หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองด้านแบคทีเรีย เป็นเครื่องมือจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองด้านเคมีและฟิสิกส์ เป็นเครื่องมือจากห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อาหารที่ใช้ในการทดลอบแบคทีเรีย (วิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ก)

2.1 อาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ และตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย

Alkaline Peptone Water (APW)

Blood Agar (BA)

Brilliant Green Agar (BGA)

Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% (BGLB)

EC Medium (EC)

Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

Glucose Azide Broth (GZ)

Lactose Broth (LB)

Maltose Azide Broth (MZ)

Marine Agar (MA)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar 3% NaCl (3% NA)

Peptone Salt Dilution Fluid (PSD)

Plate Count Agar (PGA)

Tetrathionate Brilliant Green Broth (TTBB)

Tetrathionate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

2.2 อาหารที่ใช้ในการทดลอบคุณสมบัติของเชื้อ สำหรับ V. parahaemolyticus และ V. anguillarum ให้เติม NaCl ในอาหารให้เป็น 3% ของ NaCl อาหารทดลอบคุณสมบัติของเชื้อมีดังนี้คือ

Broth Sugar (BS) ทดสอบโดยการใช้คาร์โบไฮเดรท 9 ชนิด คือ arabinose, manital, maltose, lactose, starch, sucrose, sorbital, glucose, galactose

Decarboxylase test ทดสอบโดยการใช้กรดอมิโน 3 ชนิด คือ arginine, lysine, ornithine

Gelatin Agar

Hugh-Leifson Medium (H-L Medium)

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

Nitrate Broth

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

Simmon Citrate Agar

Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Tryptone Broth 3% NaCl

Indole Test Medium

Urea Medium

3. สารและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ มีดังต่อไปนี้

Cytochrome Oxidase Reagent

Hydrogen Peroxide Solution 3%

Indole Reagent (Kovac's Reagent)

Methyl Red Solution

Nitrate Reduction Test Reagent

Oxidase Reagent

Potassium Hydroxide

Voges-Proskauer Test Reagent

Zinc Dust

011934

4. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม (Gram's Staining) มีดังต่อไปนี้

Crystal Violet Solution

Lugol's Iodine Solution

Safranin O Solution

Alcohol 95%

5. สารและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทางด้านเคมี มีดังต่อไปนี้

Cadmium-copper filings

Dilute ammonium chloride solution

Sulphanilamide solution

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride

Stock nitrate solution

Standard nitrate solution

Stock nitrite solution

Standard nitrite solution

Combined reagent

Stock phosphorus solution

Standard phosphorus solution

วิธีการ

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่างมี 7 สถานี ในบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งจังหวัดสมุทรปราการ เป็นคลองที่เชื่อมระหว่างแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำท่าจีน ดังรูปที่ 2 โดยเก็บในคลอง 2 สถานี ในนากุ้ง 4 สถานี และในชายฝั่งทะเล 1 สถานี

สถานีที่ 1 เป็นสถานีที่อยู่ชายฝั่งทะเล ตรงข้ามสถานีที่ 2 และห่างจากชายฝั่งประมาณ 1 กิโลเมตร

สถานีที่ 2 เป็นนากุ้งที่อยู่ในคลองขุนราชพินิตใจ ซึ่งเป็นคลองย่อยเชื่อมระหว่างคลองสรรพสามิตและชายฝั่งทะเล

สถานีที่ 3 เป็นนากุ้งที่อยู่ในคลองขุนราชพินิตใจ ซึ่งเชื่อมระหว่างทะเลและคลองสรรพสามิต

สถานีที่ 4 เป็นสถานีที่อยู่ในคลองขุนราชพินิจใจ ติดกับสถานีที่ 3

สถานีที่ 5 เป็นนากุ้งที่อยู่ในคลองกระออม เป็นคลองย่อยเชื่อมกับคลองสรรพสามิต อยู่ห่างจากคลองสรรพสามิตประมาณ 500 เมตร

สถานีที่ 6 เป็นนากุ้งที่อยู่ริมคลองสรรพสามิต ห่างจากสถานีที่ 5 ประมาณ 3 กิโลเมตร

สถานีที่ 7 เป็นสถานีที่อยู่ในคลองสรรพสามิต ด้านหน้าสถานีที่ 6

2. ชนิดของตัวอย่างที่เก็บ

2.1 ตัวอย่างกุ้ง เก็บเพื่อมาทำการวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรียในสถานีที่ 3, 5 และ 6

2.2 ตัวอย่างดิน เก็บเพื่อมาทำการวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรียในทุกสถานี

2.3 ตัวอย่างน้ำ เก็บเพื่อมาทำการวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรีย และเคมีในทุกสถานี

