ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. BT medium มีสูตรดังนี้

1.1 stock BT salts (กรัมต่อลิตร)

$Na_2HPO_4.7H_2O$	79	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม
NH_2Cl	3	กรัม

1.2 PS1

$MgSO_4.7H_2O$	20	กรัม

1.3VS salts

EDTA	5	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	2.2	กรัม
$CaCl_2$	0.554	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.506	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.499	กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.11	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.157	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.161	กรัม

นำ stock BT salts 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น (agar)15 กรัม ต้มให้วุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเติม PS1 และ VS salts ที่ผ่านการกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วอย่างละ 5 มิลลิลิตร

2. DMSM medium มีสูตรดังนี้

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่นใดลงไป นอกจากสารที่จะใช้เป็นสับสเตรท เพื่อใช้ศึกษาการย่อยสลายเท่านั้น และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีส่วนประกอบที่สำคัญด้วยกัน 3 ส่วน คือ

2.1 ส่วนประกอบหลักที่เป็นเกลือ ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะต้องประกอบด้วยส่วนประกอบหลักดังนี้

KCl	1.3	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
NaCl	23.0	กรัม
NH_4Cl	0.5	กรัม

$CaCl_{2}.{}_{2}H_{2}O$	0.1	กรัม
$MgCl_{2}.6H_{2}O$	1.0	กรัม

นำส่วนผสมทีละอย่างค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จนครบทุกสาร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 สารละลาย Trace salt ประกอบด้วย

$CoCl_{2}.2H_{2}O$	2.2	กรัมต่อลิตร
$CuCl_{2}$	0.01	กรัมต่อลิตร
$H_{3}Bo_{3}$	0.38	กรัมต่อลิตร
$MnCl_{2}.4H_{2}O$	1.333	กรัมต่อลิตร
$Na_{2}MoO_{4}.2H_{2}O$	0.167	กรัมต่อลิตร
$NiCl_{2}.6H_{2}O$	0.10	กรัมต่อลิตร
$ZnCl_{2}$	0.14	กรัมต่อลิตร

2.3 สารละลายวิตามิน ประกอบด้วย

B_{12}	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Biotin	20	มิลลิลิตรต่อลิตร
Folic acid	20	มิลลิลิตรต่อลิตร
Nicotinic acid	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
p-aminobenzoic acid	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
Pantothenic acid	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
Pyridoxine HCl	100	มิลลิลิตรต่อลิตร
Riboflavin	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
Thiamin	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
Thiotic	50	มิลลิลิตรต่อลิตร
2.4 สารละลายไบคาร์บอเนต	84	กรัมต่อลิตร

สำหรับการเตรียม DMSM medium ทำได้โดยเตรียมสารแต่ละอย่างแยกกัน โดยสารละลายเกลือนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส และนำมาเติม Trace salt 5 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน 1 มิลลิลิตร และสารละลายไบคาร์บอเนต (84 กรัมต่อลิตร) 29.8 กรัม โดยทั้งนี้สารละลายวิตามิน, Trace salt และไบคาร์บอเนตจะนำมากรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนการนำมาเติมลงในสารละลายเกลือ

3. Nutrient Agar (NA) มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. MAC agar มีสูตรดังนี้

MAC agar (อาหารสูตรสำเร็จ) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Peptone 190 (Pancreatic digest of Gelatin)	17.0	กรัม
Peptone 180 (Animal Tissue-Casein Pol: peptone)	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salt # 3	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Neutral Red	0.03	กรัม
Crystal violet	1.001	กรัม

pH 7.1 $\pm$ 0.2

เตรียมตามฉลากที่ติดข้างขวดอาหารสำเร็จรูป เมื่ออาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (โดยการตั้งไฟ และเขย่าตลอดเวลา) จึงนำไปนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที จากนั้นนำไปเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ขณะที่อาหารมีอุณหภูมิ ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

5. Triptic soy agar มีสูตรดังนี้

Tryptone	17	มิลลิกรัม
Soytone	3	มิลลิกรัม
Sodium chloride	5	มิลลิกรัม
Dipotassium phosphate	2.5	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม

ละลาย Tryptoneในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. OF medium มีสูตรดังนี้

OF medium (อาหารสูตรสำเร็จ) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.5	กรัม
Dipotassium phosphate	0.3	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	2.0	กรัม
Carbohydarate	10.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

8. TSI agar (Difco) มีสูตรดังนี้

TSI agar (อาหารสูตรสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto-Beef extract	3.0	กรัม
Bacto-Yeast extract	3.0	กรัม
Bacto-Peptone	15.0	กรัม
Proteose-Peptone	5.0	กรัม
Bacto-Lactose	10.0	กรัม
Saccharose	10.0	กรัม
Bacto-Dextrose	1.0	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Bacto-Phenol red	0.024	กรัม
Bacto-Agar	12.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Simmom's Citrate agar (Difco) มีสูตรดังนี้

Simmom's Citrate agar (อาหารสูตรสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

$MnSO_4$	0.2	กรัม
$(NH_4)_2H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bacto-Bromthymol blue	0.08	กรัม
Bacto –Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Tryptic Soy Broth มีสูตรดังนี้

Tryptone	17	มิลลิกรัม
Soytone	3	มิลลิกรัม
Sodium chloride	5	มิลลิกรัม
Dipotassium phosphate	2.5	มิลลิกรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Plate count agar มีสูตรดังนี้

Plate count agar (อาหารสูตรสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อย ๆ ก่อน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ เก็บในขวดสีชา

2. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตัลไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก		
คริสตัลไวโอเลต	3.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์	20.0	มิลลิลิตร
สารละลาย ข		
แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และ ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

3. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)

ซาฟรานิน	0.25	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานินด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

4. สารละลายอินดิเคเตอร์เมทธิล เรด (Methyl red)

เมทธิล เรด	0.1	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์	300	มิลลิลิตร

