สารบัญ

หน้า

1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์ของการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงาน	1
3. ขอบเขต	1
4. คำจำกัดความ	1
5. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (เรื่อง/งานClick here to enter text.)	4
5.1 วิธีการหาโดยตรงขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์	4
5.2 วิธีการที่ต้องเจือจางตัวอย่าง ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์	5
5.3 ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการคำนวณ	9
6. แบบฟอร์มที่ใช้	10
7. เอกสารอ้างอิง	10
8. ประโยชน์ของการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงาน	11

คู่มือการปฏิบัติงาน

เรื่อง การทดสอบบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD_5) โดยวิธี 5 Days Incubation และ Azide Modification ในน้ำผิวดินและน้ำเสีย

1. บทนำ

ในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำ แบคทีเรียชนิดต้องการออกซิเจนสามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนั้นเป็นอาหาร การทดสอบบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) เป็นการประมาณค่าของอาหารที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำ เช่น น้ำผิวดิน น้ำทิ้งและน้ำเสีย ถ้ามีอาหารปริมาณมาก ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียต้องการก็จะสูง การทดสอบบีโอดีนำไปใช้ในการวัดความสกปรกของน้ำ โดยการวัดปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ (สารประกอบคาร์บอน) สารอนินทรีย์ เช่น ซัลไฟด์และธาตุเหล็ก บางครั้ง อาจร วมถึงปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการเปลี่ยนรูป ของสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียและสารอินทรีย์ไนโตรเจนไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทได้ด้วยถ้าไม่ได้เติมสารยับยั้งการเกิดออกซิไดซ์ในตัวอย่าง น้ำภายใต้สภาวะที่ควบคุม โดยปกติวัดปริมาณออกซิเจนละลายเป็นมิลลิกรัมออกซิเจนที่ใช้ ต่อตัวอย่างน้ำหนึ่งลิตรที่บ่มที่อุณหภูมิ 20°C และในเวลา 5 วัน

การทดสอบบีโอดี มีประโยชน์ เช่น ใช้ในการวัดภาระบรรทุกของเสียในระบบบำบัดน้ำเสีย หาประสิทธิภาพการบำบัดของระบบ และใช้ควบคุมการเดินระบบบำบัด นอกจากนี้ ยังใช้ในการหาผลกระทบของน้ำทิ้งที่มีต่อน้ำในแหล่ งรับน้ำเสียต่างๆด้วย ข้อเสียของการทดสอบบีโอดีคือต้องใช้เวลาถึง 5 วัน ถึงจะได้ผลการทดสอบ

2. วัตถุประสงค์ของการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงาน

เพื่อให้บุคลากรที่วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานทดสอบของห้องปฏิบัติการทางเคมีของกลุ่มน้ำและขยะ

3. ขอบเขต

วิธีนี้ใช้ทดสอบหาปริมาณออกซิเจนในตัวอย่างน้ำผิวดิน น้ำเสียชุมชนและน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม ช่วงการทดสอบได้จากกการคำนวณหาปริมาณออกซิเจนในวันเริ่มต้น (DO_0, 7-9 mg/l) และในวันที่ 5 (DO_5, ≥ 1 mg/l) และนำผลต่างคูณด้วยการเจือจาง (Dilution factor) ขีดจำกัดของการทดสอบเท่ากับ 2 mg/l (DO_0-DO_5 ≥ 2 mg/l)

4. คำจำกัดความ

-

5. เกณฑ์การควบคุมคุณภาพ (Quality Assurance Criteria)

