หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เรือหางยาว

กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำของ Hydrobios

แผ่นวัดความโปร่งแสง (Secchi disc)

ลูกดิ่งสำหรับวัดความลึก

pH Meter ของ TOA HM-IF และของ Radiometer

SCT Meter ของ YSI

ท่อเหล็กสำหรับตักดิน

ถังเก็บความเย็น ทำด้วยสเตนเลสสตีล ขนาดกว้าง 16 นิ้ว ยาว 24 นิ้ว และสูง 16 นิ้ว สำหรับแช่ตัวอย่าง

ตู้เย็น 4°ซ สำหรับแช่ตัวอย่าง

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

ตู้ความร้อนฆ่าเชื้อ และอบแห้ง (Hot air oven) ของ Memmert

ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) 37°ซ ของ Memmert

ตู้เพาะเชื้อ 25°ซ ของ Termarks

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Memmert

เครื่องปั่น (Homogenizer) ของ MSE

BOD Incubator 20°ซ ของ Hot Pack

Millipore Apparatus พร้อม Suction pump ของ Little Giant

Spectrophotometer ของ Hitachi

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งของ Mettler

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Sartorius

กระดาษกรอง GF/C ของ Whatman

0.45 μ Membrane filter ของ Whatman

Reduction Column

เครื่องแก้วและวัสดุต่าง ๆ สำหรับใช้งานทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

2. อาหารและสารละลายเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ดิน และหอยทางแบคทีเรีย วิธีการเตรียมได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

2.1 อาหารเพาะแยกเชื้อ มีดังต่อไปนี้

Lactose Broth (LB)

Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGB)

EC Medium (EC)

Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar with 3% NaCl (3% NA)

Glucose Azide Broth (GAB)

Maltose Azide Broth (MAB)

Differential Reinforced Clostridium Medium (DRCM)

Litmus Milk (LM)

Plate Count Agar (PCA)

Marine Agar (MA)

Blood Agar (BA)

Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS Agar)

Alkaline Peptone Water (APW)

Tetrathionate Brilliant Green Broth (TB)

Brilliant Green Agar (BGA)

Peptone Salt Dilution Fluid (PSD)

Reinforced Clostridium Medium (RCM)

2.2 อาหารทดสอบเชื้อ สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio anguillarum* จะต้องเติม sodium chloride ให้เป็น

3 เปอร์เซ็นต์

อาหารทดล่อบเชื้อมีดังต่อไปนี้

Indole Broth (Peptone Water)

Tryptone Broth, 3% sodium chloride

Methyl Red-Voges-Proskauer Medium (MR-VP Medium)

Simmons' Citrate Agar

Nutrient Broth with 0, 3, 8, 10% NaCl

Hugh-Leifson Medium (O-F Medium)

Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Carbohydrate Fermentation Test Medium โดยใช้คาร์โบไฮเดรท 9 ชนิด คือ Arabinose, Lactose, Maltose, Mannitol, Starch, Sucrose, Glucose, Galactose และ Sorbitol

Decarboxylase Test Medium โดยใช้กรดอะมิโน 3 ชนิด คือ Arginine, Lysine และ Ornithine

Gelatin Agar

Gluconate Broth

Christensen's Urea Medium

Polyvalent Salmonella antiserum

Vibrio cholerae antiserum

2.3 สารละลายเคมีที่ใช้ในการทดล่อบและย้อมเชื้อ มีดังต่อไปนี้

Indole Reagent (Kovac's Reagent)

Methyl Red Solution

Voges-Proskauer Reagent

3% Hydrogen peroxide Solution

Cytochrome Oxidase Reagent

Nitrate Reduction Test Reagents

Zinc Dust

Acid Mercuric Chloride Solution

Benedict's solution

Gram Stain Reagents

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางฟิสิกส์และเคมี วิธีการเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก ข

Buffer solution pH 7 และ pH 9

Manganese sulfate solution

Alkali-iodide azide reagent

Sulfuric acid, conc.

Starch solution

Standard sodium thiosulfate solution, 0.025 N

Standard potassium dichromate solution, 0.025 N

Potassium iodide

Pure cadmium metal

Ammonium chloride-EDTA solution

Dilute ammonium chloride-EDTA solution

Complexing reagent (Color reagent)

Ammonium hydroxide, conc.

Hydrochloric acid, 6 N

Copper sulfate solution, 2%

Standard nitrate solution

Standard nitrite solution

Phosphoric acid

Zinc acetate solution, 2 N

Standard iodine solution, 0.0250 N

<u>วิธีการ</u>

1. ตัวอย่างที่ศึกษา ตัวอย่างที่ศึกษา ประกอบด้วย น้ำ ดิน และหอยแมลงภู่

2. สถานที่เก็บตัวอย่าง กำหนดสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่บริเวณ

ปากแม่น้ำบางปะกง โดยเริ่มตั้งแต่ใต้สะพานเทพหัสดินทร์ อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ออกไปจนถึงบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี รวมทั้งสิ้น 6 สถานี (รูปที่ 1) โดยมีจุดสังเกตดังต่อไปนี้

หมายเลขสถานี	บริเวณที่ตั้ง
1	ใต้สะพานเทพหัสดินทร์
2	ตรงกับปากคลองเขต
3	ทุ่นหมายเลข 5 ของกรมอุทกศาสตร์
4	โป๊ะเลี้ยงหอยแมลงภู่ แลตติจูด 13^{o} $27'$ $00''$ เหนือ ลองติจูด 100^{o} $52'$ $10''$ ตะวันออก
5	โป๊ะเลี้ยงหอยแมลงภู่ แลตติจูด 13^{o} $23'$ $35''$ เหนือ ลองติจูด 100^{o} $54'$ $50''$ ตะวันออก
6	โป๊ะเลี้ยงหอยแมลงภู่ แลตติจูด 13^{o} $24'$ $50''$ เหนือ ลองติจูด 100^{o} $54'$ $20''$ ตะวันออก

สถานี 1, 2 และ 3 เก็บตัวอย่างน้ำและดิน สถานี 4 และ 5 เก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่

3. ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม 2525 เดือนละครั้ง รวมทั้งสิ้น 6 ครั้ง ดังต่อไปนี้คือ