ละลายเมทธิล เรดด้วยเอทานอล 95% แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้เป็น 500 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 40% โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร

6. สารละลายแอลฟ่า-แนฟทอล

α-naphthol	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชา

7. สารละลาย Kovac's

p-dimethylaminobenzoldehyde	10	กรัม
บิวทิลแอลกอฮอล์	150	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	50	มิลลิลิตร

ละลาย p-dimethylaminobenzoldehyde ในบิวทิลแอลกอฮอล์ทำให้ร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมด ทำให้เย็นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปช้าๆ เก็บในขวดสีน้ำตาลและไว้ในตู้เย็น สารทดสอบควรมีสีเหลืองอ่อน

8. สารละลายทดสอบเอนไซม์ไซโตรโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase test)

N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ก่อนการใช้ทุกครั้ง

9. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แอมโมเนีย

9.1 Alkaline stock solution

ใช้โซเดียมซิเตรท 100 กรัม กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 0.5 ลิตร

9.2 Oxidizing reagent

ใช้ Alkaline stock solution 4 ส่วน ผสมกับ Hypochlorite stock 1 ส่วน สารละลายนี้เตรียมเมื่อต้องการจะใช้ในแต่ละครั้ง แล้วเก็บไว้ในขวดทึบแสงปิดฝาให้สนิทจนกระทั่งถึงเวลาใช้

9.3 Sodium nitroprusside reagent

ใช้ Sodium nitroprusside 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 0.2 ลิตร

9.4 Phenol reagent

ใช้ Phenol 100 กรัม ละลายในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% จนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

10.สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ไนไตรต์

10.1 Sulphanilamide solution

ค่อย ๆ รินกรด HCl เข้มข้น 0.1 ลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 0.3 ลิตร คนให้เข้ากัน ชั่ง Sulphanilamide 5 กรัม แล้วนำมาละลายในสารละลายกรด แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 0.5 ลิตร

10.2 N-1-(naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NNED)

ใช้ NNED 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรครบ 0.5 ลิตร จะได้สารละลายสีชมพูจาง ๆ หรือไม่มีสี เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือน้ำตาลเข้มต้องเตรียมใหม่

11. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ไนเตรท

11.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมให้ครบ 1 ลิตร

11.2 สารละลายกรดซัลฟูริก

ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 500 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

11.3 สารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก

ละลายบรูซีน 1 กรัม และกรดซัลฟานิลิก 0.1 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 70 มิลลิลิตร แล้วใส่กรดเกลือเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะคงตัวอยู่ได้นานหลายเดือน ถ้ามีสีชมพูขึ้นก็ไม่กระทบกระเทือนต่อปฏิกิริยา

12. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ฟอสเฟต

12.1 Acid molybdate-antimony

ใช้น้ำกลั่น 0.5 ลิตร เติม Ammonium paramolybdate 7.5 กรัม แล้วใส่ Antimony potassium tartrate 0.14 กรัม และเติม Sulphuric acid 88 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดทึบแสง

12.2 Ascorbic acid solution

ใช้ Ascorbic acid 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 0.1 ลิตร สารละลายนี้เมื่อเตรียมแล้วต้องใช้ในเวลา 24 ชั่วโมง หากแช่ตู้เย็นก็สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นเวลา 2-3 วัน

12.3 Mixed molybdate

ใช้ Acid molybdate-antimony 4 ส่วน ผสมกับ Ascorbic acid solution 1 ส่วน สารละลายนี้ใช้ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

ภาคผนวก ค

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

หลักการ

เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนอะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังสมการ

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

การทดสอบ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนีแตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ดูฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที

การอ่านผล

ผลบวก : มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ : ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

2. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ Cytochrome oxidase ของแบคทีเรีย

หลักการ

แบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีขบวนการ oxidative phosphorylation สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ในระหว่างที่ขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้น จะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน โดยอาศัยการทำงานของไซโตโครมต่าง ๆ (cytochrome) ซึ่งก็คือ ลูกโซ่ของเอนไซม์นั่นเอง ผลที่ได้ทำให้เกิดน้ำ ไซโตโครมสุดท้ายที่จับออกซิเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม หรือยีสต์เป็น cytochrome C oxidase อย่างไรก็ตาม ในแบคทีเรียมีไซโตดครมมากมายที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ oxidase ตัวสุดท้ายในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ออกซิเจน

การตรวจสอบการมีเอนไซม์ cytochrome oxidase ใช้รีเอเจนต์ที่ปกติไม่มีสี ซึ่จะมีสีเข้มถูกออกซิไดซ์ รีเอเจนต์ที่ใช้มีสอบชนิดคือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride หรือ dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride รีเอเจนต์ทั้งสองชนิดปกติไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเมื่อถูกออกซิไดซี ดังนั้น แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ oxidase จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

การทดสอบ

เตรียมสารละลายรีเอเจนต์ 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ แล้วหยดสารละลายบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ใช้เข็มขีดเชื้อมาขีดบนแผ่นกระดาษกรองนั้น สีของแบคทีเรียที่เขี่ยลงบนกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วงภายใน 10 วินาที แสดงถึงผลบวก (อย่าใช้ไม้เขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็กหรือนิโครม อาจให้ผลบวกได้) การทดสอบอาจทำได้โดยหยดรีเอเจนต์โดยตรงลงบนโคโลนีที่เจริญบน Blood หรือ Chocolate agar แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วงให้เห็น

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองหรือสีน้ำเงินเข้มบนโคโลนีที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood หรือ Chocolate agar เมื่อหยดรีเอเจนต์ลงไป

ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นให้เห็น

3. การทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล (oxidation – fermentation test)

