

ภาคผนวก ก
วิธีการตรวจวัดและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ภาคผนวก ก
วิธีการตรวจวัดและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การตรวจวัดค่าอุณหภูมิ (Temperature)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เทอร์โมมิเตอร์ชนิดกระเปาะแก้ว

วิธีการ

1. จุ่มเทอร์โมมิเตอร์ลงในน้ำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งกรณีที่ต้องการตรวจวัดในแหล่งน้ำควรจุ่มตรวจสอบในแหล่งน้ำโดยตรง โดยไม่ควรจุ่มลงลึกกว่า 2 เท่าของความยาวของแท่งแก้ว และขณะตรวจวัดควรตรวจวันในที่ร่ม ที่ไม่มีแสงส่องกระทบโดยตรง กรณีที่ไม่สะดวกจุ่มตรวจสอบโดยตรง เช่น กระแสน้ำไหลแรงและอันตรายมาก อาจเก็บตัวอย่างน้ำนี้ขึ้นมาบนฝั่งและทำการตรวจวัดทันที

2. การอ่านค่าอุณหภูมิ น้ำ ควรอ่านค่าขณะที่ยังจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ในน้ำ หรือถ้าไม่สามารถทำได้ให้อ่านทันทีที่ดึงเทอร์โมมิเตอร์ออกจากน้ำตัวอย่าง โดยให้อ่านค่าหลังจากที่จุ่มเทอร์โมมิเตอร์ในน้ำแล้วอย่างน้อย 1 นาที และให้ถือเทอร์โมมิเตอร์อ่านในระดับสายตา

3. หลังจากการตรวจวัดแล้วให้ทำความสะอาดเทอร์โมมิเตอร์โดยน้ำกลั่น และเก็บในที่ปลอดภัย

2. การตรวจวัดค่าความเป็นกรด – เบส เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัด pH (Multi-Parameter Testr 35)
2. บีกเกอร์
3. น้ำกลั่น
4. กระดาษทิชชู

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งแก้วอิเล็กโทรดให้สะอาดซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู
2. ปรับเครื่อง pH ให้ได้มาตรฐาน ด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่าวัดแล้วปรับเครื่องให้ตรงกับ pH ของสาร ณ อุณหภูมิห้อง
3. ให้น้ำกลั่นฉีดแท่งแก้วอิเล็กโทรดอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง และ วัดตัวอย่างน้ำที่ต้องการหาค่า pH บันทึกผล

3. การวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือวัดสภาพการนำไฟฟ้า EC – Metter Toledo รุ่น
LE - 703

2. บีกเกอร์ขนาด 25 ml

วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าอย่างน้อย 15 นาที ก่อนใช้
งาน

2. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งอิเล็กโทรดให้สะอาด แล้วใช้
กระดาษทิชชูซับให้แห้ง

3. ปรับเครื่องมาตรฐาน (Standardization) ตามคำแนะนำ
ในคู่มือของเครื่องนั้น โดยจุ่มอิเล็กโทรดลงในสารละลายมาตรฐาน

4. ใช้น้ำกลั่นฉีดแท่งอิเล็กโทรดอีกครั้งซับให้แห้ง

5. นำน้ำตัวอย่างที่จะนำมาวัดค่าการนำไฟฟ้า ต้องปล่อยให้
อุณหภูมิคงที่เสียก่อน เช่นในกรณีที่น้ำตัวอย่างแช่เย็นไว้ ก่อนการ
วัดต้องเขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดีและอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง
เทใส่บีกเกอร์ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำตัวอย่างจนตัวเลขแสดงค่าการ
นำไฟฟ้าหยุดนิ่งแล้วบันทึกค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำ เมื่อจะ
วัดตัวอย่างน้ำต่อไปให้ฉีดล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง
แล้วจึงวัดตัวอย่างน้ำต่อไป

4. การวิเคราะห์ค่าความขุ่น เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดความขุ่น ยี่ห้อ HACH รุ่น 2100N Bench Top Turbidimeter

2. กระดาษทิชชู
วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

2. ปรับเทียบค่าความขุ่นมาตรฐานโดยกดปุ่ม CAL เครื่องจะแสดงค่าความเข้มข้นที่จะต้องใส่

