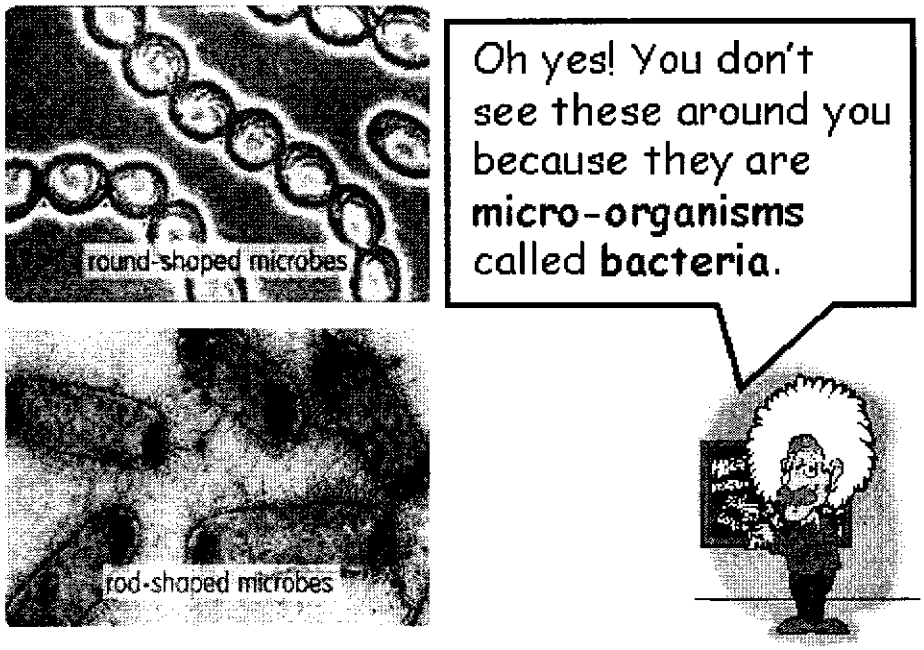
คู่มือปฏิบัติการ
รายวิชา 432 207 ปฏิบัติการชีววิทยาสิ่งแวดล้อม



ภาคการศึกษาที่ 2 ปีการศึกษา 2548

สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อภินันทนาการ

คำนำ

คู่มือปฏิบัติการวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นเอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม(432 207 Environmental Biology) ซึ่งเปิดสอนสำหรับนักศึกษาสาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ซึ่งได้มีการรวบรวมครั้งแรกโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีรัตน์ รอดทอง และต่อๆมาได้มีการปรับปรุงแก้ไขโดยคณาจารย์สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นผู้รับผิดชอบสอนในรายวิชานี้ เพื่อให้เหมาะสมและสอดคล้องกับเครื่องมือต่างๆที่มีอยู่ในสาขาวิชาในปัจจุบัน และเป็นประโยชน์ต่อศึกษาสูงสุดในการได้ฝึกใช้เครื่องมือที่ทันสมัยมากยิ่งขึ้น

จรียา ยิ้มรัตนบวร

ตุลาคม 2547

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
ปฏิบัติการที่ 1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscopes)	1
ปฏิบัติการที่ 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อ (Preparation of Culture Media and Sterilization)	10
ปฏิบัติการที่ 3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count for Enumeration of Microorganisms)	21
ปฏิบัติการที่ 4 การตรวจหาจุลินทรีย์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Multiple-Tube [MPN] Fermentation Technique for Determination of Microorganisms)	28
ปฏิบัติการที่ 5 การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธีเยื่อกรอง (Membrane – Filter Technique for Determination of Coli form Bacteria)	37
ปฏิบัติการที่ 6 สิ่งมีชีวิตในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน (Biota in Aerobic Wastewater-Treatment System)	43
ปฏิบัติการที่ 7 Biochemical Oxygen Demand (BOD)	
ปฏิบัติการที่ 8 ระบบนิเวศสระน้ำ : ปัจจัยทางกายภาพ (Pond Ecosystem: Physical Factors)	48
ปฏิบัติการที่ 9 อัตราผลผลิตทางชีวภาพ (Biological Productivity)	54

