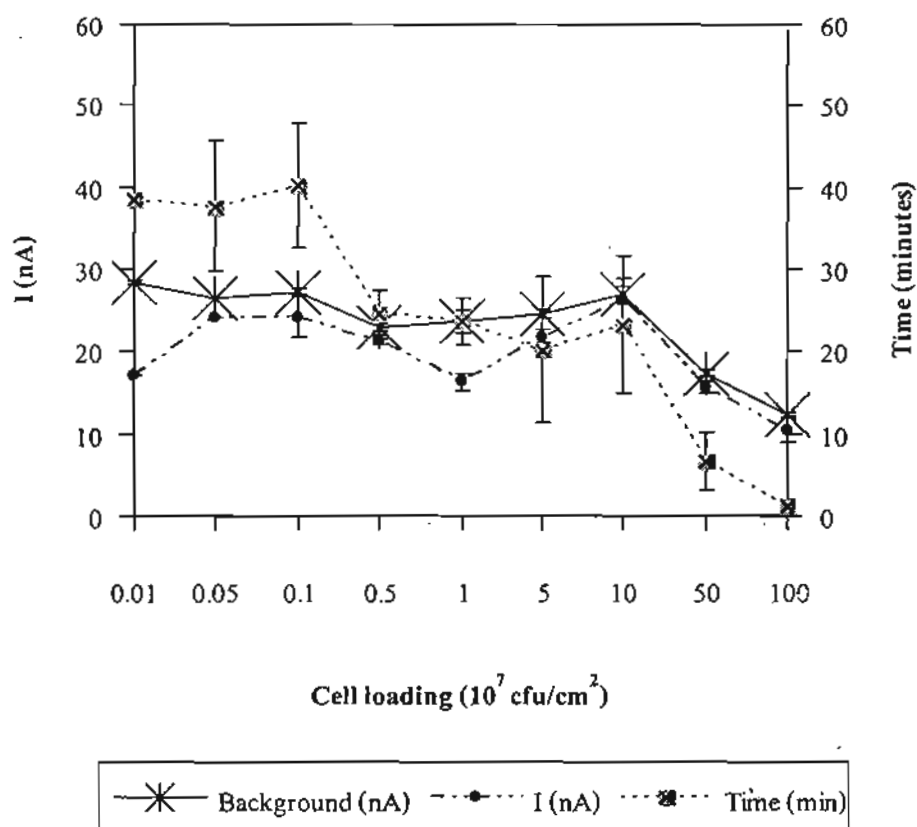
รูปที่ ๓.3 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์
Unidentified bacteria UN₁₀ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ๔.4 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์ Unidentified bacteria UN₁₁ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 5×10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ผ.5 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์ Enteric bacteria E₉ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร



รูปที่ ๘.6 ความสัมพันธ์ของกระแสที่เกิดขึ้น (I) กับระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อใช้เซลล์
ยีสต์ Y₁ ปริมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

ตารางที่ ผ.1 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ตัดแยกได้เมื่อใช้สารอาหารต่างๆ เป็นแหล่งอาหาร

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS								ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS										
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanine	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid			
INCUBATION TIME (days)																																	
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Unidentified																																	
bacteria																																	
UN ₁	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	3	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	
UN ₂	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
UN ₃	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	2	2
UN ₄	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1
UN ₅	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UN ₆	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
UN ₇	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
UN ₈	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UN ₉	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UN ₁₀	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	1	2	3	3	2	2	3	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2
UN ₁₁	2	2	3	2	2	3	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1
UN ₁₂	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS								ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS										
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid			
INCUBATION TIME (days)																																	
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Enteric bacteria																																	
E ₁	2	2	2	2	1	1	1	2	3	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	3	1	2	1	1	1	2	2	2
E ₂	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1
E ₃	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1
E ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E ₅	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
E ₆	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
E ₇	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
E ₈	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1
E ₉	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	3	2	3
E ₁₀	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
E ₁₁	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS								ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS									
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid		
INCUBATION TIME (days)																																
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Bacillus</i> sp.																																
R ₁	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
B ₂	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₃	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₄	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₅	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₆	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	3	2	3	2	3
B ₇	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₈	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
B ₉	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1
B ₁₀	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₁₁	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₁₂	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS										ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS								
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanine	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid			
INCUBATION TIME (days)																																	
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>Bacillus</i> sp.																																	
B ₁₃	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B ₁₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B ₁₅	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1
B ₁₆	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₁₇	2	2	2	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₁₈	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₁₉	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
B ₂₀	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₂₁	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₂₂	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
B ₂₃	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B ₂₄	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2

ตารางที่ ๘.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS								ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS										
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid			
INCUBATION TIME (days)																																	
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>Pseudomonas</i> sp.																																	
P ₁	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
P ₂	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P ₃	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2
P ₄	2	2	1	2	1	1	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1
P ₅	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	1	1	2
P ₆	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
P ₇	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	3	1	2	2	1	2	1	3	3	3	3	3	2	2	1	1	2	1	1	1	2
P ₈	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2
P ₉	2	3	2	3	1	2	1	2	2	3	2	3	1	1	2	3	2	3	1	2	2	2	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางที่ ผ.1 (ต่อ)