หลักการ

การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย การใช้น้ำตาลเหล่านี้จะได้กรด หรือกรดและก๊าซ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย โปรตีนเล็กน้อย โซเดียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ อินดิเคเตอร์ วุ้นและคาร์โบไฮเดรต การที่ใส่โปรตีนเพียงเล็กน้อยเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดด่างที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากขบวนการ deamination

การทดสอบ

โดยการเพาะเชื้อลงในอาหารแต่ละหลอด (2 หลอด) หลอดหนึ่งคลุมอาหารที่เพาะเชื้อแล้วด้วย mineral oil หรือพาราฟิน แต่อีกหลอดไม่คลุม สำหรับแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือเกิดการออกซิเดชัน ซึ่งต้องการออกซิเจนร่วมปฏิกิริยาด้วย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถให้กรดในหลอดที่เปิดอยู่ แต่จะไม่สามารถให้กรดในหลอดที่มีพาราฟินคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้จะให้กรดทั้งสองหลอด แบคทีเรียเหล่านี้ถูกเรียกว่า asaccharolytic การเกิดกรดทำให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลงสามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ได้ ถ้าอินดิเคเตอร์เป็น phenol red ซึ่งมีสีเหลืองในสภาพที่เป็นกรดและให้สีแดงในสภาพที่เป็นด่าง แบคทีเรียบางชนิดขณะเกิดการหมักย่อย (fermentaton) ยังให้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติค ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งตรวจสอบโดยใส่ Durham tube ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

4. การทดลอบการใช้น้ำตาลแลคโตสด้วย Macconkey agar (MAC agar)

หลักการ

MAC agar ประกอบด้วยโปรตีน เกลือน้ำดี โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลแลคโตส วัน และสี 2 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้ สี crystal violet และเกลือน้ำดี ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบเจริญได้ดี และสามารถจำแนกคุณสมบัติการหมักย่อยน้ำตาลแลคโต แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส เมื่อเจริญแล้วให้โคโลนีสีแดง หรือสีชมพู และรอบ ๆ โคโลนีอาจเห็นตะกอนของเกลือน้ำ ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด สีแดงนั้นเป็นผลมาจากสีของ neutral red ในสภาวะที่เป็นกรด (pH ต่ำกว่า 6.8) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่สามรถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส เช่น Shigella และ Salmonaella โคโลน่จะไม่มีสี และใส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเลย สำหรับ Yersinia enterocolitica เห็นเป็นโคโลนี้เล็กๆ และไม่มีสี

การทดสอบ

เพาะเชื้อหรือสิ่งตรวจลงบน MAC agar โดยขีดเพื่อให้โคโลนีแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อย่านำไปบ่มในที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การอ่านผล

ผลบวก : โคโลนีมีสีชมพู แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส

ผลลบ : โคโลนีใส (ไม่มีสี) แสดงว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลงที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส

5. การทดสอบ Indole (Indole Test)

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต Indole จากทริปโตเฟน (tryptophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth ประกอบด้วย tryptophan rich peptone และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อทริปโตเปตในเป็ปโตนถูกออกซิไดส์โดยแบคทีเรียให้ Indole, skatole และ indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ trytophanase) ซึ่งสามารถตรวจสอบผลที่ได้จากการตรวจสอบ Indole โดยใช้ alcoholic p-dimethylaminobenzaldahyde โดย Indole จะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ (aldehyde) ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer)

การทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน tryptophan broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent โดยการหยด Kovacs ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าใช้ Ehrilch's reagent ขั้นแรกใส่อีเทอร์ (ether) ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วหยดรีเอเจนต์ลงไป 5 หยด อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : สีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง

ผลลบ : สีของรีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนสี

6. การทดสอบการใช้น้ำตาลใน Triple Sugar Iron (TSI)

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSI ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส ทำให้ได้กรดและอาจได้ก๊าซเป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนั้น ยังเป็นการทดสอบถึงความสามารถของแบคทีเรียในการให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วย (H_2S)

หลักการ

TSI agar ประกอบด้วยโปรตีน โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส แหล่งซัลเฟอร์ อินดิเคเตอร์และวุ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส 10 เท่า ของน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนโดยขบวนการหายใจ (respiration) จะให้กรด สังเกตได้โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและจะเห็นสีเหลือง หรือมีกรดเกิดขึ้นเฉพาะที่ก้นหลอดมากกว่าบริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (slant) แบคทีเรียที่เจริญบน TSI สามารถให้ผลผลิตเป็นด่างจากการใช้เปปโตนโดยใช้วิธี oxidative decarboxylation ทำให้เห็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่สัมผัสกับอากาศ (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังนั้น แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส จะเห็นบนผิวหรือน้ำวุ้นเป็นสีแดง และสร้างกรด (สีเหลือง) ที่ก้นหลอด หลังจากบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สำหรับแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส หรือน้ำตาลซูโครส (หรือทั้งสองอย่าง) รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส จะให้ปริมาณกรดมาก ถึงแม้จะเกิด oxidative deamination ซึ่งให้แอมโมเนียที่มีคุณสมบติทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่างก็ไม่เพียงพอที่จะสามารถเปลี่ยนพีเอชจึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพกรดจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าว ดังนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดทั้งบนผิววุ้นและก้นหลอด จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส หรือน้ำตาลซูโครสหรือทั้งสองชนิด สำหรับการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน สังเกตได้จากรอยแตกหรือ

ฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์นั้นเกิดขึ้นจากขบวนการรีดักชันของ thiosulfate ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์นี้ไม่มีสี ดังนั้นตรวจสอบได้โดยใช้ ferric ammonium sulfate (อินดิเคเตอร์) โดยที่เมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์รวมตัวกับเฟอร์ริค อิออน (ferric ion) จะเกิดตะกอนสีดำ เรียกว่าเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfide) และขบวนการรีดักชันดังกล่าวเกิดเฉพาะสภาพที่เป็นกรดเท่านั้น และมักเกิดบริเวณก้นหลอด

การทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการขีดเชื้อบนผิวหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่ขีดเชื้อในตอนแรกลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

6.1 ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ

6.1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวบนผิววุ้น (slant) ที่มีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (Alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) เปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) อ่านผลว่า K/A

6.1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตสหรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A/A

6.1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆ ได้เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N, K/N, K/K (K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม, N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

6.2 การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตกหรือสังเกตเห็นฟองอากาศ

6.3 การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำของตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอด ถ้าเป็นสีดำบนผิวของวุ้น (slant) เป็นสีแดงของโคโลนีมากกว่า

7. การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test)

หลักการ

ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบโดยอาศัยความสามารถในการใช้ซิเตรต (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยอาศัยแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรตจะผลิตเอนไซม์ citriase ย่อยซิเตรตให้ผลผลิตเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และอะซิเตต (acetate) และยังมีเอนไซม์อีกชนิดคือ oxaloacetate decarboxylate ซึ่งสามารถย่อยอะซิเตตไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้จะรวมตัวกับโซเดียมและน้ำได้เป็น

โซเดียมคาร์บอเนตและสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงขึ้นและสีของอินดิเคเตอร์บรอมไธมอลบลูในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Citrate Agar, Simmons เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

การทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Citrate Agar, Simmons บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

8. การทดสอบการสร้างกรดและการหมักน้ำตาลกลูโคส

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดปริมาณมากๆ จากน้ำตาลกลูโคสและให้ผลผลิตที่เรียกว่า อะเซตโตอิน (acetoin) หลักการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae อะเซตโตอินมีชื่อทางด้านเคมีว่า acetylmethyl carbinol

หลักการ

แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์มากมายหลายชนิด กับกลุ่มที่สามารถให้ butylenes glycol แบคทีเรียกลุ่มแรกเช่น *Escherichia coli* ผลิตกรดอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดอะซีติค กรดฟอร์มิคและกรดซัคซินิค ส่วนกลุ่มที่สอง เช่น *Klebsiella* spp. และ *Enterobacter* spp. ผลิตกรดอินทรีย์บ้าง และผลิตให้ 2,3-butanediol เป็นผลผลิตหลัก

MR test ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ให้กรด (กลุ่มแรก) การทดสอบทำได้โดยการหยด Methyl red indicator ลงบน MR-VP test broth ที่บ่มเชื้อไว้แล้ว ปริมาณกรดที่แบคทีเรียผลิตมาก ๆ นี้ สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง (อินดิเคเตอร์จะเป็นสีแดง ถ้า pH < 4.4 และจะมีสีเหลืองที่ pH > 6.0)

VP test เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะเซโตอิน (acetylmethyl carbinol หรือ acetoin) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylenes glycol การทดสอบใส่รีเอเจนต์ 2 ชนิด คือ α-naphthol และ 40% potassium hydroxide (KOH) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งบ่มไว้แล้ว เขย่าให้เข้ากัน และเพื่อให้ออกซิเจนจากอากาศเข้าไปผสมด้วย ถ้ามีอะเซโตอิน อะเซโตอินจะถูกออกซิไดซ์ในภาพที่มีออกซิเจนและ KOH ได้ผลผลิตเป็น diacetyl และ diacetyl นี้จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม guanidine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเปปโตน (peptone) ในสภาพที่เป็นด่าง (KOH) โดยมี α-naphthol เป็นตัวคาตาลิสต์ (catalyst) และให้ผลเป็นสารประกอบสีแดง

การทดสอบ

เพาะเชื้อลงใน MR-VP broth 2 หลอด มีอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 1 มิลลิลิตร (ปริมาณน้อย เพิ่มออกซิเจน) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลกลูโคสถูกเมตาโบไลต์ ให้ 2,3-butanediol (กลุ่มที่ผลิต butylenes glycol)

MR-Test หยด Methyl red reagent 5 หยด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบเจริญอยู่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น

VP-test ใส่รีเอเจนต์ตัวแรก (α-naphthol) ลงไป 0.6 มิลลิลิตร เขย่าหลอด แล้วใส่รีเอเจนต์ตัวที่สอง (KOH) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ วางทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตการเกิดสีแดง ถ้ายังไม่มีสีแดงเกิดขึ้นทิ้งไว้ต่อไปอีก 45 นาที ดูผล

การอ่านผล

ผลบวก : MR-Test เปลี่ยนเป็นสีแดง, VP-test เกิดสีแดงให้เห็น ภายใน 15-45 นาที

ผลลบ : MR-Test เปลี่ยนเป็นสีเหลือง, VP-test ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

9. การทดสอบการเจริญในอุณหภูมิสูง

หลักการ

เป็นการทดสอบความทนการในการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ ขณะบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติ คือ 42 องศาเซลเซียส ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม nonfermenter โดยเฉพาะ *Pseudomonas aeruginosa* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แต่สำหรับ *Pseudomonas fluorescens* ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อขณะบ่มที่อุณหภูมิสูงได้ อาจเป็นได้ว่า เอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสได้

การทดสอบ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน Tryptic soy agar หรือ Brain heart infusion agar 2 หลอดเท่า ๆ กัน หลอดหนึ่งนำไปบ่มไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนอีกหลอดนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เปรียบเทียบผล

การอ่านผล

ผลบวก : มีแบคทีเรียเจริญทวีจำนวนทั้ง 2 หลอด และมีความขุ่นเท่าๆ กัน

ผลลบ : มีแบคทีเรียเจริญเฉพาะในหลอดที่บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส สำหรับอีกหลอดซึ่งบ่มไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส ไม่มีเชื้อขึ้น

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและกราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานและกราฟมาตรฐาน

1.1 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานความเข้มข้น 0.1-0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถเตรียมได้ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำแอมโมเนียมคลอไรด์ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไปเตรียมสารละลายสต๊อกแอมโมเนีย โดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 3.818 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 6 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

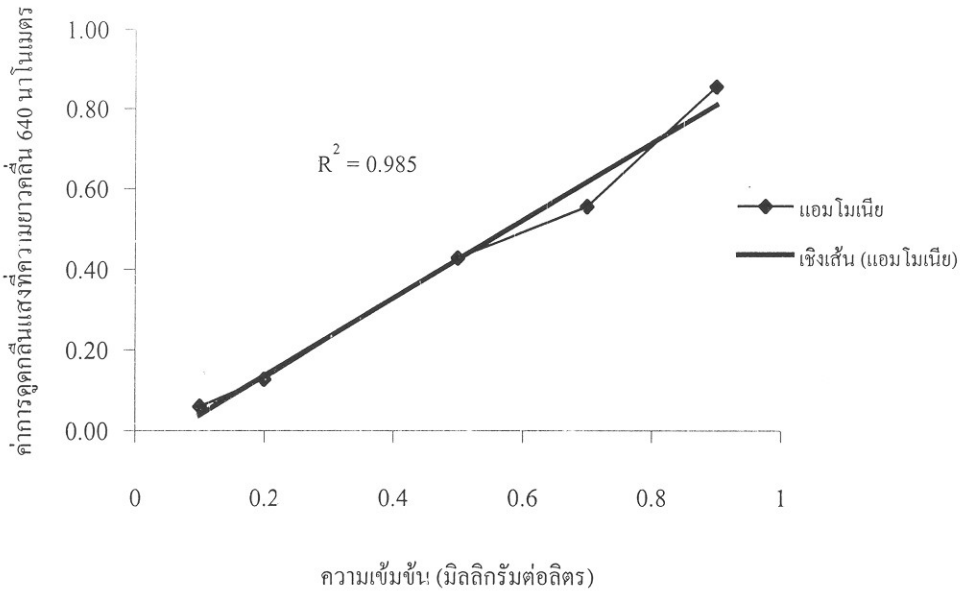
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายแอมโมเนีย (มิลลิลิตร)
0.1	0.01
0.2	0.02
0.5	0.05
0.7	0.07
0.9	0.09

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียตามวิธีของไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 7

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ ความเข้มข้น 0.1-0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร
0.1	0.060
0.2	0.127
0.5	0.428
0.7	0.556
0.9	0.856

จากข้อมูลในตาราง 7 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 105



ภาพที่ 105 แสดงกราฟมาตรฐานของแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 0.1-0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานความเข้มข้น 0.1-0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถเตรียมได้ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำแอมโมเนียมคลอไรด์ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไปเตรียมสารละลายสต๊อกแอมโมเนีย โดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 3.818 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 8 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 0.1-0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร

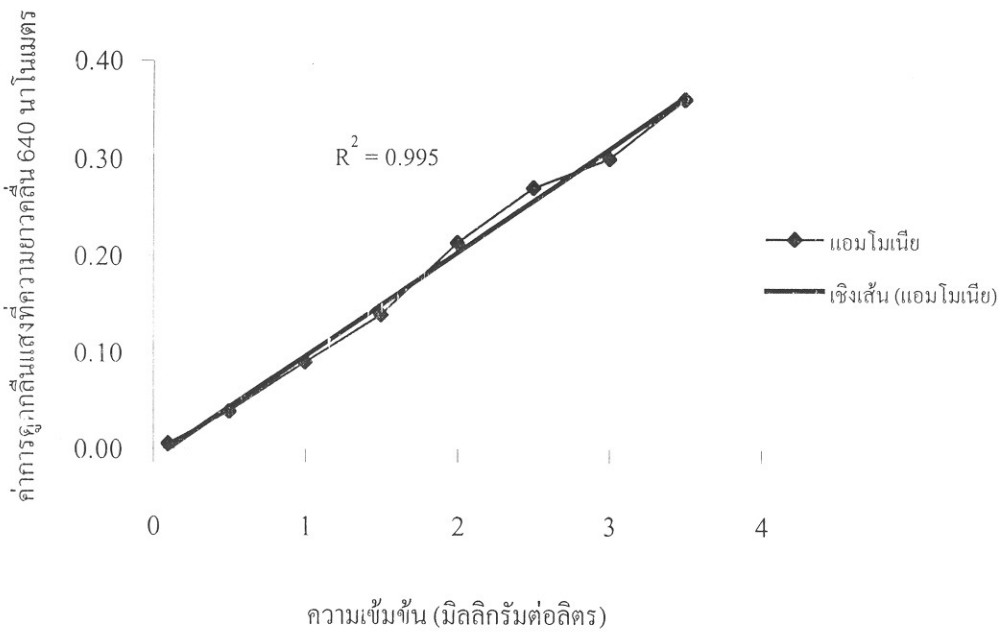
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายแอมโมเนีย (มิลลิลิตร)
0.1	0.01
0.5	0.05
1.0	0.1
1.5	0.15
2.0	0.20
2.5	0.25
3.0	0.30
3.5	0.35

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ได้ประยุกต์มาจากตามวิธีของไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ ด้วยการเจือจางความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 เท่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 9

ตารางที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ ความเข้มข้น 0.1-0.0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายแอมโมเนีย (มิลลิลิตร)
0.1	0.01
0.5	0.04
1.0	0.09
1.5	0.14
2.0	0.21
2.5	0.27
3.0	0.30
3.5	0.36

จากข้อมูลในตาราง 9 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 106



ภาพที่ 106 แสดงกราฟมาตรฐานของแอมโมเนียเจือจาง 10 เท่า ที่ความเข้มข้น 0.1-0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรทและกราฟมาตรฐาน

2.1 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมาตรฐานความเข้มข้น 2-10 ไมโครกรัม

