

ปัจจัยการทดลอง	parameters						<i>E. coli</i> (CFU/ml)										residual chlorine (mg/l)		k (นาที ⁻¹)	R ²
	pH	temp (0C)	add Cl (mg/l)	add SS (mg/l)	add NH ₃ -N (mg/l)	add COD (mg/l)	contact time (min)										contact time (min)			
							0	5	10	20	30	60	120	180	240	0	30			
สารอินทรีย์ที่มีผลต่อการ คงชีพของ <i>E. coli</i>	6.35	29.8	-	-	-	0	2.8X10 ⁵	*	1.2X10 ⁵	5.8X10 ⁴	6.4X10 ⁴	1.7X10 ⁴	4.0X10 ³	5.3 X10 ³	8.7X10 ³	ND	ND	0.0602	0.8058	
	6.45	30.1	-	-	-	20	2.2X10 ⁵	*	1.5X10 ⁵	1.1X10 ⁵	8.8X10 ⁴	4.9X10 ⁴	7.7X10 ⁴	2.1X10 ⁵	1.0X10 ⁵	ND	ND	0.0323	0.9819	
	6.34	30.1	-	-	-	50	2.2X10 ⁵	*	1.8X10 ⁵	1.4X10 ⁵	1.2X10 ⁵	2.2X10 ⁵	3.6X10 ⁵	3.8X10 ⁵	7.2X10 ⁵	ND	ND	0.0209	0.9923	
	6.47	29.9	-	-	-	100	2.0X10 ⁵	*	1.7X10 ⁵	1.6X10 ⁵	1.9X10 ⁵	3.2X10 ⁵	4.5X10 ⁵	6.3X10 ⁵	2.4X10 ⁶	ND	ND	-	-	
ความเข้มข้นของคลอรีน ที่มีผลต่อการทำลาย <i>E. coli</i>	6.58	30.5	0	-	-	100	2.9 X 10 ⁶	2.5 X 10 ⁶	2.4 X 10 ⁶	2.4 X 10 ⁵	4.5 X 10 ⁴	6.5 X 10 ⁵	*	*	*	ND	ND	-	-	
	6.66	30.3	1	-	-	100	2.0X10 ⁵	1.7 X10 ⁵	1.4 X10 ⁵	1.0 X10 ⁵	6.1 X10 ⁴	8.0 X10 ⁴	*	*	*	0.4	0.3	0.0378	0.991	
	6.63	30.5	1.3	-	-	100	2.4 X10 ⁵	1.0 X10 ⁶	4.8 X10 ⁴	3.1 X10 ³	3.3 X10 ²	3.2 X10	*	*	*	0.7	0.5	0.2141	0.9881	
	6.61	30.1	1.5	-	-	100	2.6 X10 ⁵	3.6 X10 ⁴	2.7 X10 ³	8	ND	ND	*	*	*	1	0.6	0.5455	0.9574	
	6.70	30	2	-	-	100	2.3 X10 ⁵	2.2 X10 ²	ND	ND	ND	ND	*	*	*	1.3	0.8	1.3904	1	
pH ที่มีผลต่อการทำลาย <i>E. coli</i> ด้วยคลอรีน	5.08	30.2	1.3	-	-	100	1.1 X10 ⁵	9.8 X10 ²	8.7 X10	ND	ND	ND	*	*	*	0.9	0.6	0.7602	0.9599	
	6.54	30	1.3	-	-	100	1.1 X10 ⁵	4.8 X10 ⁴	8.6 X10 ³	8.2 X10 ²	3.6 X10 ²	6.2 X10	*	*	*	0.8	0.5	0.21	0.9566	
	7.08	30	1.3	-	-	100	1.3 X10 ⁵	6.1 X10 ⁴	4.9 X10 ³	7.3 X10 ³	8.5 X10 ²	2.1 X10 ²	*	*	*	0.9	0.6	0.1558	0.965	
	8.05	30.2	1.3	-	-	100	1.1 X10 ⁵	1.7 X10 ⁴	1.9 X10 ³	1.1 X10 ²	4.8 X10	3.2 X10	*	*	*	0.9	0.5	0.2949	0.9152	
สารอินทรีย์ที่มีผลต่อ การ ทำลาย <i>E. coli</i> ด้วย คลอรีน	6.86	30.2	1.3	-	-	50	1.9 X10 ⁵	9.5 X10 ⁴	4.0 X10 ³	3.7 X10	ND	ND	*	*	*	0.8	0.5	0.4056	0.9559	
	6.85	30.2	1.3	-	-	100	2.0 X10 ⁵	1.3 X10 ⁴	1.2 X10 ⁴	2.2 X10 ³	5.3 X10 ²	1.6 X10 ²	*	*	*	0.8	0.6	0.2095	0.9571	
	6.85	30.2	1.3	-	-	200	2.1 X10 ⁵	1.8 X10 ⁴	1.4 X10 ⁵	1.2 X10 ⁵	1.3 X10 ⁵	2.1 X10 ⁵	*	*	*	0.5	0.2	0.0213	0.6248	

ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ)

ปัจจัยการทดลอง	parameters						E. coli (CFU/ml)										residual chlorine (mg/l)		k (นาที ⁻¹)	R ²
	pH	temp (OC)	add Cl ₂ (mg/l)	addSS (mg/l)	addNH ₃ -N (mg/l)	addCOD (mg/l)	contact time (min)										contact time (min)			
							0	5	10	20	30	60	120	180	240	0	30			
ตะกอนแขวนลอยที่มีผล	6.75	30.5	1.3	0	-	100	9.4 X10 ⁴	4.3 X10 ⁴	2.1 X10 ⁴	1.7 X10 ³	1.9 X10 ²	4.8 X10	*	*	*	0.9	0.5	0.2002	0.987	
ต่อการทำลาย E. coli ด้วยคลอรีน	6.61	30.6	1.3	20	-	100	3.0 X10 ⁴	1.1 X10 ⁴	7.2 X10 ³	3.5 X10 ³	2.2 X10 ³	3.7 X10 ²	*	*	*	0.7	0.5	0.0987	0.8538	
	6.54	30.3	1.3	50	-	100	8.3 X10 ⁴	7.9 X10 ⁴	5.0 X10 ⁴	2.4 X10 ⁴	1.9 X10 ⁴	1.2 X10 ³	*	*	*	0.7	0.4	0.0522	0.9497	
	6.59	30.6	1.3	100	-	100	6.6 X10 ⁴	7.1 X10 ⁴	6.2 X10 ⁴	4.2 X10 ⁴	2.5 X10 ⁴	1.7 X10 ⁴	*	*	*	0.7	0.4	0.027	0.8416	
แอมโมเนียไนโตรเจนที่มี	6.50	30	1.3	-	7	100	1.6 X10 ⁵	7.9 X10 ⁴	3.8 X10 ³	4.5 X10 ³	1.5 X10 ²	3.2 X10	*	*	*	0.8	0.4	0.2095	0.9558	
ผลต่อการทำลาย E. coli คลอรีน	6.54	30.4	1.3	-	14	100	1.6 X10 ⁵	3.9 X10 ³	1.8 X10	ND	ND	ND	*	*	*	0.9	0.4	0.876	0.9867	
	6.45	30.3	1.3	-	28	100	1.7 X10 ⁵	1.4 X10 ²	9	ND	ND	ND	*	*	*	0.8	0.4	1.0718	0.9265	

ND = ไม่พบจุลินทรีย์ / non detected

* = ไม่ได้ทำการศึกษา / วิเคราะห์

k = ค่าคงที่ของอัตราการตาย (นาที⁻¹) จากสมการ
$$-\ln \frac{(N)_t}{(N)_0} = k t \quad (\text{ในช่วง 30 นาที})$$

ตารางภาคผนวก 2 ปริมาณของ coliphage ในน้ำเสียสังเคราะห์จากสภาวะต่างๆ

ปัจจัยการทดลอง	parameters						coliphage (PFU/ml)								residual chlorine (mg/l)		k (นาที ⁻¹)	R ²
	pH	temp (°C)	Cl add (mg/l)	add SS (mg/l)	add NH ₃ -N (mg/l)	add COD (mg/l)	contact time (min)								contact time (min)			
							0	10	20	30	60	120	180	240	0	30		
สารอินทรีย์ที่มีผลต่อการคงชีพของ coliphage	6.45	29.7	-	-	-	0	1.1 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	ND	ND	-	-
	6.21	29.8	-	-	-	20	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	9.1 X 10 ³	9.5 X 10 ³	ND	ND	-	-
	6.61	29.8	-	-	-	50	1.2 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁴	9.9 X 10 ³	ND	ND	-	-
	6.47	29.8	-	-	-	100	1.0 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	9.8 X 10 ³	1.1 X 10 ⁴	9.7 X 10 ³	9.5 X 10 ³	9.8 X 10 ³	9.6 X 10 ³	ND	ND	-	-
ความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลาย coliphage	6.56	30.6	0	-	-	100	1.0 X 10 ⁴	9.8 X 10 ³	9.5 X 10 ³	9.8 X 10 ³	1.0 X 10 ⁴	*	*	*	ND	ND	-	-
	6.67 ^a	30.6	1	-	-	100	8.6 X 10 ³	7.9 X 10 ³	7.2 X 10 ³	7.3 X 10 ³	7.0 X 10 ³	*	*	*	0.6	0.3	0.0067	0.8214
	6.66	30.2	1.3	-	-	100	1.0 X 10 ⁴	8.8 X 10 ³	7.8 X 10 ³	6.4 X 10 ³	5.9 X 10 ³	*	*	*	0.8	0.5	0.014	0.983
	6.66	30.5	1.5	-	-	100	1.2 X 10 ⁴	8.7 X 10 ³	8.1 X 10 ³	7.7 X 10 ³	6.5 X 10 ³	*	*	*	1	0.6	0.0174	0.7491
	6.62	30.4	2	-	-	100	1.1 X 10 ⁴	7.7 X 10 ³	7.2 X 10 ³	6.5 X 10 ³	5.4 X 10 ³	*	*	*	1.6	1.1	0.0199	0.8052
pH ที่มีผลต่อการทำลาย coliphage ด้วยคลอรีน	5.12	30.2	1.3	-	-	100	1.1 X 10 ⁴	6.9 X 10 ³	6.5 X 10 ³	4.9 X 10 ³	4.1 X 10 ³	*	*	*	0.8	0.6	0.0282	0.8908
	6.66	30.5	1.3	-	-	100	1.2 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	8.0 X 10 ³	7.6 X 10 ³	6.3 X 10 ³	*	*	*	0.8	0.6	0.0169	0.9457
	7.10	30	1.3	-	-	100	1.2 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	9.8 X 10 ³	7.8 X 10 ³	7.3 X 10 ³	*	*	*	0.7	0.5	0.0127	0.9356
	8.05	30.2	1.3	-	-	100	1.2 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁴	9.7 X 10 ³	7.9 X 10 ³	*	*	*	0.7	0.5	0.0058	0.8121
สารอินทรีย์ที่มีผลต่อการทำลาย coliphage ด้วยคลอรีน	6.82	30.6	1.3	-	-	50	8.9 X 10 ³	6.8 X 10 ³	5.5 X 10 ³	5.6 X 10 ³	4.1 X 10 ³	*	*	*	0.9	0.5	0.0187	0.8152
	6.70	30.6	1.3	-	-	100	1.2 X 10 ⁴	9.0 X 10 ³	8.1 X 10 ³	7.8 X 10 ³	6.3 X 10 ³	*	*	*	0.8	0.6	0.0169	0.7988
	6.77	30.7	1.3	-	-	200	7.9 X 10 ³	8.2 X 10 ³	7.7 X 10 ³	7.7 X 10 ³	7.1 X 10 ³	*	*	*	0.8	0.5	0.0007	0.2617

ตารางภาคผนวก 3 ปริมาณของ *E. coli* K12 จากสภาวะต่าง ๆ ในน้ำเสียจากโรงพยาบาล

ชุดทดลอง	parameters					<i>E. coli</i> K12 (CFU/ml)						total Cl ₂ residual (mg/l)	
	pH	temp. (°C)	COD (mg/l)	SS (mg/l)	NH ₃ -N (mg/l)	contact time (mins)						contact time (mins)	
						0	5	10	20	30	60	0	30
A1	3.31	30.7	46.56	19	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A2	3.26	30.2	46.56	19	0.5	7.8 X 10 ⁴	4.3 X 10 ⁴	4.4 X 10 ⁴	4.2 X 10 ⁴	3.9 X 10 ⁴	1.6 X 10 ⁴	ND	ND
A3	3.26	30.4	46.56	19	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	ND
A4	3.29	30.5	84.48	21	**	1.7 X 10 ³	1.1 X 10 ³	3.2 X 10 ²	2.5 X 10	ND	ND	0.1	ND
A5	3.27	30.4	92.64	45	**	1.5 X 10 ²	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	ND
A6	3.26	30.4	53.76	21	5.2	6.6 X 10 ²	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	ND
A7	6.63	30.5	46.56	21	0.5	1.9 X 10 ⁵	1.4 X 10 ⁵	8.2 X 10 ⁴	7.4 X 10 ⁴	5.9 X 10 ⁴	1.1 X 10 ⁵	ND	ND
A8	6.63	30.5	46.56	21	0.5	1.6 X 10 ⁵	1.2 X 10 ⁵	1.1 X 10 ⁵	4.5 X 10 ⁴	2.2 X 10 ⁴	5.3 X 10 ³	0.8	0.4
A9	7.88	30.3	50.44	21	0.5	2.4 X 10 ⁴	2.3 X 10 ⁴	7.1 X 10 ⁴	6.1 X 10 ³	5.3 X 10 ²	3.30 X 10 ²	0.7	0.3

A1 = น้ำเสีย

A2 = น้ำเสียที่เติม *E. coli*

A3 = น้ำเสียที่เติม *E. coli* และ คลอรีน

A4 = เพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ 2 เท่า เติม *E. coli* และ คลอรีน

A5 = เพิ่มของแข็งแขวนลอย 2 เท่า *E. coli* และ คลอรีน

A6 = เพิ่มแอมโมเนียไนโตรเจน 10 เท่า *E. coli* และ คลอรีน

A7 = น้ำเสีย pH 6 เติม *E. coli* แต่ไม่เติมคลอรีน

A8 = น้ำเสีย pH 6 เติม *E. coli* และ คลอรีน

A9 = น้ำเสีย pH 8 เติม *E. coli* และ คลอรีน

ND = ไม่พบจุลินทรีย์ / non detected

* = ไม่ได้ทำการศึกษา / วิเคราะห์

ตารางภาคผนวก 4 ปริมาณของ coliphage จากสภาวะต่าง ๆ ในน้ำเสียโรงพยาบาล

จุดทดลอง	parameters					coliphage (PFU/ml)						total Cl ₂ residual (mg/l)	
	pH	temp. (°C)	COD (mg/l)	SS (mg/l)	NH ₃ -N (mg/l)	contact time (mins)						contact time (mins)	
						0	5	10	20	30	60	0	30
B1	3.31	30.2	56.4	38	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B2	3.32	30.2	56.4	38	0.6	1.4 X 10 ³	5.8 X 10 ²	5.7 X 10 ²	1.8 X 10 ²	1.1 X 10 ²	3.3 X 10	ND	ND
B3	3.32	30.2	56.4	38	0.6	5	3	2	4	1	ND	0.1	ND
B4	3.38	30.3	109	34	*	2.1 X 10 ²	1.1 X 10 ²	6.1 X 10	3.9 X 10	3.3 X 10	*	0.1	ND
B5	3.32	30.2	112.8	71	*	2.7 X 10	6	5	2	3	1	0.1	ND
B6	3.32	30.6	63.3	34	6.6	2.7 X 10 ²	1.4 X 10 ²	8.2 X 10	3.3 X 10	1.9 X 10	7	0.2	0.1
B7	6.57	30.3	60.16	34	0.6	4.9 X 10 ³	4.7 X 10 ³	5.3 X 10 ³	5.1 X 10 ³	5.3 X 10 ³	5.3 X 10 ³	ND	ND
B8	6.57	30.1	60.16	34	0.6	4.6 X 10 ³	4.6 X 10 ³	5.2 X 10 ³	4.6 X 10 ³	4.8 X 10 ³	5.1 X 10 ³	0.7	0.3
B9	7.92	30.6	56.4	34	0.6	5.3 X 10 ³	5.3 X 10 ³	4.1 X 10 ³	4.3 X 10 ³	4.3 X 10 ³	4.4 X 10 ³	0.6	0.2

B1 = น้ำเสีย

B2 = น้ำเสียที่เติม coliphage

B3 = น้ำเสียที่เติม coliphage และ คลอรีน

B4 = เพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ 2 เท่า เติม coliphage และ คลอรีน

B5 = เพิ่มของแข็งแขวนลอย 2 เท่า coliphage และ คลอรีน

B6 = เพิ่มแอมโมเนียไนโตรเจน 10 เท่า coliphage และ คลอรีน

B7 = น้ำเสีย pH 6 เติม coliphage แต่ไม่เติมคลอรีน

B8 = น้ำเสีย pH 6 เติม coliphage และ คลอรีน

B9 = น้ำเสีย pH 8 เติม coliphage และ คลอรีน

ND = ไม่พบจุลินทรีย์ / non detected

* = ไม่ได้ทำการศึกษา / วิเคราะห์

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเสีย

1. ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) โดยวิธี Dichromate Open Reflux Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการรีฟลักซ์ (Refluxing apparatus)
2. ขวดเออร์เลเมเยอร์

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.25 M ละลาย $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 98 กรัม ในน้ำกลั่น เติม $\text{conc. H}_2\text{SO}_4$ 20 ml ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร

สารละลายนี้จะต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนในแต่ละวัน ด้วยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)

นำสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 10 ml เติมน้ำ 90 ml เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 30 ml ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาไตเตรด กับเฟอร์ริสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.25 M โดยใช้เฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติเปลี่ยนจากน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

การคำนวณ

$$\text{โมลาริตีของ FAS} = [\text{ปริมาณ } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \text{ (ml)} \times 0.25] / \text{ปริมาณ FAS ที่ใช้ (ml)}$$

2. สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต 0.0417 M ละลาย $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) 12.259 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สารละลายกรดซัลฟูริก ผสม Ag_2SO_4 และ $\text{conc. H}_2\text{SO}_4$ ด้วยสัดส่วน Ag_2SO_4 5.5 กรัม ต่อ $\text{conc. H}_2\text{SO}_4$ 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน ให้ Ag_2SO_4 ละลายก่อนนำมาใช้

4. ผงเมอร์คิวริกซัลเฟต (HgSO_4)

5. สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ ละลาย 1,10-phenanthroline monohydrate 1.485 กรัม และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml

วิธีวิเคราะห์

1. ตวงตัวอย่างปริมาตร 20 ml ใส่ในขวดรีฟลักซ์สำหรับหาค่าซีโอดี

2. เติม ผงเมอร์คิวริกซัลเฟต (HgSO_4) 0.4 กรัมและเม็ดแก้ว 3-4 เม็ด เติมสารละลายกรดซัลฟูริก(ผสม Ag_2SO_4) 5 ml อย่างช้าๆ
3. เติมสารละลายมาตรฐานปอตัสเซียมไดโครเมต 0.0417 M 10 ml
4. เติมสารละลายกรดซัลฟูริก (ผสม Ag_2SO_4) 25 ml ผสมให้เข้ากัน
5. นำขวดรีฟลักซ์สวมต่อกับเครื่องคอนเดนเซอร์ เปิดน้ำหล่อเย็น
6. เปิดเตาให้ความร้อนทำการรีฟลักซ์ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างคอนเดนเซอร์
7. ไตเตรตไดโครเมตที่มากเกินไปด้วย FAS 0.25 M โดยใช้สารละลายเฟอโรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติเปลี่ยนจากน้ำเงินแกมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง
8. ทำแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากับน้ำตัวอย่าง ทำการรีฟลักซ์เหมือนตัวอย่างทุกประการรวมทั้งสารเคมีที่ใช้ก็ต้องเท่ากันด้วย

การคำนวณ $\text{COD (mg/l)} = \frac{[(A - B) \times M \times 8,000]}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}}$

โดย COD = ค่า Chemical Oxygen Demand

A = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับแบลนด์ (ml)

B = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับตัวอย่าง (ml)

M = โมลาริตีของ FAS

2. ของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids, SS) โดยวิธี Gravimetric Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรองใยแก้ว (GF/C)
2. กรวยบุคเนอร์ (blucher funnel)
3. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)
4. โถทำแห้ง (desiccator)
5. เครื่องชั่งละเอียด

วิธีวิเคราะห์

1. อบกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก
2. เลือกปริมาณน้ำตัวอย่าง ที่จะได้ปริมาณของแข็งแขวนลอยไม่น้อยกว่า 2.5 มิลลิกรัม
3. วางกระดาษลงในกรวยบุคเนอร์ที่ต่อกับเครื่องดูดอากาศ

4. ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวยบุคเนอร์
5. กรองน้ำตัวอย่างโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ
6. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ติดอยู่ข้างกรวยจนหมด
7. ปิดเครื่องดูดอากาศ คีบกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ นำไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง
8. ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งแขวนลอย (mg/l)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (B-A)} \times 1000}{\text{ปริมาณน้ำตัวอย่าง (ml)}}$$

โดยที่

$$A = \text{น้ำหนักกระดาษกรองก่อนทำการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)}$$

$$B = \text{น้ำหนักกระดาษกรองหลังทำการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)}$$

3. คลอรีนตกค้าง (Residual Chlorine) โดยวิธี DPD Ferrous Titrimetric Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพูขนาด 250 ml
2. บิวเรตขนาด 10 ml

สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ละลายไตรโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4) 24 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (KH_2PO_4) 46 กรัม ในน้ำกลั่น พร้อมกับอิดีทีเอ (ละลายอิดีทีเอ 800 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น 100 ml) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร และเติม HgCl_2 20 มิลลิกรัม เพึ่งลงไปเพื่อกันราและการรบกวนไอโอดีน

2. สารละลายดีพีดี ละลาย DPD sulfate pentahydrate 1.5 กรัม หรือ anhydrous DPD sulfate 1.1 กรัม ลงในน้ำกลั่น ที่มีกรดซัลฟูริก 1+3 จำนวน 8 ml และไตรโซเดียมอิดีทีเอ จำนวน 200 มิลลิกรัม ผสมอยู่เฉือจางให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในที่มืดโดยใช้ขวดสีชาและจุกแก้ว

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.0282 N ละลาย $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.106 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่มี 1+3 H_2SO_4 จำนวน 1 ml ผสมอยู่ เติมน้ำกลั่นที่เพึ่งต้มเดือดและปล่อยให้เย็นมาใหม่ ๆ จนได้ปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน สารละลายนี้จะต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนในแต่ละวัน ด้วยสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ COD

4. ผลึกโพแทสเซียมไอโอดีน

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ สารละลายดีพีดี ลงในขวดที่ใช้ในการไตเตรด อย่างละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมตัวอย่างน้ำ 100 ml ผสมให้เข้ากัน
3. เติมผลึกโพแทสเซียมไอโอไดด์ ประมาณ 1 กรัม ผสมให้ละลาย ปล่อยให้ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และนำไตเตรดกับสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.0282 N จนสีแดงหายไป

การคำนวณ

สำหรับน้ำตัวอย่าง 100 ml สารละลาย FAS 0.0282 N 1 ml เท่ากับ 1 mg Cl as Cl_2 /l

4. แอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia Nitrogen)

I สำหรับการวิเคราะห์ แอมโมเนียไนโตรเจน จะใช้วิธีการวิเคราะห์ 2 วิธีคือ 1. วิธี phenate method ซึ่งใช้ในกรณีที่น้ำเสียมีแอมโมเนียไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0-0.6 mg/l วิธีที่ 2 คือ วิธี Titrimetric method ซึ่งใช้ในกรณีที่มีแอมโมเนียไนโตรเจนอยู่ในช่วง >5 mg/l

4.1 แอมโมเนียไนโตรเจน วิธี Phenate Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดกลั่นแอมโมเนีย
2. ขวดรูปกรวยขนาด 300 ml
3. เครื่องวัด pH
4. ขวดเคลตาร์ทขนาด 800 ml
5. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ละลาย KH_2PO_4 14.3 กรัม และ K_2HPO_4 68.8 กรัม ในน้ำปราศจากแอมโมเนีย แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1000 ml หรือสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) เติม NaOH 0.01 N 88 ml ลงใน sodium tetraborate solution 0.025 M 500 ml (ละลาย anhydrous $Na_2B_4O_7$ 5.0 กรัม หรือ $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 9.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร) แล้วเจือจางจนได้ 1 ลิตร

3. สารละลายฟีนอล ละลาย ฟีนอล (C_6H_5OH) ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นของฟีนอล $> 89\%$ แล้วนำมาจำนวน 11.1 ml แล้วเจือจางด้วย 95 % ethyl alcohol ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 ml

4. sodium nitroprusside ละลาย sodium nitroprusside 0.5 กรัม ในน้ำปราศจากแอมโมเนียมีปริมาตรรวม 100 ml

5. alkaline citrate ละลาย trisodium citrate 200 กรัม และ NaOH 10 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

6. สารละลาย oxidizing ผสม alkaline citrate 100 ml กับ sodium hypochlorite 25 ml

5. สารละลาย standard sulfuric 0.04 N โดยใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 2.8 ml ผสมน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียจนได้ 1 ลิตร จะได้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N จากนั้นเจือจาง 400 ml ของกรด 0.1 N ด้วยน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียจนได้ 1 ลิตร กรดที่ได้ขั้นสุดท้ายนี้จะมีมีความเข้มข้นประมาณ 0.04 N หากความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 โดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.04 N

6. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.04 N : ละลาย Na_2CO_3 2.12 กรัม (อบที่อุณหภูมิ 250 นาน 4 ชม.) ในน้ำกลั่นที่ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. สารละลายสต็อกแอมโมเนีย ละลาย NH_4Cl 381.9 มิลลิกรัม (อบให้แห้งที่ $100^\circ C$) ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย จนได้ปริมาตร 1000 ml

8. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย นำสต็อกแอมโมเนีย 500 ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย จนได้ปริมาตร 1000 ml (1ml = 50 ไมโครกรัมไนโตรเจน)

8. สารละลายที่ใช้ในการปรับ pH

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N : ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียเจือจางเป็น 1 ลิตร

- สารละลายกรดซัลฟูริก 1 N : ละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 28 ml ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 500 ml ปล่องยให้เย็น แล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 N : ละลาย NaOH 240 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียเจือจางเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การกลั่นล้างเครื่องมือ ใส่น้ำกลั่น 500 ml และ buffer 20 ml ปรับ pH ให้เป็น 9.5 ด้วย NaOH 6 N ใส่ลูกแก้ว (glass beads) ลงไป ผสมสารละลายให้เข้ากัน กลั่นล้างจนแอมโมเนียหมด

2. การกลั่นตัวอย่าง นำตัวอย่าง 500 ml หรือตัวอย่างที่มีการเจือจาง 500 ml มาปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 เติมสารละลาย buffer 25 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 9.5 ถ่ายใส่ Kjeldahl flask เติมลูกแก้ว (glass beads) นำไปกลั่น เก็บ distillate 200 ml จับด้วย sulfuric 0.04 N 50 ml รวมเป็น 250 ml

3. นำ distillate 25 ml ไปเติม สารละลาย phenal sodium nitroprusside อย่างละ 1 ml และ สารละลาย oxidizing 2.5 ml ปิดด้วย parafilm เก็บในที่มืดอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

4. เทสารละลายที่ได้จากข้อ 3 ลงในเซลล์ของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วัดความขุ่นที่ 5 ± 0.5 นาที่ ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย

เตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียในไตรเจน ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการปิเปต 0, 2, 6, และ 10 ml ของสารละลายแอมโมเนียที่เตรียมไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรแต่ละขวด 500 ml และทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่าง

4. คำนวณค่าปริมาณแอมโมเนียในไตรเจน โดยนำค่าที่วัดได้จากตัวอย่าง เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียในไตรเจน

4.2 แอมโมเนียในไตรเจน วิธี Titrimetric Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดกลั่นแอมโมเนีย
2. ขวดรูปกรวยขนาด 300 ml
3. เครื่องวัด pH
4. ขวดเคลดดาห์ลขนาด 800 ml
5. บิวเรตขนาด 50 ml

สารเคมี

1. น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ละลาย KH_2PO_4 14.3 กรัม และ K_2HPO_4 68.8 กรัม ในน้ำปราศจากแอมโมเนีย แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1000 ml หรือสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) เติม NaOH 0.01 N 88 ml ลงใน sodium tetraborate solution 0.025 M 500 ml (ละลาย anhydrous $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 5.0 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 9.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร) แล้วเจือจางจนได้ 1 ลิตร

3. สารละลายอินดิเคเตอร์ : ละลาย Methyl red 200 mg ใน ethyl หรือ isoprpopyl alcohol 95 % 100 ml ละลาย methylene blue 100 mg ใน ethyl หรือ isoprpopyl alcohol 95 % 50 ml รวมสารละลายสองอย่างเข้าด้วยกันเตรียมใช้แต่ละเดือน

4. กรดบอริก+อินดิเคเตอร์ : ละลาย H_3BO_3 20 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียเติมอินดิเคเตอร์ 10 ml แล้วเจือจางจนได้ 1 ลิตร เตรียมใช้ในแต่ละเดือน

5. สารละลาย standard sulfuric 0.02 N : ใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 2.8 ml ผสมน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียจนได้ 1 ลิตร จะได้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N จากนั้นเจือจาง 200 ml ของกรด 0.1 N ด้วยน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียจนได้ 1 ลิตร กรดที่ได้ขั้นสุดท้ายนี้จะมีความเข้มข้นประมาณ 0.02 N หาความเข้มข้นของกรด H_2SO_4 โดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 N

6. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.02 N : ละลาย Na_2CO_3 1.060 กรัม (อบที่อุณหภูมิ 250 นาน 4 ชม.) ในน้ำกลั่นที่ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. สารละลายที่ใช้ในการปรับ pH

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N : ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียเจือจางเป็น 1 ลิตร

- สารละลายกรดซัลฟูริก 1 N : ละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 28 ml ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 500 ml ปล่อยให้เย็น แล้วเจือจางเป็น 1 ลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 N : ละลาย NaOH 240 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียเจือจางเป็น 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. การกลั่นล้างเครื่องมือ ใส่น้ำกลั่น 500 ml และ buffer 20 ml ปรับ pH ให้เป็น 9.5 ด้วย NaOH 6 N ใส่ลูกแก้ว (glass beads) ลงไป ผสมสารละลายให้เข้ากัน กลั่นล้างจนแอมโมเนียหมด

2. การกลั่นตัวอย่าง นำตัวอย่าง 500 ml หรือตัวอย่างที่มีการเจือจาง 500 ml มาปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 เติมสารละลาย buffer 25 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 9.5 ถ่ายใส่ Kjeldahl flask เติม ลูกแก้ว (glass beads) นำไปกลั่น เก็บ distillate 250 ml จับด้วยกรดบอริก+อินดิเคเตอร์ 50 ml รวมเป็น 300 ml นำ distillate ไปไตเตรทกับสารละลายกรดมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N จนกระทั่งถึงจุดยุติกลายเป็นสีม่วงอ่อน

สำหรับ blank ทำเหมือนตัวอย่างทุกประการแต่นำน้ำกลั่นแทน

การคำนวณ

$$\text{mg NH}_3\text{-N/l} = [(A-B) \times 280] / \text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}$$

โดยที่ $\text{NH}_3\text{-N} =$ แอมโมเนียไนโตรเจน

A = ml สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = ml สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 N ที่ใช้ในการไตเตรท blank

ภาคผนวก ค.
วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยา

1. Total coliform bacteria โดยวิธี multiple tube fermentation technique

ทำการวิเคราะห์โดยใช้ระบบ 5 หลอด เป็นเทคนิคการตรวจหาเชื้อ coliform bacteria โดยมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

สำหรับน้ำเสียที่มีปริมาณ coliform bacteria มาก ต้องนำมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ก่อน ตามความเหมาะสม ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

1.1 ละลาย 34.0 กรัม ของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ในน้ำกลั่น (distilled water) 500 ml ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ± 0.5 ด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml

1.2 นำสารละลายจากข้อ 1.1 มาปริมาณ 1.25 ml เติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 5.0 ml (50 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ต่อน้ำกลั่น 1000 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml

1.3 ตวงใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอັได อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การทดสอบขั้นแรก (presumptive test)

1. การเตรียมหลอดทดลอง (test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (durham tube) ซึ่งวางในลักษณะคว่ำภายในหลอดทดลอง วางหลอดทดลองในที่วางหลอดทดลอง (rack) 3 แถว ๆ ละ 5 หลอด

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl tryptose broth 35.6 กรัม หลอมละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปใส่ในหลอดทดลองที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน 9 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอັได อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อาหารเมื่อฆ่าเชื้อภายในอุณหภูมิความดัน และเวลาที่กำหนดแล้วไม่ควรปล่อยให้เย็นในหม้อนึ่งอັได เพราะจะทำให้อาหารพวก tryptose เสื่อมสลายตัวไป

3. เขียนสัญลักษณ์และปริมาตรของตัวอย่างบนหลอดทดลอง

4. ดูดตัวอย่างด้วยปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2 จำนวน 3 แถว ๆ ละ 5 หลอด ปริมาณ 1 ml ใน

แถวที่ 1 และ ปริมาณ 1 ml ในตัวอย่างน้ำที่ผ่านการเจือจางแล้ว โดยให้มีตัวอย่างน้ำ 0.1 ml และ 0.01 ml ในแถวที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

5. เขย่าหลอดบรรจุตัวอย่างด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติให้เข้ากัน
6. เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างเสร็จแล้ว ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัตินาน 2 นาที เพื่อให้ส่วนผสมต่าง ๆ เข้ากันดี
7. นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มเชื้อ (incubate) ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
8. การอ่านผลการทดลอง เมื่อบ่มเชื้อครบ 48 ชั่วโมง ก่อนอ่านผลต้องเขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเสียก่อน ตรวจสอบดูก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดมีก๊าซเกิดขึ้นไม่ว่าเท่าไร แสดงว่าการตรวจสอบขั้นแรกให้ผลบวกบันทึกผล และนำไปทำการตรวจสอบขั้นยืนยันทุกหลอด ถ้าหลอดใดไม่มีก๊าซแสดงว่าการตรวจสอบขั้นแรกมีผลลบ บันทึกผล

การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test)

1. นำหลอดที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอด มาทำการทดลองในขั้นยืนยันต่อไป
2. เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ เพื่อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green lactose bile broth 2% (BGLB) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 ml หลอมละลายแล้วบรรจุหลอดละ 10 ml นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. เขียนสัญลักษณ์บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารดังกล่าว และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้จำนวนเท่ากับจำนวนหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก
4. เลือกหลอดที่เกิดก๊าซ จากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบา ๆ แล้วใช้ห่วงเย็บเชื้อ (wire loop) ซึ่งฉลไฟฆ่าเชื้อจนแดง ทิ้งให้เย็นสักครู่ ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกของ lauryl tryptose broth แต่ละหลอดลงในหลอด BGLB หลอดต่อหลอด และต้อง sterile loop ทุกครั้งที่จะใช้
5. เขย่าหลอด BGLB ที่ถ่ายเชื้อลงไป ให้ส่วนผสมเข้ากันดี นำเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. อ่านผลการทดลองหลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำมาตรวจดูการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซจะให้ผลบวก บันทึกผลว่าหลอดที่เกิดก๊าซจำนวนกี่หลอด

7. นำผลของหลอดที่ให้ผลบวกและลบในแต่ละการเจือจาง ไปคำนวณหา coliform bacteria จากตารางดัชนี MPN (most probable number index) ซึ่งค่านี้จะบอกถึงจำนวน coliform bacteria ที่มีโอกาสพบได้บ่อยกว่าค่าอื่น ๆ สำหรับตัวอย่างนั้น ๆ ในรูปของ MPN/100ml

2. Fecal coliform bacteria

การตรวจวิเคราะห์ขั้นนี้ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml บรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ภายใน หลอดละ 10 ml นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที โดยมีขั้นตอนวิเคราะห์ ดังนี้คือ

1. การตรวจสอบขั้นแรก ใช้เทคนิควิธีการเดียวกับการวิเคราะห์หา coliform bacteria ทุกประการ

2. เขียนสัญลักษณ์บนหลอดอาหาร EC medium ให้ได้จำนวนเท่ากับหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก

3. ใช้หวงเขี่ยเชื้อ ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเชื้อจากหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวกทุกหลอด หลอดต่อหลอด ให้เขย่าหลอดจาก lauryl tryptose broth เบา ๆ ก่อนถ่ายเชื้อทุกครั้ง โดยทำพร้อมกับการตรวจ coliform bacteria ในชั้นยืนยันที่ใช้อาหาร BGLB

4. นำหลอดอาหารเหลว EC medium ที่ได้รับการถ่ายเชื้อแล้ว ไปบ่มเชื้อในเครื่องอ่งน้ำภายใน 30 นาที หลังจากเติมเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยให้ระดับน้ำในเครื่องอ่งน้ำ ท่วมสูงเกินระดับผิวบนอาหารในหลอด

5. การอ่านผลการทดลอง หลอดที่พบว่าเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซให้อ่านผลเป็นบวก แสดงว่า coliform bacteria ที่ปะปนอยู่ในตัวอย่าง เป็น fecal coliform bacteria ที่ถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น หลอดที่ไม่เกิดก๊าซภายใน 24 ชั่วโมงให้อ่านผลเป็นลบ แสดงว่า coliform bacteria ที่ปะปนอยู่ในตัวอย่างตรวจเป็นพวก non-fecal coliform bacteria ซึ่งมาจากพืชหรือดิน

6. นำผลการอ่านไปคำนวณหาจำนวน fecal coliform bacteria จากตารางดัชนี MPN จะได้ค่าของ fecal coliform bacteria ในรูป MPN/100 ml

3. coliphage โดยวิธี double layer agar (Adam, 1959 and Ketratanakul, 1989 quoted in Danteravanich, 1992 : 42-45)

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ phage broth ประกอบด้วย 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ และ 0.15% dextrose โดยเตรียมการละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น แล้วนำไปปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ± 0.2 เทใส่หลอดและ flask นำไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ top agar เตรียมโดยเติม bacto agar จำนวน 6 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phage broth 1,000 ml และเติมด้วย 0.1 นอร์มัล $CaCl_2$ solution 75 ml แล้วนำไปต้มจนเดือด ปิดเตาละลายใส่ในหลอด ๆ ละ 4 ml นำไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บรักษา top agar ไว้ใน waterbath อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ phage bottom agar ประกอบด้วย 1.1% bacto agar และ phage broth เตรียมโดยเติม bacto agar 11 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phage broth 1,000 ml แล้วนำไปต้มให้เดือดจน agar ละลายหมด หลังจากนั้นนำไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเทลงใน plate ที่ sterile แล้ว

2. การเตรียมไฮสท์เซลล์

แบคทีเรียที่ใช้เป็นไฮสท์เซลล์คือ E.coli K12 F^+ (A/λ) โดยนำ stock bacteria จากมหาวิทยาลัยโตเกียวในประเทศญี่ปุ่นซึ่งเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เมื่อจะเตรียมเป็น working stock bacteria นำ stock bacteria มาเชยเชื้อ (streak plate) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่เก็บรักษา working stock bacteria ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเตรียมแบคทีเรียไฮสท์โดยเชยเชื้อจาก working stock bacteria ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phage bottom agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชยเชื้อแบคทีเรียที่เป็น colony เดี่ยว ๆ 1-2 colony ลงใน phage broth ปริมาณ 10 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 3.5 – 4 ชั่วโมง แล้วจึงจะนำมาใช้เป็นแบคทีเรียไฮสท์ซึ่งเป็นระยะ early exponential growth phase

3. วิธีการตรวจวิเคราะห์

1.1 นำ top agar ที่เก็บรักษาไว้ใน waterbath มาเติมแบคทีเรียโฮสต์ *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) ในปริมาณหลอดละ 0.35 ml (ปริมาณแบคทีเรีย 10⁸ CFU/ml) (Danteravanich, 1992 : 45)

1.2 เติมน้ำตัวอย่างลงไป 0.1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วเทลงบน phage bottom agar

1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าเมื่อปรากฏเป็นวงใสขึ้นมาให้ถือว่าเป็นผลบวก แสดงว่ามี bacteriophage มีหน่วยเป็น PFU (plaque forming unit)/ml

4. *E.coli* โดยวิธี Direct Plating

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MFC agar (Merck : Germany) ซึ่งประกอบด้วย

tryptose	10	กรัม
proteose-peptone	5	กรัม
yeast extract	3	กรัม
sodium chloride	5	กรัม
lactose	12.5	กรัม
bile salts mixture	1.5	กรัม
methyl blue(formerly aniline blue)	0.1	กรัม
agar-agar	15	กรัม

การเตรียม MFC agar โดยนำ MFC agar จำนวน 52 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร พร้อมกับเติม 10 ml 1% rosolic acid ใน 0.2 N NaOH แล้วนำไปต้มให้เดือดจน agar ละลายหมด ปล่อยให้เย็นมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และควบคุมให้มี pH 7.4±0.2

วิธีการตรวจวิเคราะห์

เติมน้ำตัวอย่างลงไปบน plate 1 ml แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MFC agar บ่มที่อุณหภูมิ 44.5±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โคโลนีที่เกิดขึ้นโดย fecal coliform bacteria จะมีสีน้ำเงิน มีหน่วยเป็น CFU (colony forming unit)/ml