3. เปิดฝาเครื่องวัดความขุ่น นำค่าความขุ่นมาตรฐานที่เครื่องแสดงค่าไว้ใส่ลงในเครื่องวัดความขุ่น โดยให้ลูกศรบนขวดวัดความขุ่นตรงกับจุดที่แสดงไว้ในเครื่อง ปิดฝา แล้วกดปุ่ม Read เครื่องจะทำการอ่านค่า 1 นาที เมื่อเครื่องทำงานเสร็จสิ้น บนหน้าจอจะกระพริบค่าความขุ่นมาตรฐานต่อไปที่จะทำการ calibration เครื่องจะอ่านค่าตั้งแต่ 20, 100, 100 และ 800 ตามลำดับ

4. หลังจากทีปรับเทียบค่าความขุ่นมาตรฐานเสร็จแล้ว ให้กดปุ่ม CAL เครื่องจะขึ้นค่าศูนย์

5. ตวงตัวอย่างน้ำลงไปในช่วงวัดความขุ่น ซึ่งต้องให้น้ำอยู่ในระดับขีดที่แสดงบนขวดวัดความขุ่น เช็ดขวดให้แห้งเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนต่างๆ ด้วยกระดาษทิชชูที่เตรียมไว้

6. ใส่ขวดวัดความขุ่นลงในเครื่องโดยให้ลูกศรบนขวดวัดความขุ่นตรงกับจุดที่แสดงในเครื่องใส่ลงในเครื่อง ปิดฝา แล้วกดคำว่า Read เครื่องจะทำการอ่านค่าและเมื่อค่าความขุ่นบนหน้าจอหยุดนิ่ง บันทึกผล

5. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids, TDS)

โดยเทคนิคทำให้ระเหยที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C
เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระจกกรอง GF/C (Glass Fiber Filter)
2. ชุดกรอง
 - กรวยบุนเนอร์ ความจุ 100 มิลลิลิตร
 - ขวดกรวย
3. เครื่องดูดสุญญากาศขนาด 500 – 1000 มิลลิลิตร
4. กระจกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ถ้วยระเหย
6. เครื่องอังไอน้ำ
7. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. การกรองน้ำตัวอย่าง ต่อสายยางระหว่างปลายท่อดูดของเครื่องดูดและของขวดกรอง วางกระจกกรอง GF/C บนกรวยบุนเนอร์ เปิดเครื่องสุญญากาศ ล้างกระจกกรองด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร และปล่อยให้ดูดน้ำกลั่นออกจากกระจกกรองจนหมด ทิ้งน้ำไป นำน้ำตัวอย่างมาเขย่าให้เข้ากันอย่างดี (เนื่องจากน้ำตัวอย่างที่เหลือในขวดเก็บตัวอย่างจะได้นำไปวิเคราะห์อย่างอื่นได้) มาตรฐานผ่านกระจก GF/C ที่เตรียมไว้ให้กรองให้มากกว่าปริมาณที่เลือกให้ที่จะนำไประเหย (จะใช้น้ำตัวอย่างที่ผ่านกระจกกรองให้หาค่าของแข็งแขวนลอยก็ได้)

2. นำถ้วระเหยไปอบที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

3. เมื่อนำไปใช้น้ำถ้วมาชั่งน้ำหนัก กำหนดเป็นน้ำหนัก A กรัม

4. เขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดี เทตัวอย่างที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงในถ้วระเหย (การเลือกปริมาณน้ำตัวอย่าง ควรเลือกให้เหมาะสมโดยพิจารณาจากลักษณะน้ำและแหล่งที่มา) และนำไประเหยบนเครื่องอังไอน้ำที่ปรับอุณหภูมิที่ 95 °C

5. หลังจากระเหยน้ำออกจนหมดแล้ว ให้นำเข้าไปในตูอบที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C

6. นำออกจากตูอบ ปล่อยให้เย็นในโถทำแห้ง แล้วชั่งน้ำหนัก กำหนดเป็นน้ำหนัก B กรัม

7. ควรทำข้อ 6 ซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่

8. ทำการคำนวณหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ตามสูตร

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (มล/ล)} = (B - A) \times 10^6$$

C

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วระเหยก่อน

B = น้ำหนักถ้วระเหยและของแข็ง

ละลายน้ำ

C = ปริมาณตัวอย่างน้ำ

6. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง GF/C (Glass Fiber Filter)
2. ชุดกรองซึ่งประกอบด้วยกรวยบุคเนอร์ (Buchner) พร้อมขวดสุญญากาศ (Suction Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
3. เครื่องสุญญากาศ (Vacum/Suction Pump)
4. ตู้ดูดความชื้น (Auto Desiccator Cabinet)
5. ตู้อบ (Hot Air Oven)
6. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) สามารถชั่งได้ถึง 0.0001 กรัม
7. กระจกตวงขนาด 100 ml
8. กระดาษฟอยล์

วิธีวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรอง GF/C ไปอบที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากอบเสร็จแล้วนำไปปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จดบันทึกกำหนดเป็นน้ำหนัก A กรัม
2. นำกระดาษกรองวางบนกรวย Membrane Filter ต่อเข้ากับ Suction Pump ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ดูดน้ำออกจนแห้ง ทิ้งน้ำล้างไป
3. นำน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือมากกว่า เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรองดูดน้ำออกจนแห้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
4. นำกระดาษกรองออกจากกรวย นำกระดาษกรองวางบนถาดฟอยล์ไปอบที่อุณหภูมิ 103 – 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบ ปล่อยให้เย็นใน Dessicator ซึ่ง
น้ำหนักกระดาษกรอง กำหนดเป็นน้ำหนัก B กรัม

$$\text{การคำนวณ SS (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(B - A) \times 10^3}{V}$$

เมื่อ SS = ปริมาณสารแขวนลอย
A = น้ำหนักของกระดาษกรอง (กรัม)
B = น้ำหนักของกระดาษกรองและ
ตัวอย่าง (กรัม)
V = ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

7. การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง DO Metter (รุ่น 550A Field Pocket Gcide)
2. น้ำกลั่น
3. กระดาษทิชชู

วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่อง DO Meter แล้วทำการ Calibrate ประมาณ 15 นาที
2. ล้าง Membrane ด้วยน้ำกลั่นแล้วซับเบาๆ ด้วยกระดาษทิชชู
3. วัดตัวอย่างน้ำที่ต้องการหาค่า DO รोजनตัวเลขหนึ่งและบันทึกผล

8. วิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand, BOD)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต
สารละลายแมงกานีสซังเพตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 91 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร
2. สารละลายอัลคาไล – ไอโอดีน – เอไซด์
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 125 กรัม และโซเดียมไอโอดีน (NaI) 33.75 กรัม ในน้ำกลั่นเจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร และละลายโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายข้างต้น
3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 96 นอร์มัล
4. น้ำแป้ง
5. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล
สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 24.82 กรัม ในน้ำต้มที่เย็นแล้วเติมจนได้ปริมาตร 1 ลิตร
6. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 นอร์มัล

เตรียมโดยเจือจางสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล จำนวน 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ด้วย

7. สารละลายมาตรฐานไดโครเมต สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต

0.0250 นอร์มัลละลายโปแตสเซียมไดโครเมตที่อบแห้ง ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 1.226 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

8. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต

โดยสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต (KI) ปริมาณ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปกรวย เติมกรดซัลฟูริก (9+1) 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.0250 นอร์มัล จำนวน 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที เติมน้ำกลั่นจะได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต โดยใช้ยาแ่งเป็นอินดิเคเตอร์ (จากสีน้ำเงินจนเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี)

วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำตัวอย่างมาปรับอุณหภูมิให้ได้ 20 องศาเซลเซียส
2. เติมออกซิเจน โดยการเติมอากาศผ่านหัวลูกฟูกจนออกซิเจนละลายอิ่มตัว ประมาณ 1 ชั่วโมง
3. เติมน้ำตัวอย่างใส่ขวด BOD จนเต็ม 2 ขวด ปิดจุกให้สนิท และมีน้ำหล่อที่ปากขวด

4. นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ ถือว่าเป็นค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้น กำหนดเป็น DO_0

5. นำอีกขวดหนึ่ง ไปใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบ 5 วัน นำตัวอย่างน้ำมาหาค่าออกซิเจนละลายน้ำที่เหลืออยู่ กำหนดเป็น DO_5

การคำนวณ

$$BOD \text{ (มิลลิลิตรต่อลิตร)} = DO_0 - DO_5$$

เมื่อ $DO_0 =$ ค่าออกซิเจนละลายน้ำที่ไตเตรตได้
ในวันแรก

$DO_5 =$ ค่าออกซิเจนละลายน้ำที่ไตเตรตได้
ในวันที่ 5

9. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟส (PO_4^{3-})

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น
3. เครื่อง Spectrophoto Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000
4. ปิเปต
5. จุกยาง
6. กระดาษทิชชู

สารเคมี

1. สาร Phose Ver3 สำหรับใช้หากับเครื่อง Spectrophoto Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000

วิธีวิเคราะห์

1. กดปุ่ม HACH Program เพื่อเลือกโปรแกรมวัดที่เครื่องตั้งไว้ คือโปรแกรม 3025 แล้ว กด Enter หน้าจอจะแสดงผล HACH Program : 3025 P React As LK ความยาวคลื่น 890 nm.

2. ทำ Blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนน้ำตัวอย่าง ปริมาตร 10 ml เติมลงในหลอดวัดค่าของเครื่องเติมสาร Phose Ver3 จำนวน 1 ซอง เขย่า 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าจากนั้น กดปุ่ม ZERO หน้าจอแสดงค่า 0.00 ml/l PO_4^{3-}

3. ตวงน้ำตัวอย่างที่จะวัด ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดวัดค่าเติมสาร Phose Ver3 จำนวน 1 ซอง เขย่า 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าโดยใช้เครื่อง Spectrophoto Meter ในช่อง Cell holder ปิดฝาป้องกันแสง จะมีผลออกมาเป็น ml/l PO_4^{3-} แสดงบนหน้าจอ

10. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในรูปไนโตรเจน ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) เครื่องมือและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น
3. เครื่อง Spectrophoto Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000
4. ปิเปต
5. จุกยาง
6. กระดาษทิชชู

สารเคมี

1.สาร Phose Ver 5 สำหรับใช้หากับเครื่อง
Spectrophoto Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000
วิธีวิเคราะห์

1. กดปุ่ม HACH Program เพื่อเลือกโปรแกรมวัดที่เครื่องตั้งไว้ คือโปรแกรม2520 แล้ว กดEnter หน้าจอจะแสดงผล HACH Program : 3025 P React As LK ความยาวคลื่น 400 nm.

2. ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 ml เติมลงในหลอดวัดค่าของเครื่องเติมสาร Phose Ver 5 จำนวน 1 ซอง เขย่า 1 นาทีทิ้งไว้ 5 นาที นำไปใส่ช่อง Cell holder จากนั้น กดปุ่ม ZERO หน้าจอแสดงค่า 0.00 ml/l $\text{NO}_3^- - \text{N}$

3. ตวงน้ำตัวอย่างที่จะวัดปริมาตร 10 ml ลงในหลอดวัดค่าเติมสาร Phose Ver 5 จำนวน 1 ซอง เขย่า 1 นาที ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าใส่ ในช่อง Cell holder ปิดฝาป้องกันแสง จะมีผลออกมาเป็น ml/l ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) แสดงบนหน้าจอ

11. การตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Standard Test for Bacteria of the Coliform group)

โดยวิธีเทคนิคการหมักแบบหลายหลอด (Multiple Tube Fermentation Technique) ซึ่งเป็นการหาปริมาณของแบคทีเรียในรูป MPN/100 ml.