ครั้งที่ 1 วันที่ 27 มีนาคม 2525

ครั้งที่ 2 วันที่ 28 เมษายน 2525

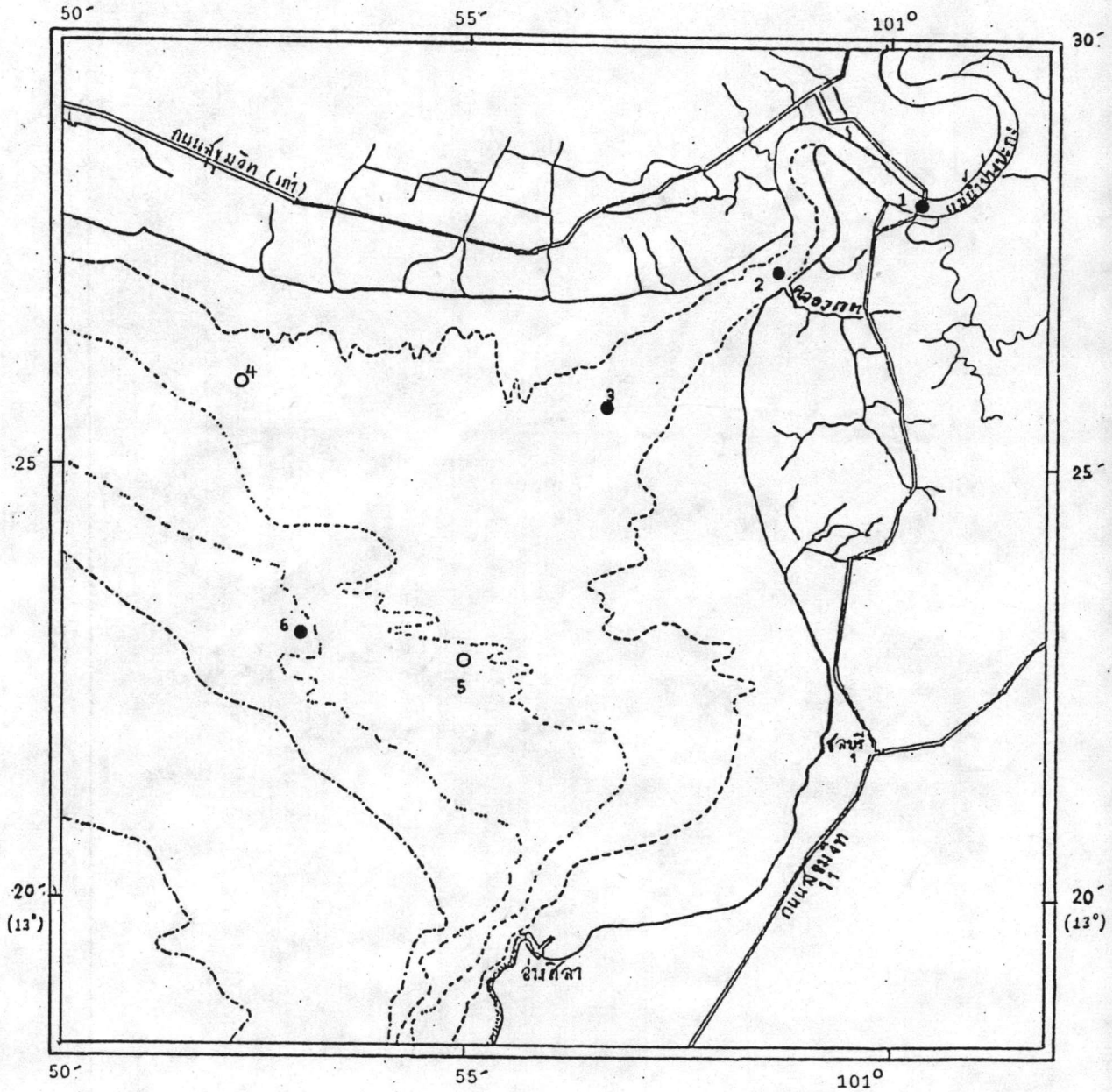
ครั้งที่ 3 วันที่ 30 พฤษภาคม 2525

ครั้งที่ 4 วันที่ 27 มิถุนายน 2525

ครั้งที่ 5 วันที่ 25 กรกฎาคม 2525

ครั้งที่ 6 วันที่ 22 สิงหาคม 2525

4. การเก็บตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่าง ตำแหน่ง ชนิดของภาชนะที่ใช้บรรจุตัวอย่าง ตลอดจนถึงการเก็บรักษา (preservation) จะแตกต่างกันตามชนิดของตัวอย่าง และพารามิเตอร์ที่จะทำการวิเคราะห์ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่ บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง

● สถานีเก็บตัวอย่างน้ำและดิน (สถานี 1, 2 และ 3)

o สถานีเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่ (สถานี 4 และ 5)

ตารางที่ 1 สรุปการเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ ดิน และหอย

ตัวอย่าง	พารามิเตอร์	อุปกรณ์และวิธีการเก็บตัวอย่าง	การวิเคราะห์ตัวอย่าง ณ สถานีเก็บตัวอย่าง หรือการเก็บรักษา (Preservation)
น้ำ	ความเป็นกรดด่าง	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	วิเคราะห์ทันทีโดยใช้ pH Meter
	ความเค็ม	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	วิเคราะห์ทันทีโดยใช้ SCT Meter
	อุณหภูมิ	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	วิเคราะห์ทันทีโดยใช้ SCT Meter
	ความโปร่งแสง	-	วิเคราะห์ทันทีโดยใช้ Secchi disc
	ออกซิเจนละลาย	ใช้กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำของ Hydrobios เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ ค่อย ๆ ถ่ายลงขวดบีโอดี (300 มล) จนล้น แล้วปิดจุกอย่าให้เกิดฟองอากาศ	เก็บรักษาโดยการเติม $MnSO_4$ solution 2 มล., Alkaline iodide azide reagent 2 มล. เขย่าขวดอย่างแรงประมาณ 25 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.
	ซัลไฟด์	เหมือนกับออกซิเจนละลาย แต่เก็บที่พื้นท้องน้ำ	เก็บรักษาโดยการเติม Zinc acetate solution 2 N 0.6 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.
	บีโอดี	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.
	ไนเตรท-ไนโตรเจน	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.
	ไนไตรท์-ไนโตรเจน	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.
	ตะกอนแขวนลอย	ใช้ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 7 วัน
	แบคทีเรีย	ใช้ขวดแก้วขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำ	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 48 ชม.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	พารามิเตอร์	อุปกรณ์และวิธีการเก็บตัวอย่าง	การวิเคราะห์ตัวอย่าง ณ สถานีเก็บตัวอย่าง หรือการเก็บรักษา (Preservation)
ดิน	แบคทีเรีย	ใช้ท่อเหล็กตักดินที่ผิวดิน ใส่ขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 48 ชม.
หอย	แบคทีเรีย	เก็บตัวอย่างหอยจากหลักไม้ใส่ถุงพลาสติก	แช่น้ำแข็งในถังเก็บความเย็น ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชม.

หมายเหตุ ผิวน้ำ = ที่ความลึกประมาณ 50 ซม. จากผิวน้ำ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 ตัวอย่างน้ำ

4.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย ใช้ขวดแก้วปากแคบจุกเกลียวขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 50 ซม. จากผิวน้ำ นำขวดนี้เก็บในถังเก็บความเย็นซึ่งมีน้ำแข็งบรรจุอยู่

4.1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีและฟิสิกส์ ใช้ขวดพลาสติกปากแคบจุกเกลียวขนาด 1 ลิตร 2 ขวด เก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 50 ซม. จากผิวน้ำ เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเป็นกรด ด่าง ความเค็ม อุณหภูมิ บีโอดี ไนเตรท-ไนโตรเจน ไนไตรท์-ไนโตรเจน และตะกอนแขวนลอย โดยทำการวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง ความเค็ม และอุณหภูมิทันที ณ สถานีเก็บตัวอย่าง นำน้ำตัวอย่างทั้งสองขวดเก็บในถังเก็บความเย็นซึ่งมีน้ำแข็งบรรจุอยู่ สำหรับตัวอย่างน้ำที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย เก็บตัวอย่างโดยใช้กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำของ Hydrobios แล้วค่อย ๆ ถ่ายลงขวดบีโอดีขนาด 300 มล. จนล้น ปิดจุกอย่าให้มีฟองอากาศค้างอยู่ในขวด ทำการเก็บรักษาตัวอย่างโดยการเติม Manganese sulfate solution 2 มล. ตามด้วย Alkaline iodide azide reagent 2 มล. เขย่าขวดกลับไปมาอย่างแรงประมาณ 25 ครั้ง ส่วนตัวอย่างน้ำที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย แต่เก็บตัวอย่างที่พื้นท้องน้ำ แล้วเก็บรักษาตัวอย่างโดยเติมสารละลาย Zinc acetate 2 N 0.6 มล. เขย่าให้เข้ากัน