- เช็คความถูกต้องของการเจือจางตัวอย่าง โดยใช้ glucose glutamic acid check (GGA) ซึ่งควรมีค่า 198 ± 30.5 mg/l หรืออีกวิธี ห้องปฏิบัติการทำแผนภูมิควบคุม (control chart) โดยทำ GGA อย่างน้อย 25 ครั้ง ในระยะเวลาหลายเดือน เก็บค่ามาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±3sd) และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่า 198 ± 30.5 mg/l ซึ่งควรอยู่ในช่วงนี้ ในการหาค่าบีโอดีของ GGA ในการทดสอบตัวอย่างแต่ละครั้ง หากค่าที่ได้อยู่นอกแผนภูมิควบคุม ผลการทดสอบตัวอย่างนั้นจะใช้ไม่ได้
- ผลต่างของปริมาณ DO_0 และ DO_5 สำหรับ Blank ของน้ำเจือจางต้องมีค่าไม่มากกว่า 0.2 mg/l
- กรณีที่เติมเชื้อ ความแตกต่างของ DO สำหรับ Blank ควรจะอยู่ระหว่าง 0.6 และ 1.0 mg/l
- การทำซ้ำ ค่า RPD (Relative Percent Difference) ไม่เกิน 15%
- ปริมาณ DO_5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 1 mg/L
- ผลต่างของปริมาณ DO_0 และ DO_5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 2 mg/L

6. การเก็บรักษาตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์หาค่า BOD ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ภายใน 2 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C และวิเคราะห์ตัวอย่างภายใน 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ให้ปรับอุณหภูมิของตัวอย่างให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำมาวิเคราะห์

7. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดบีโอดี ขนาด 250-300 mL พร้อมจุกปิดสนิทแบบ ground joint
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 20 องศาเซลเซียส และต้องมืดเพื่อป้องกันการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายในตัวอย่าง
3. อุปกรณ์สำหรับเติมอากาศในน้ำ
4. ไมโครปิเปต
5. กระบอกตวง
6. อุปกรณ์สำหรับการไทเทรต
7. ขวดรูปชมพู่

8. สารเคมี

1. สารละลาย Phosphate buffer

ชั่งสาร KH_2PO_4 8.5 กรัม สาร K_2HPO_4 21.75 กรัม สาร $Na_2HPO_4.7H2O$ 33.4 กรัม และสาร NH_4Cl 1.7 กรัม ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ค่า pH ของสารละลายนี้ควรจะประมาณ 7.2 โดยไม่ต้องปรับ

2. สารละลาย Magnesium sulfate

ชั่งสาร $MgSO_4$. $7H_2O$ 22.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

3. สารละลาย Calcium chloride

ชั่งสาร $CaCl_2$ 27.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลาย Ferric chloride

ชั่งสาร $FeCl_3 . {}_6H_2O$ 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลายกรดและด่าง 1 N เพื่อใช้ในการปรับค่า pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง

6. สารละลาย Sodium sulfite

ชั่งสาร Na_2SO_3 1.575 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ไม่อยู่ตัว ต้องเตรียมในวันที่จะใช้

7. สารป้องกันการเกิด Nitrification : 2Chloro-6-(trichoromethyl) pyridine

8. สารละลาย Glucose glutamic acid

อบ Glucose (reagent grade) และ Glutamic acid (reagent grade) ที่อุณหภูมิ 103 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่ง Glucose 150 มิลลิกรัม และ Glutamic acid 150 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นได้ 3 สัปดาห์

9. สารละลาย Manganous sulfate

ชั่งสาร $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม หรือสาร $MnSO_4.2H_2O$ 400 กรัม หรือสาร$MnSO_4.H_2O$ 364 กรัม ละลายในน้ำกลั่น กรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายที่เตรียมได้ไม่ควรให้สีกับน้ำแป้ง เมื่อนำไปเติมลงไปในสารละลาย Potassium iodide (KI) ที่มีสภาพเป็นกรด

10. สารละลาย Alkali-iodide-azide

ชั่งสาร NaOH 500 กรัม (หรือสาร KOH 700 กรัม) และสาร NaI มา 135 กรัม (หรือสาร KI 150 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หลังจากนั้นชั่งสาร NaN_3 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมในสารละลายที่เตรียมขึ้น

11. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

12. น้ำแป้ง

ละลาย Soluble starch 2 กรัม และ Salicylic acid 0.2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ทำให้ร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร

13. สารละลายมาตรฐาน Potassium bi-iodate (0.025 N)

ละลาย KH(IO3)2 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

14. สารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate (0.025 N)

ชั่งสาร $Na_2S_2O_3.5H_2O$ มา 6.205 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติม NaOH 6N จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือสาร NaOH จำนวน 0.4 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ทำการ Standardize สารละลายนี้ด้วยสารละลาย bi-iodate ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

การหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ของสารละลายมาตรฐ าน Sodium thiosulfate เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ ให้ละลาย KI ประมาณ 2 กรัม ในขวดรูปกรวยด้วยน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร เติม กรด H_2SO_4 ที่เข้มข้น 6 N 1 มิลลิลิตร หรือเติมH_2SO_4 เข้มข้น 2-3 หยด ตามด้วยสารละลายมาตรฐาน potassium bi-iodate 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้น ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ ให้เติมน้ำแป้ง 2-3 หยดเมื่อใกล้ถึงจุดยุติ ซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลายเป็นสีเหลืองอ่อน ถ้าสารละลาย $Na_2S_2O_3$ มีความเข้มข้น 0.025 N พอดี ปริมาตรที่ใช้ในการ ไทเทรตจะเท่ากับ 10 มิลลิลิตร พอดี ถ้าปริมาตรสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไทเทรตไม่เท่ากับ 10 มิลลิลิตร สมมติเท่ากับ x ให้นำค่า 10/x ไปคูณกับค่า DO ที่หาได้

9. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (เรื่อง/งาน <u>การทดสอบบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD5) โดยวิธี 5 Days Incubation และ Azide Modification ในน้ำผิวดินและน้ำเสีย</u>**)**

ในการทดสอบหา ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำใช้วิธี Winkler (Azide modification) โดยเติมสารละลาย Manganese sulfate แล้วสารละลาย Alkali-iodide-azide ลงในตัวอย่างน้ำตามลำดับ ออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับ Manganese เกิดเป็นตะกอนสีแดงของ Manganese dioxide และภายใต้สภาวะที่เป็นกรด Iodide จะทำปฏิกิริยากับ Manganese dioxide ได้เป็น Iodine จากนั้น titrate หา Iodine ด้วยสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate

วิธีการหาโดยตรง

9.1 ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์

ในกรณีที่ตัวอย่างมีค่า BOD ไม่เกิน 7 mg/L ไม่จำเป็นต้องเจือจางตัวอย่าง ส่วนใหญ่จะได้แก่น้ำจากแม่น้ำลำคลอง ให้วิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ปรับอุณหภูมิตัวอย่างให้ได้ประมาณ 20 $^{\circ}$C
2. เติมอากาศให้ตัวอย่างมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำใกล้จุดอิ่มตัว
3. เติมตัวอย่างในขวด BOD จำนวน 2 ขวด
4. วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในขวดที่ 1 ทันที
5. นำขวดที่ 2 เข้าเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 $^{\circ}$C เป็นเวลา 5 วัน
6. หลังจาก 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เหลืออยู่ในขวดที่ 2

วิธีการที่ต้องเจือจางตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ถ้าจำเป็นให้ทำการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสมและให้มีปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพียงพอ และอาจต้องมีการเติมอากาศเพื่อปรับปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำในน้ำตัวอย่าง แล้วนำไปหาปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20°C ใน

ที่มืด เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำตัวอย่างมาหาปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำที่เหลืออยู่ ค่า BOD หาได้จากปริมาณของออกซิเจนที่ลดลง

วิธีนี้ใช้กับตัวอย่างที่มีความสกปรกสูง โดยมีค่า BOD มากกว่า 7 mg/L ซึ่งถ้าไม่เจือจางตัวอย่างแบคทีเรียจะใช้ออกซิเจนจนหมดก่อนเวลา 5 วัน ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีค่าเท่ากับศูนย์ จึงไม่สามารถหาค่า BOD ได้

9.1 ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. การเตรียมน้ำเจือจาง

ก. ตวงน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการใช้

ข. เติมสารละลาย Phosphate buffer, Magnesium sulfate, Calcium chloride และ Ferric chloride อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

ค. เติมอากาศอย่างน้อย 4 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มออกซิเจนที่ละลายน้ำ

ง. ปรับอุณหภูมิให้ได้ 20 $^{\circ}$C

จ. เติมเชื้อ (seed) ถ้าจำเป็น โดยปกติแล้วถ้าเป็นน้ำเชื้อจากน้ำเสียชุมชนจะใช้น้ำเชื้อ 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร

2. การเติมน้ำเชื้อ (Seeding)

ตัวอย่างจำเป็นต้องมีจุลินทรีย์ ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ในปริมาณที่เพียงพอ น้ำเสียชุมชน น้ำที่ผ่านการบำบัดแบบชีวภาพและยังไม่มีการฆ่าเชื้อหรือเติมคลอรีน และน้ำผิวดินจะมีปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพียงพอ แต่ตัวอย่างบางประเภทมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่เพียงพอ เช่น น้ำเสียจากโรงงานบางประเภท น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ น้ำเสียที่มีอุณหภูมิสูงหรือน้ำเสียที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูง เป็นต้น สำหรับน้ำเสียประเภทเหล่านี้จำเป็นต้องเติมน้ำเชื้อลงในน้ำเจือจางด้วย น้ำเชื้อที่ใช้สามารถใช้น้ำเสียชุมชน โดยนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่อย่าให้นานเกิน 36 ชั่วโมง แล้วนำส่วนที่ใสมาใช้เป็นน้ำเชื้อ Seed control คือการวิเคราะห์ค่าBODของน้ำเชื้อที่ใช้เติมลงในน้ำเจือจาง ค่าที่ได้จะนำไปใช้คำนวณภายหลัง

3. การจัดการขั้นต้นกับตัวอย่าง

ก. ตัวอย่างที่มีความเป็นกรดหรือด่าง : ให้ปรับให้เป็นกลางโดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 ด้วย H_2SO_4 หรือ NaOH โดยปริมาณของกรดหรือด่างที่เติมไม่ควรมากกว่า 5% ของปริมาตรตัวอย่าง

ข. ตัวอย่างที่มีสารประกอบคลอรีนตกค้าง : ถ้าเป็นไปได้ควรหลีกเลี่ยงตัวอย่างที่มีสารคลอรีนตกค้าง โดยเก็บตัวอย่างก่อนที่จะผ่านเข้าขบวนการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ถ้าตัวอย่างผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้วตรวจไม่พบสารคลอรีนตกค้างให้เติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจางด้วย ถ้าพบปริมาณคลอรีนตกค้างให้กำจัดคลอรีนก่อนและเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจางด้วย

ค. ตัวอย่างที่มีสารพิษ : น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น โรงงานชุบโลหะจะมีโลหะที่เป็นสารพิษอยู่ ตัอย่างประเภทนี้จำเป็นต้องได้รับการศึกษาและบำบัดเป็นกรณีพิเศษ

ง. ตัวอย่างที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเกินจุดอิ่มตัว : ตัวอย่างที่มีค่าออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 9 mg/L ที่อุณหภูมิ 20 °C ให้ลดปริมาณออกซิเจนลงมาจนถึงจุดอิ่มตัว โดยการเติมตัวอย่างไม่ต้องเต็มขวดแล้วเขย่า หรือโดยการเติมอากาศ

จ. การป้องกันการเกิด nitrification : ถ้าต้องการป้องกันความผิดพลาดของค่าBODจากการเกิด nitrification ให้เติม 2-chloro-6- (trichloro methyl) pyridine (TCMP) จำนวน 3 mg ในขวดBOD ขนาด 300 mL ก่อนปิดจุกหรือเติมในน้ำเจือจาง ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 mg/L

4. การทำ Blank

นำน้ำเจือจางมาเทใส่ขวด BOD 6 ขวด นำ 3 ขวดไปวิเคราะห์หา DO ทันที และ 3 ขวดที่เหลือไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 oC เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปหา DO

5. การทำตัวอย่าง QC

1. เลือกตัวอย่างน้ำเสียชุมชนมา 1 ตัวอย่างใช้เป็นเชื้อ (seed) โดยนำมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในกระบอกตวง 1000 มิลลิลิตร
2. เติม สารละลาย Glucose-glutamic acid จำนวน 20 mL
3. เติมน้ำเจือจางจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
4. กวนสารละลายในกระบอกตวงให้เข้ากันด้วยแท่งกวน
5. ค่อย ๆ เทสารละลายในกระบอกตวงใส่ขวด BOD 3 ขวด พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ
6. ขวด 1 นำไปหา DO ทันที
7. ขวด 2 และ 3 นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไปหา DO

6. การทำซ้ำ (duplicate)

ให้ทำ duplicate สำหรับตัวอย่างน้ำที่ใช้ทำ QC โดยเจือจางตัวอย่างให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวด BOD 3 ขวด นำไปหา DO ทันที 1 ขวด แล้วนำ 2 ขวดที่เหลือไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไปหาค่า DO

7. การเจือจางตัวอย่าง

การเจือจางตัวอย่าง สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเจือจางในกระบอกตวง และการเจือจางโดยตรงในขวด BOD สำหรับการเจือจางโดยตรงในขวด BOD ถ้าใช้ตัวอย่างน้อยกว่า 0.5 mL ให้เจือจางตัวอย่างเบื้องต้นก่อน โดยขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างในกระบอกตวง มีดังนี้

ก. เติมอากาศให้ตัวอย่างประมาณ 2 นาที

ข. กำหนดปริมาณการเจือจางตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่กำหนด 3 ช่วง ให้ครอบคลุมค่า BOD ที่ประเมินไว้ การเจือจางที่ดีควรให้ผลของ DO ที่เวลา 5 วัน มีค่าอย่างน้อย 1 mg/L และปริมาณของ DO ที่ลดลงหลังจากเวลา 5 วัน ควรมีค่าอย่างน้อย 2 mg/L

การหาค่า COD ของตัวอย่าง ซึ่งสามารถรู้ผลภายในเวลา ประมาณ 2 ชั่วโมง สามารถช่วยในการเลือกช่วงที่จะเจือจางตัวอย่างได้ โดยส่วนใหญ่ค่า BOD จะมีประมาณ 60% ของค่า COD หรืออาจจะประเมินจากประเภทของตัวอย่าง ดังนี้

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม	ให้เจือจาง	น้อยกว่า 1.0%
น้ำเสียชุมชน	ให้เจือจาง	1 ถึง 5%
น้ำที่ผ่านการบำบัดทางชีวภาพ	ให้เจือจาง	5 ถึง 25%
น้ำแม่น้ำที่เน่าเสีย	ให้เจือจาง	25 ถึง 100%

สำหรับช่วงของค่า BOD ที่สัมพันธ์กับสัดส่วนการเจือจางนั้นแสดงไว้ในตารางข้างล่าง

ตารางแสดงช่วงของค่า BOD กับวิธีการเจือจางต่างๆ

Using Percent mixtures		By direct pipetting into 300-ml bottles	
% mixture	Range of BOD	mL	Range of BOD
0.01	20,000-70,000	0.02	30,000-105,000
0.02	10,000-35,000	0.05	12,000-42,000
0.05	4,000-14,000	0.10	6,000-21,000
0.1	2,000-7,000	0.20	3,000-10,500
0.2	1,000-3,500	0.50	1,200-4,200
0.5	400-1,400	1.0	600-2,100
1.0	200-700	2.0	300-1,050
2.0	100-350	5.0	120-420
5.0	40-140	10.0	60-210
10.0	20-70	20.0	30-105
20.0	10-35	50.0	12-42
50.0	4-14	100	6-21
100	0-7	300	0-7

สำหรับการเลือกช่วงเจือจางนั้น ให้ประมาณค่าBODของตัวอย่างก่อน เช่น ประมาณว่าตัวอย่างมีค่า BOD เท่ากับ 500 mg/L จากตารางแนะนำให้เจือจางตัวอย่าง 1% สำหรับBODที่มีค่าอยู่ระหว่าง 200 ถึง 700 mg/L จากนั้นให้เลือกเจือจางตัวอย่างอีก 2 ช่วง ที่มากกว่าและน้อยกว่า 1% อยู่ 1 ขั้น คือ 0.5% และ 2.0% ช่วงของBODที่ทำการเจือจางจะเป็น 100 ถึง 1400 mg/L ซึ่งน่าจะครอบคลุมค่าBODของตัวอย่างและสามารถป้องกันการผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการประมาณขั้นต้น

ค. เทตัวอย่างในปริมาณที่ต้องการลงในกระบอกตวง 1 ลิตร

ง. เติมน้ำเจือจางลงไปจนปริมาตรได้ 700 มิลลิลิตร

จ. กวนตัวอย่างให้เข้ากันดีด้วยแท่งกวน

ฉ. ค่อยๆ เทตัวอย่างลงในขวด BOD จำนวน 2 ขวด พยายามอย่างให้เกิดฟองอากาศ เพราะจะถือว่า DO ของตัวอย่างทั้ง 2 ขวด มีค่าเท่ากัน ปิดจุกหล่อน้ำ ใส่ฝาครอบ

ช. นำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 $^{\circ}$C 1 ขวด ขวดที่เหลือนำไปวิเคราะห์หาค่า DO ทันที ด้วยวิธี Azide Modificationในกรณีที่หาค่า DO โดยใช้วิธี membrane electrode ให้เตรียมตัวอย่างขวดเดียว และหาค่า DO เริ่มต้นก่อน แล้วจึงปิดฝาอย่าให้มีฟองอากาศในขวดหล่อน้ำ แล้วนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

8. การหาค่า DO เริ่มต้นและสุดท้าย

การหาค่า DO สามารถทำได้ 2 วิธี คือวิธี Winkler (Azide Modification) และ วิธี Membrane electrode

การหา DO โดยวิธี Winkler (Azide Modification)

ก. เทน้ำที่หล่อจุกขวดตัวอย่างออก

ข. เปิดจุก เติมสารละลาย Manganese sulfate 1 มิลลิลิตร โดยขณะเติมให้ปลาย pipet อยู่ใต้ผิวน้ำ

ค. เติมสารละลาย Alkali-iodide-azide 1 มิลลิลิตร โดยให้ปลาย pipet อยู่ใต้ผิวน้ำขณะเติม

ง. ปิดจุกโดยอย่าให้มีฟองอากาศภายในขวด คว่ำขวดไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้สารผสมกัน

จ. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส เกินครึ่งหนึ่งของขวด

ฉ. เติมกรด H2SO4 เข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้าง ๆ คอขวด ปิดจุกคว่ำขวดขึ้นลงหลายครั้งจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

ช. ตวงปริมาตร 201 มิลลิลิตร นำไป titrate กับสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate (0.025 N) จนได้สีเหลืองอ่อน

ซ. เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม titrate ต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานsodium thiosulfate ที่ใช้ จะเทียบเท่ากับปริมาณ DO ของน้ำตัวอย่างโดยมีหน่วยเป็น mg/L

9.2 ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการคำนวณ

1. กรณีไม่มีการเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจาง

$$BOD_5 = \frac{DO_0 - DO_5}{P}$$

โดย BOD_5 = ค่า BOD ที่ระยะเวลากักเก็บตัวอย่าง 5 วัน, mg/L

DO_0 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างที่หาได้ทันที, mg/L

DO_5 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 วัน, mg/L

P = สัดส่วนปริมาณของตัวอย่างที่ใช้เจือจาง โดยคิดปริมาณทั้งหมดเป็น 1 ส่วน

2. กรณีเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจาง

$$BOD_5 = \frac{(DO_0 - DO_5) - (B_1 - B_2)f}{P}$$

โดย BOD_5 = ค่า BOD ที่ระยะเวลากักเก็บตัวอย่าง 5 วัน, mg/L

DO_0 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างที่หาได้ทันที, mg/L

DO_5 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 วัน, mg/L

P = สัดส่วนปริมาณของตัวอย่างที่ใช้เจือจาง โดยคิดปริมาณทั้งหมดเป็น 1 ส่วน

B_1 = DO ของ seed control ก่อนนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ, mg/L

B_2 = DO ของ seed control หลังจากเก็บไว้ 5 วัน

f = อัตราส่วนน้ำเชื้อในตัวอย่างที่เจือจางกับใน seed control

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างที่ 1 กรณีไม่มีการเติมเชื้อ (seed) ในน้ำเจือจาง

น้ำตัวอย่างชนิดหนึ่งเจือจางตัวอย่าง 5% (คิดเป็น 0.05 ส่วนใน 1 ส่วน) หาค่า DO_0= 8.5, DO_5= 4.3

การคำนวณ

$$BOD_5 = \frac{DO_0 - DO_5}{P}$$

$$= \frac{8.5 - 4.3}{0.05} = 84 \text{ mg/L}$$

ตัวอย่างที่ 2 กรณีเติมเชื้อ (seed) ในน้ำเจือจาง

น้ำตัวอย่างชนิดหนึ่งเจือจาง 5% (คิดเป็น 0.05 ส่วนใน 1 ส่วน) เติมเชื้อ 2 มิลลิลิตร ต่อ น้ำเจือจาง 1000 มิลลิลิตร หาค่า DO_0= 8.5, DO_5= 4.3, DO_0 ของ seed control ที่ 2% = 8.4, DO_5 ของ seed control ที่ 2% = 5.2

การคำนวณ

หาปริมาณ seed ในน้ำตัวอย่าง เนื่องจากเจือจางตัวอย่าง 5% ดังนั้นในตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 มิลลิลิตร มีน้ำเจือจางอยู่ 95 มิลลิลิตร และในน้ำเจือจาง 95 มิลลิลิตร มีเชื้อ อยู่ $95 \times \frac{2}{1000} =$ 0.19 มิลลิลิตร

∴ ปริมาณเชื้อ ในตัวอย่างที่เจือจาง = 0.19 %, ปริมาณเชื้อ ใน seed control = 2%

$$BOD_5 = \frac{(DO_0 - DO_5) - (B_1 - B_2)f}{P}$$

$$= \frac{(8.5 - 4.3) - (8.4 - 5.2) \times \frac{0.19}{2}}{0.05}$$

$$= 78 \text{ mg/L}$$

10. การรายงานผล

รายงานผลค่า BOD เป็นเลขจำนวนเต็มมีหน่วยเป็น mg/l

11. เอกสารอ้างอิง

วิธีการทดสอบนี้ยึดหลัก (followed) วิธีที่ 5210 B ของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition, 1992. APHA, AWWA, WEF.

12. แบบฟอร์มที่ใช้

-

13. ประโยชน์ของการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงาน

ในการทำงานจะได้ทำตามขั้นตอนการทำงานตามที่คู่มือกำหนดไว้ ทำให้สามารถควบคุม ข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น หรือกรณี ที่ผลการทดสอบไม่เป็นไปต ามการควบคุมคุณภาพ ผู้วิเคราะห์สามารถทบทวนได้ว่าเกิดผิดพลาดในขั้นตอนไหนและควรแก้ไขอย่างไร ทำให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องเที่ยงตรงตามเกณฑ์ที่ระบุไว้

ลำดับที่	ขั้นตอน/ผังการปฏิบัติงาน	รายละเอียดงาน	ผู้รับผิดชอบ	เอกสารอ้างอิง	หมายเหตุ
1	ปรับอุณหภูมิตัวอย่าง ให้ได้ประมาณ 20°C	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	
2	เติมอากาศให้ตัวอย่างมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำใกล้จุดอิ่มตัว	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	
3	เติมตัวอย่างในขวดบีโอดี จำนวน 2 ขวด	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	

4	วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในขวดที่ 1 ทันที	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	
5	นำขวดที่ 2 เข้าเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20°C เป็นเวลา 5 วัน	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	
6	หลังจาก 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ เหลืออยู่ในขวดที่ 2	ตามคู่มือข้อ 9.1	บุคลากรที่ทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้านเคมี กลุ่มน้ำและขยะ	ตามคู่มือข้อ 11	

หมายเหตุ: 1. สัญลักษณ์ที่ใช้

แสดงถึงจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของขั้นตอน	แสดงถึงกิจกรรมและการปฏิบัติงาน	แสดงถึงการตัดสินใจ เช่น พิจารณาเห็นชอบ/ยืนยัน	แสดงถึงทิศทางหรือการเคลื่อนไหวของงาน	แสดงถึงจุดเชื่อมต่อระหว่างขั้นตอน