ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (A.O.A.C, 1990)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกลม (สำหรับใส่ตัวทำละลาย), ซอคเลต (soxhlet), อุปกรณ์ควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน
2. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดกลมสำหรับหาไขมัน ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม บนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้ว แล้วนำไปใส่ในซอคเลต
3. เติมตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดกลมที่ได้จากข้อ 1 แล้ววางไว้บนเตาสำหรับกลั่น
4. ประกอบชุดสกัดไขมัน และทำการกลั่นนาน 14 ชั่วโมง โดยต้องมีการหล่อเย็นตลอดเวลา
5. เมื่อครบเวลา นำขวดกลมในข้อ 3 บ่มในตู้อบ นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
6. คำนวณหาไขมันจากสูตร

ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก = $\frac{X \times 100}{Y}$

กำหนดให้ X คือ น้ำหนักไขมันหลังอบ

Y คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

2. โปรตีนในรูปไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeidhal (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยตัวอย่างขนาด 2.5×31 เซนติเมตร
2. หลอดกลั่นตัวอย่างขนาด 4.0×30 เซนติเมตร

3. เครื่อง Kjeltech ซึ่งประกอบด้วย เครื่องย่อย เครื่องกลั่น และเครื่องจับไอกรด

สารเคมี

1. sodium sulfate (Na_2SO_4)
2. สารละลาย mercury sulfate ($HgSO_4$)

ละลายผง mercury oxide จำนวน 10 กรัม ใน boric acid เข้มข้นจำนวน 12 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรด sulfuric เข้มข้น
4. สารละลาย sodium hydroxide 60% โดยน้ำหนัก (w/w)

ละลาย sodium hydroxide 60 กรัม และ sodium thiosulfate (Na_2SO_3) 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรด boric 4% โดยน้ำหนัก (w/w)
6. สารละลายกรด hydrochloric 0.02 นอร์มัล
7. อินดิเคเตอร์

ละลาย methyl red 0.2 กรัม และ methyl blue 0.1 กรัม ในสารละลาย ethanol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัม ใส่ในขวดย่อยโปรตีน ใช้น้ำกลั่นเป็น blank
2. เติม sodium sulfate 2 กรัม และ mercury sulfate 5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายกรด sulfuric เข้มข้น 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเครื่องย่อย จนกว่าจะได้สารละลายใส ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. นำสารที่ได้จากข้อ 3 ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น และนำขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายกรด boric 4% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2 หยด ไปรองรับสารที่กลั่นได้จนกว่าจะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร
5. นำสารที่ได้จากข้อ 4 มาไตเตรทกับสารละลายกรด hydrochloric 0.02 นอร์มัล จุดยุติจะมีสีม่วง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B)\times N\times 14\times 100}{W}$$

A คือ ปริมาตรของสารละลายกรด hydrochloric ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของสารละลายกรด hydrochloric ที่ใช้ไตเตรทกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรด hydrochloric (นอร์มัล)

3. การวิเคราะห์BOD (Biochemical Oxygen Demand) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวด BOD ขนาดปริมาตร 300 มิลลิลิตร
2. air incubator หรือ water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 20±1 องศาเซลเซียส
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม K_2HPO_4 21.75 กรัม $Na_2HPO_4.7H2O$ 33.4 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร pH ของสารละลายนี้ควรจะประมาณ 7.2 โดยไม่ต้องปรับ

4. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (ละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร)
5. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ละลาย $CaCl_2$ ที่อบแห้งแล้ว 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร)
6. สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (ละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร)
7. สารละลายกรดและด่าง 1 N (ใช้ในการปรับ pH)
8. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.025 N (ละลาย Na_2SO_3 ที่อบแห้งแล้ว 1.575 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

1.1 ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาตรที่จะใช้ 1 ลิตร ใส่ในภาชนะสะอาด

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และเฟอร์ริคคลอไรด์ ตามลำดับ ใช้สารละลายแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร

1.3 เป่าอากาศที่สะอาด (ผ่านเครื่องกรอง) เพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือเติมน้ำลงไปในขวด ให้มีช่องว่างข้างบน แล้วนำไปเขย่า หรืออาจปิดจุกขวดด้วยสำลี และเก็บไว้นานพอที่น้ำจะอิ่มตัวด้วย DO

1.4 ปรับอุณหภูมิของน้ำเจือจางเป็น 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเติมในขวด BOD

2. การเตรียมตัวอย่างน้ำที่จะหาค่า BOD

2.1 วัด pH ของตัวอย่างน้ำ หากเป็นกรดหรือด่าง ต้องปรับ pH ให้เป็น 7.0 (6.5-7.5) ด้วย 1 N H_2SO_4 หรือ NaOH (ปริมาณที่ปรับไม่ควรเจือจางตัวอย่างเกิน 0.5%)

2.2 ตัวอย่างน้ำที่มีสารประกอบคลอรีนตกค้าง ให้ตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง ในที่ที่มีแสง เพื่อให้คลอรีนสลายตัว

3. วิธีการทำเจือจาง

3.1 เลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างในการทำเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนด แล้วเลือกเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่าประมาณก่อน ปกติแล้วใช้เปอร์เซ็นต์เจือจางดังนี้

Strong trade waste	0.1-1.0%
Raw and settled sewage	1.0-5.0%
Oxidized effluent	5.0-25.0%
Polluted river water	25.0-100.0%

ต้องปรับอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำให้ได้ 20 องศาเซลเซียสก่อนทำการเจือจาง

3.2 รินน้ำสำหรับเจือจาง 300-500 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

3.3 เติมตัวอย่างน้ำจำนวนที่ต้องการ แล้วเติมน้ำสำหรับเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.4 ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน อย่าให้มีฟองอากาศ

3.5 ค่อยๆรินใส่ขวด BOD 3 ขวด ปิดจุกเติมน้ำบริเวณฝาจุก นำไปเก็บในตู้ที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ขวด ส่วนขวดที่เหลือนำไปหา DO ทันที เพื่อทราบค่า DO ที่จุดเริ่มต้น (D_1)

3.6 ทำเช่นเดียวกันสำหรับเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเจือจางที่ต่ำกว่าและสูงกว่าตามลำดับ

4. การหาค่าปริมาณ DO

ใช้วิธี Azide Modification of the Iodometric Method

5. การเพาะเลี้ยง

เก็บ 2 ขวดของแต่ละเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเจือจางเพาะเลี้ยงในตู้เย็นมืดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำออกมาหาปริมาณ DO (D_2)

การคำนวณหาค่า BOD

ผลที่เชื่อถือได้นั้น ต้องมีค่า DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของตัวอย่างที่ทำการเจือจาง จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาถูกต้องที่สุด

$$\text{mg/l BOD} = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

เมื่อ D_1 = DO ของตัวอย่างน้ำที่ได้ทำการเจือจางภายหลังการเตรียม 15 นาที

D_2 = DO ของตัวอย่างน้ำที่ได้ทำการเจือจางภายหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน

P = Decimal fraction ของตัวอย่างน้ำที่ใช้

$= \frac{\%\ \text{sewage in diluted sample}}{}$

4. การวิเคราะห์ COD (Chemical Oxygen Demand) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Refluk appatus ประกอบด้วย flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งคอทำด้วย ground glass 24/40 และ condenser 300 มิลลิเมตร Jacket Liebig ซึ่งมีข้อต่อทำด้วย ground glass 24/40 เช่นกัน
2. Hot plate
3. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
4. สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 0.25 N (0.0417 M)

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ (อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติม Sulfamic acid 0.12 กรัม (เพื่อกำจัดการขัดขวางการหาเนื่องจาก NO_2^-) แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. Sulfuric acid reagent

ละลาย Ag_2SO_4 22 กรัม ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 9 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจาก Ag_2SO_4 ละลายยากมาก อาจต้องใช้เวลา 1-2 วันจึงจะละลายหมด เติม Ag_2SO_4 ลงไปในกรดซัลฟูริคเข้มข้น ในอัตรา 5.5 กรัม Ag_2SO_4/kg H_2SO_4)

6. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต 0.10 N

ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4).6H_2O$ 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

7. สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์

ละลาย 1-10 phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) 1.485 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

8. ซิลเวอร์ซัลเฟอร์ (Ag_2SO_4) เป็นผง
9. เมอร์คิวริคซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดเป็นผลึกบริสุทธิ์ หรือเป็นผง (ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl^-) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl^- = 10 ต่อ 1มิลลิลิตร)
10. ซัลฟามิคแอซิค (sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่จะกำจัดไนไตรท์เท่านั้น
11. Potassium hydrogen phthalate (KHP) standard เตรียมโดยนำ KHP มาบดอย่างหยาบๆ และทำให้แห้งโดยอบที่ 120 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ละลาย KHP 0.425 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนได้ครบ 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. เติม 0.4 กรัม $HgSO_4$ (ในกรณีที่มี Cl^-) ลงในขวด reflux เติมตัวอย่างลงไป 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ (0.25 N) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ glass beads (ซึ่งให้ความร้อนที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) 3-5 เม็ด ค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันขณะที่เติมกรดเพื่อละลาย $HgSO_4$ ก่อนให้ความร้อนเขย่าอีกครั้ง (เมื่อเติมกรด เปิด cooling ด้วยเพื่อป้องกันมิให้เกิดการสูญเสียพวกสารที่ระเหยได้)
2. กลั่นในเครื่อง refluk ประมาณ 2 ชั่วโมง (ปิด condenser ปลายเปิดด้วยบิกเกอร์เล็กๆ) ปล่อยให้เย็น แล้วฉีดล้างเครื่องควบแน่น ด้วยน้ำกลั่นก่อนถอด flat-bottle flask
3. เติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตร ประมาณ 150 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง
4. ไตเตรตสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอิน เป็นอินดิเคเตอร์ ปกติใช้ประมาณ 2-3 หยด (หรือ 0.10-0.15 มิลลิลิตร) เมื่อถึงจุดยุติ สีจะเปลี่ยนจาก น้ำเงินเขียว ไปเป็น สีเทา (ถึงแม้ว่าเมื่อทิ้งไว้สีน้ำเงินเขียวอาจกลับมาอีกก็ตาม)
5. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำและทำเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

การคำนวณ

$$\text{mg/l } O_2 \text{ COD} = \frac{(a-b)\times N\times 8\times 1000}{\text{ตัวอย่าง(มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ a = มิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)$ ที่ใช้ในการไตเตรต blank

b = มิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)$ ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่างน้ำ

N = นอร์มัลลิตี้ของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)$

5. การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุอุปกรณ์

1. Desiccator พร้อมด้วยสารดูดความชื้น
2. Oven ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. Platinum หรือ porcelain crucible
4. เครื่องชั่งชนิดละเอียด
5. Water bath

วิธีการวิเคราะห์

1. นำ crucible มาล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator แล้วชั่ง

2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่านี้ใส่ลงใน crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งบน water bath
4. เอาเข้าอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นใน desiccator ประมาณ 45 นาที
6. ชั่ง

การคำนวณ

$$\text{mg/l total solid} = \frac{\text{mg solids} \times 1000}{\text{ml sample}}$$

6. การวิเคราะห์ของแข็งแขวนลอย (Total Suspended Solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุอุปกรณ์

1. Glass fibre filter disks (Whatmn GF/C, 5.5 เซนติเมตร)
2. Filter holder อาจใช้ Membrane filter holder หรือ gooch crucible
3. เครื่องดูดสุญญากาศ
4. ตู้อบที่ควบอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
5. เตาเผาที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 550 องศาเซลเซียส
6. Desiccator
7. เครื่องชั่งชนิดละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียม gooch crucible วางกระดาษกรองลงใน gooch crucible ผ่านน้ำกลั่นลงไป ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้แห้ง นำไปอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ถ้าไม่ต้องการหาค่า volatile solids ก็ทำ gooch ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องใน desiccator ชั่ง ถ้าจะหาค่า volatile solids ด้วยให้เอา gooch นี้ไปเผาให้ร้อนในเตาเผาที่ 550 องศาเซลเซียส 15 นาที ใส่ใน desiccator จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ชั่ง
2. สำหรับตัวอย่างที่มีสารห้อยแขวนมากทำให้กรองได้ช้า ให้เลือกปริมาตรของตัวอย่างที่จะใช้ซึ่งจะเท่ากับ 14 มิลลิลิตร/ตารางเซนติเมตร ของกระดาษกรอง
3. เอา gooch ซึ่งเตรียมใส่ในที่สำหรับดูดอากาศ ทำกระดาษกรองให้เปียกด้วยน้ำกลั่น เปิดเครื่องดูด วัดปริมาตรตัวอย่างโดยใช้ปิเปตปลายกว้าง หรือ volumetric flask หรือกระบอกตวง แล้วกรอง ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูดจนแห้งนำไปอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator ชั่ง

การคำนวณ

$$\text{mg/l total suspended solids} = \frac{\text{mg suspended solids} \times 1000}{}$$

ml sample

7. การวิเคราะห์ของแข็งไม่ละลายน้ำ (Settleable Solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

วัสดุอุปกรณ์

Imhoff cone

วิธีวิเคราะห์

1. โดยปริมาตร เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันเทลงใน Imhoff cone จนถึงขีด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที จดปริมาตรของของแข็งที่นอนก้นในกรวย รายงานผลเป็นมิลลิลิตร/ลิตร
2. โดยน้ำหนัก

2.1 หาค่าของแข็งแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร) ของตัวอย่างน้ำ

2.2 เขย่าตัวอย่างให้เข่ากันดี เทลงในภาชนะที่เป็นแก้วซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 9 เซนติเมตร ปกติใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 1 ลิตร เพื่อให้มีความลึก 20 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ดูดเอาตัวอย่างจากจุดศูนย์กลางของภาชนะที่จุดครึ่งทางระหว่างผิวของตะกอนที่ตกตะกอนและผิวของของเหลว หาค่า ของแข็งแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร) ของส่วนนี้ ซึ่งเป็น nonsettleable matter

การคำนวณ

mg/l settleable solids = mg/l suspended matter – nonsettleable matter

8. การวิเคราะห์ของแข็งละลายน้ำ (Dissolved solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

Dissolved solids = Total solid – suspended solids

9. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1954)

Reaction mixture ประกอบด้วยตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เติม Somogyi reagent 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วเติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร อ่านค่าความเข้มสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank ทราบปริมาณน้ำตาลโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคส

Solution I : ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	12	กรัม
Na_2CO_3 (anhydrous)	24	กรัม
$NaHCO_3$	16	กรัม
Na_2SO_4 (anhydrous)	144	กรัม

น้ำกลั่น

ละลายสารข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

Solution II : ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	4	กรัม
Na_2SO_4	36	กรัม
น้ำกลั่น	200	กรัม

เตรียม Somogyi reagent โดยผสม Solution I 4 ส่วน กับ Solution II 1 ส่วน

การเตรียม Nelson reagent (Nelson, 1954)

1. ละลาย ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม conc. H_2SO_4 42 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี
2. ละลาย Sodium arsenate (Na_2NAsO_4) 3.5762 กรัม หรือ ($Na_2NAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายจากข้อ 2 ลงในสารละลายจากข้อ 1 และผสมให้เข้ากันดี
4. บ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
5. เก็บไว้ในขวดสีชา

10. การสร้างสารยับยั้งการเจริญโดยวิธี disc diffusion (Naclerio *et al*., 1993)

1.นำ *Bacillus* sp. และยีสต์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB และ YM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ดูดส่วนใสที่ได้มา 20 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร) วางบนจานเพาะเชื้อที่มีการเกลี่ยเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* (มีความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 0.5 และ 0.6 McFarland) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มนาน 18-24 ชั่วโมง

11. การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count)

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์
    1. ชั่ง trypan blue 0.15 กรัม ละลายในสารละลายเกลือแกงเข้ม 2.6 เปอร์เซ็นต์ ปั่นให้ละลายโดยใช้ magnetic stir ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง
    2. นำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ที่ความเร็ว 10,000 ต่อนาที ส่วนใสที่ได้นำมากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
    3. ดูดใส่ microtube หลอดละ 450 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

11.1 วิธีการนับปริมาณเม็ดเลือด

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 26 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้เลือดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ดูดมา 50 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลาย trypan blue นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้คำนวณเป็น เซลล์/มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

11.2 ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์

= กว้าง×ยาว×สูง

= 1mm×1mm×0.1mm

= $0.1(mm)^3$

ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด = $\frac{(\text{ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}/2) \times 5 \times 10(\text{dilution})}{0.1\ (mm)^3}$

= ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ $\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง

1. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)	1	ลิตร
ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	15.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		
2. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)	1	ลิตร
ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	15.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2		
3. อาหารเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth)	1	ลิตร
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	20.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	15	กรัม
แอมโนเนียมซิเตรต ($HOC(COONH_4)(CH_2COONH_4)_2$)	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรต (CH_3COONa)	5.0	กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.04	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 6.5 ± 0.2		
4. อาหารนมผงพร่องมันเนย (Skim milk agar)	1	ลิตร
นมผงพร่องมันเนย (Skim milk)	2.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	เล็กน้อย	
วุ้นผง	15.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ลงในน้ำ 900 มล. เข้าด้วยกันยกเว้นนมผงพร่องมันเนย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นจนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงนำมาผสมกับนมผงพร่องมันเนย 2% ปริมาตร 100 มล. ที่แยกฆ่าเชื้อต่างหากที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

5. อาหารแป้ง (Starch agar)	1	ลิตร
แป้ง (Soluble starch)	2.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2		

ภาคผนวก ค

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram' s iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มล.

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายแอมโนเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเล็ต (Amonium oxalate crytal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเลต (Crytal violet)	3.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	20.0	มล.

สารละลาย ข

แอมโนเนียมออกซาเลต (Amonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ผสมสารละลาย ก และ ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

3. สารละลายอะซีโตนแอลกอฮอล์ (Acetone alcohol solution)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	400.0	มล.
อะซิโตน (Acetone)	300.0	มล.

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดปิดฝาให้แน่น

4. สารละลายซาฟานิน (Safranin solution)

ซาฟานิน (Safranin)	0.25	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	10.0	มล.
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายซาฟานินด้วยเอธิลแอลกอฮออล์ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

5. สีย้อมสปอร์ (Endospore stain)

มาลาไคท์ กรีน (malachite green)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายสีในน้ำกลั่น หากมีตะกอนต้องกรองก่อนการใช้ทุกครั้ง

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟีนอลออกซิเดสแอคติวิตี้

1. M-199

ใช้ 1 ซองละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 500 มิลลิลิตร เติม $NaHCO_3$ 2.2 g ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.6 นำไปกรองแล้วเก็บในตู้เย็น

2. K-199 ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- M-199	50	มิลลิลิตร
- salt mixture	10	มิลลิลิตร
- $CaCl_2.2H_2O$	10	มิลลิลิตร
- NaCl	10	มิลลิลิตร
- L-glutamine	1	มิลลิลิตร
- Hepes	0.238	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น deionize sterilized ปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. Cacodylate buffer (CAC buffer) : ใน 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- Na Cacodylate	1.07	กรัม
- $CaCl_2$	0.37	กรัม
- $MgCl_2$	5.08	กรัม

ละลาย Cacodylate buffer ในน้ำกลั่น deionize sterilized แล้วเติม $CaCl_2$ ปั่นให้ละลายแล้วเติม $MgCl_2$ เมื่อละลายแล้วปรับ pH ให้ได้ 7.0 ไม่ต้องกรองเก็บไว้ในตู้เย็น

* CAC buffer ที่ใช้เตรียมสาร เมื่อนำออกมาจากตู้เย็น ควรตั้งไว้ให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อน

4. Stock solution

salt mixture : ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- KCl	0.4	กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$	3	กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$	3.3	กรัม
- $NaH_2PO_4.2H_2O$	0.05	กรัม

$CaCl_2.2H_2O$: ชั่ง 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร

NaCl ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร

L-glutamine ชั่ง 0.015 กรัม ใส่ใน microtube ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตร แช่แข็งไว้ แล้วแบ่งมาใช้ตามต้องการ

5. L-cysteine 3%

ชั่ง 0.03 กรัม ใส่บีกเกอร์ละลายใน K-199 1 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.6 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แช่เย็นไว้

6. Trypsin

ชั่ง 0.001 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย CAC buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าละลายจนหมด กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แช่เย็นไว้

7. L-DOPA

ชั่ง 0.003 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย CAC buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าละลายจนหมด (เนื่องจากละลายยาก จึงควรแบ่งมาละลายครั้งน้อยๆ) กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แช่เย็นไว้

8. Folin Reagent

นำมาเจือจาง 1: 10 เก็บไว้ในตู้เย็น

9. Working Alkaline Copper solution ประกอบด้วย

- 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ 1 ส่วน
- 1% NaKtatrate 1 ส่วน
- 1% Na_2CO_3 ใน 0.5 N NaOH 50 ส่วน

0.5% $CuSO_4.5H_2O$: เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ มา 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

1% NaKtatrate : เตรียมโดยชั่ง NaKtatrate มา 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

1% Na_2CO_3 ใน 0.5 N NaOH : เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น deionize sterilized 100 มิลลิลิตร แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นสนิท แล้วใส่ NaOH 2 กรัม เมื่อละลายแล้วจึงเติม Na_2CO_3 ลงไป 1 กรัม ปั่นหรือคนให้ละลายจนหมด

ผสมสารละลายทั้ง 3 อย่างรวมกันตามสัดส่วน จะได้ Working Alkaline Copper solution เก็บไว้ใช้ได้