สามารถเตรียมได้โดยนำแอนไฮดรัสโปแตสเซียมไนเตรท (KNO_3) 721.8 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นี้จะใช้เป็นสารละลายสต๊อกไนเตรท จากนั้นนำสารละลายสต๊อกไนเตรท 20.0 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนเตรท แล้วนำไปใช้เตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 10 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่ความเข้มข้น 2-10 ไมโครกรัม

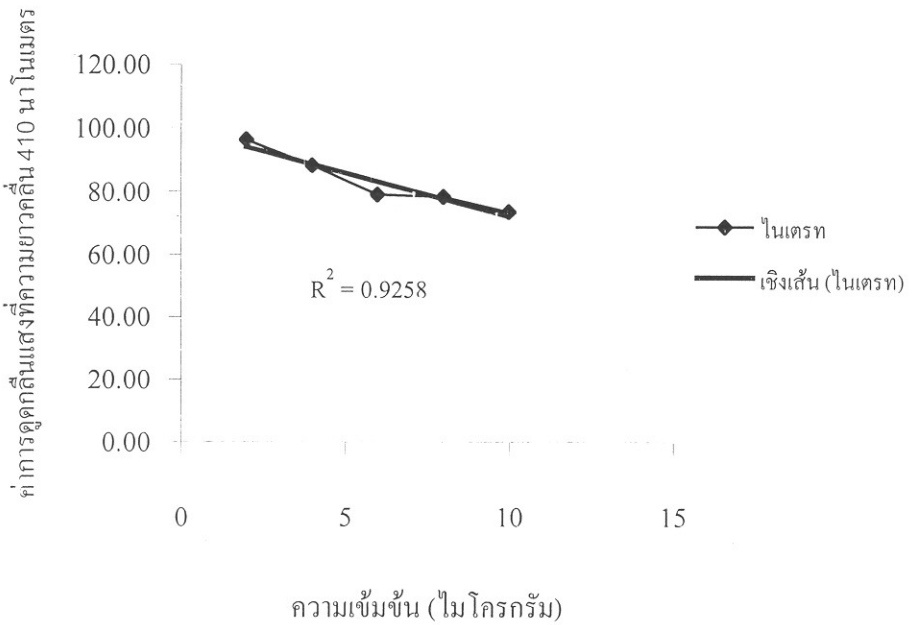
ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ปริมาตรสารละลายไนเตรท (มิลลิลิตร)
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5

เติมลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร นำสารละลายไนเตรทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทตามวิธีของมั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 11

ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทที่ความเข้มข้น 2-10 ไมโครกรัม และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
2	96.37
4	88.23
6	79.07
8	78.40
10	73.63

จากข้อมูลในตาราง 11 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 107



ภาพที่ 107 แสดงกราฟมาตรฐานของไนเตรทที่ความเข้มข้น 2-10 ไมโครกรัม

จากกราฟมาตรฐานที่ได้สามารถนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนเตรทในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ได้จากสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ไนเตรท-ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ไมโครกรัมที่อ่านได้จากกราฟ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

2.2 การเตรียมสารละลายไนเตรทมาตรฐานความเข้มข้น 0.5-17 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถเตรียมได้ในขวดปรับปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยนำโปแตสเซียมไนเตรทที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไปเตรียมสารละลายสต๊อกไนเตรท โดยละลายโปแตสเซียมไนเตรท 0.5056 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 12 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างกันปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากสารละลายสต็อกมาตรฐาน

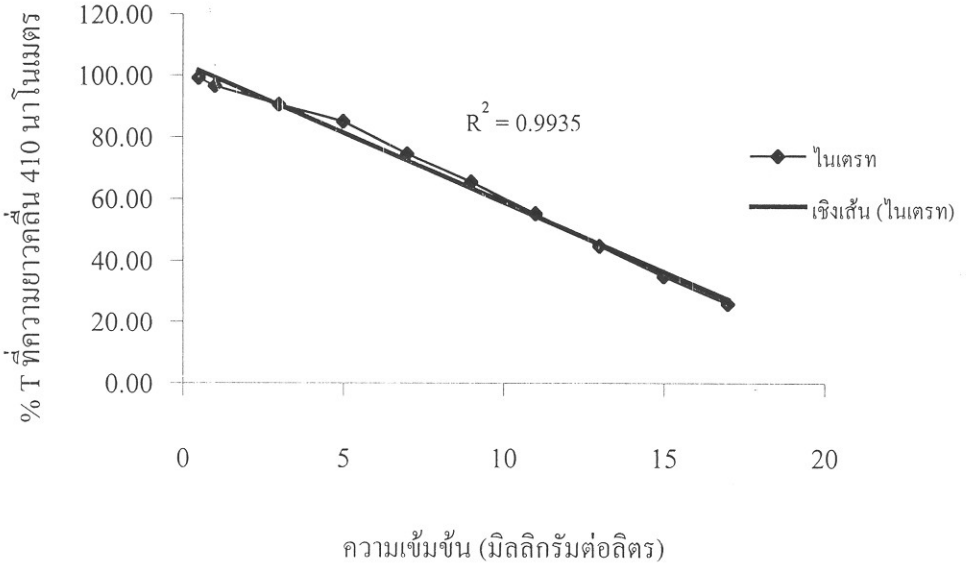
ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ปริมาตรสารละลายไนเตรท (มิลลิลิตร)
500	0.25
1000	5.0
3000	15.0
5000	25.0
7000	35.0
9000	45.0
11,000	55.0
13,000	65.0
15,000	75.0
17,000	85.0

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ได้ประยุกต์มาจากตามวิธีของธงชัย พรรณสวัสดิ์และอุษา วิเศษสุมน ด้วยการเจือจางความเข้มข้นของโปแตสเซียมไนเตรท 40 เท่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 13