เครื่องมือและอุปกรณ์

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. เครื่องอบแห้งสำหรับฆ่าเชื้อ (Hot air Ovens) | 9. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ |
| 2. เครื่องชั่ง | 10. หม้อนิ่งความดัน |
| 3. ตะเกียงแอลกอฮอล์ | 11. หลอดทดลอง |
| 4. ปิเปตนิ่งฆ่าเชื้อ (ขนาด 0.1, 1.0, 5.0, และ 10.0 มล.) | |
| 12. ตูบมเพาะเชื้อ | |
| 5. บีกเกอร์ | 13. ขวดรูป |
| ชมพู่ | |

ดวง	6. ช้อนตักสาร	14. กระจก
ร้อน	7. ห่วงเขี่ยเชื้อ	15. แผ่นความ
	8. ลูกยางใช้กับปิเปต	16. ตู้ถ่ายเชื้อ
		17. หลอดดักแก๊ส

สารเคมี

1. Lactose broth
2. Brilliant green lactose bile broth
3. Alcohol 95%
4. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการทดสอบ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Lactose broth (LB)

1. ชั่ง Lactose broth 13 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก แต่ถ้าเป็นน้ำบริโภคนจะใช้ Lactose broth เข้มข้นเป็น 2 เท่า คือ 26 กรัม ในแถวแรก

2. ปิเปต Lactose broth ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊ส และปิดด้วยฝาครอบ

3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi

4. นำหลอดทดลองออกจาก Autoclave ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 - 10 องศาเซลเซียส

Brilliant-Green Lactose bile broth (BGLB)

1. ชั่ง Brilliant-Green Lactose bile broth 40 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก
2. บีบ Brilliant-Green Lactose bile broth ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊ส และปิดด้วยฝาครอบ
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi
4. นำหลอดทดลองออกจาก Autoclave ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 - 10 องศาเซลเซียส และเก็บในตู้เย็น 4 - 10 องศาเซลเซียส

การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

1. การทดสอบขั้นแรก (Presumptive Test) การทดสอบขั้นนี้เป็นการตรวจ Screen เบื้องต้น เพื่อจะแยกโคลิฟอร์มแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการทดสอบอาจใช้ระบบเลี้ยงเชื้อแบบ 3 หลอด หรือแบบ 5 หลอด คือ จำนวนมิลลิลิตรของตัวอย่างที่ต่างกันเป็นชุด ๆ ดังนี้ คือ 10 - 1 - 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 1 - 0.1 - 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.1 - 0.01 - 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสกปรกของตัวอย่างน้ำ โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. นำ Lactose Broth ที่เตรียมไว้ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (Overnight) ก่อนการทดสอบ

2. นำตัวอย่างที่แช่เย็นออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. จัดเรียง Lactose Broth เป็น 3 แถวๆ ละ 5 หลอด

4. เขียนรหัสตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่างน้ำข้างหลอด

ทดลอง เช่น ถ้าเป็นกรณีของน้ำจากแหล่งน้ำ จะใช้อนุกรม 3 การเจือจาง ได้แก่ 0.1 - 0.01 - 0.001 แถวที่ 1 ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 0.1 หรือ (10⁻¹) แถวที่ 2 ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 0.01 หรือ (10⁻²) และแถวที่ 3 ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 0.001 หรือ (10⁻³)

5. นำขวดตัวอย่างน้ำมาเขย่าขึ้นลงเพื่อให้น้ำผสมเข้ากันได้ดี ประมาณ 20 ครั้ง

แถวที่ 1 ความเข้มข้น 0.1

แถวที่ 2 ความเข้มข้น 0.01

แถวที่ 3 ความเข้มข้น 0.001

9 มิลลิลิตร 9 มิลลิลิตร 9 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร

6. เปิดฝาขวดเก็บตัวอย่าง และลนไฟที่ปากขวด ปิดตัวอย่างน้ำ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำสำหรับใช้เจือจางหลอดที่ 1 (ลนไฟที่ปากหลอดก่อนปิดตัวอย่างน้ำลงไปทุกครั้ง) แล้วเขย่าให้เข้ากัน

7. ปิเปตน้ำตัวอย่างจากหลอดน้ำสำหรับใช้เชื้อจากหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำสำหรับใช้เชื้อจากหลอดที่ 3 (ลนไฟที่ปากหลอดก่อนปิเปตตัวอย่างน้ำลงไปทุกครั้ง) แล้วเขย่าให้เข้ากัน

8. ปิเปตตัวอย่างน้ำจากข้อ ใสใน Lactose Broth แถวที่ 1 แถวที่ 2 และแถวที่ 3 ตามลำดับ โดยใส่แถวละ 5 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ลนไฟที่ปากหลอดก่อนปิเปตตัวอย่างน้ำลงไปทุกครั้ง) แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยการเขย่าประมาณ 5 ครั้ง

9. นำหลอดทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

10. อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นและแก๊สที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดแก๊ส จะดูได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดดักแก๊ส หรือมีฟองปุดเมื่อเขย่าเบาๆ แสดงว่า หลอดนั้นให้ผลบวก ถ้าหลอดใดไม่เกิดแก๊ส แสดงว่าหลอดนั้นให้ผลลบ ให้นำกลับไป

อบเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

การทดสอบยืนยัน (Confirm Test)

เนื่องจากการเกิดแก๊สในการทดสอบขั้นแรกยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องทดสอบยืนยันโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ EC

Medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบ
หาฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้
การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth ที่เตรียมไว้เท่ากับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก และเรียงให้ตรงกับหลอด Lactose broth ที่ให้ผลบวก
2. เขียนรหัสตัวอย่างที่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth
3. เขย่าหลอด Lactose broth ที่ให้ผลบวก และเปิด Lactose broth 0.1 mL ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth หลอดต่อหลอดโดยวิธีปลอดเชื้อ
4. เข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C นาน 24 - 48 ชม.
5. อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นและแก๊สที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดแก๊สจะดูได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดดักแก๊ส หรือมีฟองปุดเมื่อเขย่าเบาๆ แสดงว่า หลอดนั้นให้ผลบวก ถ้าหลอดใดไม่เกิดแก๊ส แสดงว่าหลอดนั้นให้ผลลบ ให้นำกลับไปอบเพาะเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

ตารางที่ ก.1 เปรียบเทียบค่า KPN Index

เมื่อใช้ 10 มล. 5 หลอด, 1 มล. 5 หลอด และ 0.1 มล. 5 หลอด

Combination of positives	MPN Index/100 ml	95% Confidence limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<2	-	-
0-0-1	2	<0.5	7
0-1-0	2	<0.5	7
0-2-0	4	<0.5	11
1-0-0	2	<0.5	7
1-0-1	4	<0.5	11
1-1-0	4	<0.5	11
1-1-1	6	<0.5	15
1-2-0	6	<0.5	15
2-0-0	5	<0.5	13
2-0-1	7	1	17
2-1-0	7	1	17
2-1-1	9	2	21
2-2-0	9	2	21
2-3-0	12	3	28
3-0-0	8	1	19
3-0-1	11	2	25
3-1-0	11	2	25
3-1-1	14	4	34
3-2-0	14	4	34

3-2-1	17	5	46
-------	----	---	----

ตารางที่ ก.1 เปรียบเทียบค่า KPN Index (ต่อ)

Combination of positives	MPN Index/100 ml	95% Confidence limits	
		Lower	Upper
3-3-0	17	5	46
4-0-0	17	5	46
4-0-1	21	7	63
4-1-0	26	9	78
4-1-1	22	7	67
4-1-2	26	9	78
4-2-0	27	9	80
4-2-1	33	11	93
4-3-0	34	12	93
4-3-1	23	7	70
4-4-0	31	11	89
5-0-0	43	15	110
5-0-1	33	11	93
5-0-2	46	16	120
5-1-0	63	21	150
5-1-1	49	17	130
5-1-2	70	23	170
5-2-0	94	28	220
5-2-1	79	25	190

5-2-2	94	28	220
5-3-0	79	25	190

ตารางที่ ก.1 เปรียบเทียบค่า KPN Index (ต่อ)

Combination of positives	MPN Index/100 ml	95% Confidence limits	
		Lower	Upper
5-3-1	110	31	250
5-3-2	140	37	340
5-3-3	180	44	500
5-4-0	130	35	300
5-4-1	170	43	490
5-4-2	220	57	700
5-4-3	280	90	850
5-4-4	350	120	1000
5-5-0	240	68	750
5-5-1	350	120	1000
5-5-2	540	180	1400
5-5-3	920	300	3200
5-5-4	1600	640	5800
5-5-5	>2400	-	-