4.2 ตัวอย่างดิน เก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์คุณภาพดินทางแบคทีเรียเท่านั้น โดยใช้ท่อเหล็กสำหรับตักดิน ซึ่งประกอบด้วยท่อหลาย ๆ ท่อต่อกัน จนได้ความยาวตามต้องการ แต่ละท่อมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 นิ้ว ยาว 1 เมตร ปลายทั้งสองด้านเป็นเกลียวซึ่งสามารถนำมาต่อกันได้ ที่ปลายสุดด้านหนึ่งจะเป็นกระบอกยาวประมาณ 3 นิ้ว วางตั้งฉากกับตัวท่อ ซึ่งใช้ส่วนนี้สำหรับตักดิน ตัวอย่างดินเก็บใส่ขวดแก้วปากกว้างขนาด 1 ลิตร ซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในถังเก็บความเย็นซึ่งมีน้ำแข็งบรรจุอยู่

4.3 ตัวอย่างหอยแมลงภู่ เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่เพื่อวิเคราะห์คุณภาพเนื้อหอยแมลงภู่ทางแบคทีเรีย โดยเก็บหอยแมลงภู่จากหลักไม้ที่หอยเกาะ เก็บตัวอย่างประมาณ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ในถังเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.1 การวิเคราะห์ทางแบคทีเรีย

วิเคราะห์คุณภาพน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่ทางแบคทีเรีย ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและหอยแมลงภู่ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างน้ำ ทำการวิเคราะห์ภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่าง โดยทำการศึกษาแบคทีเรียดังต่อไปนี้คือ Coliforms, *Escherichia coli*, Fecal Streptococci, *Clostridium perfringen*, Total Plate Count, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum* และ *Salmonella spp.*

ก. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

1) Coliforms ตรวจหาตามวิธีของ American Public Health Association, 1970

(ก) ตัวอย่างน้ำ เตรียมตัวอย่างน้ำโดยการเจือจางตัวอย่างน้ำด้วย PSD ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1 มล. ใส่ลงใน PSD 9 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-1} มล. ต่อ มล. (มีปริมาณตัวอย่าง 10^{-1} มล. ต่อตัวอย่างน้ำเจือจาง 1 มล.) ปิเปตตัวอย่างน้ำเจือจางนี้ 1 มล. ลงใน PSD 9 มล. ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-2} มล. ต่อ มล. ทำเช่นนี้ต่อไปตามลำดับ จนได้ตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-4} มล. ต่อ มล.

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test) ปิเปตตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 3 มล. ลงไปใน LB ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า (Single Strength) จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. ปิเปตตัวอย่างน้ำ 3 มล. ลงไปใน LB ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำลงไปใน LB ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (Double Strength) จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 10 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48±3 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่เกิดแก๊สใน durham fermentation tube

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (Confirmed Test) ใช้ห่วงลวดถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกลงสู่ BGB นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48±3 ชั่วโมง

บันทึกผลเช่นเดียวกับปฏิบัติการยั้นต้น นำไปหาปริมาณ Coliforms ในหน่วย MPN/100 ml. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ข) ตัวอย่างดิน เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงใน PSD 90 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างดินที่มีความเจือจาง 10^{-1} กรัมต่อมล. ปิเปตสารละลายนี้ 1 มล. ลงใน PSD 9 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายตัวอย่างดินที่มีความเจือจาง 10^{-2} กรัมต่อมล. ทำเช่นนี้ต่อไปตามลำดับ จนได้สารละลายตัวอย่างดินที่มีความเจือจาง 10^{-5} กรัมต่อมล.

ปฏิบัติการยั้นต้น (Presumptive test) ปิเปตสารละลายตัวอย่างดินที่มีความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} กรัมต่อมล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 3 มล. ลงใน LB 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48±3 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่เกิดแก๊สใน durham fermentation tube

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ก) ทุกประการ นำผลบวกไปหาปริมาณ Coliforms ในหน่วย MPN/gm. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ เตรียมตัวอย่าง ทำความสะอาดเปลือกหอยโดยใช้มีดขูดเอาเพรียงออก แล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปากคีบ กรรไกร และมีดซึ่งลนไฟให้ปราศจากเชื้อ แกะเอาเนื้อหอยออกมาใส่ petridish ไว้ ชั่งเนื้อหอยแมลงภู่ 10 กรัม ใส่ลงใน Voltex flask เติม PSD ประมาณ 40 มล. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer) จากความเร็วต่ำค่อย ๆ เพิ่มความเร็วขึ้น จนได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกัน จึงเติม PSD ที่เหลืออีก 50 มล. ลงไป จะได้สารละลายตัวอย่างหอยที่มีความเจือจาง 10^{-1} กรัม ต่อมล. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างหอยเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างดิน

ปฏิบัติการยั้นต้นและยั้นยืนยัน เช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ (ข) ทุกประการ

2) *Escherichia coli* ตรวจหาตามวิธีของ American Public Health Association, 1970 และ Elliott et al., 1978

(ก) ตัวอย่างน้ำ ดำเนินการทดลองต่อจากปฏิบัติการขั้นต้นในหัวข้อ 1) (ก) ใช้ห่วงลวดถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกลงใน EC Medium นำไปเพาะเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 44.5±0.2°ซ นาน 24±2 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่เกิดแก๊สใน durham fermentation tube

ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวก เกลี่ยลงบน EMB เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *E. coli* คือโคโลนีสีม่วงปุ่น ๆ หรือโคโลนีสีม่วง ตรงกลางมีสีดำ ซึ่งอาจมีสีปีกแมลงทับ (metallic sheen) ปนอยู่ด้วย แล้วทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการเกลี่ยลงบน NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบเชื้อที่คาดว่าเป็น *E. coli* type I (Elliott et al., 1978, Lennette et al., 1974 และ Poonsuk, 1978)

(1) Indole test เขี่ยเชื้อลงใน Indole broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เติม Indole reagent ลงไป 2-3 หยด เชย่า *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สามารถผลิต Indole จาก Indole broth ได้ ทำให้เกิดสีแดงที่ผิวหน้าของอาหาร (ในชั้นที่เป็น alcohol)

(2) MR-VP test เขี่ยเชื้อลงใน MR-VP Medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง แล้วแบ่ง MR-VP Medium นี้เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งทดสอบ MR โดยการเติม Methyl Red Reagent ลงไป 2-3 หยด เชย่า *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สามารถใช้ glucose แล้วเกิดกรดขึ้น (pH ประมาณ 4.5) อาหารเป็นสีแดง อีกส่วนหนึ่งทดสอบ VP โดยการเติม Voges-Proskauer Reagent ลงไป แล้ววางหลอดให้เอียง (Slant position) นาน 30 นาที *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่สามารถผลิต acetoin หรือ acetylmethyl carbinol ได้ อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาล

(3) Citrate test เขี่ยเชื้อเกลี่ยลงบนผิวหน้าของ Simons' Citrate Agar Slant เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ คือ ไม่สามารถใช้ citrate ได้ ซึ่งอาหารยังคงเป็นสีเขียวเช่นเดิม

บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลการทดลองว่าเป็น *E. coli* แล้วนำไปหาค่า *E. coli* ในหน่วย MPN/100 ml. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ข) ตัวอย่างดิน ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 2) (ก) แล้วหาปริมาณ *E. coli* ในหน่วย MPN/gm. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ 2) (ข) ทุกประการ

3) Fecal Streptococci ตรวจหาตามวิธีของ Harrigan and Mc. Cance, 1976

(ก) ตัวอย่างน้ำ เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำ ในหัวข้อ 1) (ก)

ปฏิบัติการยั้นต้น (Presumptive test) ปิเปตตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-1} ตามลำดับ ความเจือจางละ 3 มล. ลงใน GAB ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. ปิเปตตัวอย่างน้ำ 3 มล. ลงไปใน GAB ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. และปิเปตตัวอย่างน้ำลงไปใน GAB ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 10 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 72 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่ GAB เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ใช้ห่วงลวดถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกลงสู่ GAB หลอดใหม่ (5 มล. ต่อหลอด) นำไปเพาะเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.5^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลบวกเช่นเดียวกับปฏิบัติการยั้นต้น นำไปหาปริมาณ Fecal Streptococci ในหน่วย MPN/100 ml. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ข) ตัวอย่างดิน เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข)

ปฏิบัติการยั้นต้น (Presumptive test) ปิเปตสารละลายดินที่มีความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} กรัม ต่อมล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 5 มล. ลงใน MAB 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. นำไปเพาะเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่เปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลือง

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 3) (ก) ทุกประการ นำผลบวกไปหาปริมาณ Fecal Streptococci ในหน่วย MPN/gm. จากตารางที่ 2 ในภาคผนวก ค

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค) ปฏิบัติการยั้นต้นและยั้นยืนยันเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ 3) (ข) ทุกประการ

4) <u>*Clostridium perfringens*</u> ตรวจหาตามวิธีของ Harrigan and Mc. Cance., 1976 และ Collin and Lyne, 1976)

(ก) <u>ตัวอย่างน้ำ</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1) (ก) แต่ใช้ RCM แทน PSD

ปฏิบัติการยั้นต้น (Presumptive test) ปิเปตตัวอย่างน้ำซึ่งเจือจางด้วย RCM จากที่มีความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 5 มล. ลงไปใน DRCM (ซึ่งได้อุ่นอีกครั้งหนึ่งเพื่อไล่อากาศออก) ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. ปิเปตตัวอย่างน้ำ 5 มล. ลงไปใน DRCM ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. ปิเปตตัวอย่างน้ำลงใน DRCM ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า 5 หลอด ๆ ละ 10 มล. และ 1 ขวด 50 มล. นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่ DRCM เปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ใช้ห่วงลวดถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกลงสู่ Litmus milk นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ Litmus milk เกิด Stromy fermentation นำไปหาปริมาณ *Clostridium perfringens* ในหน่วย MPN/100 ml. จากตารางที่ 2 หรือ 3 ในภาคผนวก ค

(ข) <u>ตัวอย่างดิน</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข) แต่ใช้ RCM แทน PSD

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Presumptive test) ปีเปตสารละลายดินที่เจือจางด้วย RCM จากที่มีความเจือจาง 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} ตามลำดับ ความเจือจางละ 3 มล. ลงใน DRCM 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือหลอดที่ DRCM เปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ

ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 4) (ก) ทุกประการ นำผลบวกไปหาปริมาณ *Clostridium perfringens* ในหน่วย MPN/gm. จากตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค) ปฏิบัติการยั้นต้นและยั้นยืนยันเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ 4) (ข) ทุกประการ

ข. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี Total Plate Count

1) การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนบน PCA โดยใช้ 2 วิธี คือ pour plate method และ spreading method (Elliott <u>et al</u>., 1978)

1.1 Pour plate method

(ก) <u>ตัวอย่างน้ำ</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1) (ก)

ปีเปตตัวอย่างน้ำจากที่มีความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อ (petridish) และปีเปตตัวอย่างน้ำ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้ออีกจานหนึ่ง เท PCA ที่มีอุณหภูมิ 45^{o}ซ ลงไปในจานเพาะเชื้อเหล่านี้ จานละประมาณ 15 มล. หมุนจานให้ตัวอย่างน้ำกระจายไปทั่วจานอย่างสม่ำเสมอ ปล่อยไว้จน PCA แข็ง คว่ำจาน นำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้ Colony counter แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/มล.

(ข) <u>ตัวอย่างดิน</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1.1 (ก) แต่ใช้สารละลายดินที่มีความเจือจาง 10^{-5} ถึง 10^{-1} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วยจำนวนโคโลนีต่อกรัม

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ 1.1 (ข) ทุกประการ

1.2 <u>Spreading method</u>

(ก) <u>ตัวอย่างน้ำ</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1) (ก)

ปิเปตตัวอย่างน้ำจากที่มีความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 0.1 มล. ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี PCA ซึ่งผิวหน้าแห้งแล้ว ใช้ pasteur pipette ลนไฟให้งอเป็นรูปสามเหลี่ยม เกลี่ยสารละลายตัวอย่างน้ำบนผิวหน้า PCA ให้ทั่ว จากจานเพาะเชื้อที่มีความเจือจางมากไปหาความเจือจางน้อย คว่ำจาน นำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้ Colony counter แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/มล.

(ข) <u>ตัวอย่างดิน</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1.2 (ก) แต่ใช้สารละลายดินซึ่งมีความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} กรัม ต่อมล. นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนีต่อกรัม

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ 1.2 (ข) ทุกประการ

2) การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนบน MA

2.1 Pour plate method

(ก) ตัวอย่างน้ำ เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1) (ก)

ปิเปตตัวอย่างน้ำจากที่มีความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อ (petridish) เท MA ที่มีอุณหภูมิ 45°ซ ลงในจานเพาะเชื้อเหล่านี้จานละประมาณ 15 มล. หมุนจานให้ตัวอย่างน้ำกระจายไปทั่วจานอย่างสม่ำเสมอ ปล่อยไว้จน MA แข็ง คว่ำจาน นำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้ colony counter แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/มล.

(ข) ตัวอย่างดิน เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 2.1 (ก) แต่ใช้สารละลายดินที่มีความเจือจาง 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, และ 10^{-2} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/ต่อกรัม

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 2.1(ก) แต่ใช้สารละลายหอยแมลงภู่ที่มีความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แลวคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนีต่อกรัม

2.2 Spreading Method

(ก) ตัวอย่างน้ำ เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 1) (ก)

ปิเปตตัวอย่างน้ำจากที่มีความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. ตามลำดับ ความเจือจางละ 0.1 มล. ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี MA ซึ่งผิวหน้าแห้งแล้ว ใช้ pasteur pipette ลนไฟให้งอ

เป็นรูปสามเหลี่ยม เกลี่ยสารละลายตัวอย่างน้ำบนผิวหน้า MA ให้ทั่ว จากจานเพาะเชื้อที่มีความเจือจางมากไปหาความเจือจางน้อย คว่ำจาน นำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้ colony counter แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/มล.

(ข) <u>ตัวอย่างดิน</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างดินในหัวข้อ 1) (ข)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 2.2 (ก) แต่ใช้สารละลายดินซึ่งมีความเจือจาง 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/กรัม

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการตรวจหา Coliforms ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ในหัวข้อ 1) (ค)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ 2.2 (ก) แต่ใช้สารละลายหอยแมลงภู่ซึ่งมีความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/กรัม

3) การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนบน BA โดยวิธี Spreading method

(ก) <u>ตัวอย่างน้ำ</u> ปฏิบัติการเช่นเดียวกับ spreading method บน MA ในหัวข้อ 2.2 (ก) แต่อาหารเพาะเชื้อเป็น BA ใช้ตัวอย่างน้ำซึ่งมีความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} และ 10^{-1} มล. ต่อ มล. และตัวอย่างน้ำเริ่มต้น (original sample) ด้วย เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้ (Haemolytic bacteria) ซึ่งลักษณะของ BA รอบโคโลนีจะใส และนับจำนวนโคโลนีที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดด้วย (Non-haemolytic bacteria) แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/มล.

(ข) <u>ตัวอย่างดิน</u> ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ก) แต่ใช้สารละลายดินที่มีความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/กรัม

(ค) <u>ตัวอย่างหอยแมลงภู่</u> ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ (ข)

I16827978

4) การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวน Vibrio บน TCBS (Elliott et al., 1978)

4.1) การตรวจนับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

(ก) ตัวอย่างน้ำ ปฏิบัติการเช่นเดียวกับ spreading method บน PCA ในหัวข้อ 1.2) (ก) แต่อาหารเพาะเชื้อเป็น TCBS ใช้ตัวอย่างน้ำซึ่งมีความเจือจาง 10^{-1} มล. ต่อ มล. และตัวอย่างน้ำเริ่มต้น (original sample) ด้วย เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* คือ colony สีเขียวน้ำเงินเข้ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. คำนวณในหน่วยจำนวนโคโลนีต่อมล. ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการเขี่ยเชื้อลักษณะดังกล่าว เกลี่ยลงบน NA 3% NaCl เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีเดี่ยว ๆ แยกออกมา นำไปทำการทดลอบเชื้อทางชีวเคมีต่อไป

การทดลอบเชื้อที่คาดว่าเป็น *Vibrio parahaemolyticus* ทางชีวเคมี (Colwell, 1970, Elliott et al., 1978 และ Poonsuk, 1978)

(1) การย้อมสีกรัม (Gram's stainning method)

ก. ป้ายเชื้อเล็กน้อยลงบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงไปเกลี่ยให้ทั่วสไลด์ ปล่อยให้แห้งแล้วลนไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดกับสไลด์

ข. หยด crystal violet ลงบนสไลด์ นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

ค. หยดสารละลายไอโอดีนลงไป ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

ง. หยดแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

จ. ย้อมด้วย Counterstain นาน 10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง

ฉ. ส่องด้วยกล้องจุลทัศน์ *Vibrio parahaemolyticus* จะให้ผลการทดสอบเป็นกรัมลบ คือติดสีแดง และมีรูปร่างเป็นแท่ง

(2) Catalase Test

เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ หยด 3% Hydrogen peroxide solution ลงไป 1-2 หยด *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สามารถผลิต catalase enzyme ซึ่งทำให้เกิดฟองอากาศ

(3) Oxidase Test

หยด 1-2 หยด Cytochrome oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง เขี่ยเชื้อป้ายลงบนกระดาษกรองนี้ *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สามารถผลิต oxidase enzyme ทำให้บริเวณที่ป้ายเชื้อเป็นสีม่วง

(4) Oxidation-Fermentation Test และทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงไปใน H & L Medium 3% NaCl 2 หลอดต่อ 1 เชื้อ โดยหลอดหนึ่งปิดด้วยพาราฟินเหลว อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องปิด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลการทดสอบเป็น fermentation คือ สามารถใช้คาร์โบไฮเดรทในสภาวะ anerobic ได้ ทำให้อาหารทั้งสองหลอดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ในลักษณะที่แผ่กระจายออกตามขวางจากรอยเข็มที่แทงไว้

(5) ทดสอบการเจริญเติบโตในสารละลายเกลือแกง

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Nutrient broth ซึ่งมี NaCl อยู่ 0%, 3%, 8% และ 10% เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มี NaCl 3%, 8% และ 10% ซึ่งสังเกตได้จากอาหารที่ขุ่น และไม่เจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี NaCl

(6) Indole Test

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Tryptone broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยเติม Indole Reagent ลงไป 1-2 หยด เชย่า *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลการทดลอบเป็นบวก คือ สามารถผลิต Indole จาก amino acid Tryptone ทำให้เกิดสีแดงที่ผิวหน้าของอาหาร (ในชั้นที่เป็น alcohol)

(7) Carbohydrate Fermentation Test

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Carbohydrate Fermentation Test Medium ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรทดังต่อไปนี้ คือ sucrose, arabinose, maltose, manitol, lactose และ starch เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* สามารถใช้ (ferment), maltose, manitol และ starch ไม่สามารถใช้ sucrose, lactose และ arabinose แต่บาง strain อาจใช้ arabinose ได้ ซึ่งพบน้อยมาก ผลจากการใช้คาร์โบไฮเดรทจะได้กรดและแก๊สซึ่งทำให้ sugar broth เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

(8) Decarboxylase Test

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Decarboxylase Test Medium 3% NaCl 4 หลอด หลอดหนึ่งเป็น control ซึ่งไม่มี amino acid ส่วนอีก 3 หลอด จะมี amino acid 3 ชนิด คือ lysine, arginine และ ornithine ปิดทุกหลอดด้วยพาราฟินเหลว เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 72 ชั่วโมง การอ่านผล หลอด control จะต้องเป็นสีเหลือง (เกิดกรด) *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลการทดลอบ arginine เป็นลบ lysine และ ornithine เป็นบวกคือ เชื้อนี้สามารถ decarboxylase lysine และ ornithine เป็น amine ซึ่งจะมีสภาพเป็นด่าง อาหารเป็นสีม่วงเหมือนเดิม แต่เชื้อนี้ไม่สามารถ decarboxylase arginine ได้ จึงเกิดกรดขึ้น และอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

(9) ทดสอบการใช้ TSI 3% NaCl และการเกิด H_2S

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงใน TSI 3% NaCl แล้วเกลี่ยลงบนผิวหน้า (slant) ด้วย เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio parahaemolyticus* สามารถใช้ glucose ได้ แต่ไม่ใช้ lactose และ sucrose ทำให้ผิวหน้าของ TSI เป็นสีแดง ส่วนเนื้อของ TSI เป็นสีเหลือง ไม่ผลิต H_2S ซึ่งจะไม่เห็นสีดำของ H_2S ใน TSI

(ข) ตัวอย่างดิน ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ก) ทุกประการ แต่ใช้สารละลายดินที่มีความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-1} กรัม ต่อ มล. นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/กรัม

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างดิน ในหัวข้อ (ข) ทุกประการ

4.2) การตรวจนับ Marine Vibrio อื่น ๆ

นับจำนวน Marine Vibrio อื่น ๆ จากจานเพาะเชื้อซึ่งตรวจนับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยนับจำนวนโคโลนีที่เป็นสีเหลืองทั้งหมด สำหรับตัวอย่างน้ำ คำนวณในหน่วยจำนวนโคโลนี/มล. ส่วนตัวอย่างดินและหอยแมลงภู่ คำนวณในหน่วย จำนวนโคโลนี/กรัม