ตารางที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.5-17 มิลลิกรัม ต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของไนเตรท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
0.5	0.25
1	0.50
3	1.50
5	2.50
7	3.50
9	4.50
11	5.50
13	6.50
15	7.50
17	8.50

จากข้อมูลในตาราง 13 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 108



ภาพที่ 108 แสดงกราฟมาตรฐานของไนเตรทเจือจาง 40 เท่า ที่ความเข้มข้น 0.5-17 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรต์และกราฟมาตรฐาน

3.1 การเตรียมสารละลายไนไตรต์มาตรฐานความเข้มข้น 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำโซเดียมไนไตรต์ที่อบแห้งแล้ว ไปเตรียมสารละลายสต๊อกไนไตรต์ โดยละลายโซเดียมไนไตรต์ 0.4926 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 14 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

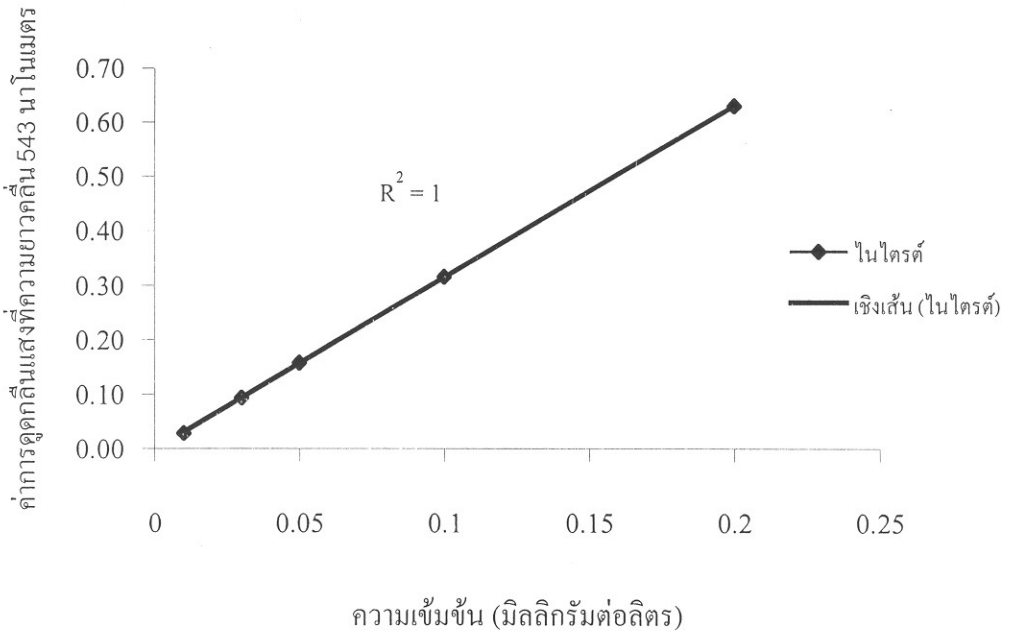
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายไนไตรต์ (มิลลิลิตร)
0.01	0.01
0.03	0.03
0.05	0.05
0.1	0.1
0.2	0.2

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ตามวิธีของ ไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนไตรต์และค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 15

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร
0.01	0.029
0.03	0.094
0.05	0.158
0.1	0.315
0.2	0.629

จากข้อมูลในตาราง 15 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนไตรต์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 109



ภาพที่ 109 แสดงกราฟมาตรฐานของไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การเตรียมสารละลายไนไตรต์มาตรฐานความเข้มข้น 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถเตรียมได้ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำโซเดียมไนไตรต์ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไปเตรียมสารละลายสต๊อกไนไตรต์ โดยละลายโซเดียมไนไตรต์ 0.0345 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 16 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

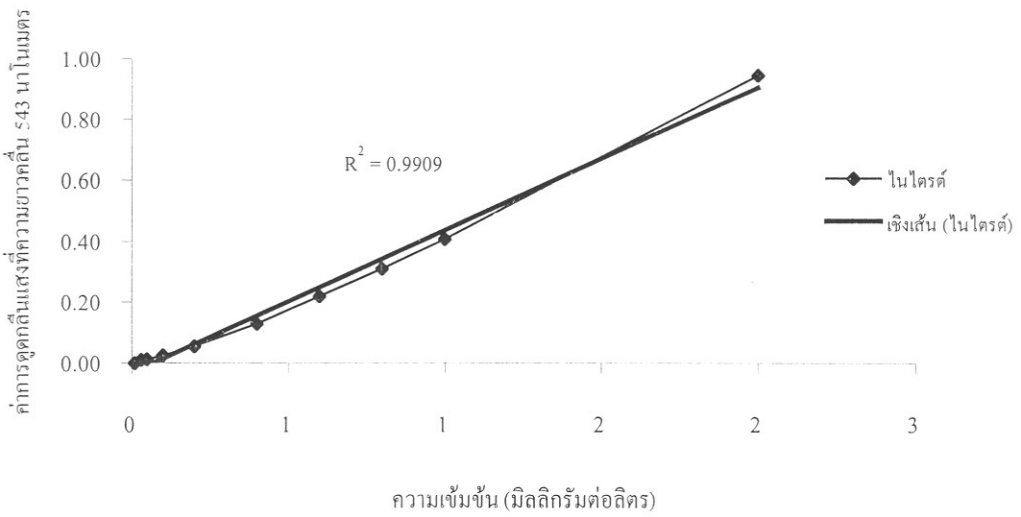
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายไนไตรต์ (มิลลิลิตร)
0.01	0.01
0.03	0.03
0.05	0.05
0.10	0.10
0.20	0.20
0.40	0.40
0.60	0.60
0.80	0.80
1.0	1.0
2.0	2.0

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ได้ประยุกต์ตามวิธีของไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนไตรต์และค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 17

ตารางที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร
0.01	0
0.03	0.01
0.05	0.01
0.10	0.03
0.20	0.05
0.40	0.13
0.60	0.22
0.80	0.31
1.0	0.41
2.0	0.95