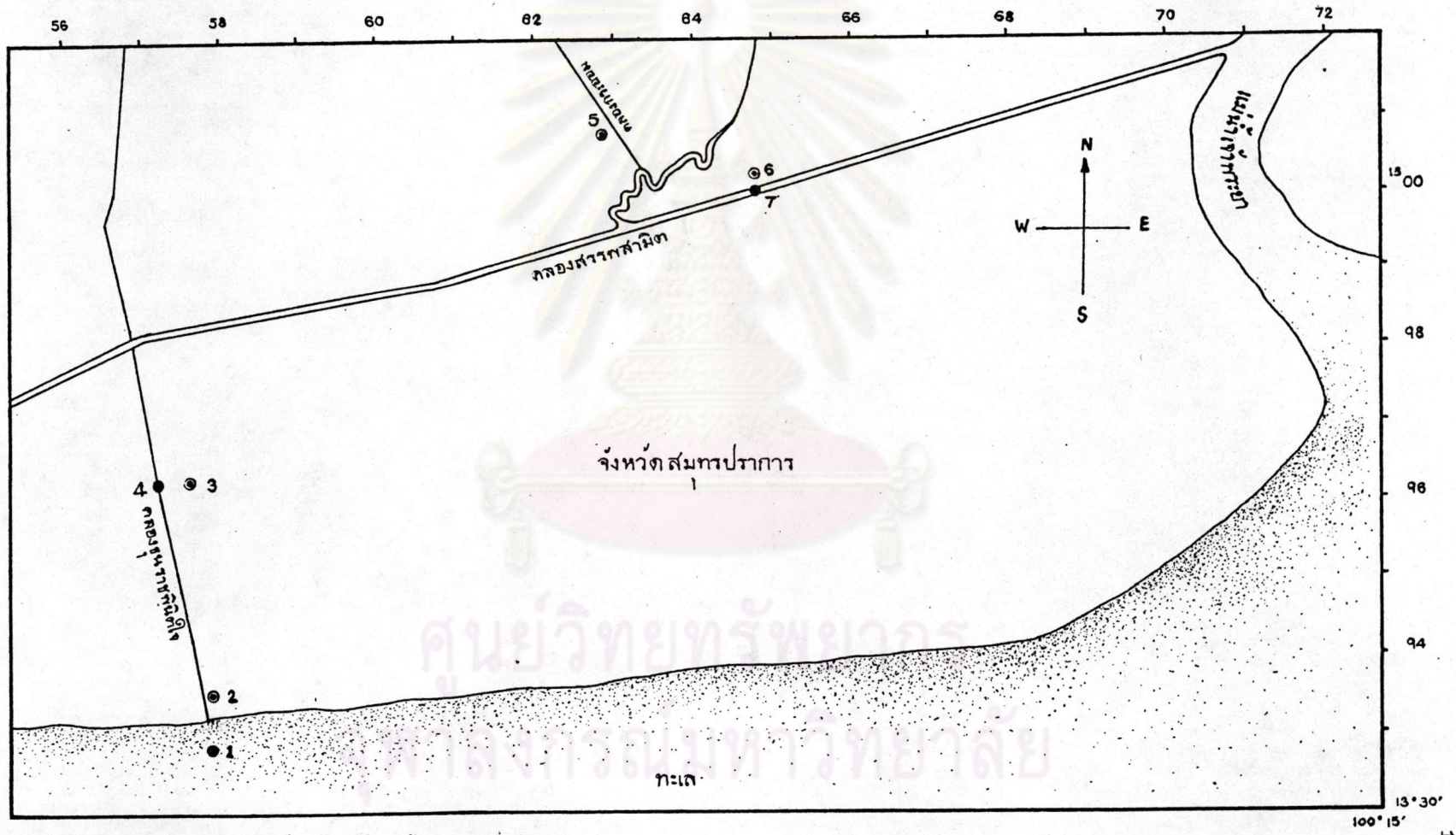
3. วิธีการเก็บตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างกุ้ง โดยชาวนากุ้งจะทำการเก็บตัวอย่างด้วยการเปิดน้ำออกในตอนกลางคืน ดักด้วยถุงอวน และในตอนเช้ามืดจึงนำมาใส่ตะกร้า และใส่ถุงพลาสติก ประมาณ 100 กรัม ปิดปากถุงให้แน่น

3.2 ตัวอย่างดิน โดยใช้ Peterson grab เก็บตัวอย่างดินใส่ขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 100 กรัม

3.3 ตัวอย่างน้ำ โดยใช้ขวดแก้วจุ 5 ลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จับที่กันขวด จุ่มปากขวดลงไปในผิวน้ำลึกประมาณ 30 เซนติเมตร ค่อย ๆ พลิกขวดกลับจนกระทั่งคอขวดเอียงขึ้นเล็กน้อย และปากขวดอยู่ในทางที่กระแสน้ำไหล ปริมาตรของตัวอย่างที่เก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรียโดยเก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ประมาณ 1 ลิตร และตัวอย่างน้ำเพื่อทำการวิเคราะห์ทางด้านเคมี วิธีเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำเพื่อการวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรีย แต่ใส่ในขวดพลาสติกขนาดจุ 1 ลิตร สำหรับอุณหภูมิ ความเค็ม และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำวิเคราะห์ทันทีโดยใช้ SCT meter และความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH-Meter