ค. การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ

1) *Vibrio cholerae* ทำการเพาะเชื้อตามวิธีการของ Elliott et al., 1978

(ก) ตัวอย่างน้ำ ปิเปตตัวอย่างน้ำ 10 มล. ลงใน APW 90 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นานไม่เกิน 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงลวดถ่ายเชื้อจาก APW เกลี่ยลงบน TCBS agar ที่ผิวหน้าแห้งแล้ว นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ แยกออกมา โคโลนีที่คาดว่าเป็น *Vibrio cholerae* คือ โคโลนีสีเหลืองขุ่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มม. และค่อนข้างแบน เขี่ยโคโลนีเหล่านี้ลงใน TSI เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio cholerae* สามารถใช้ glucose และ sucrose ทำให้ TSI เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด เขี่ยเชื้อจาก TSI ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเกลี่ยลงบน

NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีเดี่ยว ๆ แยกออกมานำไปทำการทดลอบเชื้อทางชีวเคมีต่อไป

การทดลอบเชื้อที่คาดว่าเป็น *Vibrio cholerae* ทางชีวเคมี (Colwell, 1970, Elliott et al., 1978 และ Poonsuk, 1978)

(1) Indole Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (1) *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบเป็นบวก

(2) MR-VP Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (2) *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบ MR เป็นบวก ส่วนผลการทดลอบ VP อาจจะเป็นบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

(3) Citrate Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (3) *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบเป็นบวก

(4) Carbohydrate Fermentation Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (7) โดยใช้ Carbohydrate Fermentation Test Medium ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรท sucrose, lactose และ arobinose *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบคือ sucrose เป็นบวก lactose และ arabinose เป็นลบ

(5) Decarboxylase Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (8) โดยใช้ Decarboxylase Test Medium *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบ arginine เป็นลบ ส่วน Lysine และ ornithine เป็นบวก

(6) Gluconate Test

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Gluconate broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เติม benedict reagent ลงไป 2-3 หยด นำไปต้มใน water bath นาน 10 นาที *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดลอบเป็นบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง คือสามารถ reduce gluconate

ทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลหรือสีส้ม หรือไม่สามารถ reduce gluconate จึงคงเป็นสีเขียวหรือฟ้า และไม่เกิดตะกอน

(7) ทดสอบการใช้ TSI และการเกิด H_2S

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (9) *Vibrio cholerae* สามารถใช้ glucose และ sucrose ได้ ซึ่ง TSI จะเป็นสีเหลือง แต่ไม่ผลิต H_2S

(8) ทดสอบการจับตัวเป็นก้อน (Agglutination) กับ *Vibrio cholerae* antiserum

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อปริมาณน้อย ๆ ป้ายลงบนสไลด์หยด *Vibrio cholerae* antiserum ลงไปหนึ่งหยด ใช้ไม้จิ้มฟันคนให้เชื้อละลาย ทิ้งไว้ 1-2 นาที *Vibrio cholerae* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือมีการจับตัวเป็นก้อนเกิดขึ้น

(ข) ตัวอย่างดิน ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ลงใน APW 90 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วปฏิบัติการต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ก) ทุกประการ

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างดินในหัวข้อ (ข) ทุกประการ

2) *Vibrio anguillarum*

(ก) ตัวอย่างน้ำ จากเชื้อที่ขึ้นบน BA ในหัวข้อ ข. 3) (ก) เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Vibrio anguillarum* คือ โคโลนีที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้ และมีลักษณะกลมใสขนาดเล็ก โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มม. ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการเขี่ยเชื้อลักษณะดังกล่าวเกลี่ยลงบน BA ใหม่ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25^{o}ซ นาน 48 ชั่วโมง นำไปทำการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

การทดสอบเชื้อที่คาดว่าเป็น *Vibrio anguillarum* ทางชีวเคมี (Hendrie et al., 1971, Elliott et al., 1978 และ Poonsuk, 1978)

(1) การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ และ 37^{o}ซ

ใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลงใน Nutrient broth 3% NaCl 2 หลอด นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ และ 37^{o}ซ นาน 24 ชั่วโมง

Vibrio anguillarum สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ และ 37°ซ ซึ่งสังเกตได้จากอาหารที่ขุ่น แต่บาง strain ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37°ซ

(2) ทดสอบการเจริญเติบโตในสารละลายเกลือแกง

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (5) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio anguillarum* เจริญเติบโตได้ในอาหารที่มี NaCl 0% และ 3% แต่ไม่เจริญเติบโตในอาหารที่มี NaCl 8% และ 10%

(3) Oxidase Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (3) *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

(4) Indole Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (6) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

(5) MR-VP Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 2) (ก) (2) โดยใช้ MR-VP Medium 3% NaCl เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดสอบ MR เป็นลบ VP เป็นบวก

(6) Nitrate Reduction Test

เขี่ยเชื้อลงใน Nitrate broth 3% NaCl เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง เติม Nitrate Reduction Test Reagent ลงไป *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สามารถ reduce ไนเตรทเป็นไนไตรท์ หรือเป็นก๊าซไนโตรเจน ถ้าอาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูก reduce เป็นไนไตรท์ แต่ถ้าอาหารทดสอบใสเหมือนเดิม แสดงว่าไนเตรทไม่ถูก reduce หรือไนเตรทถูก reduce ไปเป็นก๊าซไนโตรเจน ต้องเติม Zinc dust ลงไป ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่าไนเตรทถูก reduce ไปเป็นก๊าซไนโตรเจนแล้ว

(7) Gelatin Hydrolysis Test

ป้ายเชื้อลงบน Gelatin agar 3% NaCl เป็นรูปกากะบาด (cross streaking) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง หยด Acid mercuric chloride solution ลงไปให้ท่วมเชื้อ *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดล่อบเป็นบวก คือมี gelatinase enzyme ย่อย gelatin ทำให้เห็นเป็นพื้นที่ใสรอบ ๆ โคโลนี

(8) Carbohydrate Fumentation Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (7) ใช้คาร์โบไฮเดรท 6 ชนิด คือ starch, manitol, glucose, sorbitol, galactose และ sucrose เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง ซึ่ง *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดล่อบเป็นบวกทั้งหมด

(9) Decarboxylase Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (8) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 72 ชั่วโมง *Vibrio anguillarum* ให้ผลการทดล่อบ arginine เป็นบวก ส่วน lysine และ ornithine เป็นลบ

(ข) ตัวอย่างดิน ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ก) ทุกประการ

(ค) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำในหัวข้อ (ข) ทุกประการ

3) *Salmonella spp.* ทำการเพาะแยกเชื้อตามวิธีของ Elliott et al., 1978

(ก) ตัวอย่างน้ำ ปิเปตตัวอย่างน้ำ 10 มล. ลงใน TB 90 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก TB เกลี่ยลงบน BGA เพาะเชื้อที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella spp.* คือ โคโลนีสีชมพูอ่อนใส หรือขุ่น และอาหารรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีชมพูหรือแดง เขี่ยโคโลนีเหล่านี้ลง TSI เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง *Salmonella spp.* จะทำให้ Slant ของ TSI เป็นสีแดง และส่วนก้น (butt.) เป็นสีเหลือง อาจเกิดสีดำของ H_2S ด้วย ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อเกลี่ยลงบน NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำไปทดล่อบทางชีวเคมีต่อไป

การทดสอบเชื้อที่คาดว่าเป็น *Salmonella spp.* ทางชีวเคมี (Lennette et al., 1974, Elliott et al., 1978 และ Poonsuk, 1978)

(1) Indole Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (1) *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

(2) MR-VP Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (2) *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบ MR เป็นบวก VP เป็นลบ

(3) Citrate Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ ก. 2) (ก) (3) *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบเป็นบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

(4) Carbohydrate Fermentation Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (7) โดยใช้ Carbohydrate Fermentation Test Medium ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรทดังต่อไปนี้ คือ sucrose, lactose และ manitol *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบ sucrose และ lactose เป็นลบ manitol เป็นบวก

