ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

น้ำยาเคมี

1. 1 N HCl

HCl เข้มข้น	8.3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

2. Methylene Blue Solution

Methylene Blue	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

3. 1 N NaOH

NaOH	4 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์ทางเคมี

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามวิธีของ (Miller, 1955 อ้างถึงใน วรรณภา นัยบุตร, 2532)

1. นำจานอลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จะได้น้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในเดสซิเคเตอร์แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ถ่ายใส่จานอลูมิเนียมที่ชั่งหาน้ำหนักไว้แล้ว

3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ทิ้งให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน หักลบค่าน้ำหนักจานอลูมิเนียม ผลต่างที่ได้จะเป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi-Nelson, 1944 อ้างถึงใน วรรณภา นัยบุตร, 2532)

1. สารเคมี

1.1 Somogyi Reagent (Copper Reagent: Solution A)

1.1.1 ละลาย Sodium Potassium Tartrate 12 กรัม และ Anhydrous Sodium Carbonate (Na_2CO_3) 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้ม 250 มิลลิลิตร

1.1.2 เติม $CuSO_4 . 5H_2O$ 4 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.1.3 เติม $NaHCO_3$ 16 กรัม คนให้ละลาย

1.1.4 เติม Anhydrous Na_2SO_4 180 กรัมละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (ต้มให้ละลาย ทำให้เย็น แล้วจึงเติม)

1.1.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นต้มเป็น 1 ลิตร

1.1.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้

1.2 Nelson Reagent (Solution B)

1.2.1 ละลาย Ammonium Molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

1.2.2 เติม H_2SO_4 ปริมาตร 21 มิลลิลิตร และ $NaHAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

1.2.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส

1.3 Standard Glucose

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ใช้ D-Glucose ที่ความเข้มข้น 15, 30, 50, 75, 120 และ 150 ไมโครกรัมมิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น

2. การวิเคราะห์

2.1 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางจนมีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ระหว่าง 15 ถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเตรียมเป็นกราฟมาตรฐาน

2.2 เติม Copper Reagent 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำเย็นจัดเพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.3 เติม Nelson Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

2.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด OD ที่ 520 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

การหาค่าซีโอดีวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (Close Reflux Method) (ธงชัย พรรณสวัสดิ์และวิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์, 2540)

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 หลอดย่อย (Digestion Vessels) เป็นหลอดแก้วซึ่งใช้เลี้ยงเชื้อขนาด 16x100 หรือ 20x150 หรือ 25x150 มิลลิเมตร มีฝาสลักเกลียว

1.2 ตู้อบ

1.3 บิวเรต

1.4 ขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

2.1 สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หนัก 4.913 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 167 มิลลิลิตรและปรอทซัลเฟต 33.3 กรัม คนให้ละลาย ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.2 กรดซัลฟุริคและซิลเวอร์ซัลเฟต

ชั่งซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 8.8 กรัม ใส่ลงในกรดซัลฟุริคเข้มข้น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายได้ทั้งหมด ก่อนนำไปใช้ต่อไป

2.3 สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.05 นอร์มัล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 .6H_2O$) 19.6 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.4 สารละลายเฟอร์โรอีนอินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีน โมโนไฮเดรต (1,10-Phenanthroline Monohydrate, $C_{12}H_8N_2H_2O$) 1.485 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต (Ferrous Sulfate, $FeSO_4.7H_2O$) 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลาย FAS

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 0.1 นอร์มัล 5.0 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปกรวย เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงค่อย ๆ เติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เติมเฟอโรอีน 2-3 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS จนได้สีน้ำตาลเป็นจุดยุติ ความเข้มข้นของ FAS , นอร์มัล (N) = (5.0 x 0.1)/ ml FAS ที่ใช้

2.5 สารละลายกลูโคส

ละลายกลูโคส 486.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะมีค่าซีโอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลูโคส 1 กรัม จะให้ซีโอดี 1.067 กรัม) สารละลายกลูโคสจะไม่ค่อยคงตัวเพราะสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว

3. วิธีวิเคราะห์

3.1 เลือกขนาดของหลอดแก้วสำหรับต้มซีโอดีให้เหมาะสม

ถ้าตัวอย่างน้ำมีซีโอดีต่ำให้เลือกใช้หลอดแก้วขนาด 25x150 มิลลิเมตร (ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 5 มิลลิลิตร) และถ้าซีโอดีสูงสามารถใช้หลอดแก้วขนาด 16x100 มิลลิเมตร (ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 2.5 มิลลิลิตร) ไม่จำเป็นต้องใช้หลอดหลายขนาดใช้เพียง 2 ขนาด คือ 25x150 มิลลิเมตร สำหรับหาซีโอดีที่มีค่าต่ำและขนาด 20x150 มิลลิเมตร สำหรับหาซีโอดีที่มีค่าสูง ถ้าตัวอย่างมีค่าสูงมากก็ให้เจือจางตัวอย่างน้ำก่อน

3.2 การเลือกปริมาตรตัวอย่างน้ำ

ถ้าเป็นน้ำสะอาด น้ำธรรมชาติหรือน้ำที่มีค่าซีโอดีต่ำ ๆ (< 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) ควรใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดแก้วขนาด 25x150 มิลลิเมตร แต่ถ้ามีค่าซีโอดีสูงกว่านั้นให้ใช้หลอดแก้วขนาด 20x150 มิลลิเมตร โดยเลือกใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำมากที่สุด 5 มิลลิลิตร หรือใช้น้อยกว่า แล้วเติมน้ำกลั่นให้เป็น 5 มิลลิลิตร และถ้าตัวอย่างน้ำมีค่าซีโอดีสูงมากต้องเจือจางตัวอย่างน้ำก่อนนำมาใช้ ควรประมาณค่าซีโอดีของตัวอย่างน้ำอย่างคร่าว ๆ ก่อนเพื่อที่จะได้เลือกใช้ปริมาณตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม การประมาณค่าซีโอดีสามารถทำได้โดยพิจารณาจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะตัวอย่างน้ำ แหล่งที่มาของน้ำ และค่า Rapid COD การเลือกขนาดตัวอย่างน้ำที่จะใช้วิเคราะห์ให้เหมาะสมอาจดูได้จากตารางภาคผนวก ข-1

3.3 ใส่น้ำตัวอย่างลงในหลอดแก้วขนาดเหมาะสม เติมน้ำยาย่อยสลายหรือโปตัสเซียมไดโครเมต ตามด้วยกรดซัลฟุริคอย่างช้า ๆ ในปริมาณที่แสดงอยู่ในตารางภาคผนวก ข-2 (ถ้าใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำน้อยกว่าที่แสดงไว้ในตารางให้เติมน้ำกลั่นให้ครบตามจำนวน) ปิดฝาให้แน่นและเขย่าผสมกันให้ดี สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแล้วทำเหมือนตัวอย่างทุกอย่าง

3.4 วางหลอดแก้วในบล็อคแล้วใส่ตู้อบ ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.5 เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้วนำออกจากตู้อบปล่อยทิ้งให้เย็น

3.6 เทสารละลายออกจากหลอดแก้วลงในขวดรูปกรวย ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างสารละลายในหลอดแก้วให้หมดแล้วเทรวมในขวดรูปกรวย เติมเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน FAS สีของสารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นเขียวอมเหลืองเป็นสีฟ้าและสีน้ำตาลแดง ซึ่งแสดงว่าถึงจุดยุติ จดปริมาณ FAS ที่ใช้ไตเตรต

3.7 การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี, มิลลิกรัม/ลิตร} = \frac{(A-B)xNx8000}{\text{ml ของตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์

B = มิลลิลิตรของ FAS ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่างน้ำ

N = ความเข้มข้นของ FAS, นอร์มัล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางภาคผนวก ข-1 ขนาดตัวอย่างและอัตราเจือจางที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาซีโอดี

ช่วงซีโอดี	ขนาดตัวอย่าง (ml)	อัตราเจือจาง
< 200	5	1: 1
200-400	4	1: 1
400-800	2	1: 1
800-1,600	1	1: 1
1,600-3,200	5	1: 10
2,700-5,300	3	1: 10
4,000-8,000	4	1: 20
8,000-16,000	2	1: 20
13,000-26,500	3	1: 50
20,000-40,000	2	1: 50
40,000-80,000	2	1: 100
80,000-160,000	1	1: 100

*เมื่อใช้ FAS ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล และโปแตสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ตารางภาคผนวก ข-2 ขนาดของหลอดแก้ว ปริมาตรตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม

ขนาดหลอดแก้ว (ml)	ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (ml)	สารละลายไดโครเมต (ml)	สารละลายกรดซัลฟุริค (ml)	ปริมาตรทั้งหมด (ml)
16x100	2.5	1.5	3.5	7.5
20x150	5.0	3.0	7.0	15.0
25x150	10.0	6.0	14.0	30.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารแขวนลอย (รตีวรรณ อ่อนรัศมี, 2536)

สารแขวนลอยหรือเอสเอส หมายถึง ปริมาณของแข็งแขวนลอยที่สามารถกรองได้ด้วยกระดาษกรองใยแก้ว ("Whatman" GF/C)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรองใยแก้ว GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร
2. กรวยบุคเนอร์
3. เครื่องดูดอากาศ
4. เตาอบแห้ง
5. เดสซิเคเตอร์
6. เครื่องชั่ง

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นทำให้เย็นในเดสซิเคเตอร์
2. ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้วสมมติ เป็น A
3. นำกระดาษกรองวางบนชุดกรอง กรองล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้ดูดน้ำออกจากกระดาษกรองจนหมด
4. ตวงตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตรหรือปริมาตรที่เหมาะสม การเลือกปริมาตรของตัวอย่างขึ้นอยู่กับลักษณะของน้ำถ้าตัวอย่างน้ำมีสารแขวนลอยมาก ควรใช้ปริมาตรน้อย ๆ
5. กรองตัวอย่างน้ำผ่านกระดาษกรองทีละน้อยอย่างต่อเนื่องจนหมด ฉีดล้างภาชนะตวงตัวอย่าง และรอบ ๆ ภาชนะชุดกรองด้วยน้ำกลั่น เทลงกรองจนหมด
6. กรองจนกระดาษกรองใยแก้วแห้ง
7. นำกระดาษกรองใยแก้วไปอบไล่ความชื้น ที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง
8. ทำให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว สมมติเป็น B

การคำนวณ

$$\text{สารแขวนลอย (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(B-A)\times 1000}{C}$$

เมื่อ A = น้ำหนักกระดาษกรอง, กรัม

B = น้ำหนักกระดาษกรองและของแข็ง, กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

C = ปริมาตรน้ำตัวอย่าง, มิลลิลิตร

สารทั้งหมด (Total solid) (รตีวรรณ อ่อนรัศมี, 2536)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานระเหย
2. เครื่องอังน้ำ
3. เตาอบแห้ง
4. เครื่องชั่ง

วิธีวิเคราะห์

1. นำจานระเหยไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดสซิเคเตอร์แล้วชั่งหาน้ำหนัก สมมติเท่ากับ A

2. เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำให้เหมาะสม โดยปกติใช้ 50 หรือ 100 มิลลิลิตร

3. ค่อย ๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการหาลงในถ้วยระเหยที่ตั้งบนเครื่องอังน้ำ เมื่อไอน้ำระเหยออกหมดแล้ว ให้นำจานระเหยไปอบที่เตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในเดสซิเคเตอร์

4. ชั่งจานระเหยทันทีที่เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง สมมติเท่ากับ B (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักของปริมาณสารทั้งหมด)

การคำนวณ

$$\text{ทีเอสหรือสารทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (B-A)x1000}}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

การหาปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีนับจำนวนโคโลนี (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2543)

วิธีการ

1. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

2. เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกับในข้อ 1 เป็นลำดับจนได้ตัวอย่างความเจือจางที่ต้องการ

3. นำตัวอย่างความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (เช่น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-5}) มาปฏิบัติดังนี้

3.1 วิธีสเปรดเพลท

3.1.1 ถ่ายตัวอย่างจากแต่ละค่าเจือจางลงบนผิวอาหาร PCA ในจานเพาะเชื้อ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.2 ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ (เผาด้วยเปลวไฟ ทิ้งให้เย็น) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน

4. บ่มจานอาหาร PCA (โดยวางแบบคว่ำ) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเพื่อเพาะเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร PDA บ่มเพาะเชื้อ (ไม่ต้องคว่ำจาน) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน

5. นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง

การจัดจำแนกจุลินทรีย์ (API, Biomeriux, France)

วิธีการ

1. ทำเสมียร์และฟิกซ์ โดยการหยดน้ำลงบนสไลด์ก่อนหนึ่งหยด แล้วจึงใช้ลวดเขี่ยเชื้อเผาไฟแล้วแตะเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งแล้วมาผสมลงในหยดน้ำ เมื่อสเมียร์เชื้อแล้วทิ้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้งเองและการทำการฟิกซ์โดยนำสไลด์มาลนไฟให้เปลวไฟผ่านใต้สไลด์ตรงรอยสเมียร์

2. หยดสี Crystal Violet ให้ท่วมเสมียร์ของเชื้อนาน 1 นาที

3. เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมกับหยดสารละลายไอโอดีน ไล่สีออกไปและหยดให้ท่วมสเมียร์ทิ้งไว้นาน 1 นาที

4. เทไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยด Acohol 95% หรือ Alcohol Acetone ล้างสีออกจนกระทั่งสีม่วงละลายออกมา

5. ซับด้วยกระดาษซับแล้วย้อมทับด้วยสี Safranin O นาน 1 นาที

6. ล้างน้ำ ซับวางไว้ให้แห้ง

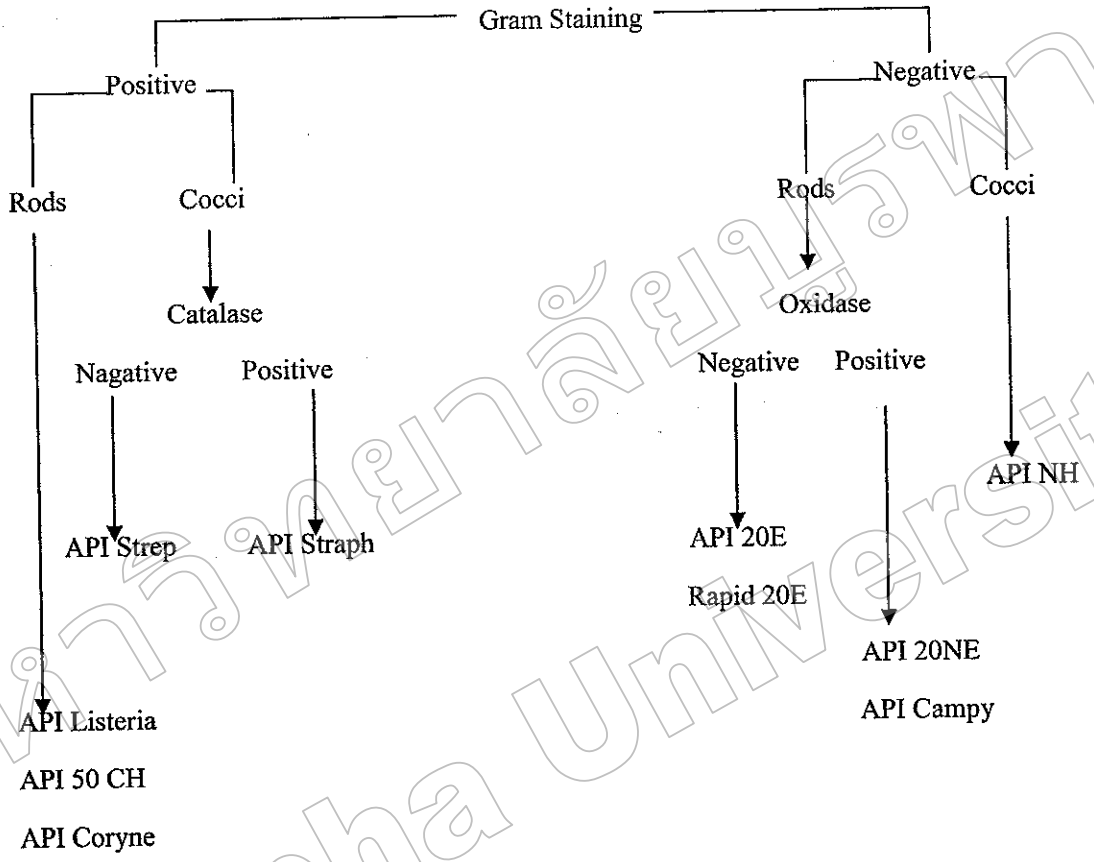
7. สังเกตความแตกต่างในการติดสีของเชื้อแต่ละชนิด เชื้อที่ติดสีม่วงของ Crystal Violet จัดว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ติดสีแดงของ Safranin O จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. ทดสอบ Catalase โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนสไลด์ที่เชื้อแบคทีเรียอยู่ ถ้าเกิดฟองแสดงว่า Catalase บวก ส่วนแบคทีเรียที่เป็น Catalase ลบจะไม่เกิดฟองเมื่อหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

9. นำไปทดสอบในชุด API 50 CH และ API Strep เนื่องจากแบคทีเรียชนิดแรกมีรูปร่างเป็นแท่งติดสีแกรมบวก และชนิดที่สองมีรูปร่างกลมแกรมบวก และ Catalase ลบดังภาพภาคผนวก ข-1 ด้านล่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Classification



ภาพ ข-1 การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธี API

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยชุดทดสอบของ API (Biomerieux, France)

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องวัดความขุ่น
2. Strip ของ API
3. ตู้บ่มเชื้อ
4. น้ำกลั่น
5. API Suspension (5 ml)
6. Pipettes
7. Mineral Oil

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

9. VP1 และ VP2

10. NIN

11. Zym A และ Zym B

12. Blood Agar

วิธีทำการทดลองในชุด API 50 CH

1. เปิดขวด API Suspension นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบใส่และนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดความขุ่นให้ได้ความขุ่นที่ 2 McF

2. นำปิเปตปลอดเชื้อดูด API Suspension ดังกล่าวเติมลงใน Strip ของ API 50 CH

3. เติมน้ำกลั่นลงในแผ่นรอง Strip เพื่อให้ความชื้นระหว่างทำการบ่ม

4. นำ Strip ที่เติมอาหารที่มีเชื้อใส่ลงบนแผ่นรอง Strip แล้วปิด

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36±2 องศาเซลเซียส

6. ทำการอ่านผลเมื่อครบ 24±2 ชั่วโมงและ 48±2 ชั่วโมง

7. นำผลที่ได้ไปแปลผลด้วยโปรแกรมแปลผลของ API

วิธีทำการทดลองในชุด API 20 Strep

1. เลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนด้วยการ Swab เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง นำไปบ่มในสภาพแอนแอโรบิค ที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส และดูผลการฮีโมไลซิส

2. นำเชื้อที่เตรียมไว้บน Blood Agar มาใส่ใน API Suspension นำไปวัดความขุ่นให้มีความขุ่นมากกว่า 4 McF นำไปใส่ใน Strip API 20 Strep ช่อง RIB-GLYG และดูด API Suspension ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ใน API Suspension อีกขวดผสมให้เข้ากันและนำไปใส่ใน Strip ช่อง VP-ADH

3. เติม Mineral Oil ในช่อง ADH-GLYG เพื่อให้เกิดสภาพแอนแอโรบิค

4. นำแผ่นรอง Strip มาใส่น้ำกลั่น แล้ววาง Strip API 20 Strep ลงไป และปิดฝา

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37± 2 องศาเซลเซียส

6. เมื่อครบ 4 ชั่วโมงเติม VP1 และ VP2 ลงใน Strip ช่อง VP, เติม NIN ในช่อง HIP และเติม Zym A และ Zym B ลงในช่อง PYRA LAP

7. นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลอีกครั้ง

8. นำข้อมูลที่ได้ไปแปลผลด้วยโปรแกรมของ API

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University