# บีโอดี ( Biological Oxygen Demand: BOD)

นางสาวเพ็ญนภา สุขแสง
นักวิชาการสิ่งแวดล้อม

## 1. หลักการ (Principle)

บีโอดี เป็นการวัดความสกปรกของน้ำคิดเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจน ($O_2$) ที่ลดลงเนื่องจากจุลชีพจำพวกแบคทีเรีย (Bacteria) นำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์(organic) โดยการหาค่าความต่างของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในตัวอย่างน้ำที่วัดได้วันแรก ($DO_0$) กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในตัวอย่างน้ำเดียวกันที่เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 20 ± 1°C เป็นเวลา 5 วัน ($DO_5$)

$$BOD = DO_0 - DO_5$$

$DO_0$ = ค่าออกซิเจนละลายในน้ำที่ไตเตรตได้ในวันแรก

$DO_5$ = ค่าเฉลี่ยออกซิเจนละลายในน้ำที่ไตเตรตได้ หลังจากเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 ± 1 ˚C เป็นเวลา 5 วัน

## 2. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

2.1 ขวดบีโอดี ขนาด 300 mL พร้อมจุกแก้ว และฝาพลาสติกที่ปิดได้สนิท
2.2 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 ml จำนวน 2 ใบ
2.3 บิวเรต (burette) ขนาด 50 ml จำนวน 1 อัน
2.4 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาดความจุ 500 mL
2.5 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 20± 1 ˚C
2.6 ปิเปต (pipette) ขนาด 10 ml จำนวน 4 อัน
2.7 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 1000 mL
2.8 อุปกรณ์เติมอากาศ
2.9 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 ml (ปรับปริมาตรเป็น 201 ml) จำนวน 1 ใบ
2.10 ก้านจุก

## 3. น้ำยาเคมี (Reagents)

3.1 น้ำกลั่น (Distilled Water : DW)
3.2 Sulfuric acid เข้มข้น (conc.$H_2SO_4$)
3.3 Sulfuric acid ($H_2SO_4$) ความเข้มข้น 1 N

ปิเปต conc.$H_2SO_4$ ปริมาตร 2.8 mL ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.4 Starch solution

ชั่งแป้ง (Soluble starch) ชนิด laboratory grade 20 g และ salicylic acid ($C_7H_6O_3$) 2 g (เพื่อกันไม่ให้แป้งบูด) ละลายในน้ำกลั่นร้อน 1000 mL

3.5 Manganese sulfate solution

ชั่ง Manganese sulfate tetrahydrate ($MnSO_4.4H_2O$) 480 g หรือManganese sulfate dihydrate ($MnSO_4.2H_2O$) 400 g หรือ Manganese sulfate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) 364 g ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปกรอง และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL สารละลายนี้จะต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อเติม potassium iodide solution ในสภาพที่เป็นกรด

3.6 Alkali – Iodide – Azide solution

ชั่ง Sodium hydroxide (NaOH) 500 g หรือ Potassium hydroxide (KOH) 700 g และ Sodium iodide (NaI) 135 g หรือ Potassium iodide (KI) 150 g ละลายในน้ำกลั่น และเติมโซเดียมเอไซด์ ($NaN_3$) (ชั่ง $NaN_3$ 10 g ละลายในน้ำกลั่น 40 mL) ลงในสารละลาย Alkali – Iodide และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.7 Standard sodium thiosulfate titrant ความเข้มข้น 0.025 N

ชั่ง Sodium thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) 6.205 g และ Sodium hydroxide (NaOH) 0.4 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร standardize กับ Standard potassium bi-iodate solution

3.8 Standard potassium bi-iodate solution ความเข้มข้น 0.025 N

ชั่ง Potassium bi-iodate [$KH(IO_3)_2$] 812.4 mg ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.9 Magnesium sulfate solution

ชั่ง Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) 22.5 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.10 Calcium chloride solution

ชั่ง Calcium chloride ($CaCl_2$) 27.5 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.11 Ferric chloride solution

ชั่ง Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$) 0.25 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.12 Phosphate buffer solution

ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) 8.5 g Dipotassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_4$) 21.75 g และDisodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 33.4 g และAmmonium chloride ($NH_4Cl$) 1.7 g ละลายในน้ำกลั่น 500 mL และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีค่า pH เท่ากับ 7.2

3.13 Glucose-Glutamic acid solution

ชั่ง Glucose และ Glutamic acid ชนิด reagent grade (อบที่อุณหภูมิ 103 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) อย่างละ 0.15 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง เว้นแต่จะเก็บไว้ในสภาวะที่ปลอดเชื้อ ในที่ที่มีอุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 °C

3.14 Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 1 N

ชั่ง NaOH 40 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.15 Sulfuric acid ความเข้มข้น 1 N

เติม Conc. $H_2SO_4$ ปริมาตร 28 mL ลงในน้ำกลั่นประมาณ 600 mL และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ในขวดปรับปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.16 Sodium sulfite solution

ชั่ง Sodium sulfite ($Na_2SO_3$) 1.575 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ในขวดปรับปริมาตร (สารละลายนี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

**4. ขั้นตอนการทดสอบ**

4.1 การ Standardize Standard sodium thiosulfate titrant ด้วย Standard potassium bi-iodate solution ความเข้มข้น 0.025 N

4.1.1 ชั่ง Potassium iodide (KI) ประมาณ 2 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 – 150 mL

4.1.2 เติม conc.$H_2SO_4$ ปริมาตร 0.5 mL

4.1.3 เติม Standard potassium bi-iodate solution ปริมาตร 20 mL

4.1.4 ปรับปริมาตรเป็น 200 mL ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

4.1.5 นำไปไตเตรตกับ Standard sodium thiosulfate titrant โดยใช้น้ำแป้งเป็น indicator เมื่อถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสารละลายไม่มีสี

4.1.6 คำนวณความเข้มข้นของ Standard sodium thiosulfate titrant จากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย $N_1$ = N ของ Standard sodium thiosulfate titrant

$V_1$ = ปริมาตรของ Standard sodium thiosulfate titrant ที่ใช้ในการไตเตรต

$N_2$ = N ของ Standard potassium bi-iodate solution

$V_2$ = ปริมาตรของ Standard potassium bi-iodate solution

4.2 การเตรียมตัวอย่าง

4.2.1 นำตัวอย่างน้ำมาวัด pH ถ้าไม่อยู่ในช่วง 6.0-8.0 ให้ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.2 โดยการเติม 1 N $H_2SO_4$ หรือ 1 N NaOH โดยปริมาณของ 1 N $H_2SO_4$ หรือ 1 N NaOH ที่ใช้ปรับ pH ต้องไม่ทำให้ตัวอย่างน้ำมีปริมาตรเกิน 0.5% ของปริมาตรเดิม

4.2.2 ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีคลอรีนตกค้าง (residual chlorine) จำเป็นจะต้องกำจัดออกก่อน โดยปกติคลอรีนตกค้างจะลดลงเองเมื่อตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 1 – 2 ชั่วโมง แต่ในตัวอย่างที่คลอรีนตกค้างปริมาณมากๆ จะต้องกำจัดโดยเติม Sodium sulfide solution ซึ่งปริมาณที่จะต้องเติมลงไปหาได้จากการนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 100 – 1000 mL เติม $H_2SO_4$ 1 + 50 ($H_2SO_4$ 1 mL + น้ำกลั่น 50 mL) 10 mL เติม Potassium iodide solution 10 mL (ชั่ง Potassium iodide 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL) จากนั้นไตเตรต ด้วย Standard sodium thiosulfate titrant 0.025 N โดยใช้น้ำแป้งเป็น indicator จะทราบปริมาณของ Standard sodium thiosulfate titrant ที่ต้องเติมในตัวอย่างน้ำ หลังจากเติม Sodium sulfide solution ตามปริมาณที่คำนวณได้ในตัวอย่างน้ำแล้วกวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 – 20 นาที (ข้อควรจำ : ปริมาณ Sodium sulfide solution ที่มากเกินไปจะทำให้ความต้องการออกซิเจน และการตอบสนองต่อ Organic chloramine compound ช้าลง ซึ่งจะส่งผลต่อการทดสอบตัวอย่าง)

4.2.3 ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีสารพิษเจือปนอยู่ปริมาณมากจะฆ่าเชื้อแบคทีเรียตาย เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานชุบโลหะ โรงงานผลิตสารเคมี เป็นต้น จะต้องศึกษาวิธีกำจัดออกก่อน

4.2.4 กรณีตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของ DO มากกว่าจุดอิ่มตัวที่ 20 °C ซึ่งสามารถพบได้ในน้ำตัวอย่างที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในแหล่งน้ำที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เพื่อป้องกันการสูญเสียปริมาณออกซิเจนระหว่างการบ่มจึงต้องลดปริมาณ DO ลงโดยการนำตัวอย่างไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 20±3 °C ในภาชนะปิด แล้วนำไปเขย่า หรือเติมอากาศ จากนั้นนำไปกรอง

4.2.5 กรณีตัวอย่างน้ำที่มี Hydrogen peroxide ปนเปื้อน โดย Hydrogen peroxide ในน้ำเสียจะมาจากกระบวนการฟอกสีของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น โรงงานกระดาษ บ่อบำบัดของโรงงานทอผ้า สำหรับการวิเคราะห์ BOD ให้นำน้ำตัวอย่างใส่ภาชนะเปิดแล้วเขย่าเพื่อให้ Hydrogen peroxide สลายตัว หลังจากนั้นให้ตรวจดูปริมาณ peroxide ที่สลายตัวไปโดยใช้ Peroxide specific test strip วัดความเข้มข้นของ DO ตลอดระยะเวลาการเขย่า ระยะเวลาการเขย่าควรอยู่ในช่วง 1-2 ชั่วโมง ทั้งนี้ต้องขึ้นกับปริมาณของ Hydrogen peroxide (ปฏิกิริยา peroxide จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อค่า DO ไม่เพิ่มขึ้นภายในช่วง 30 นาที

4.3 การทดสอบตัวอย่าง

การทดสอบตัวอย่างมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีโดยตรง (direct method) และวิธีทำให้เจือจาง ( Dilution Method )

4.3.1 วิธีโดยตรง (direct method)

ใช้ในกรณีตัวอย่างน้ำมีค่า BOD น้อยกว่า 7 mg/L ได้แก่ น้ำประเภท แม่น้ำ คลอง บึง สระ ฯลฯ

4.3.1.1 นำน้ำตัวอย่างที่ปรับปรุงแล้วตามข้อ 4.2 ประมาณ 1- 1.5 L มาปรับอุณหภูมิให้ได้ 20 ± 3˚C

4.3.1.2 เติมอากาศให้มีออกซิเจน($O_2$) ละลายอิ่มตัว(ใช้เวลาประมาณ 20–30 นาที)

4.3.1.3 รินน้ำตัวอย่างลงในขวด BOD จนเต็ม 3 ขวดปิดจุกให้สนิทดูให้แน่ใจว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวด นำขวดหนึ่งมาหาค่า $DO_0$ ก่อน อีก 2 ขวดนำไปเก็บไว้ใน Incubator ควบคุมอุณหภูมิที่ 20± 3˚C เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาหาค่า $DO_5$

4.3.1.4 การหาค่าออกซิเจนละลาย (DO)

การหาค่าออกซิเจนละลายจากตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บไว้ในขวด BOD ขนาด 300 mL ทำได้ดังต่อไปนี้

- เติม Manganese Sulfate Solution 1 mL และ Alkali – Iodide – Azide solution 1 mL ลงในขวด BOD ที่ใส่ น้ำตัวอย่างโดยให้ปลายปิเปตอยู่เหนือผิวน้ำตัวอย่างเล็กน้อย ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลง 15 ครั้ง
- ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส 1/2 ของขวด
- เติม conc.$H_2SO_4$ 1mL ปิดจุกขวดก่อนตะกอน (Oxidised floc) จะล้นออกจากปากขวดเขย่ากลับไปกลับมาประมาณ 15 ครั้ง
- ถ้าใช้ขวด BOD ที่มีความจุ 300 mL ต้องตวงตัวอย่างจากขวดปริมาตร 201 mL เพื่อนำไปไตเตรต (ปริมาตรตัวอย่างนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรน้ำตัวอย่างเริ่มต้น 200 mL) เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำตัวอย่างจากขวดบีโอดีโดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมลงไปทั้งสิ้น 2 mL ดังนั้น ปริมาตรตัวอย่างซึ่งใช้ในการไตเตรตจึงควรเท่ากับ

$$\frac{200 \times 300}{(300 - 2)} = 201 \text{ mL}$$

- ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 N จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 1 mL จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม ไตเตรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป

4.3.1.5 บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้สำหรับการไตเตรต (สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 1 mL มีค่าเท่ากับออกซิเจนละลาย 1 mg/L)

## ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อน

1. นำตัวอย่างน้ำปนเปื้อนคลอรีน

1) นำตัวอย่างน้ำมาทำการตรวจวัดค่าคลอรีนอิสระตกค้าง (residual choline) โดยใช้ชุด test kit ถ้ามีค่าคลอรีนตัวอย่างน้ำจะออกสีเหลืองๆ ให้ทำการเติมสารละลาย 5% โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ละหยดลงในตัวอย่างที่ทดสอบคลอรีน มีสีเหมือนหรือใกล้เคียงสีของตัวอย่างน้ำปกติ

2) ในกรณีถ้าเติมสารละลาย5% โซเดียมไธโอซัลเฟตทีละหยดและทำการทดสอบปริมาณคลอรีนตกค้างควบคู่ไปตลอดแต่สีของการทดสอบคลอรีนยังคงเป็นสีเหลือง สีไม่ลดให้ตั้งสมมุติฐานว่าอาจมีการฆ่าเชื้ออื่นๆ ให้กำจัดโดยเติมกรดซัลฟามิค แอซิด (sulfamic acid) เติมที่ละเกร็ดจนกระทั่งสีของตัวอย่างที่ทดสอบคลอรีนสีเมือนหรือใกล้เคียงสีของตัวอย่างน้ำปกติ

2. กรณีตัวอย่างน้ำปนเปื้อนไนไตรท์ซึ่งจะทำให้เน่าเสีย

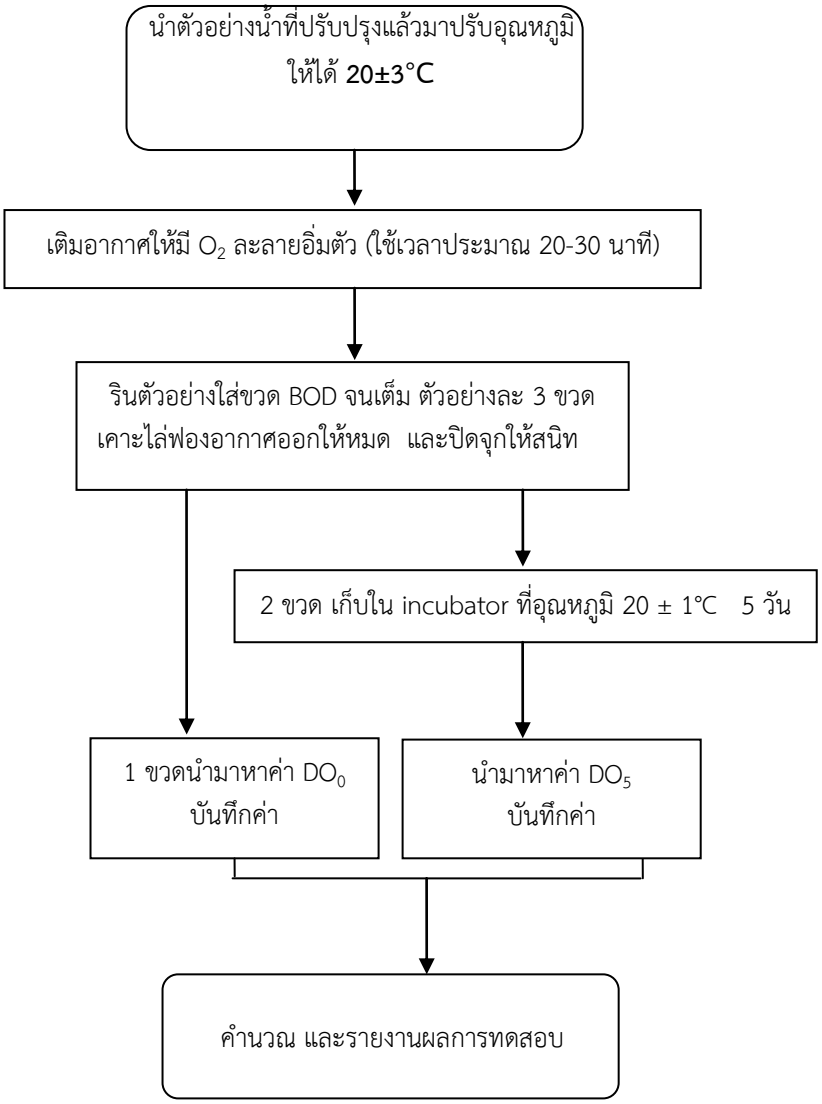
1) ให้แบ่งตัวอย่างที่วิเคราะห์มาประมาณ 5-10 mL เติมสารละลาย sulfanilamide และ N-1 napthylene diamine อย่างละ 4 หยด เขย่าให้เข้ากัน ดูสีที่เกิดขึ้นถ้าเป็นสีชมพูแสดงว่ามีไนไตรท์ ให้กำจัดไนไตรท์โดยเติมกรอซัลฟามิค แอซิด (sulfamic acid) ลงในตัวอย่างน้ำที่จะทดสอบเติมทีละเกร็ดและทำการวิเคราะห์หาไนไตรท์ต่อจนกระทั่งสีของตัวอย่างน้ำทดสอบเหมือนหรือใกล้เคียงของตัวอย่างน้ำปกติ

2) จากนั้นให้ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) และปรับให้เป็นกลาง ก่อนทำตามขั้นตอนวิเคราะห์ต่อไป เนื่องจากกรดซัลฟามิค แอซิด เป็นกรด

สารเคมีที่ต้องเตรียมและต้องไว้ในการตรวจทดสอบ

1. สารละลาย 5% โซเดียมไธโอซัลเฟต
2. กรดซัลฟามิค แอซิด (sulfamic acid)
3. สารละลาย N-1 napthylene diamine
4. สารละลาย sulfanilamide
5. ชุดตรวจค่าคลอรีนอิสระตกค้าง

## ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธีตรง



4.3.2 วิธีทำให้เจือจาง ( Dilution Method )

ใช้ในกรณีที่น้ำตัวอย่างมีความสกปรกสูง (มีค่า BOD มากกว่า 7 mg/L) จำเป็นจะต้องทำให้ตัวอย่างน้ำมีความสกปรกเจือจางลง โดยใช้น้ำผสมเจือจาง (dilution water) และควรทำหลายๆ ความเข้มข้น(อย่างน้อย 2 ความเข้มข้น) เช่น ถ้าน้ำตัวอย่างมีการปนเปื้อนสูง สกปรก สีดำคล้ำ ให้ทดสอบตามวิธีที่ 2 และเลือกทำ dilution ที่ 10 – 100 %

4.3.2.1 การคัดเลือกและเก็บรักษาน้ำเพื่อใช้เจือจางน้ำที่ใช้สำหรับเจือจางควรมาจากแหล่งที่เหมาะสม เช่น น้ำกลั่น และควรเป็นน้ำกลั่นที่ปราศจากโลหะหนักโดยเฉพาะทองแดงและสารพิษจำพวกคลอรีน ซึ่งจะรบกวนการทดสอบบีโอดี การเก็บรักษาน้ำเจือจางควรเก็บในภาชนะที่สะอาดและไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง หลังจากเติมสารอาหาร แร่ธาตุ และบัฟเฟอร์ แล้ว และหลีกเลี่ยงการใช้น้ำเจือจางที่มีค่าบีโอดีของ Blank มากกว่า 0.2 mg/L

4.3.2.2 การเตรียมน้ำผสมเจือจาง ( Dilution water )

- นำน้ำกลั่นที่ปราศจากสารมีพิษ ( กลั่นจากเครื่องกลั่นแก้ว ) มาปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 20 $\pm$ 3˚C และปรับ pH เป็นกลาง ปรับคุณภาพให้เหมาะกับการดำรงชีวิตของจุลชีพ โดยเติมสารละลายอาหารฟอสเฟตบัฟเฟอร์, แมกนีเซียมซัลเฟต, แคลเซียมคลอไรด์ และไอร์ออน (III) คลอไรด์อย่างละ 1 mL ต่อน้ำกลั่น 1 L
- เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ( มีค่า DO อยู่ระหว่าง 8 - 9 mg/L)

4.3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อจุลชีพ ( Seed )

1) หลักพิจารณาในการเติมหัวเชื้อ

ในการทดสอบหาค่าบีโอดี จำเป็นจะต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ที่มากพอที่จะย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ ดังนั้นในการเตรียมหัวเชื้อจุลชีพมีหลักพิจารณาดังนี้

- น้ำเสียจากชุมชน น้ำคลอง น้ำแม่น้ำที่ปนเปื้อนและมีปริมาณจุลินทรีย์สูง ไม่จำเป็นต้องเติมหัวเชื้อจุลชีพเพิ่ม สามารถทำเจือจางได้เลยตามวิธีที่ 4.3.2
- น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรม โรงพยาบาลที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ น้ำทิ้งที่มีอุณหภูมิสูง น้ำที่มีค่าปริมาณจุลินทรีย์ต่ำ เช่นน้ำเสียจากระบบบำบัดชนิดแอนแอโรบิค ต้องเติมหัวเชื้อจุลชีพชนิดแอโรบิคเพิ่ม

2) วิธีเตรียมหัวเชื้อ

ตวง Dilution Water ปริมาตร 500 mL เติมกลูโคส 1% ปริมาตร 5 mL เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัวตลอดเวลา และเติมจุลชีพสำเร็จรูป 1 แคปซูล หรือเขี่ยเชื้อจุลชีพซึ่งเพาะเชื้อเอง จาก Nutrient Agar Slant 1 หลอด ลงในน้ำดังกล่าว ใช้เวลาเพาะเชื้อ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จุลชีพจะเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมใช้งาน (ควรใช้งานให้หมดภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง)

3) วิธีเพาะเชื้อจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Nutrient Agar Slant)

เตรียม Nutrient Agar Slant โดยชั่งสาร nutrient agar 23 g ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 L ตวงใส่หลอดที่มีจุกเกลียวหรือมีฝาครอบ หลอดละ 10 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 ˚C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัวให้เอียงหลอดและเขี่ยเชื้อจุลชีพประเภท aerobic bacteria ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar Slant เพาะเชื้อในตู้ incubator อุณหภูมิ 37˚C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ใช้งานได้นานโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4-10˚C

4.3.2.4 วิธีเลือกอัตราส่วนในการผสมเจือจาง

เนื่องจากการทดสอบค่า BOD อาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวการย่อยสลาย สภาวะแวดล้อมจะมีผลต่อการทดสอบมากทำให้ค่า BOD มีความผันแปรสูง การทดสอบตัวอย่างหนึ่งๆจึงควรผสมเจือจางหลายๆความเข้มข้น (ไม่ควรน้อยกว่า 2 ความเข้มข้น) ส่วนอัตราส่วนการผสมเจือจางอาจประมาณตามชนิดของตัวอย่างตามตารางที่ 1 จากสถิติข้อมูลเดิม หรือจากค่าความเข้มข้นโดยประมาณ
(ดูตารางที่ 2 ) จากค่า COD (Chemical Oxygen Demand) ของตัวอย่างน้ำเสียที่ต้องการทดสอบ

<u>ตารางที่ 1.</u> Dilution and Type of Sample

| เปอร์เซ็นต์ที่ใช้เจือจางตัวอย่างน้ำเสีย ( % Dilution ) | ชนิดของตัวอย่างน้ำ ( Type of sample ) |
|---|---|
| 0.0 - 1.0 | Strong lndustrial Wastes |
| 1 - 5 | Raw and Settled Waste water |
| 5 - 20 | Biologically treated Effluent |
| 10 - 100 | polluted River Waters |

<u>ตารางที่ 2.</u> BOD Measurable with Various Dilution of Sample

| Using percent mixtures | |
|---|---|
| % Dilution | Range of BOD mg/L |
| 0.01 | 50,000 - 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 |
| 1.0 | 200 - 700 |
| 2.0 | 100 - 350 |
| 5.0 | 40 - 140 |
| 10.0 | 20 - 70 |
| 20.0 | 10 - 35 |
| 50.0 | 4 - 14 |
| 100 | 0 - 7 |

<u>ตัวอย่าง</u>

ถ้าตัวอย่างน้ำเสียมีค่าซีโอดี = 100 mg/L

ค่าบีโอดีโดยประมาณ $= \frac{\text{ค่า COD}}{2} = \frac{100}{2} = 50$ mg/L

เลือกอัตราส่วนที่ต้องใช้เจือจางตัวอย่างน้ำเสียจากตารางที่ 2 เพื่อใช้ทดสอบค่า BOD ได้ 3 ความเข้มข้น คือ 5%, 10% และ 20%

4.3.2.5 ขั้นตอนการทดสอบวิธีทำให้เจือจาง

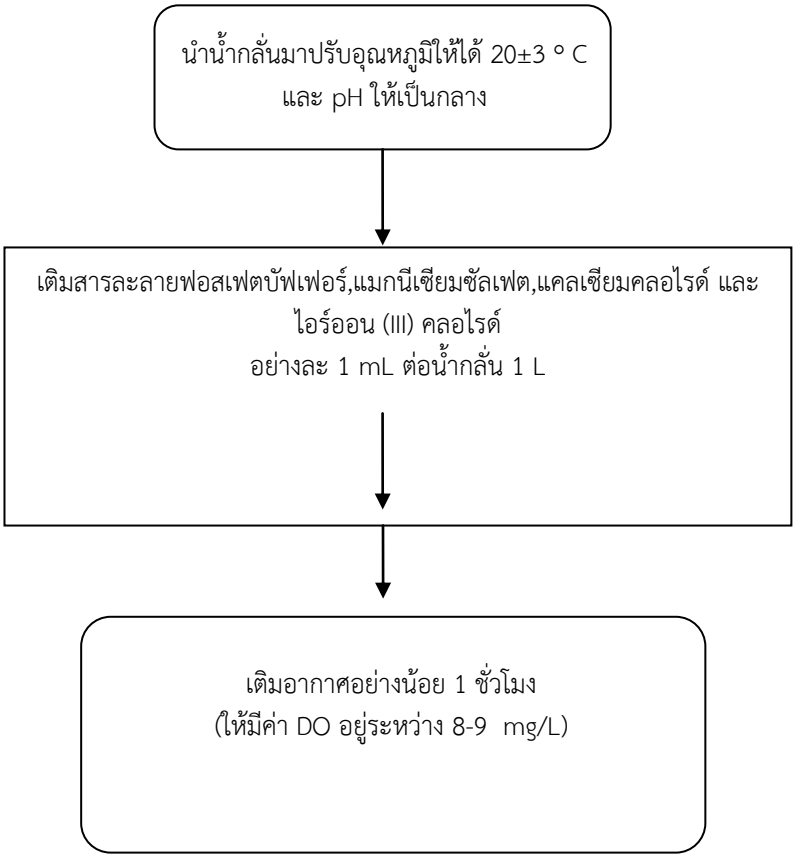
- ค่อย ๆ ริน dilution water ที่ได้จากข้อ 4.3.2.2 ลงในกระบอกตวงขนาด 1,000 mLประมาณ 200 mLโดยให้น้ำค่อย ๆ ไหลลงตามข้างกระบอกตวง
- เติมหัวเชื้อจุลชีพที่ได้จากข้อ 4.3.2.3 ลงในกระบอกตวง 2 mL
- เติมตัวอย่างน้ำตามส่วนที่คำนวณได้จากตารางที่2 เช่น 50 mL (5 %)
- เติม dilution water ลงจนครบ 1,000 mL
- กวนให้เข้ากันโดยใช้แท่งพลาสติกเสียบจุกยางไว้ที่ปลายชักขึ้นลงเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ประมาณ 20 ครั้ง
- ค่อย ๆ รินสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วนี้ใส่ลงในขวด BOD ที่แห้งสะอาดจนเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท ขวดหนึ่งนำไปทดสอบหาค่า$DO_0$ อีกสองขวดนำไปเก็บใน incubator ที่อุณหภูมิ 20±3˚C เป็นเวลา 5 วัน ก่อนเก็บ ให้ตรวจดูน้ำหล่อที่ปากขวดและใช้ฝาพลาสติก (BOD Cap) ครอบป้องกันน้ำระเหยและป้องกันการสูญเสียออกซิเจน
- หลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 20±1˚C ครบ 5 วันแล้ว นำมาหาค่า $DO_5$ ตัวอย่างที่ใช้ได้จะต้องมีค่าออกซิเจนละลายเหลืออยู่อย่างน้อย 1 mg/L และมีการใช้ออกซิเจน ไปอย่างน้อย 2 mg/L

4.3.2.6 การแก้ค่าเนื่องจากการเติมหัวเชื้อ ( Seed Correction Control )

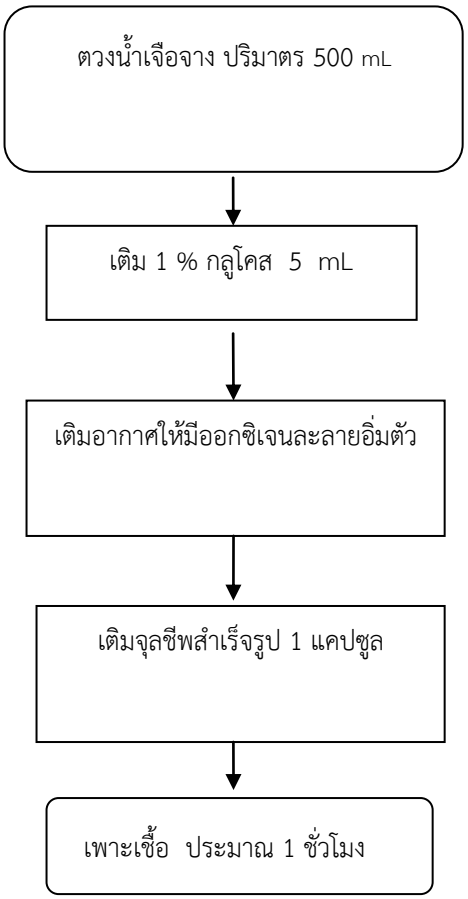
ถ้ามีการใส่หัวเชื้อจะต้องนำหัวเชื้อมาทำให้เจือจาง (dilute) ประมาณ 5 – 20% แล้วนำไป incubate เช่นเดียวกับตัวอย่าง 5 วัน แล้วหาค่า $DO_5$ เลือกค่าความเข้มข้นที่มีการใช้ออกซิเจนระหว่าง 40 – 70% (ดูการคำนวณ) การเติมหัวเชื้อจะเติมกรณีเจือจางตัวอย่างน้ำเสียน้อยกว่า 10% หรือกรณีตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีจุลชีพน้อย

**ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธีทำให้เจือจาง**

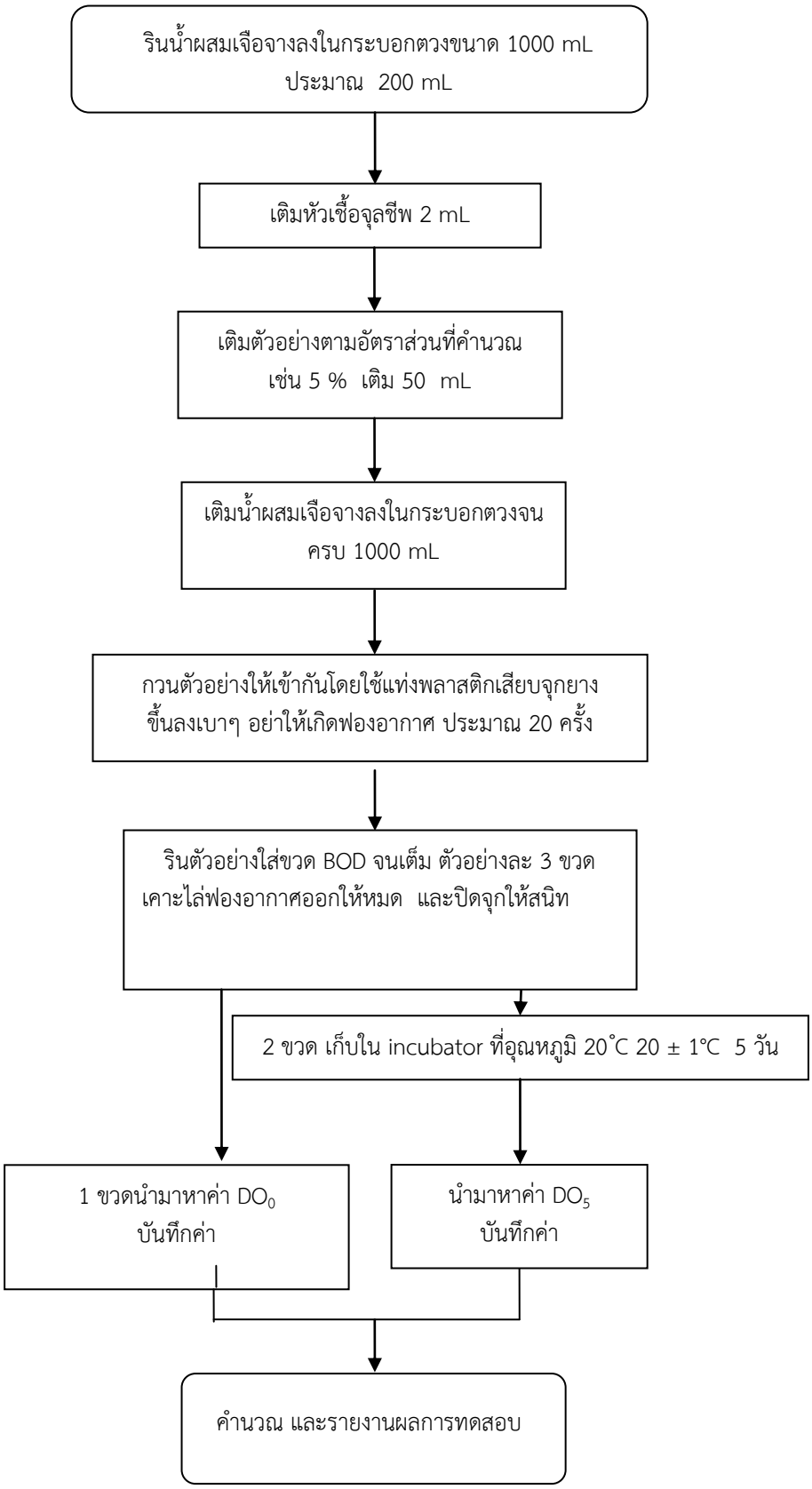
1. การเตรียมน้ำผสมเจือจาง



2. การเตรียมหัวเชื้อจุลชีพ



3. การทดสอบ


รินน้ำผสมเจือจางลงในกระบอกตวงขนาด 1000 mL ประมาณ 200 mL
เติมหัวเชื้อจุลชีพ 2 mL
เติมตัวอย่างตามอัตราส่วนที่คำนวณ เช่น 5 % เติม 50 mL
เติมน้ำผสมเจือจางลงในกระบอกตวงจนครบ 1000 mL
กวนตัวอย่างให้เข้ากันโดยใช้แท่งพลาสติกเสียบจุกยาง ขึ้นลงเบาๆ อย่าให้เกิดฟองอากาศ ประมาณ 20 ครั้ง
รินตัวอย่างใส่ขวด BOD จนเต็ม ตัวอย่างละ 3 ขวด เคาะไล่ฟองอากาศออกให้หมด และปิดจุกให้สนิท
2 ขวด เก็บใน incubator ที่อุณหภูมิ 20˚C 20 ± 1°C 5 วัน
1 ขวดนำมาหาค่า $DO_0$ บันทึกค่า
นำมาหาค่า $DO_5$ บันทึกค่า
คำนวณ และรายงานผลการทดสอบ

4.4 การคำนวณ

4.4.1 วิธีโดยตรง

$$BOD\ (mg/L) = DO_0 - DO_5$$

$DO_0$ = ค่า DO ของตัวอย่างที่ไตเตรตได้ในวันแรก

$DO_5$ = ค่าเฉลี่ย DO ของตัวอย่างที่ไตเตรตได้ หลังจากเก็บใน incubator 5 วัน

4.4.2 วิธีทำให้เจือจาง

$$BOD\ (mg/L) = \frac{[(DO_0 - DO_5) - (B_1 - B_2)f]}{P} \times 100$$

$DO_0$ = ค่า DO ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วในวันแรก

$DO_5$ = ค่าเฉลี่ย DO ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วเก็บใน incubator 5 วัน

P = เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ใช้ ( เช่น 5 % , 10 % )

$B_1$ = ค่า DO ของ seed control ที่ทำการเจือจางแล้วในวันแรก

$B_2$ = ค่าเฉลี่ย DO ของ seed control ที่ทำการเจือจางแล้วเก็บใน incubator 5 วัน

f = อัตราส่วนของน้ำเชื้อ ( seed ) ในตัวอย่าง ต่อ seed control

$$f = \frac{\%\ \text{น้ำเชื้อใน}\ DO_0}{\%\ \text{น้ำเชื้อใน}\ B_1} \qquad \text{ตัวอย่าง} \quad f = \frac{0.2\ \%}{10\ \%}$$

4.5 การควบคุมคุณภาพ

ควบคุมคุณภาพผลการทดสอบโดยใช้ กลูโคส – กรดกลูตามิค (Glucose Glutamic Acid check) เนื่องจากน้ำกลั่นที่ใช้อาจมีสารปนเปื้อนอยู่โดยเฉพาะทองแดงซึ่งจะทำให้หัวเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง มีผลทำให้ค่า BOD ที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ควรตรวจสอบโดยใช้สารอินทรีย์บริสุทธิ์ที่ทราบค่า BOD แล้ว ซึ่งได้แก่ กลูโคส และกรดกลูตามิค กลูโคสออกซิไดซ์ได้ง่ายแต่ไม่คงที่ ใช้กับหัวเชื้อทั่วๆไป แต่สำหรับกรดกลูตามิคนั้นอัตราการออกซิไดซ์จะคงที่และมีสมบัติคล้ายน้ำเสียจากชุมชน

1. นำสารละลายกลูโคส – กรดกลูตามิค 20 mL ใส่กระบอกตวงขนาด 1000 mL และนำมาทดสอบตามข้อ 4.3.2.5 จากนั้นนำมาหาค่าออกซิเจนที่ใช้ไป (oxygen depletion) และค่า BOD นี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของหัวเชื้อที่ใส่ลงไป โดยมีค่ามาตรฐาน BOD เท่ากับ 198 ± 30.5 mg/L

2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำผสมเจือจาง (dilution water control)

นำน้ำผสมเจือจางมาทดสอบหาค่าบีโอดี โดยเติมน้ำตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อลงในขวด BOD 3 ขวดแล้วทดสอบหาค่าบีโอดีตามข้อ 4.3.1 ถ้าคุณภาพน้ำดี จะให้ค่า $DO_0$ - $DO_5$ ไม่ควรลดมากกว่า 0.2 mg/L

3. การตรวจเพื่อควบคุมคุณภาพ

ตรวจสอบการลดลงของออกซิเจนและปริมาณออกซิเจนคงเหลือ เมื่อผ่านการบ่มมาเป็นระยะเวลา 5 วัน ต้องมีค่าออกซิเจนลดลง ($DO_0$ - $DO_5$) อย่างน้อย 2.0 mg/L และค่าออกซิเจนที่เหลืออยู่อย่างน้อย 1.0 mg/L

# เอกสารอ้างอิง

American public Hssociation. 2005. Standard Methods for Examination of water and Wastewater.21st Edition. American Public Hssociation.

วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2557