(5) Decarboxylase Test

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (8) โดยใช้ Decarboxylase Test Medium *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบ lysine เป็นบวก arginine และ ornithine เป็นลบ

(6) Urease Test

เขี่ยเชื้อเกลี่ยลงบนผิวหน้าของ Christensen's urea medium slant เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ นาน 24 ชั่วโมง *Salmonella spp.* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

(7) ทดสอบการใช้ TSI และการเกิด H_2S

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) (ก) (9) *Salmonella spp.* สามารถใช้ glucose แต่ไม่ใช้ lactose และ sucrose ซึ่งทำให้ผิวหน้าของ TSI (slant) เป็นสีแดง ส่วนก้น (butt.) ของ TSI เป็น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นสีเหลือง อาจเกิดสีดำของ H_2S ด้วย

(8) <u>ทดลอบการจับตัวเป็นก้อน (Agglutination) กับ Polyvalent Salmonella antisera</u>

เขี่ยเชื้อปริมาณน้อย ๆ ป้ายลงบนสไลด์ หยด Polyvalent Salmonella antisera ลงไป 1 หยด ใช้ไม้จิ้มฟันคนให้เชื้อละลายทิ้งไว้ 1-2 นาที *Salmonella spp.* ให้ผลการทดลอบเป็นบวก คือ จะมีการจับตัวเป็นก้อนเกิดขึ้น

5.2 การวิเคราะห์ทางฟิสิกส์ และเคมี

วิเคราะห์คุณภาพน้ำทางฟิสิกส์และเคมี ณ ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ดังต่อไปนี้คือ ออกซิเจนละลาย บีโอดี ซัลไฟด์ ไนเตรท-ไนโตรเจน ไนไตรท์-ไนโตรเจนและ ตะกอนแขวนลอย

5.2.1 ออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen, DO) วิเคราะห์โดยวิธี Azide Modification of Iodometric Method (American Public Health Association, 1975)

จากตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บไว้ในขวดบีโอดี เติม Manganese sulfate solution และ Alkaline iodide azide reagent อย่างละ 2 มล. และเขย่าให้เข้ากันแล้วนั้น เมื่อกลับมาถึงห้องปฏิบัติการฯ นำมาเติมกรดซัลฟูริค 2 มล. ปิดจุกแล้วเขย่าจนตะกอนละลายหมด ตวงสารละลายนี้ 203 มล. ใส่ลงใน flask ขนาด 500 มล. (ปริมาตรจำนวนนี้จะแทนปริมาตรของตัวอย่างน้ำ 200 มล. เนื่องเนื่องจากปริมาตรตัวอย่างน้ำถูกแทนที่ด้วย Manganese sulfate solution และ Alkaline iodide azide reagent รวม 4 มล. ที่เติมลงไปในขวดขนาด 300 มล. ดังนั้น ปริมาตรที่จะนำมาเพื่อไตเตรตจึงควรเป็น $\frac{200 \times 300}{300-4} = 203$ มล.) นำไปไตเตรตด้วย Standard Sodium thiosulfate solution 0.025 N จนได้สีเหลืองอ่อน ๆ เติมน้ำแป้ง 1-2 มล. ไตเตรทต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลาย Standard sodium thiosulfate ที่ใช้ไปในหน่วย มล. ค่าที่ได้จะเท่ากับปริมาณออกซิเจนละลายในหน่วย มก./ลิตร

5.2.2 บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association, 1975

เป่าอากาศด้วยเครื่องเป่าอากาศลงไปในขวดน้ำตัวอย่างประมาณ 10 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายให้กับตัวอย่างให้มากที่สุด ค่อย ๆ รินตัวอย่างน้ำลงในขวดบีโอดี 2 ขวดให้เต็ม ปิดจุก นำขวดหนึ่งไปหาปริมาณออกซิเจนละลายทันที (DO_0) โดยปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.2.1 ส่วนอีกขวดหนึ่ง นำไปเก็บไว้ในตู้ 20°ซ นาน 5 วัน แล้วนำมาหาปริมาณออกซิเจนละลาย (DO_5) เช่นเดียวกัน คำนวณผลการวิเคราะห์ได้โดย BOD = DO_0-DO_5 หน่วยเป็น มก./ลิตร

5.2.3 ซัลไฟด์ (Sulfide) วิเคราะห์โดยวิธี Titrimetric, Iodine ตาม U.S. Environmental Protection Agency, 1979

กรองตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดี โดยใช้กระดาษกรอง GF/A นำกระดาษกรองนี้ใส่ลงไปในขวดเติม เติมน้ำกลั่น 200 มล. แล้วเติม Standard iodine solution 10 มล. (มากเกินพอ) เติมกรดไฮโดรคลอริค 6 N 2 มล. แล้วนำไปไตเตรทด้วย reducing solution คือ Standard sodium thiosulfate solution 0.025 N จนได้สีเหลืองอ่อน ๆ เติมน้ำแป้ง 1-2 มล. ไตเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป คำนวณปริมาณของซัลไฟด์ในหน่วย มก./ลิตร โดยใช้สูตร

$$\text{มก./ลิตร ซัลไฟด์} = \frac{400\ (A-B)}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$$

เมื่อ A = มล. ของ 0.025 N Standard iodine solution

B = มล. ของ 0.025 N Standard sodium thiosulfate solution

5.2.4 ไนไตรท์-ไนโตรเจน (NO_2-N) วิเคราะห์โดยวิธี Spectrophotometric (U.S. Environmental Protection Agency, 1979)

กรองตัวอย่างน้ำโดยใช้ 0.45 µ membrane filter ปิเปตตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 50.0 มล. ใส่ลงใน Erlenmeyer flask เติม complexing reagent 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง

นำไปวัดค่า absorbance โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm. และใช้เซลขนาด 1 ซม.

ขณะเดียวกัน เตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ ($NaNO_2$) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.010, 0.025, 0.050 และ 0.100 มก. ไนไตรท์-ไนโตรเจน/ลิตร ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ นำค่า absorbance ที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน (Standard curve) โดย plot graph ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนไตรท์

อ่านผลปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำในหน่วย มก. ไนไตรท์-ไนโตรเจน/ลิตร โดยนำค่า absorbance ของตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5.2.5 ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N) วิเคราะห์โดยวิธี Spectrophotometric, Cadmium Reduction (U.S. Environmental Protection Agency, 1979)

ปิเปตตัวอย่างน้ำที่กรองแล้วด้วย 0.45 μ membrane filter 25.0 มล. ลงใน Erlenmeyer flask เติม Ammonium Chloride-EDTA 75 มล. ลงไปเขย่าให้เข้ากัน เทสารละลายนี้ผ่าน Reduction Column (การเตรียมแล่ดงไว้ในภาคผนวก ข) ใช้ Erlenmeyer flask รองรับสารละลายที่ไหลผ่าน column ออกมา แต่ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมา 25 มล. แรกไป ปิเปตสารละลายที่รองรับ 50.0 มล. ลงใน Erlenmeyer flask ใหม่ แล้วเติม complexing reagent 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่า absorbance เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ไนไตรท์ในหัวข้อ 5.2.4

ขณะเดียวกับเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท (KNO_3) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 และ 1.00 มก. ไนเตรท-ไนโตรเจน/ลิตร ปฏิบัติการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ นำค่า absorbance ที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน (Standard curve) โดย plot graph ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนเตรท

อ่านผลปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำเช่นเดียวกับการอ่านผลไนไตรท์-ไนโตรเจนในหัวข้อ 5.2.4 แต่ค่าที่อ่านได้จะเป็นค่าไนเตรท-

ไนโตรเจนรวมกับไนไตรท์-ไนโตรเจน ที่มีอยู่เดิมในตัวอย่างน้ำนั้น จึงต้องนำค่าของไนไตรท์-ไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้มาลบออก จะได้เป็นปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำในหน่วย มก. ไนเตรท-ไนโตรเจน/ลิตร

5.2.6 ตะกอนแขวนลอย (Total Nonfiltrable Residue) วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association, 1975

อบกระดาษกรอง GF/C ซึ่งอยู่ในถ้วยอลูมิเนียมให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105°ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้องใน desiccator และนำไปชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง กรองตัวอย่างน้ำ 25.0 มล. ผ่านกระดาษกรองนี้ โดยใช้ Millipore apparatus และ suction pump ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างตัวอย่างน้ำที่ค้างอยู่ที่ปีเปต และที่ติดอยู่ข้างกรวยจนหมด ใช้ปากคีบคีบกระดาษใส่ถ้วยอลูมิเนียมนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105°ซ นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง

คำนวณปริมาณตะกอนแขวนลอยโดยใช้สูตร

$$\text{มก./ลิตร ตะกอนแขวนลอย} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{มล. ตัวอย่างที่ใช้}}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของกระดาษกรอง + ถ้วยอลูมิเนียม + ตะกอนแขวนลอย (มก.)

B = น้ำหนักของกระดาษกรอง + ถ้วยอลูมิเนียม (มก.)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลในครั้งนี้ ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของ ยูศรี (2523), Walker and Joseph (1965) และ Snedecor and Willaim (1967)

6.1 ตัวกลางเลขคณิต (Arithmatic mean, $\overline{X}$)

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \ldots X_n}{N}$$

$$= \frac{\Sigma X}{N}$$

ΣX = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

N = จำนวนข้อมูล

6.2 <u>ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน</u> (Standard deviation)

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{X})^2}{N-1}}$$

6.3 <u>การวิเคราะห์ความสัมพันธ์</u> (Spearman Rank Correlation, r_s) ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา

6.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในน้ำ ในเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม ที่สถานี 1 ถึง สถานี 6

6.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียต่าง ๆ ในดิน ในเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม ที่สถานี 1 ถึงสถานี 6

6.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียต่าง ๆ ในหอยแมลงภู่ ในเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม ที่สถานี 4 และ 5

$$r_s = 1 - \frac{6\Sigma d^2}{N(N^2-1)}$$

d = ผลต่างของ rank ระหว่างข้อมูล 2 ชุด

N = จำนวนข้อมูล

นำค่า r_s ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่า r_s จากตาราง ถ้าค่า r_s จากการคำนวณมีค่ามากกว่าค่า r_s จากตาราง แสดงว่าข้อมูล 2 ชุดนี้ มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญในระดับที่ตั้งไว้

6.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, F-Test) แบบมี 2 ตัวประกอบ (Two-way classification) ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา

6.4.1 ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียในน้ำ ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม และระหว่างสถานี 1 ถึง สถานี 6

6.4.2 ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียในดิน ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม และระหว่างสถานี 1 ถึงสถานี 6

6.4.3 ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียในหอยแมลงภู่ ระหว่างเดือน มีนาคม ถึงสิงหาคม และระหว่างสถานี 4 และสถานี 5

6.4.4 ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่ และระหว่างเดือนมีนาคม ถึง สิงหาคม ที่สถานี 4

6.4.5 ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างน้ำ ดิน และหอยแมลงภู่ และระหว่างเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม ที่สถานี 5

6.4.6 ความแตกต่างของปัจจัยสภาวะแวดล้อมในน้ำ ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงสิงหาคม และระหว่างสถานี 1 ถึง สถานี 6

6.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, F-Test) แบบมี 1 ตัวประกอบ (One-way classification) ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความแตกต่างของปัจจัยสภาวะแวดล้อมในน้ำ ระหว่างฤดูน้ำน้อย (มีนาคม-พฤษภาคม) และฤดูน้ำมาก (มิถุนายน-สิงหาคม)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 1 ตัวประกอบ สรุปได้ดังนี้

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square	F	$F_{Table\ at}$
Between classes	k-1	$SSB = \sum_{j=1}^{k} \frac{T_j^2}{n_j} - \frac{T^2}{N}$	$MSB = \frac{SSB}{k-1}$	$\frac{MSB}{MSW}$	$df_1 = k-1$ $df_2 = N-k$ $\alpha = 0.05$
Within classes	N-k	$SSW = SST - SSB$	$MSW = \frac{SSW}{N-k}$		
Total	N-1	$SST = \sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{nj} X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$			

เมื่อ T_j = ผลรวมของข้อมูล n ค่าในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

T = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

$\sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{nj} X_{ij}^2$ = ผลรวมของข้อมูลแต่ละตัวยกกำลังสองทุก ๆ ค่า ในทุกกลุ่มตัวอย่าง

nj = จำนวนข้อมูลในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

k = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 2 ตัวประกอบ สรุปได้ดังนี้

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square	F	$F_{Table\ at}$
Row	r-1	$SSR = \frac{\sum_{i=1}^{r} T_{i.}^2}{c} - \frac{T_{..}^2}{rc}$	$MSR = \frac{SSR}{r-1}$	$\frac{MSR}{MSE}$	$df_1 = r-1$ $df_2 = (r-1)(c-1)$ $\alpha = 0.05$
Column	c-1	$SSC = \sum_{i=1}^{c} T_{.j}^2 - \frac{T_{..}^2}{rc}$	$MSC = \frac{SSC}{c-1}$	$\frac{MSC}{MSE}$	$df_1 = c-1$ $df_2 = (r-1)(c-1)$ $\alpha = 0.05$
Error	(r-1)(c-1)	$SSE = SST - (SSR + SSC)$	$MSE = \frac{SSE}{(r-1)(c-1)}$		
Total	rc-1	$SST = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c} X_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{rc}$			

เมื่อ $\sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c} X_{ij}^2$ = ผลรวมของข้อมูลแต่ละตัวยกกำลังสอง ทุก ๆ ค่าในทุกกลุ่มตัวอย่าง

$T_{..}$ = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

$T_{i.}$ = ผลรวมของข้อมูลในแถวนั้น ๆ

$T_{.j}$ = ผลรวมของข้อมูลในคอลัมน์นั้น ๆ

r = จำนวนแถว

c = จำนวนคอลัมน์

6.6 การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทีละคู่ หลังจากการวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ Least Significant Difference (LSD)

การทดสอบมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ก. เรียงลำดับค่าเฉลี่ยของทุกกลุ่มจากค่าน้อยไปหาค่ามาก

ข. หาผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ จนครบหมดทุกคู่

ค. คำนวณค่า LSD แล้วนำไปเปรียบเทียบกับผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ที่ทดสอบ ถ้าผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละคู่มีมากกว่า LSD แสดงว่าค่าเฉลี่ยคู่นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ระดับที่ตั้งไว้

$$LSD = t_{\alpha/2}\sqrt{\frac{2S^2}{f}}$$

เมื่อ $t_{\alpha/2}$ = ค่าจากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$)

f = จำนวนกลุ่มของค่าเฉลี่ย

S^2 = ความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง (= MSE)