จากข้อมูลในตาราง 17 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 110



ภาพที่ 110 แสดงกราฟมาตรฐานของไนไตรต์เจือจาง 10 เท่า ที่ความเข้มข้น 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตและกราฟมาตรฐาน

4.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตมาตรฐานความเข้มข้น 0.005-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไปเตรียมสารละลายสต๊อกฟอสเฟต โดยละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2197 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 18 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.005-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

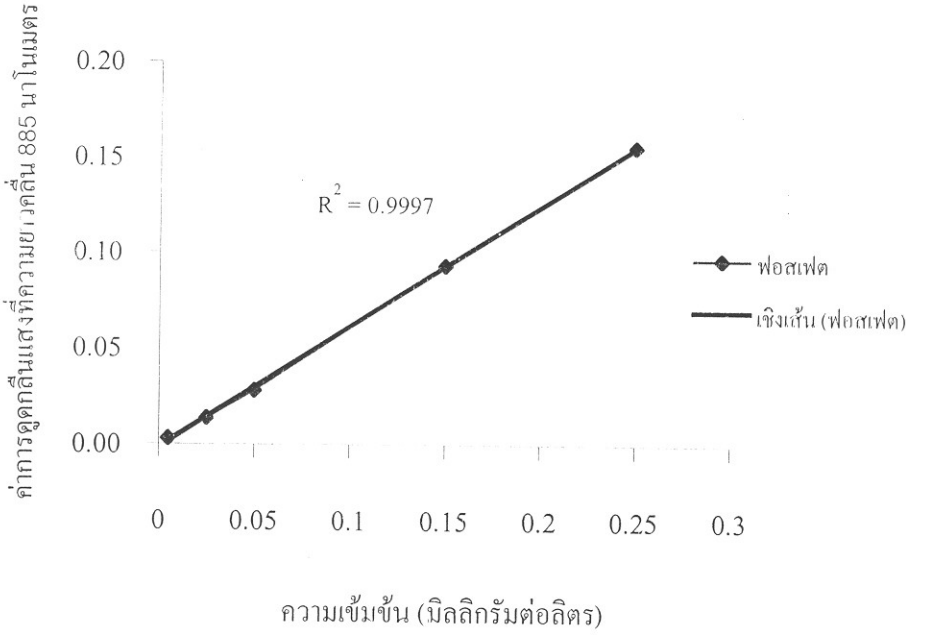
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายฟอสเฟต (มิลลิลิตร)
0.005	0.01
0.025	0.02
0.050	0.1
0.15	0.3
0.25	0.5

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตตามวิธีของ ไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 19

ตารางที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.005-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
0.005	0.003
0.025	0.014
0.050	0.028
0.15	0.093
0.25	0.156

จากข้อมูลในตาราง 19 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 111



ภาพที่ 111 แสดงกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.005-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 การเตรียมสารละลายไนไตรต์มาตรฐานความเข้มข้น 0.01-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไปเตรียมสารละลายสต๊อกฟอสเฟต โดยละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2197 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ไปเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 20 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.01-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

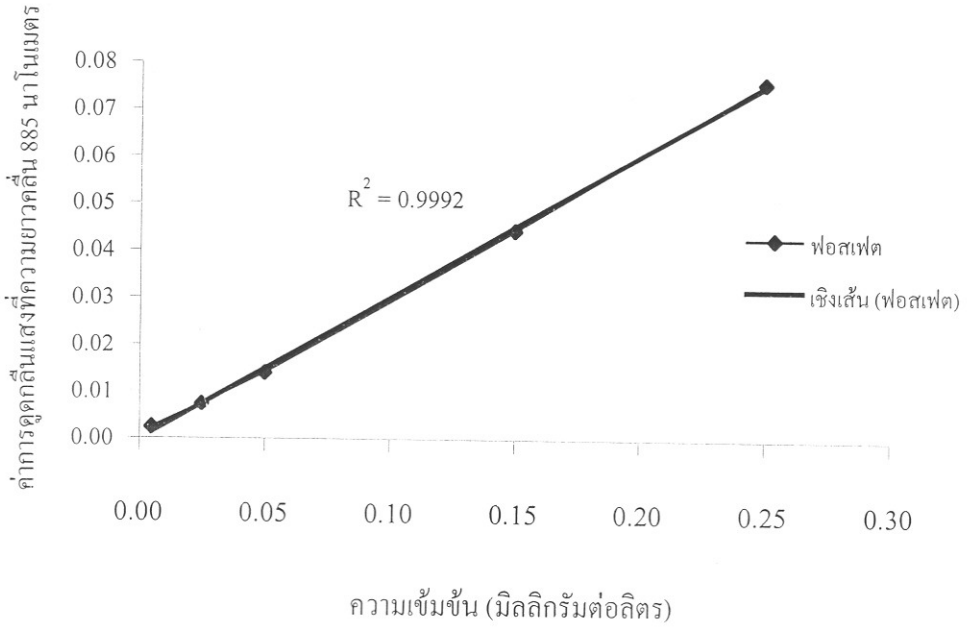
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลายฟอสเฟต (มิลลิลิตร)
0.01	0.02
0.03	0.06
0.05	0.1
0.15	0.3
0.25	0.5

เติมลงในขวดปรับปริมาตรและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต ซึ่งวิธีวิเคราะห์ได้ประยุกต์มาจากตามวิธีของไมตรี ดวงแก้วและจารุวรรณ สมศิริ ด้วยการเจือจางโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 เท่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 21

ตารางที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.01-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
0.005	0.0
0.025	0.01
0.050	0.01
0.15	0.04
0.25	0.08

จากข้อมูลในตาราง 21 สามารถเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 112



ภาพที่ 112 แสดงกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตเจือจาง 1 เท่า ที่ความเข้มข้น 0.01-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร