ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

1. Carbohydrate metabolism (O/F medium) test

ส่วนประกอบของอาหาร

Pancreatic digest of casein	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	0.3	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	2.0	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนส่วนประกอบทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งอาหารให้เย็นและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จะมีสีเขียว

2. Citrate utilization test

ส่วนประกอบอาหาร

Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Dipotassium phosphate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนส่วนประกอบทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางหลอดอาหารแบบเอียง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีสีเขียว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Lysine Indole Motility medium (LIM)

ส่วนประกอบของอาหาร

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
L-lysine dihydrochloride	10.0	กรัม
L-tryptophan	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	3.0	กรัม

pH 6.6 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เนื้ออาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Methyl Red test และ Vogas-Prokauer test (MR-VP test)

ส่วนประกอบ MR-VP broth

Peptone	9	กรัม
Glucose	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Nitrate และ Nitrite test

ส่วนประกอบของอาหาร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium nitrate	1	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Ornithine decaboxylase test

ส่วนประกอบของอาหาร

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Ornithine	5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม

pH 6.8 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้ออาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Phenol red broth for carbohydrate/sugar utilization

ส่วนประกอบของอาหาร

Pancreatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
D-mannitol	5	กรัม
Phenol red	18	มิลลิกรัม
Agar	0.5-1	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น นำไปต้มจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จะมีสีแดง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar

ส่วนประกอบของอาหาร

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	7	กรัม
Oxgall	5	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Saccharose (Sucrose)	20	กรัม
Sodium chlorate	3	กรัม
Ferric citrate	1	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol B blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม

pH 8.8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนส่วนประกอบทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่ออาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 45 -50 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีสีเขียวมะกอก

9. Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบของอาหาร

Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม

pH 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบของอาหาร

Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

pH 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

12. Vibriostatic compound (O/129) susceptibility

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar

Beef extract power	2	กรัม
Acid digest of casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม

pH 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จะมีสีเหลืองจาง

13. *Vibrio harveyi* (VHA) agar

ส่วนประกอบของอาหาร

D-cellobiose	2	กรัม
L-ornithine	2	กรัม
Sodium chloride	30	กรัม
Tris[hydroxymethyl]aminomethane	1.21	กรัม
K_2HPO_4	0.075	กรัม
Bacto peptone	0.1	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Thymol blue	0.04	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Agar	20	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันหมด รอให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 56 องศาเซลเซียส ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 9 ด้วย 1M NaOH และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีสีฟ้า

14. Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Agar

ส่วนประกอบของอาหาร

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10

15. Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Broth

ส่วนประกอบของอาหาร

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10

16. การหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ

ส่วนประกอบของอาหาร

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sugar	10	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ใช้เป็น Basal medium แล้วจึงเติมน้ำตาลที่ต้องการทดสอบลงไป เช่น ถ้าต้องการใช้น้ำตาลกลูโคสให้ผสมกับ Basal medium โดยความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1% (w/v) และบรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 6-7 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีหลอดดักก๊าซอยู่ในหลอดทดลอง ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นก็ทำในลักษณะเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 6 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

17. ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ

ส่วนประกอบของอาหาร

Peptone	0.1	กรัม
Sodium chloride (เติมตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ)		

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายใส่หลอดขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมน้ำยาทดสอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

1. ชุดย้อมแกรม (Gram strain solution)

การเตรียมรีเอเจนต์

Crystal violet stain

Crystal violet (Gentain violet)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Decolourizer

95 % ethanol	250	มิลลิลิตร
Acetone	250	มิลลิลิตร

Gram iodine solution

Iodine	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Safranin O solution

Safranin	2.5	กรัม
Ethanol	100	มิลลิลิตร

2. 3% Hydrogen peroxide solution

การเตรียมรีเอเจนต์

H_2O_2	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3. Kovac' s reagent

การเตรียมรีเอเจนต์

Amyl หรือ Isoamyl alcohol	150	มิลลิลิตร
p-dimethyl aminobenzaldehyde	10	กรัม
Hydrochloric acid (conc.)	50	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ละลาย *p*-dimethyl aminobenzaldehyde ในแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงค่อย ๆ เติมกรดลงไปอย่างช้า ๆ

4. MR reagent

การเตรียมรีเอเจนต์

Methyl red	0.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	300	มิลลิลิตร
Distilled water	200	มิลลิลิตร

ละลาย Methyl red ในแอลกอฮอล์ จากนั้นเติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

6. Nitrate reagent

การเตรียมรีเอเจนต์

Solution A

Sulfanilic acid	8	กรัม
Acetic acid, 5 N	1,000	มิลลิลิตร

Solution B

Alpha-naphthylamine	5	กรัม
Acetic acid, 5 N	1,000	มิลลิลิตร

7. Oxidase test

การเตรียมรีเอเจนต์

N,N,N,N-Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride		
($C_{10}H_8Cl_2N_2$)	10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลายสารนี้ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา (ห้ามถูกแสง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค

สารเคมีและกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

1. สารเคมีและกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์แอมโมเนีย

1.1 Hypochlorite stock

ใช้ Sodium hypochlorite (5.5% Available chlorine) หรือน้ำยาฟอกสี (Bleach) ที่ขายตามท้องตลาดที่มีคลอรีน 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 Alkaline stock slution

ชั่งโซเดียมซิเทรต 100 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

1.3 Sodium nitroprusside reagent

ชั่งโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิลิตร

1.4 Phenol reagent

ชั่งฟีนอล 100 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

1.5 Oxidizing reagent

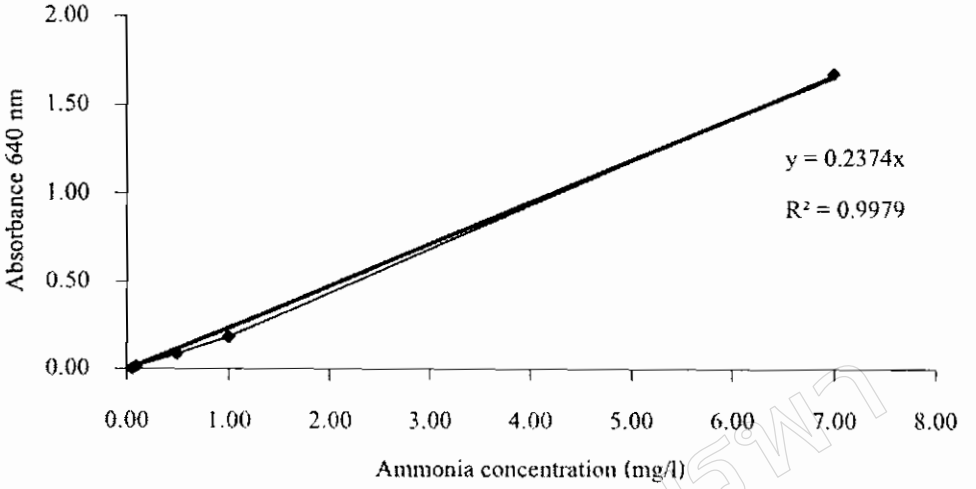
เตรียมโดยใช้ Alkaline stock solution 4 ส่วน ผสมกับ Hypochlorite stock 1 ส่วน (สารละลายนี้เตรียมเมื่อต้องการใช้แต่ละครั้ง แล้วเก็บไว้ในขวดทึบแสง ปิดฝาให้สนิท)

1.6 สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 ^{o}C ปริมาณ 3.813 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

1.7 กราฟมาตรฐานแอมโมเนียความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. สารเคมีและกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ในเทรต

2.1 สารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก

ละลายบรูซีนซัลเฟตปริมาณ 1 กรัม และกรดซัลฟานิลิกปริมาณ 1 กรัม ลงในน้ำร้อนปริมาตร 70 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายกรดซัลฟิวริก

ค่อย ๆ เทกรดซัลฟิวริกปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 125 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปิดจุกให้แน่นเพื่อป้องกันความชื้น

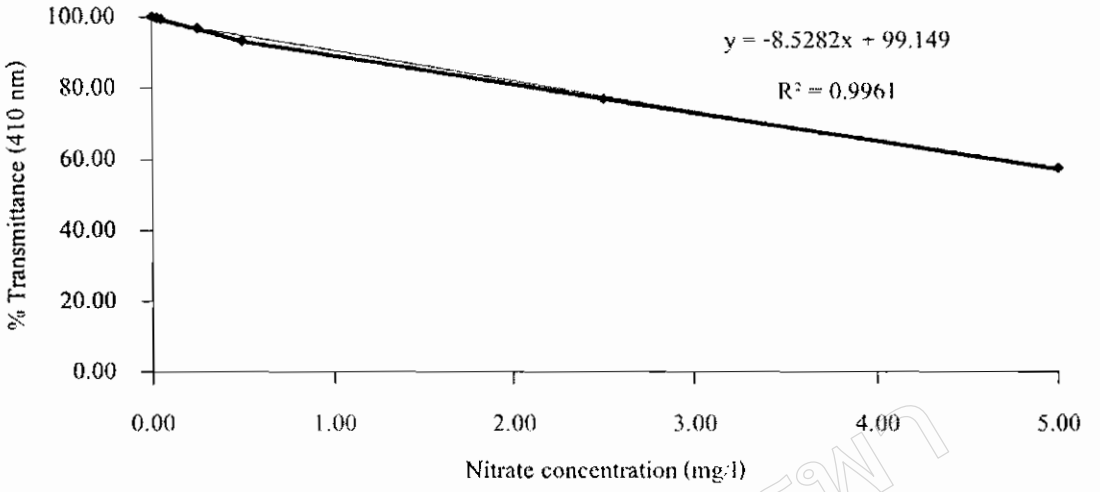
2.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 300 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.4 สารละลายมาตรฐานไนเทรตความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 ^{o}C ปริมาณ 0.722 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

