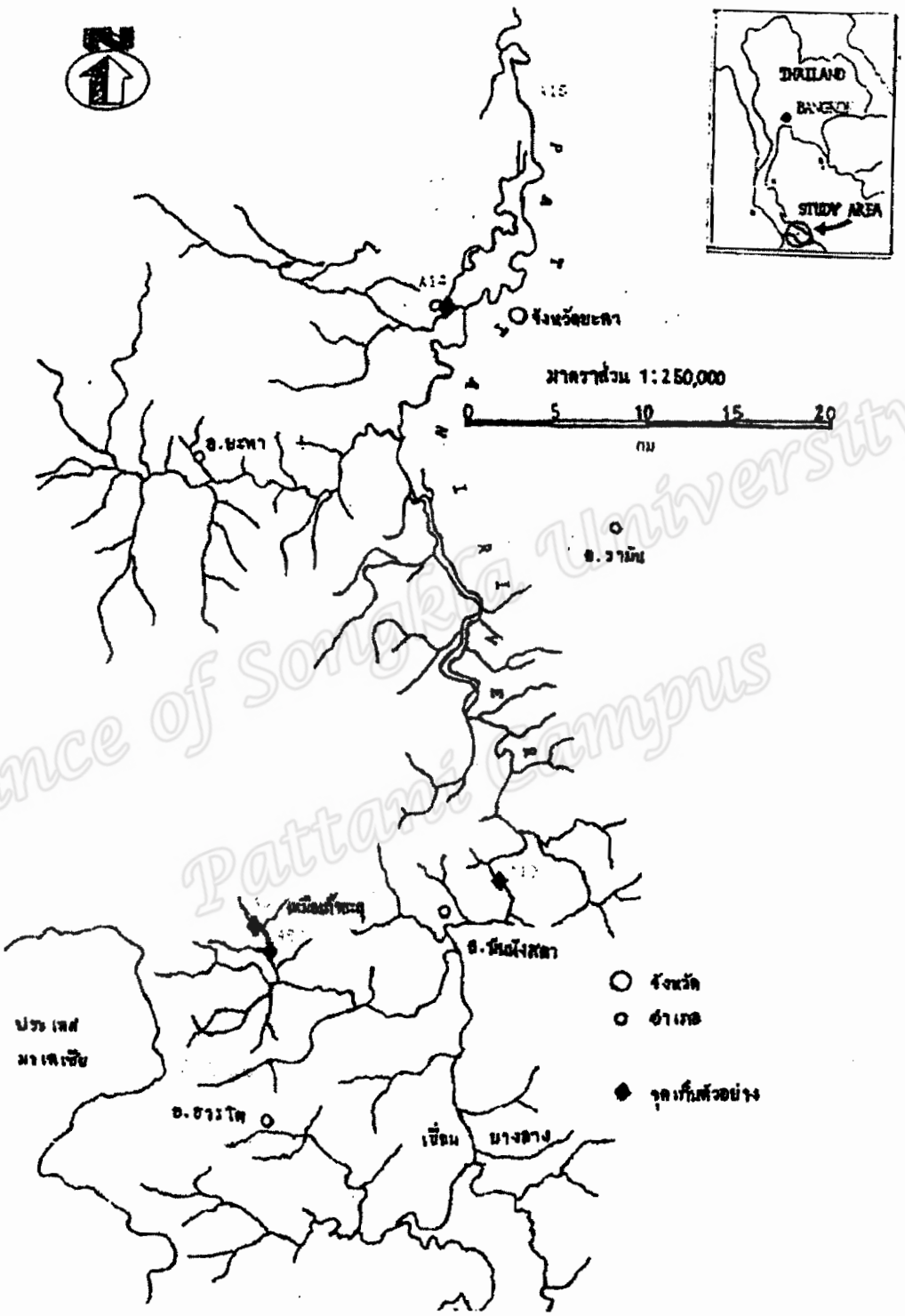
ภาคผนวก ก

ก. 1 สถานที่เก็บตัวอย่าง



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ ก. 1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง, แม่น้ำปัตตานีตอนบน จังหวัดยะลา

หมายเหตุ 1 = เหมืองเก่าวัดถ้ำทะลุ ต. วัดถ้ำทะลุ อ. บันนังสตา จ. ยะลา

2 = บริเวณรอบเหมืองเก่าวัดถ้ำทะลุ ต. วัดถ้ำทะลุ อ. บันนังสตา จ. ยะลา

3 = ใต้สะพานยีลาปัน ต. ตลิ่งชัน อ. บันนังสตา จ. ยะลา

4 = ใต้สะพานท่าสาบ เทศบาลเมือง อ. เมือง จ. ยะลา

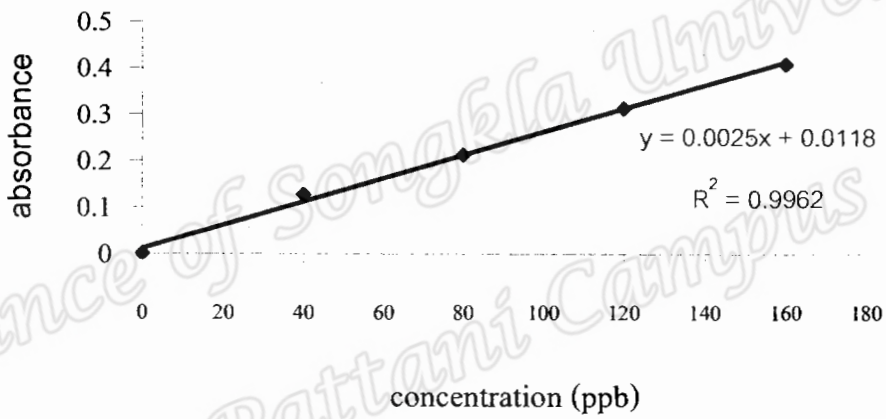
ก. 2 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยเครื่องแอบซอบชันสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (AAS)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายตะกั่วและทองแดง

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานทองแดงที่ 324.8 nm โดยวิธี GF-AAS

Cu^{2+}(µg/L)	Abs ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	SD
0	0.017	22	0.0034
40	0.145	10	0.0164
80	0.231	8	0.0185
120	0.332	7	0.0272
160	0.428	7	0.0380

The detection limit เท่ากับ 4.08 µg/L



Prince of Songkla University Pattani Campus

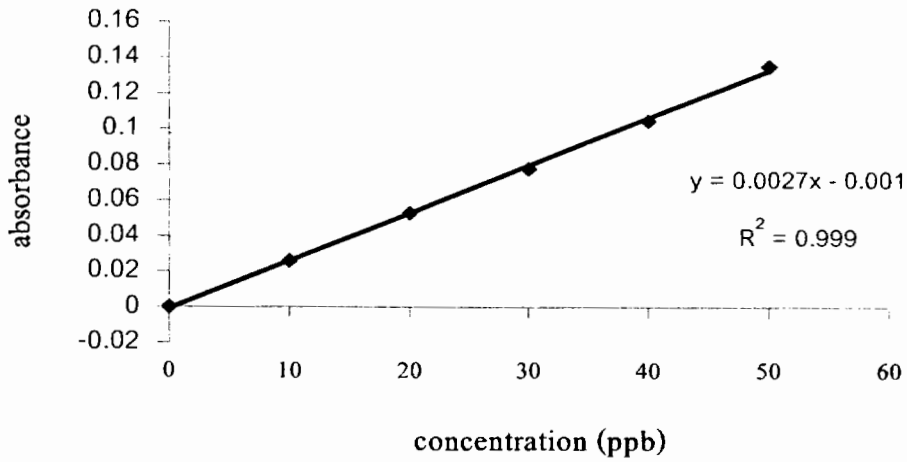
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของทองแดงโดยวิธี GF-AAS

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานตะกั่วที่ 283.3 nm โดยวิธี GF-AAS

Pb^{2+}(ppb)	Abs ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	SD
0	0.0055	24	0.0038
10	0.082	10	0.0029
20	0.109	6	0.0021
30	0.134	6	0.0019
40	0.162	6	0.0022
50	0.192	6	0.0060

Modifier : PO_4 ($NH_4H_2PO_4$), 0.2 mg/10 µL Injection

Detection limit เท่ากับ 5.33 µg/L

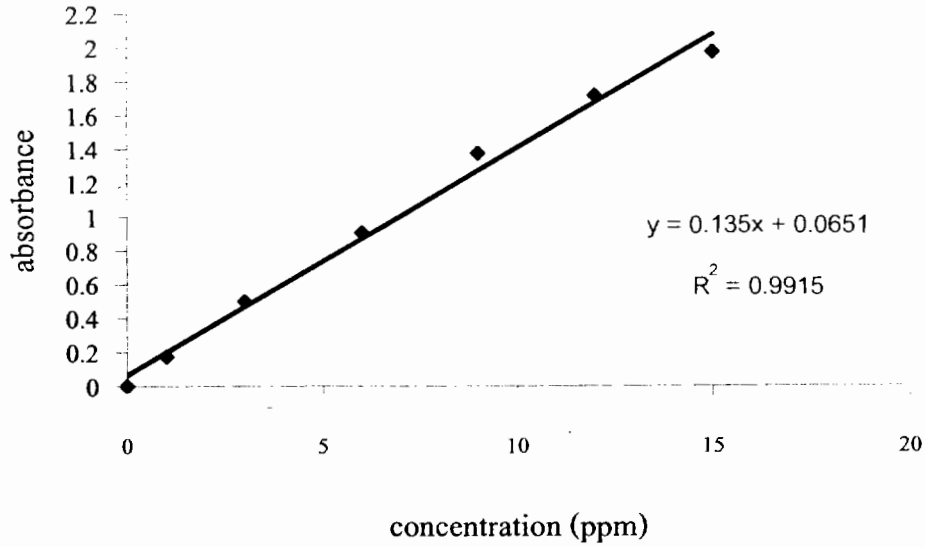


รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของตะกั่วโดยวิธี GF-AAS

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานทองแดงที่ 324.8 nm โดยวิธี FAAS

Cu^{2+}(mg/L)	Abs ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	SD
0	0.003	33	0.0031
1	0.170	11	0.0033
3	0.496	5	0.0068
6	0.904	5	0.0183
9	1.379	5	0.0152
12	1.720	5	0.0149
15	1.980	5	0.0130

Detection limit เท่ากับ 0.067 mg/L



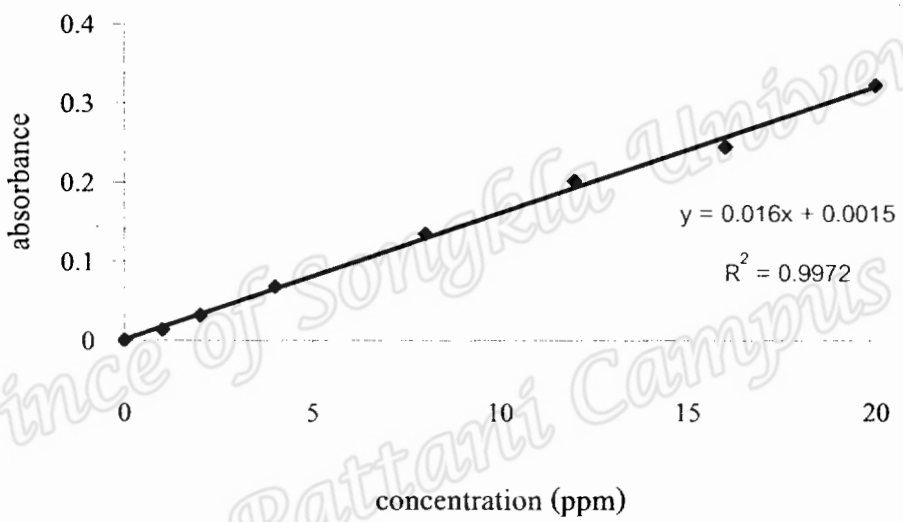
รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของทองแดงโดยวิธี FAAS

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานตะกั่วที่ 238.3 nm โดยวิธี FAAS

Pb^{2+}(mg/L)	Abs ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	SD
0	0.0012	22	0.0032
1	0.015	10	0.0020
2	0.033	5	0.0026
4	0.069	5	0.0023
8	0.136	5	0.0042
12	0.203	5	0.0068
16	0.246	5	0.0045
20	0.324	5	0.0080

Detection limit เท่ากับ 0.58 mg/L

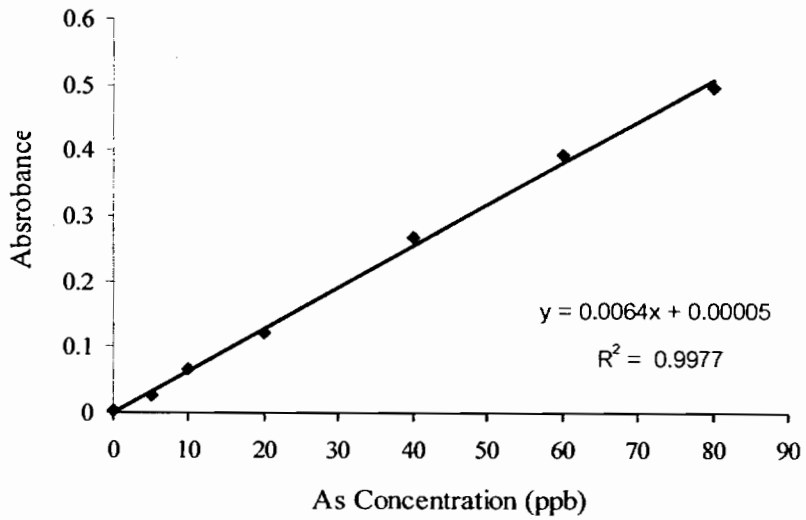


Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของตะกั่วโดยวิธี FAAS

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานสารหนู โดยวิธี AAS-Hydride generation

As^{3+}(ppb)	Abs ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	SD
0	0.003	20	0.0040
5	0.025	10	0.0039
10	0.067	5	0.0025
20	0.122	5	0.0031
40	0.267	5	0.0033
60	0.395	5	0.0028
80	0.499	5	0.0030



รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของสารหนูโดยวิธี AAS-Hydride generation

สูตรคำนวณ Detection limit

$$S_m = X_{bl} + kS_{bl}$$

$$C_{dl} = \frac{S_m - X_{bl}}{m}$$

X_{bl} = mean blank signal

S_{bl} = standard deviation of blank

S_m = minimum distinguishable analytical signal

k = constant : 3, m = slope

C_{dl} = detection limit

สูตรคำนวณ Limit of quantitation

$$S_m = X_{bl} + k_q S_{bl}$$

$$C_{loq} = \frac{S_m - X_{bl}}{m}$$

C_{loq} = limit of quantitation, k_q = constant : 10

ตารางที่ ก. 6 สรุปค่า detection limit และ limit of quantitation ของโลหะต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดย FAAS, GFAAS หรือ AAS-Hydride generation

โลหะ	detection limit	limit of quantitation	วิธีการวิเคราะห์
ทองแดง	4.08 mg/L	13.5 mg/L	FAAS
	0.067 mg/L	0.23 mg/L	GFAAS
ตะกั่ว	0.58 mg/L	2.0 mg/L	FAAS
	5.33 µg/L	14.07 µg/L	GFAAS
สารหนู	2.20 µg/L	6.20 µg/L	AAS-Hydride generation

Prince of Songkla University Pattani Campus

ก. 3 ผลการศึกษา % Total solid ของสาหร่ายผมนาง สาหร่ายผักกาด และถ่านกัมมันต์

ตารางที่ ก. 7 % Total solid ของ สาหร่ายผมนาง สาหร่ายผักกาด และถ่านกัมมันต์

No.	น้ำหนักบีกเกอร์ (g)	บีกเกอร์+ตัวอย่าง ก่อน (g)	บีกเกอร์+ตัวอย่าง หลัง (g)	% total solid
ผมนาง 1	29.67	34.43	33.91	89.07
ผมนาง 2	29.17	34.38	33.80	88.86
ผมนาง 3	29.24	34.39	33.81	88.77
เฉลี่ย				88.90±0.15
ผักกาด 1	28.87	29.89	29.76	87.18
ผักกาด 2	28.85	29.88	29.75	87.16
ผักกาด 3	28.97	29.99	29.89	87.23
เฉลี่ย				87.19±87.23
Act.C 1	28.92	29.92	29.82	90.75
Act.C 2	29.25	30.30	30.20	89.94
Act.C 3	29.00	30.13	30.01	89.31
เฉลี่ย				90.00±0.72

ผมนาง = สาหร่ายผมนาง

ผักกาด = สาหร่ายผักกาด

Act.C = ถ่านกัมมันต์ (granular activated carbon)

สูตรการคำนวณ $$\% \text{ Total solid} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times \frac{100}{D}$$

ให้ A = weight of dried residue + dish, mg

B = weight of dried, mg

C = weight of wet sample, mg

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ข

ข. 1 ตารางแสดงผลการศึกษาการดูดซับของแบคทีเรีย

ตารางที่ ข. 1 ปริมาณสารหนูที่เหลือในอาหารเหลว NB (mg/L) และปริมาณการดูดซับสารหนู (%) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีสารหนู 12 mg/L เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	ปริมาณสารหนูที่เหลือในอาหารเหลว NB (mg/L)	ปริมาณการดูดซับสารหนู (%)
1. S 2-4 1	5.16	56.71
2. S 3-2 8	10.61	10.99
3. W 1-2 10	10.62	10.91
4. W 1-3 4	9.97	16.36
5. W 1-3 6	9.09	23.74
6. W 1-4 7	10.71	10.15
7. W 2-4 3	4.36	63.42
8. W 3-4 1	6.38	46.48
9. Control	11.92	-

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ ข. 2 ปริมาณการดูดซับสารหนู (%) ของเซลล์ W 2-4 3 เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L ที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

NB pH	As concentration in NB (mg/L)	% As Adsorption
3.0	5.28	54.7
4.0	4.90	58.0
5.0	4.71	59.6
6.0	4.24	63.6
7.0	4.07	65.1
Control	11.66	-

ตารางที่ ข. 3 ปริมาณการดูดซับสารหนู (% As Adsorption) โดยเซลล์ W 2-4 3 เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีสารหนูเข้มข้น 12 mg/L ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

Time (day)	Residual As concentration (mg/L)	% As Adsorption
1	9.50	21.6
2	8.71	28.1
3	7.88	34.9
4	7.10	41.4
5	5.10	57.9
6	4.88	59.7
7	4.77	60.6
Control	12.10	-

ข. 2 วิธีการทดสอบทางชีวเคมี

1. Motility test

1.1 ***วิธีการทดสอบ*** มี 2 วิธี คือ Hanging drop method และ semisolid method

1) Hanging drop method

ก. ป้ายวาสลินหรือหยดน้ำมันบริเวณมุมหรือขอบของกระจกปิดสไลด์

ข. หยดน้ำกลั่น 1 หยดเล็กลงตรงกลางกระจกปิดสไลด์

ค. ใช้เข็มเพาะเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้วแตะลงบนหยดน้ำ

ง. วางสไลด์หลุมให้ส่วนของหลุมครอบลงตรงกลางหยดน้ำ

จ. กลับสไลด์เอาส่วนกระจกปิดสไลด์ไว้ข้างบน จะเห็นหยดน้ำอยู่ตรงกลางกระจกปิดสไลด์

ฉ. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า บันทึกผลที่ได้

2) Semisolid method

ใช้เข็มเพาะเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรีย แทงลงไปในเนื้ออาหาร motility test medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2 การตรวจผล

1) ตรวจการเคลื่อนไหวของแบคทีเรียในสไลด์หลุมว่ามีหรือไม่ ถ้ามี บันทึกผลเป็น + ถ้าไม่มีบันทึกผลเป็น –

2) ศึกษาจาก agar stab ถ้ามีการเจริญเติบโตกระจายออกไปจากรอยเดิม ถือว่าให้ผลเป็น + ถ้ามีการเจริญเติบโตตามรอยเดิม ถือว่าให้ผลเป็น –

2. Oxidase test

2.1 วิธีการทดสอบ มี 2 วิธี คือ Indirect paper procedure และ direct plate procedure

Prince of Songkla University Pattani Campus

1) Indirect paper procedure

ก. วางกระดาษกรองลงในจานเพาะเชื้อ

ข. หยด Oxidase reagent ลงบนกระดาษกรองให้พอชื้น

ค. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนบริเวณกระดาษกรอง โดยลากให้เป็นเส้นยาว ประมาณ 3 cm

ง. คอยสังเกตการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายลงบนกระดาษกรอง

2) Direct paper procedure

ก. Streak เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดลงบน agar plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ

ข. หยด Oxidase reagent 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ

ค. สังเกตการเปลี่ยนของโคโลนี

2.2 การตรวจผล

1) Oxidase positive : เชื้อที่ป้ายลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายในเวลา 1 นาที

Oxidase negative : เชื้อที่ป้ายลงไปไม่มีการปลี่ยนสี

2) Oxidase positive : โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายในเวลา 1 นาที

Oxidase negative : โคโลนีไม่มีการปลี่ยนสี หรืออาจเป็นสีชมพูอ่อนซึ่งเป็นสีของ reagent

3. Nitrite production

3.1 วิธีการทดสอบ

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรีย ใส่ลงในขวดอาหาร Nitrate broth เขย่าขวดอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเมื่อครบเวลา 14 วัน

3.2 การตรวจผล

ก. หยดกรดซัลฟุริกเข้มข้นละลายน้ำอัตราส่วน 1:3 ลงในจานหลุม 2-3 หยด

ข. หยดน้ำยา Trommsdorf's 1-2 หยด

ค. ใช้แท่งแก้วสะอาดจุ่มในขวดอาหาร แล้วหยดลงไปบนน้ำยาในจานหลุม (ไม่ต้องคน) ถ้าเกิดสีน้ำเงินแกมม่วงหรือน้ำเงินอมดำ แสดงว่า มีไนไตรท์ (ควรอ่านผลภายใน 5 นาที)

4. Denitrification

4.1 วิธีการทดสอบ

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรีย ใส่ลงในขวดอาหาร Nitrate broth เขย่าขวดอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเมื่อครบเวลา 14 วัน

4.2 การตรวจผล

ก. หยดน้ำยา diphenylamine 3 หยด ลงในจานหลุม

ข. ใช้แท่งแก้วสะอาดจุ่มในขวดอาหาร แล้วหยดลงไปบนน้ำยาในจานหลุม 1 หยด ถ้าเกิดสีน้ำเงินแกมเขียวภายในเวลา 3-5 นาที แสดงว่า มีไนเตรท (น้ำยา diphenylamine จะให้สีน้ำเงินแกมเขียวกับไนไตรท์ด้วย ดังนั้น การตรวจหาไนเตรทจะทำได้เมื่อตรวจไม่พบไนไตรท์แล้ว)

Prince of Songkla University Pattani Campus

5. Gelatinase test

5.1 วิธีการทดสอบ

ก. หลอมอาหาร Gelatin agar วางไว้ให้เย็นลงประมาณ 45°C แล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ให้อาหารแข็ง และผิวหน้าอาหารแห้งไม่มีน้ำเกาะอยู่

ข. ทำ point inoculation เชื้อแบคทีเรียลงบนผิวอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน

5.2 การตรวจผล

หยดน้ำยา $HgCl_2$ ให้ท่วมผิวอาหาร ส่วนของเจลาตินที่ไม่ถูกย่อย จะเห็นเป็นตะกอนขุ่น ส่วนแบคทีเรียที่สามารถเอ็นไซม์ gelatinase มาย่อยเจลาตินได้ รอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเจริญจะมีลักษณะใส

6. Litmus milk peptonized

6.1 วิธีการทดสอบ

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อถ่ายมาใส่ในหลอดอาหาร Litmus milk บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-7 วัน

6.2 การตรวจผล

สังเกตการเปลี่ยนแปลงในหลอดอาหาร และสรุปผลดังต่อไปนี้

เกิดสีชมพู	=	เกิดกรด
เกิดสีม่วงน้ำเงิน	=	เกิดด่าง
สีขาว (ไม่มีสี)	=	เกิดสภาพรีดักชัน
ใส	=	มีการย่อยโปรทีน (proteolysis)
จับกันเป็นก้อนแข็ง	=	เกิด acid curd
จับกันเป็นก้อนนิ่ม	=	เกิด rennet curd (alkaline curd)
มีฟองปุดขึ้นในอาหารหรือมีรูพรุนในก้อนแข็ง	=	เกิดก๊าซ
เหนียวติดลูปเป็นยางยืด	=	ropiness
มีน้ำใสแยกตอนบนของก้อนแข็ง	=	whey
ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ	=	inert

7. Starch hydrolysis

7.1 วิธีการทดสอบ

ก. หลอมอาหาร Starch agar วางไว้ให้เย็นลงประมาณ 45°C แล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ให้อาหารแข็ง และผิวหน้าอาหารแห้งไม่มีน้ำเกาะอยู่

ข. ทำ point inoculation เชื้อแบคทีเรียลงบนผิวอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน

7.2 การตรวจผล

เทน้ำยาไอโอดีนในจานอาหาร Starch agar ตรวจดูบริเวณใสรอบบริเวณที่เชื้อเจริญ ถ้าเกิดบริเวณใส แสดงว่าเชื้อชนิดนั้นสร้างเอ็นไซม์ amylase ถ้าไม่พบบริเวณใส แสดงว่าเชื้อชนิดนั้นไม่สร้างเอ็นไซม์ ควรอ่านผลภายในเวลา 2 นาที เพราะหาทิ้งไว้นานเกินไป สีน้ำเงินหรือม่วงอาจจางหายไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

8. Growth on SS agar

8.1 วิธีการทดสอบ

ก. หลอมอาหาร SS agar วางไว้ให้เย็นลงประมาณ 45°C แล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ให้อาหารแข็ง และผิวหน้าอาหารแห้งไม่มีน้ำเกาะอยู่

ข. Streak เชื้อแบคทีเรียลงบนผิวอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.2 การตรวจผล

ตรวจดูว่ามีการเจริญของเชื้อบนอาหารหรือไม่ บันทึกผล

9. Oxidative-Fermentation test

9.1 วิธีการทดสอบ

ก. Inoculate เชื้อแต่ละชนิดลงไปใน glucose medium ชนิดละ 2 หยด โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงไปให้ห่างจากก้นหลอดประมาณ ¼ นิ้ว ทั้งสองหลอด เขียนเครื่องหมายกำกับไว้ ให้หลอดแรกเป็น open หลอดที่ 2 เป็น covered

ข. นำหลอดที่เป็น covered ไปหยด sterile paraffin จำนวน 2 mL แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ค. สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดก๊าซ

9.2 การตรวจผล

Positive : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

Negative : อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

Prince of Songkla University Pattani Campus