	CARBOHYDRATES								AMINO ACIDS								ALCOHOLS						ORGANIC ACIDS												
	Glucose	Fructose	Maltose	Mannose	Xylose	Lactose	Sucrose	Starch	Glutamic	Phenylalanin	Serine	Cysteine	Arginine	Aspartic	Glycine	Histidine	Methionine	Lysine	Methanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Citric acid	Malic acid	Succinic	Acetic acid	Lactic acid					
INCUBATION TIME (days)																																			
Isolate	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			
Yeast																																			
Y ₁	3	3	3	2	2	2	1	2	1	3	3	1	2	2	3	2	3	2	3	2	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2	3	1	2	2	3
Y ₂	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Y ₃	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Y ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Acid tolerant																																			
bacteria																																			
AB ₁	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
AB ₂	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
AB ₃	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	3	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
AB ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

- เมื่อ
- 1 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้เล็กน้อย มีความขุ่นน้อยกว่า 0.4 McFarland standard
 - 2 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ปานกลาง มีความขุ่นในช่วง 0.4 – 0.75 McFarland standard
 - 3 หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้มาก มีความขุ่นมากกว่า 0.75 McFarland standard

ผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน

ตารางที่ ผ.2 ผลการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของสารละลายบีโอดีมาตรฐาน (glucose-glutamic acid standard solution GGA solution) ด้วยวิธีมาตรฐาน APHA-BOD₅เปรียบเทียบกับหัววัดจุลินทรีย์

ตัวอย่าง	BOD ₅ (mg/L)	BOD _{sensor} (mg/L)
GGA ความเข้มข้น 20 mg/L	19.2	25.1
GGA ความเข้มข้น 40 mg/L	38.4	44.4
GGA ความเข้มข้น 60 mg/L	54.4	59.3
GGA ความเข้มข้น 80 mg/L	76	76.8

ผนวก 3 การทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบการวัดตัวอย่างระหว่างหัตถ์จูลินทรีย์กับวิธีมาตรฐาน

การทดสอบค่าเฉลี่ย 2 กลุ่มที่สัมพันธ์กัน

ใช้กับรูปแบบการวิจัยลักษณะ Matching design หรือต้องการเปรียบเทียบผลจากการวัดด้วยเครื่องมือคนละชนิดกัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องมือ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องคำนวณค่า

d คือ ความแตกต่างของข้อมูลระหว่างการวัดทั้ง 2 ครั้ง

S_d คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

μ_d คือ ค่าเฉลี่ยของประชากรมาตรฐาน

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired test โดยโปรแกรม SPSS โดยมีสมมติฐานดังนี้

$H_0 : \mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัดไม่แตกต่างกัน

$H_1 : \mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัดแตกต่างกัน

สูตรที่ใช้ทดสอบคือ
$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}}$$

การทดสอบทางสถิติจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานสุราและเบียร์
2. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานน้ำอัดลมและชาเขียว
3. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานผลไม้กระป๋อง

ผลการทดสอบมีดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานสุราและเบียร์

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BOD5	4980.7143	7	7315.8120	2765.1170
	BODS	2480.5814	7	3643.1213	1376.9704

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	BOD5 & BODS	7	.995	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	BOD5 - 8BODS	2500.1329	3709.1296	1401.9192	-930.2399	5930.5056	1.783	6	.125

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired-Sample t-test

$H_0 : \mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

$H_1 : \mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีแตกต่างกัน

ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 หรือ $\alpha = 0.05$

จากการคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS แล้วพิจารณาค่า P สรุปได้ว่า $P = 0.125 > \alpha = 0.05$

รับ H_0 แสดงว่าค่าที่ได้จากการวัด ไม่แตกต่างกัน

2. กลุ่มตัวอย่างจากโรงงานเครื่องดื่มน้ำอัดลมและชาเขียว

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	BOD5	558.5000	6	872.4608	356.1806
	BODS	142.7833	6	171.9163	70.1845

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	BOD5 & BODS	6	.957	.003

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower Upper			
Pair 1	BOD5 - BODS	415.7167	709.7309	289.7464	-329.1002 1160.5335	1.435	5	.211

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ Paired-Sample t-test

$H_0 : \mu_d = 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

$H_1 : \mu_d \neq 0$ ค่าเฉลี่ยจากการวัด 2 วิธีแตกต่างกัน

ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 หรือ $\alpha = 0.05$

จากการคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS แล้วพิจารณาค่า P สรุปได้ว่า $P = 0.211 > \alpha = 0.05$

รับ H_0 แสดงว่าค่าที่ได้จากการวัด ไม่แตกต่างกัน