2.5 กราฟมาตรฐานไนเทรตความเข้มข้น 0.04-0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐานไนเทรตที่ความเข้มข้น 0.04-0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. สารเคมีและกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ไนไทรต์

3.1 สารละลายซัลฟานิลาไมด์

ชั่งซัลฟานิลาไมด์ 5 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

3.2 สารละลาย NNED

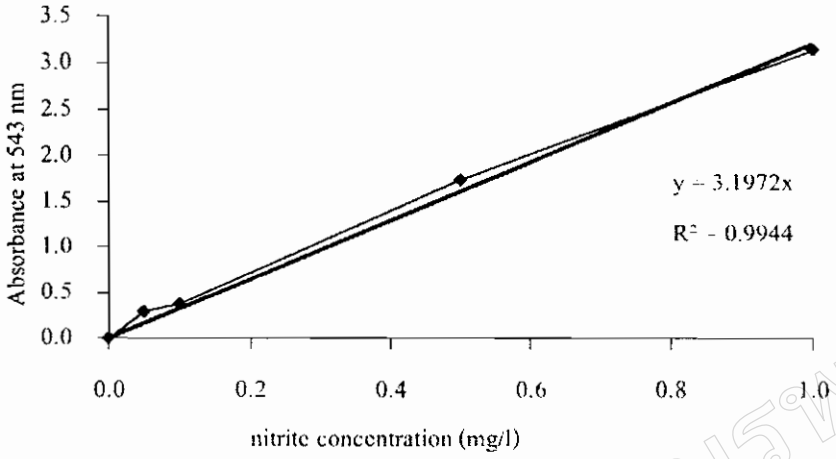
ชั่ง NNED 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายมาตรฐานไนไทรต์ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโซเดียมไนไทรต์ ($NaNO_2$) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 ^{o}C ปริมาณ 0.4926 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

3.4 กราฟมาตรฐานไนไทรต์ความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐานไนไทรต์ที่ความเข้มข้น 0.01-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. สารเคมีและกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

4.1 Acid molybdate - antimony

ชั่ง Ammonium paramolybdate 7.5 กรัม และ Antimony potassium tartrate 0.14 กรัม ลงในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 conc.) ปริมาตร 88 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร (เก็บสารละลายไว้ในขวดทึบแสง)

4.2 Ascorbic acid solution

ชั่ง L-Ascorbic acid 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (สารละลายนี้เมื่อเตรียมแล้วต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง หรือแช่ตู้เย็นสามารถเก็บได้ 2-3 วัน)

4.3 Mixed molybdate

ผสม Acid molybdate – antimony 4 ส่วน กับ Ascorbic acid solution 1 ส่วน สารละลายนี้ใช้ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

4.4 สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 $^{\circ}C$ ปริมาณ 0.2197 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

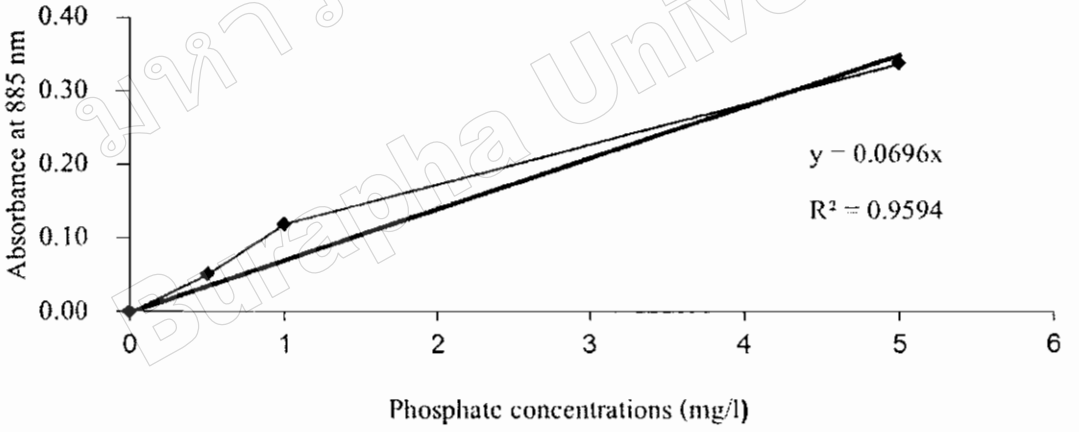
4.5 การทำกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

4.5.1 ดูดสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตปริมาตร 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นฟอสเฟตเท่ากับ 5, 25, 50, 100, 150 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.5.2 ดูดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 25 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออนอย่างเดียว 25 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น Blank ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

4.5.3 เติม Mixed molybdate ที่เตรียมใหม่ ๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละความเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

4.5.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่วัดได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของฟอสเฟต



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.005-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร