ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. สีย้อมแกรม (Gram stain) โดยวิธี Hucker modification of gram method (Rodina, 1972)

การเตรียมสารละลาย

1. crystal violet

- crystal violet	2	กรัม
- ammonium oxalate	0.8	กรัม
- ethyl alcohol (95เปอร์เซ็นต์)	20	มิลลิลิตร
- distilled water	80	มิลลิลิตร

ทำการผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน ควรเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

2.Lugal solution

- crystalline iodine	1	กรัม
- potassium iodine	2	กรัม
- distilled water	300	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วคนสารให้ละลายเข้าด้วยกัน แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

3.Safranin solution

เตรียม stock safranin 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

วิธีการย้อมสีแกรม

นำเชื้อมาเกลี่ย (smear) บาง ๆ ลงบนสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ (fixed) เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับสไลด์ แล้วหยด crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยด lugal solution ทิ้งไว้ 1 นาที ทำการล้างสี (decolorized) ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 30 วินาที รีบล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสี safranin ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ผลการทดสอบ คือ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง
แบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง

2. การเตรียมการทดสอบด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อสเตรฟโตคอคคัสทางชีวเคมี (Api 20 Strep) และอาหารทดสอบอื่น ๆ (Atlas, 1993 ; Mars, 1994)

1. Api 20 Strep (Biomerieux) เป็นชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารทดสอบคุณสมบัติทั้งหมดได้ 20 คุณสมบัติ คือ Acetoin production (VP), Hydrolysis (HIP), β-glucosidase(ESC), Pyrrolidonyl arylamidase (PYRA), α-galactosidase (α GAL), β-glucuronidase (βGUR), β-galactosidase (βGAL), Alkaline phosphatase (PAL), Leucine arylamidase (LAP), Arginine dihydrolase (ADH), Ribose (RIB), L-Arabinose (ARA), Mannitol (MAM), Sorbital (SOR), Lactose (LAC), Trehalose (TRE), Inulin (INU), Raffinose (RAF), Starch (AMD) และ Glycogen (GLYG)

วิธีการทดสอบ

เตรียมสารละลายเชื้อสเตรฟโตคอคคัสให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 แล้วใช้ไมโครไปเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายเชื้อใส่ลงในช่อง ต่าง ๆ จนเรียบร้อย และนำแถบ Api มาใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายรีเอเจนต์แล้วนำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจผล หลังจากได้ผลแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Api test เพื่อที่จะแยกเชื้อ

3. หลักการการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและกายภาพของเชื้อสเตรฟโตคอคคัส (นันทนา, 2537)

1. การทดสอบ Catalase test

หลักการ : เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกได้ก๊าซออกซิเจน และน้ำ ดังนั้นการทดสอบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ชนิดนี้หรือไม่ ทำได้โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนี ถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลเป็นบวก การทดลองนี้ไม่ควรทำการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่เพราะเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์คะตะเลสอยู่ภายในเซลล์ จึงทำให้แปรผลผิดพลาดได้

การทดสอบ ใช้เข็มหรือลูปเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนีมาแตะลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้วทำการหยด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ สังเกตุผลดังนี้

การอ่านผล ผลบวก มีฟองอากาศเกิดขึ้นในทันที

ผลลบ ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น

2. การทดสอบ Oxidase test

หลักการ : เป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase) โดยปกติจะใช้รีเอเจนต์ที่ไม่มีสี แต่จะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ รีเอเจนต์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride หรือ dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เมื่อถูกออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้จะมีสีม่วงหรือน้ำเงินเข้ม ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดส จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

น้ำยาทดสอบ สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทดสอบ หยดสารละลายลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้เข็มหรือลูปเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองนั้น

การอ่านผล ผลบวก จะเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองภายในเวลา 10นาที

ผลลบ ไม่มีสีเกิดขึ้น

3. การทดสอบ Decarboxylase test

หลักการ : แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยกรดอะมิโนให้เอมีนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller decarboxylase medium ที่มีกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ ไลซีน, อาร์จีนีน และ/หรือ ออร์นีทีน อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสและอินดิเคเตอร์ คือ bromcresol purple ในช่วงแรกของการบ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลืองและอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสทำงาน หมายถึง มีการย่อยกรดอะมิโนเกิดขึ้นให้เอมีนที่มีผลทำให้เป็นด่างมากขึ้นทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนกลับเป็นสีม่วง ดังนั้นในหลอดควบคุมที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน แต่ไม่มีกรดอะมิโน แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสหลอดควบคุมควรให้สีเหลือง เพราะมีการใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศไม่สามารถให้สีเหลืองก่อนได้ ดังนั้นการใช้กรดอะมิโน โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงให้สีม่วงเข้ม ในการทดสอบจะใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ decarboxylase medium ทั้งในหลอดที่มีกรดอะมิโนและไม่มีกรดอะมิโน หยดพาราฟินลงไปให้สูงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในการอ่านผลต้องเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมเสมอ โดยผลบวกหลอดควบคุมจะเป็นสีเหลือง หลอดที่เป็นกรดอะมิโนจะเป็นสีม่วง ส่วนผลหลอดควบคุมเป็นสีเหลือง หลอดที่มีกรดอะมิโนเป็นสีเหลือง

อาหารทดสอบ ชุดทดสอบ Api 20 Strep

การทดสอบ ใส่สารละลายเชื้อสเตรฟโตคอคคัสลงในช่อง ADH แล้วปิดทับด้วยพาราฟินเหลว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นส้มแดงหรือแดง

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ตารางภาคผนวกที่ ก1 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 10 วัน ในปลานิลแดงแปลงเพศขนาดเล็ก ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

conc	lny D	n	nDd	nAl	acc Dd	acc Al	t	Per M
1.400×10^{9}	21.060	10	7	3	28	22	50	70
1.275×10^{7}	16.361	10	6	4	21	19	40	60
1.325×10^{5}	11.794	10	6	4	15	15	30	60
1.050×10^{3}	6.957	10	5	5	9	11	20	50
0.975×10^{2}	4.580	10	4	6	4	6	10	40

conc. = concentration of *Streptococcus* sp. (cell/ml/fish)

lny D = lny dose

n = number of test fish per concentration

nDd = number of dead fish

nAl = number of living fish

acc Dd = accumulated of dead fish

acc Al = accumulated of living fish

t = total of accumulated dead amd living fish

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 10 วัน

จากสูตร

LD_{50} = lny concentration below 50 % mortality+(50-mortality below 50 % / mortality above 50 %-mortality below 50 %) x (lny concentration above 50 %-lny concentration below 50 %)

$$= 4.580+\frac{(50-40)}{60-40}x(11.794-4.580)$$

$$= 4.580+\frac{(10)}{20}x(7.214)$$

$$= 4.580+3.607$$

$$= 8.187$$

get anti lny 8.187 = $3.59x10^{3}$ โคโลนี/มิลลิลิตร

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร

lny = 329.95X+4.8155

เมื่อ y = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

X = absorbance ที่ 540 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) = 0.981

แทนค่าในสูตร

$$8.187 = 329.95X+4.8155$$

$$329.95X = 8.187–4.8155$$

$$X = \frac{3.3715}{329.95}$$

= 0.0102 ที่ 540 นาโนเมตร

ดังนั้นค่า absorbance ที่ 540 นาโนเมตร คือ 0.0102

ตารางภาคผนวกที่ ก2 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 10 วัน ของปลานิลแดงแปลงเพศขนาดใหญ่ ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

conc	lny D	n	nDd	nAl	acc Dd	acc Al	t	Per M
1.000×10^{9}	20.723	10	9	1	34	16	50	90
0.225×10^{7}	14.626	10	9	1	25	15	40	90
1.125×10^{5}	11.631	10	8	2	16	14	30	80
0.925×10^{3}	6.830	10	6	4	8	12	20	60
1.500×10^{2}	5.011	10	2	8	2	8	10	20

conc. = concentration of *Streptococcus* sp. (cell/ml/fish)

lny D = lny dose

n = number of test fish per concentration

nDd = number of dead fish

nAl = number of living fish

acc Dd = accumulated of dead fish

acc Al = accumulated of living fish

t = total of accumulated dead amd living fish

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 10 วัน

จากสูตร

LD_{50} = Iny concentration below 50 % mortality+(50-mortality below 50 % / mortality above 50 %-mortality below 50 %) x (Iny concentration above 50 %-Iny concentration below 50 %)

$$= 5.011+\frac{(50-20)}{60-20}x(6.830-5.011)$$

$$= 5.011+\frac{(30)}{40}x(1.819)$$

$$= 5.011+1.364$$

$$= 6.375$$

get anti Iny 6.375 = $5.87x10^{2}$ โคโลนี/มิลลิลิตร

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร

$$Iny = 329.95X+4.8155$$

เมื่อ y = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

X = absorbance ที่ 540 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) = 0.981

แทนค่าในสูตร

$$6.375 = 329.95X+4.8155$$

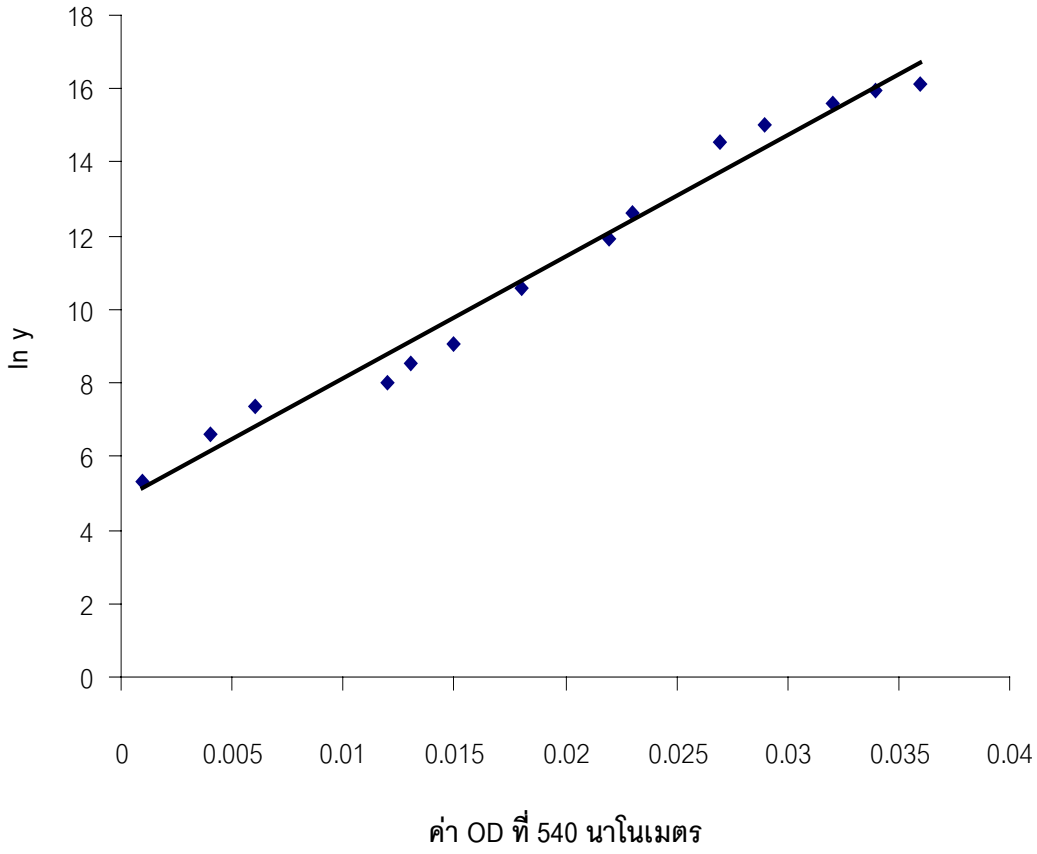
$$329.95X = 6.375–4.8155$$

$$X = \frac{1.5595}{329.95}$$

= 0.0047 ที่ 540 นาโนเมตร

ดังนั้นค่า absorbance ที่ 540 นาโนเมตร คือ 0.0047

ภาพผนวกที่ ก1 standard curve ระหว่างค่า absorbance และ จำนวนเซลล์ต่อมล. (ln y)



$$\ln y = 329.95X + 4.8155$$

เมื่อ y = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

X = absorbance ที่ 540 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (corelation) = 0.981

ตารางภาคผนวกที่ ก3 การหา standard curve ระหว่างค่า absorbance และจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (lny)

absorbance	lny
0.001	5.298
0.004	6.620
0.006	7.346
0.010	7.990
0.013	8.549
0.015	9.040
0.018	10.558
0.022	11.918
0.023	12.612
0.027	14.532
0.029	15.020
0.032	15.607
0.034	15.956
0.036	16.118

ภาคผนวก ข

การเตรียมและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

การเตรียมอาหารทดลอง

ตารางภาคผนวก ข1 ส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลอง ดัดแปลงสูตรของ อรอุษา, (2546)

ส่วนประกอบ (กรัม/อาหาร 100 กิโลกรัม)	สูตรอาหาร			
	1	2	3	4
1. ปลาป่น	22	22	22	22
2. กากถั่วเหลือง	25	25	25	25
3. รำ	26	26	26	26
4. แป้งสาลี	15	15	15	15
5. วิตามินผสม	1	1	1	1
6. แร่ธาตุผสม	4	4	4	4
7. โปรตีนแป้ง	5	5	5	5
8. น้ำมันปลา : น้ำมันพืช	2	2	2	2
9. น้ำมันเปลือกอบเชยเทศ (มิลลิลิตร)	0	0.025	0.05	0.10

[1] วิตามินผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Retinal (A) 1.20 มิลลิกรัม (4,000 IU) ; Cholecalciferol (D_3) 0.51 มิลลิกรัม (2,000 IU) ; Tocopherol (E) 50 มิลลิกรัม ; Menadione sodium bisulfite 10 มิลลิกรัม ; Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม ; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม ; Pyridoxine (B_6) 20 มิลลิกรัม ; Cyanocobalamin 0.2 มิลลิกรัม ; Calcium pantothenate 200 มิลลิกรัม ; Niacin 150 มิลลิกรัม ; Folic acid 5 มิลลิกรัม ; Biotin 2 มิลลิกรัม และ Inositol 400 มิลลิกรัม

[2] แร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย $MnSO_{4.}.H_2O$ 25 มิลลิกรัม ; $ZnSO_{4.}.7H_2O$ 20 มิลลิกรัม ; $FeSO_4.7H_2O$ 30 มิลลิกรัม ; KIO_3 5 มิลลิกรัม ; $CuSO_4.5H_2O$ 5 มิลลิกรัม ; $CoCl_2.6H_2O$ 0.05 มิลลิกรัม และ Na_2SeO_3 0.3 มิลลิกรัม

เตรียมอาหารทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง โดยอาหารทุกชุดการทดลองมีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ให้มีระดับความเข้มข้นของน้ำมันเปลือกอบเชยเทศที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 250, 500 และ 1,000 พีพีเอ็ม

วิธีการเตรียมอาหารทดลองโดยชั่งวัสดุดิบอาหารแต่ละอย่างได้แก่ รำละเอียด ปลาป่น กากถั่วเหลือง น้ำมันพืช น้ำมันปลา โปรตีนแป้ง วิตามิน และแร่ธาตุรวม จากสูตร (ตารางผนวก ข1) ผสมส่วนประกอบวัสดุดิบอาหารให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร ซึ่งในการเตรียมวิตามินและแร่ธาตุรวมให้ทำการชั่งด้วยเครื่องชั่งที่ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัดจนกระทั่งส่วนผสมของวัสดุดิบอาหารดังกล่าวผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จึงนำน้ำมันผสมลงไปในอาหารจนกระทั้งส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้ากันจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ส่วนในขั้นตอนการเตรียมน้ำมัน โดยการผสมน้ำมันพืช : น้ำมันปลา ในอัตราส่วน 1 : 1 ตามปริมาณในสูตร หลังจากอาหารผสมเข้ากันดี นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ด ทำการอัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารทดลองไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่ออาหารแห้งแล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลองมาสเปรย์น้ำมันเปลือกอบเชยในสภาพอุณหภูมิต่ำ ให้มีความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 250, 500, และ 1,000 พีพีเอ็ม หลังจากนั้นเก็บรักษาอาหารที่เตรียมเสร็จในตู้แช่แข็งพร้อมทำการทดลอง

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ในระหว่างการทดลองสังเกตลักษณะผิดปกติภายนอกและพฤติกรรมการกินอาหารของปลารวมทั้งสังเกตพฤติกรรมที่ผิดปกติในปลาแต่ละกลุ่ม โดยตรวจสอบระหว่างการกินอาหาร

2. การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ทำการชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์ weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ specific growth rate) คำนวณตามวิธีของ Jantrarotai และคณะ (1994) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966)

ตารางภาคผนวก ข2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของอาหารปลานิลแดงแปลงเพศทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ	**ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)**
1. ความชื้น	4.29±0.11
2. โปรตีน	40.05±0.21
3. ไขมัน	9.14±1.04
4. เถ้า	13.00±0.25

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

การคำนวณการเจริญเติบโตตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994)

- การคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์ weight gain) โดยสมการ

$$\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักปลาสุดท้าย-น้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}} \times 100$$

- การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) โดยสมการ

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวต่อวัน)} = \frac{(\ln \text{น้ำหนักสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{เวลา (วัน)}} \times 100$$

- การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีการของ Dupree and Sneed (1966) จากสมการ

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

1. **การวิเคราะห์ความชื้น** (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนักของขวดโดยละเอียด
3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด
4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง
6. ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไป คือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ เปอร์เซ็นต์ ความชื้นด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ความชื้น} = \frac{(a-b)}{w} \times 100$$

a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง
b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง
w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

2. **การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า** (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ
2. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว
3. นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

- คำนวณเปอร์เซ็นต์ เถ้าด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ เถ้า} = \frac{(b-a)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ
b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา
w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

3. การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 93-98 เปอร์เซ็นต์
2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (NaOH) โดยละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร
4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
5. กรดบอริค (H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร
6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทธิลเรด และเมทธิลีนบลู ละลายเมทธิลเรด 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน
7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

<u>วิธีการ</u>

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน
2. เติมสารเร่งรวม 10 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร
4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร
2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลาย
3. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตร อยู่ โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ
4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2-3 หยด
5. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) โดยใช้อินดิเคเตอร์รวม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน
2. จดปริมาตรของกรดเกลือไว้เพื่อคำนวณต่อไป

<u>การคำนวณ เปอร์เซ็นต์ โปรตีน</u>

$$\text{เปอร์เซ็นต์ โปรตีน} = \frac{1.4x(V_1-V_2)xNx6.25}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

4. การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6) (ตามวิธีการของ AOAC, 1985)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)
2. เมทธานอล (methanol)

<u>วิธีการ</u>

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)
4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1-2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง Soxtec System HT6
5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องให้เรียบร้อย
6. เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที
7. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที
8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที
9. ปิดเครื่อง อากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง แล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
10. นำถ้วยออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

<u>การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน</u>

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ไขมัน} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

ภาคผนวก ค.

วิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลา

1. สารเคมี วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (Bancroft, 1967 ; Humason, 1972)

สารเคมี

ก. การเตรียมน้ำยาดองเนื้อเยื่อและสีย้อม

1. ฟอร์มาลีน (formalin) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

- ฟอร์มาลีน (formalin)	100	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

- ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4	กรัม
- โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8	กรัม
- อลัม (potasium aluminium sulfate, alum)	100	กรัม
- กรดซิตริก (citric acid)	4	กรัม
- คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200	กรัม
- น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

- อีโอซิน (eosin Y.Cl 45380)	1	กรัม
- เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethyl aclohol)	1,000	มิลลิลิตร
- กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ข. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) 50 พีพีเอ็ม

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับออกแล้วดองในน้ำยาบูแองทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตัดแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนที่ 2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตัดแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover grass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

6. นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	10-20
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2-4
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. เมาท์ (mount) ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) เพื่อทำสไลด์ถาวร แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ง.
วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

1.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

<u>สารเคมี</u>

1. ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphthalein indicator): เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ ๆ แล้วเปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ ๆ วางไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

- การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

<u>วิธีการ</u>

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดฟีนอลฟ์ทาลีนอินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน

2.1 ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไปบันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

- การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ

$$\text{ค่าความเป็นด่าง} = \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1,000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

2. การวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker, 1992)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) : เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 67.5 กรัม ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปริมาตร 570 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2. อีรีโอโครมแบล็กที (Eriochrome black T) อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride, $H_2NOH.HCl$) 4.5 กรัม และอีรีโอโครมแบล็กที 0.50 กรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.01 โมลาร์ : เตรียมละลายแอนไฮดราสคาร์บอเนต (anhydrous $CaCO_3$) ปริมาณ 1 กรัม ในกรดเกลือเจือจาง (1:1) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือดนาน 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย ให้ได้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมอีดีทีเอ (sodium EDTA) 0.01 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งอีดีทีเอ 4 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, $MgCl_26H_2O$) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

- การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

ดูดสารละลายสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0.010 โมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ที่ใช้ไป เพื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ (โมล) โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. เติมอินดิเคเตอร์ อีรีโอโครมแบล็กที 8 หยด เขย่าให้เข้ากัน

4. นำมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แล้วจดปริมาตรของสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ ทั้งหมดที่ใช้ไป

- การคำนวณค่าความกระด้างของน้ำ (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)

$$\text{ค่าความกระด้าง} = \frac{\text{ปริมาตรของอีดีทีเอxโมลาริตี้ของอีดีทีเอx100.1x1,000}}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$