4. การเก็บรักษาตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดเมื่อทำการเก็บตัวอย่างแล้วจะถูกนำมารักษาไว้ในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นได้ หลังจากนั้นจะนำสู่ห้องปฏิบัติการ เวลาประมาณ 17.00 น. สำหรับตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ทางด้านเคมี จะทำการวิเคราะห์ทันที และตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรีย จะทำการ



รูปที่ 1 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ, ดิน, กุ้ง จังหวัดสมุทรปราการ

● เก็บตัวอย่างน้ำ, ดิน ◉ เก็บตัวอย่างน้ำ, ดิน, กุ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น โดยอยู่ในระยะไม่เกิน 24 ชั่วโมง นับแต่เก็บตัวอย่าง

5. ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2526 และเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายในเดือนเมษายน พ.ศ. 2527 ในการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนแรก จะเป็นระยะที่มีการขุดลอกบ่อ และปล่อยน้ำเข้าออกนาตลอดเวลา หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างในช่วงของน้ำเกิด เดือนละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงเวลาสุดท้ายที่มีการเลี้ยงกุ้ง และจะจับกุ้งขึ้นมาทั้งหมดเพื่อทำการขุดลอกบ่อ และเตรียมบ่อในการเลี้ยงกุ้งรอบต่อไป

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางด้านแบคทีเรีย

1. การเตรียมส่วนผสมเนื้อเดียวกัน (Preparation of the food homogenate)

1.1 ตัวอย่างกุ้ง นำกุ้งสดที่ยังไม่ได้ล้างทั้งตัวมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรและปากคีบที่ลนไฟแล้ว และนำกุ้งที่ตัดแล้วใส่ลงใน Voltex flask 10 กรัม เติม PSD 50 มล. ปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด (MSE homoginizer) ด้วยความเร็วต่ำ แล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มความเร็วให้สูงขึ้น ใช้เวลาประมาณ 2 นาที เท PSD ที่เหลือ 40 มล. ลงไปผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ส่วนผสมที่มีความเข้มข้นเป็น 10^{-1}

1.2 การเตรียมความเจือจางของตัวอย่างกุ้ง จากส่วนผสมเนื้อเดียวกันของตัวอย่างในข้อ 1.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันจาก Voltex flask 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี PSD 9 มล. จะได้ส่วนผสมที่มีความเจือจาง 10^{-2} และทำวิธีเช่นเดียวกันนี้ จากส่วนผสมของกุ้งที่มีความเจือจาง 10^{-2} ทำส่วนผสมให้เจือจางถึง 10^{-7}

1.3 ตัวอย่างดิน ตัวอย่างดินใช้ช้อนที่ลนไฟแล้วตักดินมาชั่งในขวดแก้ว (Erlenmeyer flask) 10 กรัม เท PSD 90 มล. เขย่าให้เป็นส่วนผสมเนื้อเดียวกัน จะได้ความเข้มข้นของส่วนผสมเป็น 10^{-1}

1.4 การเตรียมความเจือจางของตัวอย่างดิน ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ทำจนถึงส่วนผสมมีความเจือจางเป็น 10^{-6}

1.5 ตัวอย่างน้ำ จากน้ำตัวอย่าง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำมา 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี PSD 9 มล. จะได้ส่วนผสมที่มีความเจือจาง 10^{-1}

1.6 การเตรียมความเจือจางของตัวอย่างน้ำ ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ทำจนถึงส่วนผสมมีความเจือจางเป็น 10^{-5}

2. การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) (Elliott et al., 1978 และ Harrigan และ McCance, 1976)

2.1 บนอาหาร Plate Count Agar (PCA) โดยวิธี pour plate

2.1.1 ตัวอย่างกุ้ง โดยใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันของกุ้ง ตั้งแต่ความเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-7} โดยใช้ petridish 2 จาน ต่อหนึ่งความเข้มข้น ดูดจากตัวอย่างความเข้มข้นละ 1 มล. ลงใน petridish เท PCA ที่หลอมเหลวที่ 44.5°ซ ลงในแต่ละ plate 10-12 มล. จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหมุน petridish กลับไปมา ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวจึงพลิก plate คว่ำลง นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นับ plate ที่มีจำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30-300 โคโลนีเท่านั้นที่จะเป็น Standard Plate Count ให้คำนวณจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ คูณด้วยส่วนกลับของ dilution ที่ใช้ และหาค่าเฉลี่ยต่อหนึ่งความเข้มข้นโดยหารล่อง รายงานผลเป็น โคโลนี/กรัม

2.1.2 ตัวอย่างดิน ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 โดยใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-5}

2.1.3 ตัวอย่างน้ำ ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 โดยใช้ความเจือจางตั้งแต่ stock solution ถึง 10^{-4}

2.2 บน Marine Agar (MA) โดยวิธี pour plate เพาะเชื้อที่ 25° ซ 48 ชั่วโมง (Atlas และ Bartha, 1981)

2.2.1 ตัวอย่างกุ้ง ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 โดยใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7}

2.2.2 ตัวอย่างดิน ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 โดยใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-3} ถึง 10^{-6}

2.2.3 ตัวอย่างน้ำ ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 โดยใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-5}

2.3 บน Blood Agar (BA) โดยวิธี spreading เพาะเชื้อที่ 25°ซ 48 ชั่วโมง

2.3.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันของกุ้ง ตั้งแต่ความเจือจาง 10^{-3} ถึง 10^{-7} จากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย โดยดูดจากตัวอย่างความเข้มข้นละ 0.1 มล. ลงใน BA ใช้ pasteur pipette ลนไฟเป็นรูปสามเหลี่ยม เกลี่ยเชื้อให้กระจายรอบ petridish พลิก plate คว่ำลง นำเข้าตู้อบที่ 25°ซ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา บ่มเชื้อ นับ plate ที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี คำนวณจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ คูณด้วยส่วนกลับของ dilution ที่ใช้ และคูณด้วย 10 รายงานผลเป็นโคโลนี/กรัม ในการนับเชื้อบน BA นับแบคทีเรียที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง (haemolytic bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง (Non-haemolytic bacteria)

2.3.2 ตัวอย่างดิน ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 ใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-3} ถึง 10^{-6}

2.3.3 ตัวอย่างน้ำ ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 ใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-4}

2.4 การนับเชื้อ V. parahaemolyticus บน TCBS ด้วยวิธี spreading (Elliott et al., 1978)

2.4.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันของกุ้ง ตั้งแต่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-3} จากความเข้มข้นมากไปสู่ความเข้มข้นน้อย ดูดจากตัวอย่างความเข้มข้นละ 0.1 มล. ลงในอาหาร TCBS ใช้ pasture pipette ลนไฟเป็นรูปสามเหลี่ยม เกลี่ยเชื้อให้กระจายรอบ petridish พลิก plate คว่ำลง นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มเชื้อให้นับ plate ที่มีโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. สีเขียวเข้มขึ้น จำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30-300 โคโลนี คำนวณจำนวนแบคทีเรียที่นับได้คูณด้วยส่วนกลับของ ditution ที่ใช้ และคูณด้วย 10 รายงานผลเป็นโคโลนี/กรัม จากนั้นนำเชื้อที่สงสัยมาเขี่ยเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บน NA 3% NaCl เพื่อพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีต่อไป

2.4.2 ตัวอย่างดิน ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 ใช้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-3}

2.4.3 ตัวอย่างน้ำ ทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 ใช้ความเจือจางตั้งแต่ stock dilution ถึง 10^{-2}

2.4.4 การพิสูจน์เชื้อ V. parahaemolyticus ที่สงสัย โดยลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS มีสีเขียวเข้มขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. ในหัวข้อ 2.4.1 และนำเชื้อที่สงสัยมาเขี่ยเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บน NA 3% NaCl โคโลนีมีสีขาวขุ่นขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. เพื่อพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีต่อไป

2.4.4.1 การทดสอบการติดสีแกรม รายละเอียดการย้อมสีแกรมแสดงในภาคผนวก ก. V. parahaemolyticus เซลจะเป็นท่อนติดสีแดง

2.4.4.2 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) ใช้ platinum loop เขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl วางบนสไลด์ หยด hydrogen peroxide 3% 1-2 หยด สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นให้ผลเป็นบวก V. parahaemolyticus แสดงผลเป็นบวก

2.4.4.3 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ใช้ platinum loop เขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลากเป็นเส้นบนกระดาษกรองที่หยดด้วย cytochrome oxidase reagent สังเกตดูการเปลี่ยนแปลง ถ้าผลเป็นบวก หรือมีเอนไซม์ออกซิเดส ตรงรอบที่มีเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงิน ภายใน 5-10 วินาที V. parahaemolyticus แสดงผลเป็นบวก

2.4.4.4 การทดสอบ Oxidative-Fermentative (Fermentation of Hugh-Leifson Medium) เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากการใช้กลูโคสในสภาพที่มีออกซิเจน หรือไม่มีออกซิเจนโดยใช้อาหาร Hugh-Leifson medium ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl แทงลงใน H-L medium 3% NaCl เขี่ยเชื้อละ 2 หลอด เทพาราฟินเหลว (soft paraffin) ปิดทับหลอดหนึ่งเพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพไม่มีอากาศ ส่วนหลอดที่ 2 ปล่อยทิ้งไว้ นำหลอดทั้ง 2 ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่เป็น fermentative จะสร้างกรดในอาหารทั้ง 2 หลอด สังเกตจากการเปลี่ยนสีของ bromthymol blue จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ส่วนเชื้อที่เป็น oxidative จะให้กรดเฉพาะหลอดที่ไม่ปิด paraffin V. parahaemolyticus เป็นพวก fermentative

2.4.4.5 การทดสอบอินโดล (Indole test) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl มาเลี้ยงในอาหาร tryptone broth 3% NaCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent 3-5 หยด ลงในหลอด

ทดล่อบที่มีเชื้อ เขย่า ถ้าเกิดสีแดงในชั้นของ amyl alcohol ในเวลา 10 นาที แล่ดงว่าเชื้อนั้นสามารถสร้างสารอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก V. parahaemolyticus แล่ดงผลเป็นบวก

2.4.4.6 การใช้ซีเตรท (Citrate Utilization test) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl แทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon' citrate agar 3% NaCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แล่ดงว่าแบคทีเรียนั้นสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ V. parahaemolyticus

2.4.4.7 การรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ใส่ลงใน nitrate broth 3% NaCl บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง เติม Solution A และ Solution B อย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดงเกิดขึ้น แล่ดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าผลเป็นลบจะไม่เกิดสีแดงในอาหารทดล่อบต่อโดยใส่ zinc dust ลงไปเล็กน้อย ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในอาหาร ถือว่าผลการทดลองเป็นบวก V. parahaemolyticus แล่ดงผลเป็นบวก

2.4.4.8 การผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ (Fermentation of Carbohydrates) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงใน Broth agar ที่มีคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด คือ sucrose, arabinose, maltose, mannital, starch บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง คือ แบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตจะได้กรดเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นกรด V. parahaemolyticus สามารถใช้ maltose, mannital และ starch ได้ แต่ไม่สามารถใช้ sucrose, arabinose

2.4.4.9 การทดล่อบ Decarboxylase ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงใน decarboxylase medium ที่มีกรดอะมิโนแต่ละชนิด คือ Arginine, Lysine, Ornithine และหลอดควบคุม 1 หลอด ทั้ง 4 หลอดปิดด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24-72 ชั่วโมง อ่านผลจากหลอดควบคุมต้องเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งในระยะแรกอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากเกิดกรดจากการใช้ glucose

หลังจากนั้นถ้าเกิด decarboxylation อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นด่าง คือ มีสีม่วงเหมือนเดิม แล่ดงผลเป็นบวก V. parahaemolyticus แล่ดงผลเป็นบวกใน Lysine, Ornithine และแล่ดงผลเป็นลบใน Arginine

2.4.4.10 การทดล่อบการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Triple Sugar Iron Agar Test) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงบนผิวหน้า และในเนื้อในของ TSI Agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง V. parahaemolyticus จะให้ผลคือที่ slant เป็นสีแดง และที่ butt เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ไม่มี H_2S เกิดขึ้น

2.4.4.11 การทดล่อบความทนเกลือ (Salt Tolerant) เขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrient broth ที่มี NaCl 0%, 8%, 10% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง สังเกตในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrient broth ที่มี NaCl 0%, 8%, 10% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง สังเกตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีลักษณะขุ่น แล่ดงว่าเชื้อล่ามารถเจริญได้ V. parahaemolyticus เจริญได้ที่ความเค็ม 8% ที่ความเค็ม 0% และ 10% เชื้อนี้ล่วนมากจะไม่เจริญ

3. การตรวจหาจำนวนแบคทีเรียที่เป็นอินดิเคเตอร์ (Indicator) โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

3.1 Coliform โดยวิธีของ Elliott et al. (1978) และ APHA, AWWA และ WPCF (1975)

3.1.1 ตัวอย่างกุ้ง

ก. ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test) ใช้ปีเปตขนาด 10 มล. ดูดล่ารผล่มเนื้อเดียวกันของกุ้ง ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-4} ความเข้มข้นหลอดละ 1 มล. ทำ 3 หลอดต่อความเข้มข้น โดยใล่ลงใน LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูก๊าซที่เกิดใน durham tube บันทึกผลจำนวนหลอดที่มีก๊าซ

ข. ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (Confirmed test) ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก LB ที่ให้ผลเป็นบวกใล่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูก๊าซที่เกิดใน durham tube ทบทวนกับหลอด

ที่ให้ผลเป็นบวกใน LB และหาค่า MPN จากตารางในภาคผนวก ข คำนวณเชื้อเป็น MPN/กรัม

3.1.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 3.1.1

3.1.3 ตัวอย่างน้ำ

ก. ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test) ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างน้ำที่เป็น stock solution 10 มล. และ 1 มล. ใส่ลงใน LB ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และ 1 เท่า ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 หลอด และใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดตัวอย่างน้ำที่ได้ทำความเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-3} ความเข้มข้นหลอดละ 1 มล. ทำ 3 หลอด ต่อ 1 ความเข้มข้น ลงใน LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูก๊าซที่เกิดใน durham tube บันทึกผลจำนวนหลอดที่มีก๊าซ

ข. ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 3.1.1 (ข) รายงานผลเป็น MPN/100 มล.

3.2 Fecal coliform โดยวิธีของ American Public Health Association (1970) และ Elliott et al. (1978)

3.2.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก LB ในหัวข้อ 3.1.1 (ก) ที่ให้ผลเป็นบวก ใส่ในหลอด EC medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูก๊าซที่เกิดขึ้นใน durham tube รายงานผลเป็น MPN/กรัม

3.2.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 3.2.1 รายงานผลเป็น MPN/กรัม

3.2.3 ตัวอย่างน้ำ ปฏิบัติตามหัวข้อ 3.2.1 รายงานผลเป็น MPN/กรัม

3.3 Fecal streptococci โดยวิธีของ Harrigan และ McCance (1976)

3.3.1 ตัวอย่างกุ้ง

ก. ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test) ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดสารผสมเนื้อเดียวกันของกุ้ง ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-4} ความเข้มข้นหลอดละ 1 มล. ทำ 5 หลอด ต่อ 1 ความเข้มข้น โดยใส่ลงใน MZ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจาก

สีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผล

ก. ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก MZ ที่ให้ผลเป็นบวก ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GZ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผล ทบทวนกับหลอดที่ให้ผลเป็นบวกใน MZ และหาค่า MPN จากตารางในภาคผนวก ข คำนวณเชื้อเป็น MPN/กรัม

3.3.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 3.3.1

3.3.3 ตัวอย่างน้ำ

ก. ปฏิบัติการยั้นต้น (Presumptive test) ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดน้ำที่เป็น stock solution 10 มล. และ 1 มล. ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GZ ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และ 1 เท่า ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 หลอด และใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำที่ได้ ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-2} ความเข้มข้นหลอดละ 1 มล. ทำ 5 หลอด ต่อ 1 ความเข้มข้น ลงใน GZ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผล

ข. ปฏิบัติการยั้นยืนยัน (Confirmed test) ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก GZ ที่ให้ผลเป็นบวกในปฏิบัติการยั้นต้น ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GZ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผลทบทวนกับหลอดที่ให้ผลเป็นบวกใน GZ และหาค่า MPN จากตารางในภาคผนวก ข คำนวณเชื้อเป็น MPN/100 มล.

4. การตรวจหาเชื้อ V. cholerae โดยวิธีของ Elliott et al. (1978)

4.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างสารผสมเนื้อเดียวกันของกุ้งที่มีความเจือจาง 10^{-1} มา 10 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ APW นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง จึงใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก APW มา streak บนอาหาร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่เป็น V. cholerae จะมีสีเหลืองนวล กลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากอาหาร TCBS ลงบน TSI บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกหลอดอาหาร TSI ที่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองทั้งหลอดมาเกลี่ยเชื้อบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบเชื้อทางชีวเคมีต่อไป

4.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1

4.3 ตัวอย่างน้ำ โดยวิธีของ APHA, AWWA และ WPCF (1975)

ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างน้ำที่เป็น stock solution ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ APW 90 มล. นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก APW มา streak บนอาหาร TCBS นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่เป็น V. cholerae จะมีสีเหลืองนวล กลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. และนำมาทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

การพิสูจน์เชื้อ V. cholerae ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง นวล กลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. บนอาหาร TCBS มาทำการทดสอบทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

4.3.1 การทดสอบ Oxidative-Fermentative ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.4 V. cholerae แสดงผลเป็น oxidative

4.3.2 การทดสอบ Indole ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.5 V. cholerae แสดงผลเป็นบวก

4.3.3 การใช้ซีเตรท ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.6 V. cholerae แสดงผลเป็นบวก

4.3.4 การผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ. ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.8 โดยใช้คาร์โบไฮเดรท 3 ชนิด คือ sucrose, mannose, arabinose ซึ่ง V. cholerae แสดงผลเป็นบวกใน sucrose, mannose และแสดงผลเป็นลบใน arabinose

4.3.5 การทดสอบ Decarboxylase ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.9 โดยใช้ amino acid 3 ชนิด คือ Lysine, Arginine, Ornithine ซึ่ง V. cholerae แสดงผล Lysine และ Ornithin เป็นบวก Arginine เป็นลบ

4.3.6 Methyl Red test เขี่ยเชื้อจาก NA ในหัวข้อ 4.1, 4.2 และ TCBS ในหัวข้อ 4.3 ลงในอาหาร MR-VP medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยดน้ำยา methyl red 5 หยด ลงในอาหารที่ทดสอบ เขย่า ถ้าเกิดสีแดงในอาหารให้ผลเป็นบวก V. cholerae แสดงผลเป็นบวก

4.1.7 Voges-Proskauer test ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1.6 โดยหยดสารละลาย naphthol 0.6 มล. และ KOH 0.2 มล. เขย่าหลอดตั้งทิ้งไว้ 2-4 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงแดงเข้ม ให้ผลเป็นบวก V. cholerae ให้ผลเป็นบวกหรือลบ

5. การตรวจหาเชื้อ Salmonella spp. โดยวิธีของ Elliott et al. (1978) และ APHA, AWWA และ WPCF (1975)

5.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างของสารผสมเนื้อเดียวกันของกุ้ง ความเข้มข้น 10^{-1} มา 10 มล. นำมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 90 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก TTBB มา streak ลงบนอาหาร BGA นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีเป็น Salmonella spp. จะมีสีชมพูขุ่น จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก BGA ลงบน TSI บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกหลอดอาหาร TSI ที่มีกัน (butt) เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และอาจมีสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) นำมาพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีต่อไป

5.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 5.1

5.3 ตัวอย่างน้ำ ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างน้ำที่เป็น Stock solution 10 มล. ใส่ลงในอาหาร TTBB 90 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42.5^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่งโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก TTBB มาเกลี่ยลงบนอาหาร BGA นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่เป็น Salmonella spp. จะมีสีชมพูขุ่น จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก BGA ลงบน TSI บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกหลอดอาหาร TSI ที่มีกัน (butt) เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และอาจมีสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดขึ้น นำมาพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีต่อไป

การพิสูจน์เชื้อ Salmonella spp. ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพูขุ่นบนอาหาร BGA และในหลอดอาหาร TSI ที่มี Slant เป็นสีแดง และ butt เป็นสีเหลือง นำมาพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมีต่อไป

5.3.1 การทดสอบอินโดล (Indole test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.5 Salmonella spp. ให้ผลเป็นลบ

5.3.2 การใช้ซีเตรท (Citrate Utilization test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.6 Salmonella spp. ให้ผลเป็นบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

5.3.3 การผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ (Fermentation of Carbohydrate) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.8 โดยใช้ sucrose, lactose, mannitol ซึ่ง Salmonella spp. ให้ผล sucrose, lactose เป็นลบ mannitol เป็นบวก

5.3.4 การทดล่อบ Decarboxylase ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.9 Salmonella spp. ให้ผล Lysine เป็นบวก Arginine และ Ornithine เป็นลบ

5.3.5 การทดล่อบการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Triple Sugar Iron Agar test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.10 Salmonella spp. ให้ผล slant เป็นสีแดง butt เป็นสีเหลือง และอาจมีสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดขึ้น

5.3.6 Methyl Red test ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1.6 Salmonella spp. ให้ผลเป็นบวก

5.3.7 Voges Proskauer test ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1.7 Salmonella spp. แล่ดงผลเป็นลบ

5.3.8 Urease test ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA ลงบนผิวหน้าของ Urea medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง Salmonella spp. ให้ผลการทดล่อบเป็นลบ

6. การตรวจหาเชื้อ V. anguillarum (โดยวิธีของ Hendrie et al., 1971 และ Elliott et al., 1978)

6.1 ตัวอย่างกุ้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก BA ในหัวข้อ 2.3.1 เลือกโคโลนีที่ล่งสัยว่าเป็น V. anguillarum คือโคโลนีที่ย่อยเม็ดเลือดได้ขนาดประมาณ 1 มม. หลังจากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบน BA อีกครั้งหนึ่ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาตรวจล่อบทางชีวเคมีต่อไป โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 ตัวอย่างดิน ปฏิบัติตามหัวข้อ 6.1

6.3 ตัวอย่างน้ำ ปฏิบัติตามหัวข้อ 6.1

6.3.1 การล่ร้างเอ็นไซม์ออกซิเดล่ (Oxidase test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.3 V. anguillarum ให้ผลเป็นบวก

6.3.2 การทดล่อบอินโดล (Indole test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.5 V. anguillarum ให้ผลเป็นบวก

6.3.3 การรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.7 V. anguillarum ให้ผลเป็นบวก

6.3.4 การผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ (Fermentation of Carbohydrate) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.8 โดยใช้ Starch, glucose, galactose, sucrose V. anguillarum ให้ผลเป็นบวกหมด

6.3.5 การทดสอบ Decarboxylase ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.9 V. anguillarum ให้ผล Arginine เป็นบวก Lysine และ Ornithine เป็นลบ

6.3.6 การทดสอบความทนเกลือ (Halophilism) ปฏิบัติตามหัวข้อ 2.4.4.11 V. anguillarum ให้ผลเป็นบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 0 และ 3% และเป็นลบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 และ 10%

6.3.7 Methyl Red test ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1.6 V. anguillarum แสดงผลเป็นลบ

6.3.8 Voges-Proskauer test ปฏิบัติตามหัวข้อ 4.1.7 V. anguillarum แสดงผลเป็นลบ

การวิเคราะห์ปัจจัยทางด้านเคมี

1. ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N) โดยวิธีของ Strickland และ Parsons (1968) วัดโดยวิธี Cadmium reduction เปลี่ยน nitrate ให้เป็น nitrite ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ sulphanilamide และ N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine

1.1 กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง 0.45 µ

1.2 นำตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 100 มล. ใส่ใน erlenmeyer flask เติม conc. NH_4Cl มล.

1.3 นำไปผ่าน Cadmium reduction column สารละลายที่ผ่านมา 40 มล. แรกให้ทิ้งไป และเก็บสารละลายที่เหลืออีก 50 มล.

1.4 เติมสารละลาย sulphanilamide 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 2 ถึง 8 นาที เติมสารละลาย naphthylethylenediamine 1 มล. ผสมเข้าด้วยกันทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง

1.5 นำไปวัด absorbance ที่ wavelength 543 nm. โดยใช้เซลขนาด 1 ซม.

วิธีเตรียม Calibration curve

1. จากสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ ในภาคผนวก ก เตรียมสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้นเป็น 0.010, 0.050, 0.100, 0.200, 0.500, 0.700, 1.00 มก. ไนเตรท-ไนโตรเจน/ลิตร

1.1 ปฏิบัติตามวิธีการของการวิเคราะห์ตัวอย่างหาไนเตรทในน้ำทุกประการ

1.2 วัดค่า absorbance ที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน นำค่า absorbance ที่วัดได้จากตัวอย่างมาเทียบกันกับกราฟมาตรฐานนี้ ค่าที่ได้จะเป็นค่าความเข้มข้นของไนเตรท-ไนโตรเจน รวมกับไนไตรท์-ไนโตรเจน จึงต้องหักลบจากค่าไนไตรท์-ไนโตรเจนก่อน จึงนำมาใช้ได้

2. ไนไตรท์-ไนโตรเจน (NO_2-N) โดยวิธีของ Strickland และ Parsons (1968)

2.1 กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง 0.45 µ

2.2 นำตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว 50 มล. เติมสารละลาย sulphanilamide 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 2 ถึง 8 นาที เติมสารละลาย naphthylethylenediamine 1 มล. ผสมเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง

2.3 นำไปวัด absorbance ที่ wavelength 540 nm โดยใช้เซลขนาด 1 ซม.

วิธีเตรียม Calibration curve

1. จากสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ ในภาคผนวก ก เตรียมสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้นเป็น 0.001, 0.003, 0.005, 0.007, 0.009, 0.010 มก. ไนไตรท์-ไนโตรเจน/ลิตร

2. ปฏิบัติตามวิธีการของการวิเคราะห์ตัวอย่างหาไนไตรท์ในน้ำทุกประการ

3. วัดค่า absorbance ที่ได้ นำมาสร้างกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน นำค่า absorbance ที่วัดได้จากตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานนี้

3. ออโธฟอสเฟต (Orthophosphate)

3.1 ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7±0.2

3.2 เติม Combined reagent 8 มล. ในตัวอย่างน้ำ 50 มล. เขย่าให้สารละลายผสมกันโดยทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 880 nm. โดยใช้เซลขนาด 1 ซม.

วิธีเตรียม Calibration curve

1. จากสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส ในภาคผนวก ก เตรียมสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้นเป็น 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส/ลิตร

2. ปฏิบัติตามวิธีการของการวิเคราะห์ตัวอย่างหาออโธฟอสเฟตในน้ำทุกประการ

3. วัดค่า absorbance ที่ได้ นำมาสร้างกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน นำค่า absorbance ที่วัดได้จากตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานนี้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การหาค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูลที่เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ต่อ 1 เดือน

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

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบแต่ละชนิด

Σx = ผลรวมขององค์ประกอบแต่ละชนิด

N = จำนวนตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, F-test) แบบ 2 ตัวประกอบ โดย จรัล (2522) และ Snedecor และ William (1967)

3. การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเฉลี่ยเป็นคู่ หลังจากการวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ Least Significant Difference (LSD)

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

4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (Spearman Rank Correlation, r_s) โดย Snedecor (1967) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของปริมาณแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในกุ้ง, ดิน, น้ำ และปัจจัยสภาวะแวดล้อม

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

d = ผลต่างของ Rank ระหว่างข้อมูล 2 ชุด

n = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

นำค่า r_s ที่คำนวณได้ไปเทียบกับค่า r_s จากตาราง ถ้าค่า r_s ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าตาราง แสดงว่าข้อมูล 2 ชุด มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ 2 ตัวประกอบ

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	$SSC = \frac{\sum_{i=1}^{c} T^2.j}{r} - \frac{T^2..}{rc}$	$MSC = \frac{SSC}{c-1}$	$\frac{MSC}{MSE}$	$df_1 = c-1$ $df_2 = (r-1)(c-1)$ $\alpha = 0.05$
Error	(r-1)(c-1)	SSE = SST = (SSR+SSC)	$MSE = \frac{SSE}{(r-1)(c-1)}$		
Total	rc - 1	$SST = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c} X_{ij}^2 - \frac{T^2..}{rc}$			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

$T..$ = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

$Ti.$ = ผลรวมของข้อมูลในแถว

$T.j$ = ผลรวมของข้อมูลในคอลัมน์

r = จำนวนแถว

c = จำนวนคอลัมน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16886418