บทปฏิบัติการที่ 1

กล้องจุลทรรศน์ (Microscopes)

กล้องจุลทรรศน์ เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยให้เห็นสิ่งมีชีวิต เซลล์ ฯลฯ ที่มีขนาดเล็กได้ กล้องจุลทรรศน์อาจแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ กล้องจุลทรรศน์แสง (Light microscopes) กับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopes) ในกรณีของกล้องจุลทรรศน์แสงที่ใช้ในปฏิบัติการวิชาหลักชีววิทยานี้จะมี 2 แบบ คือ

1) กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

ประกอบด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective) ชุดเดียวที่จะทำหน้าที่รับแสงที่ผ่านมาจากวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้ตา (ocular หรือ eyepiece) กล้องแบบนี้ใช้ระบบแสงส่องผ่านทะลุ (transmitted light) ซึ่งใช้สำหรับศึกษาวัตถุที่บางและโปร่งแสง ภาพที่เห็นจากกล้องแบบนี้มีเพียง 2 มิติ (กว้าง x ยาว) โดยไม่มีความลึก กล้องแบบนี้สามารถปรับกำลังขยายได้ตั้งแต่ 40 – 1,000 เท่าหรือมากกว่า โดยทั่วไปเรียกกล้องแบบนี้ว่า กล้องจุลทรรศน์

2) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)

ประกอบด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective) 2 ชุดแยกจากกัน ทำให้ภาพที่เห็นเป็นแบบ 3 มิติ (กว้าง x ยาว x ลึก) เหมือนดูด้วยตาจริง ๆ กล้องแบบนี้ใช้สำหรับศึกษาวัตถุทั้งวัตถุโปร่งแสงและทึบแสง กล้องแบบนี้มีกำลังขยายไม่สูงมากนักเพียงประมาณ 4-40 เท่าหรือมากกว่า โดยทั่วไปเรียกกล้องแบบนี้ว่ากล้องสเตอริโอ (Stereo microscope) หรือ กล้องผ่าตัด (Dissecting microscope)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาสามารถ

1) บอกส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ทั้ง 2 แบบได้
2) ใช้และดูแลรักษากล้องจุลทรรศน์ทั้ง 2 แบบได้อย่างถูกต้อง
3) รู้จักวิธีเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (wet mount) ได้

วัสดุและอุปกรณ์

Compound microscope, Stereo microscope

Ocular และ Stage micrometer

สไลด์, กระจกปิดสไลด์, ตัวอย่างน้ำที่จะใช้ศึกษา, ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ใช้วัด

วิธีการศึกษา

แบ่งการศึกษา ออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาส่วนประกอบ การใช้ และการดูแลรักษาของกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope (รูปที่ 1.1)

1.1 ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์

1.1-1 เลนส์ใกล้ตา (eyepiece หรือ ocular)

อาจมี 1 หรือ 2 อัน ถ้ามี 1 อันเรียก monocular microscope ถ้ามี 2 อันเรียก binocular microscope (สำหรับกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในปฏิบัติการนี้เป็นชนิด binocular microscope) eyepiece นี้อาจมีกำลังขยายขนาดต่าง ๆ ได้ แต่โดยทั่วไปใช้กำลังขยาย 10 เท่า (10 x) ตัวเลนส์สวมอยู่ในกระบอกบนท่อสำหรับดูวัตถุ ตัวท่อสามารถหมุนได้รอบตัว ที่ฐานของตัวเลนส์จะมีที่ปรับระยะห่างของตาทั้ง 2 ข้าง (interpupillary distance scale) เพื่อให้เหมาะกับตาของแต่ละบุคคล และยังมีที่ปรับความยาวของกระบอกท่อสำหรับดู (mechanical tube length adjustment ring) เพื่อปรับระยะโฟกัสของตาม ทั้ง 2 ข้าง ซึ่งอาจไม่เท่ากัน ภายในเลนส์อาจใส่เข็มชี้ (pointer) โดยทั่วไปอาจใช้เส้นผม เพื่อใช้ชี้แสดงตำแหน่งของภาพที่มองเห็น

1.1-2 ลำกล้อง (body tube) เป็นส่วนที่อยู่ระหว่างเลนส์ใกล้ตา กับเลนส์ใกล้วัตถุ

1.1-3 เลนส์ใกล้วัตถุ (objective) (ดูภาคผนวกประกอบ) มี 4 อัน คือ

เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 4 x (low-power objective)

เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 10 x (medium-power objective)

เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 40 x (high-power objective)

เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยายสูงสุด 100 x (Oil immersion objective)

จะสังเกตเห็นว่า Objective ทั้ง 4 อันนี้ ติดอยู่กับแป้นที่หมุนได้ (revolving nosepiece)

1.1-4 แขน (arm)

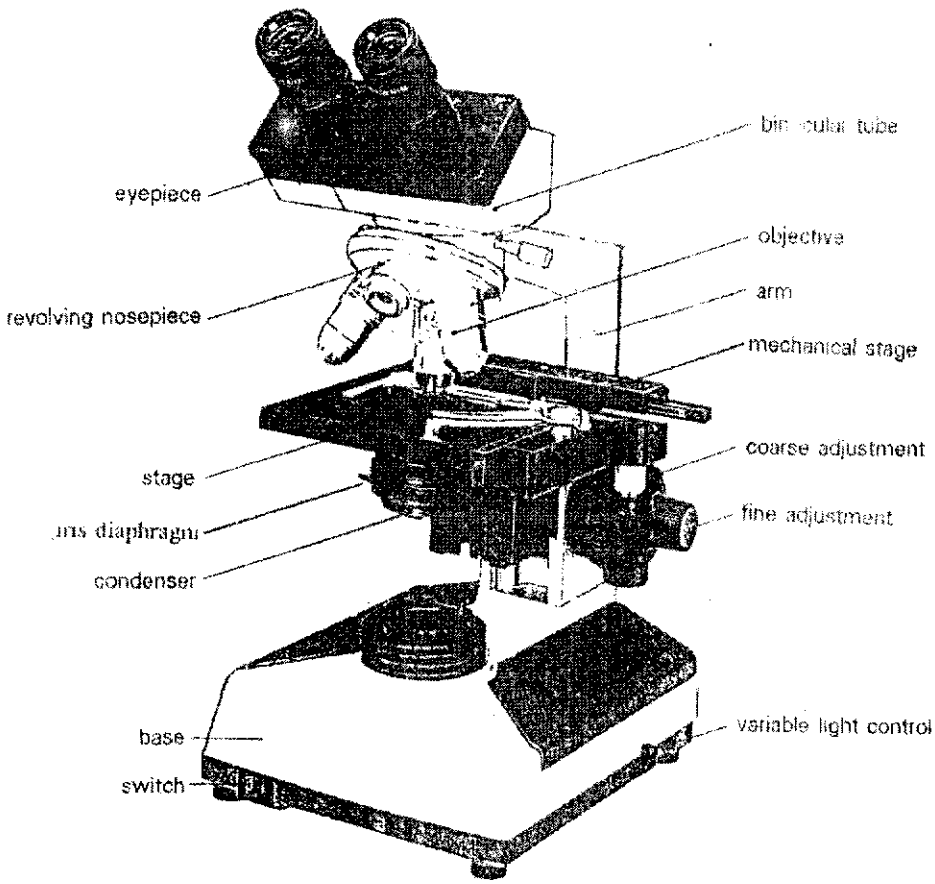
แขนของกล้องจะติดอยู่กับฐาน (Base) ของกล้องซึ่งฐานนี้เป็นส่วนที่ช่วยยึดตัวกล้องให้ตั้งได้อย่างมั่นคงที่ฐานจะมีสวิตซ์ สำหรับเปิด-ปิดไฟ แยกออกจากปุ่มเร่ง-หรี่ แสง (variable light control)

1.1-5 แท่น (stage)

เป็นที่รองรับแผ่นกระจกสไลด์ หรือวัตถุอื่นที่จะนำมาตรวบริเวณกลางแท่นจะมีช่องให้แสงผ่านวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุ แท่นนี้สามารถปรับขึ้นลงได้ด้วยปุ่มปรับหยาบ และละเอียด (Coarse and fine adjustment) ใช้ปรับระยะโฟกัสเพื่อให้เห็นวัตถุที่ต้องการตรวจหาในกล้องจุลทรรศน์

1.1-6 แท่นกล (mechanical stage)

เป็นอุปกรณ์ซึ่งติดอยู่บนแท่นของกล้อง เพื่อให้ยึดแผ่นกระจกสไลด์มีปุ่มสำหรับหมุนเลื่อนกระจกสไลด์ไปทางซ้าย ขวา ไปข้างหน้าหรือถอยหลังได้ มีสเกลบอกตำแหน่งของกระจกสไลด์เพื่อสะดวกในการนำกระจกสไลด์มาศึกษาใหม่โดยไม่จำเป็นต้องเสียเวลาในการตรวจหาตำแหน่งของวัตถุที่ต้องการดูใหม่ ใต้แท่นกลจะมีเลนส์รวมแสง (Condenser) และใต้เลนส์รวมแสงจะมีม่านปรับแสง (iris diaphragm) ซึ่งอาจปรับหรี่หรือขยายได้ เพื่อปรับปริมาณแสงที่เข้าไปยังเลนส์รวมแสง



รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของ Compound microscope

1.2 วิธีใช้ Compound microscope และการเก็บรักษา

1.2-1 วิธีใช้กล้องจุลทรรศน์

การปรับกล้องจุลทรรศน์เพื่อให้เห็นภาพชัดควรทำตามลำดับ ดังนี้

การปรับแสง

1) เปิดสวิตซ์ที่ฐาน ปรับปุ่มควบคุมความเข้มของแสง

2) ปรับตำแหน่งให้อยู่ในตำแหน่งต่ำจาก Stage ประมาณ 2-3 มม.

3) เลื่อนคันโยกเพื่อเปิด iris diaphragm ให้แสงผ่านได้เต็มที่

การจัด Condenser และ iris diaphragm ให้อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ จะมีผลเปลี่ยนแปลงความเข้มของแสงได้ แต่ในทางปฏิบัติไม่นิยมปรับความเข้มของแสงโดยวิธีนี้ เพราะจะทำให้เสียความสามารถในการจำแนกรายละเอียด (resolution) การเลื่อนตำแหน่งเลนส์รวมแสงและม่านปรับแสงจะใช้เพื่อเพิ่มความคมชัดเท่านั้น เช่น ในการศึกษาสิ่งมีชีวิต ซึ่งย้อมสีไม่ได้

การปรับภาพให้ชัด

1) เลื่อน stage ลงต่ำสุดด้วย coarse adjustment

2) จัด objective กำลังขยายต่ำสุด (4 x) ให้อยู่ในตำแหน่งโดยหมุน revolving nosepiece ให้เลนส์เข้าที่จนมีเสียงดังกริ๊ก

3) วาง กระจกสไลด์ ที่ต้องการดูลงบน stage ล็อคกระจกสไลด์ ให้อยู่กับที่ และจัดให้สิ่งที่ต้องการศึกษาในกระจกสไลด์ อยู่ตรงกับตำแหน่งของลำแสง

4) หมุน coarse adjustment ให้ stage ขึ้นสูงสุด

5) มองผ่าน eyepiece พร้อมกันทั้ง 2 ตา ปรับระยะห่างของ eyepiece ให้พอดีกับระยะห่าง ของตาของผู้ที่จะศึกษา และปรับโฟกัสด้วย coarse adjustment จนกระทั่งเห็นภาพแล้วจึงปรับด้วย fine adjustment เพื่อให้เห็นภาพชัดเจนยิ่งขึ้น

6) เลื่อนตำแหน่งของสิ่งที่ต้องการศึกษาให้อยู่ตรงกลางพื้นที่ที่มองเห็น

7) เมื่อเห็นภาพด้วย objective 4 x แล้ว หากจะเปลี่ยนมาที่กำลังขยาย 10 x หรือ 40 x ก็ให้จับ revolving nosepiece แล้วหมุนมาที่ objective ตามต้องการจนมีเสียงดังกริ๊ก นักศึกษาจะยังคงเห็นภาพปรากฏอยู่ หากไม่ชัดก็เพียงแต่ปรับ fine adjustment อีกเล็กน้อยก็จะเห็นภาพชัดเจนดีขึ้น

หมายเหตุ: ทุกครั้งที่เปลี่ยนกำลังขยายของ Objective ให้ปรับความเข้มข้องแสงให้พอเหมาะด้วย

1.2-2 วิธีรักษาและเก็บกล้องจุลทรรศน์

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ให้นักศึกษา

1) ปรับปุ่มควบคุมความเข้มของแสงไปที่ศูนย์ แล้วปิดสวิตช์ไฟ

2) เลื่อน stage ลงให้อยู่ในตำแหน่งต่ำสุด

3) เก็บกระจกสไลด์ ออกจาก stage

4) จัด objective 4 x ให้กลับมาอยู่ในตำแหน่งเดิม จนมีเสียงดังกริ๊ก โดยจับ revolving nosepiece หมุน

5) ทำความสะอาด objective ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์เท่านั้น อย่าให้มีรอยขีดข่วน หรือรอยนิ้วมือสัมผัสบนเลนส์เป็นอันขาด สำหรับ objective ที่ใช้น้ำมันให้ใช้กระดาษ

เช็ดเลนส์เช็ดน้ำมันออก แล้วเช็ดตามด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ชุบไซลีน (xylene) เล็กน้อย หลังจากนี้จึงเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์อีกครั้งหนึ่ง

6) ทำความสะอาด stage ด้วยผ้าที่สะอาด

7)

ปิดไฟทุกครั้งที่ไม่ได้ใช้กล้องหรือขณะหยุดไปทำการทดลองอื่นการปิดไฟจะช่วยยืดอายุของหลอดไฟ

8) ถอดสายไฟออก

9) คลุมกล้องทุกครั้งเพื่อกันฝุ่น

การเคลื่อนย้ายกล้อง

เมื่อต้องการเคลื่อนย้ายกล้องให้ใช้มือหนึ่งจับที่ arm ของกล้อง อีกมือหนึ่งรองที่ base อย่าแกว่งหรือเอียงกล้อง เพราะจะทำให้ส่วนประกอบบางชิ้นซึ่งถอดได้หลุดเสียหาย

การทดลองที่ 2 ศึกษาส่วนประกอบการใช้และการดูแลรักษาของกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) รูปที่ 1.2

2.1 ส่วนประกอบสำคัญของกล้องจุลทรรศน์

กล้องสเตอริโอ ที่ใช้ในปฏิบัติการนี้ เป็นกล้องแบบ Binocular ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ

1) ฐาน (base) มี clip สำหรับหนีบกระดาษสไลด์และ มีแท่น (stage) ซึ่งเป็นแผ่นวัตถุกลม ๆ ด้านหนึ่งสีดำ ด้านหนึ่งสีขาว สามารถถอดเปลี่ยนได้

2) แหล่งกำเนิดแสง อาจอยู่ติดกับตัวกล้อง หรืออยู่นอกกล้องก็ได้ แต่กล้องสเตอริโอในปฏิบัติการนี้ จะมีอุปกรณ์เป็นชนิดไฟส่องบนและติดอยู่กับตัวกล้อง

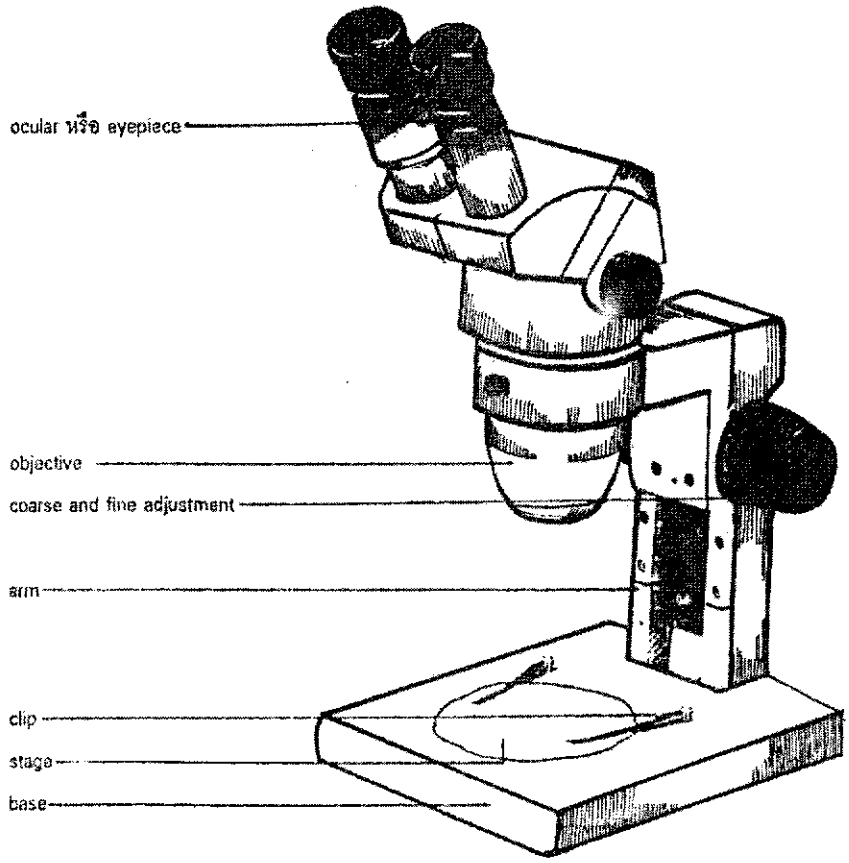
3) ปุ่มปรับหยาบ (coarse adjustment) และปุ่มปรับละเอียด (fine adjustment) อยู่ด้วยกัน

4) เลนส์ใกล้วัตถุ (objective) เป็นชนิดซูมทำให้สามารถเปลี่ยนกำลังขยายได้ต่อเนื่องกันมีกำลังขยาย 0.67-4 เท่า

5) เลนส์ใกล้ตา (ocular หรือ eyepiece) มีกำลังขยาย 10 เท่า

6) แขน (arm) จะติดอยู่กับฐาน

ภาพขยายจากกล้องสเตอริโอ เป็นภาพเสมือนที่มีลักษณะเหมือนวัตถุที่จะดู เป็นภาพ 3 มิติ มองเห็นรายละเอียดของสิ่งที่ต้องการดู เช่น เกสรดอกไม้ ตาแมลง ฯลฯ ชัดเจนขึ้น กล้องแบบนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในการผ่าตัด และศึกษาหรือแยกตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตบางชนิดได้



รูปที่ 1.2 ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

2.2 วิธีใช้ Stereo microscope และการเก็บรักษา

นำวัตถุ หรือสิ่งที่ต้องการศึกษามาวางลงบน Stage เช่น ดอกไม้ หรือแมลง ฯลฯ จากนั้นเปิดไฟให้ส่องไปยังสิ่งที่ต้องการดู ปรับซูม objective จนเห็นภาพชัด ทำให้เห็นภาพของดอกไม้ หรือแมลง ฯลฯ ที่มีขนาดขยายใหญ่ขึ้น เห็นรายละเอียดมากขึ้น ลักษณะของภาพที่เห็นเป็น 3 มิติ

ในการเก็บรักษากล้องสเตอริโอ คล้ายกับการเก็บรักษา Compound microscope นอกจากนี้ยังควรระมัดระวังไม่ให้ stage ของ stereo microscope เกิดรอยขูดขีด หรือสกปรก ด้วยเป็นพิเศษ

การทดลองที่ 3 การเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (wet mount) และศึกษาสไลด์จากกล้องจุลทรรศน์ 2 แบบ

3.1 การเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (wet mount) เป็นการเตรียมสไลด์สำหรับศึกษาตัวอย่างพืช หรือสัตว์ขนาดเล็กขณะยังมีชีวิตอยู่

3.2 การเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (รูปที่ 1.3) และใช้ดูด้วย Compound microscope มีลำดับขั้นดังนี้ คือ

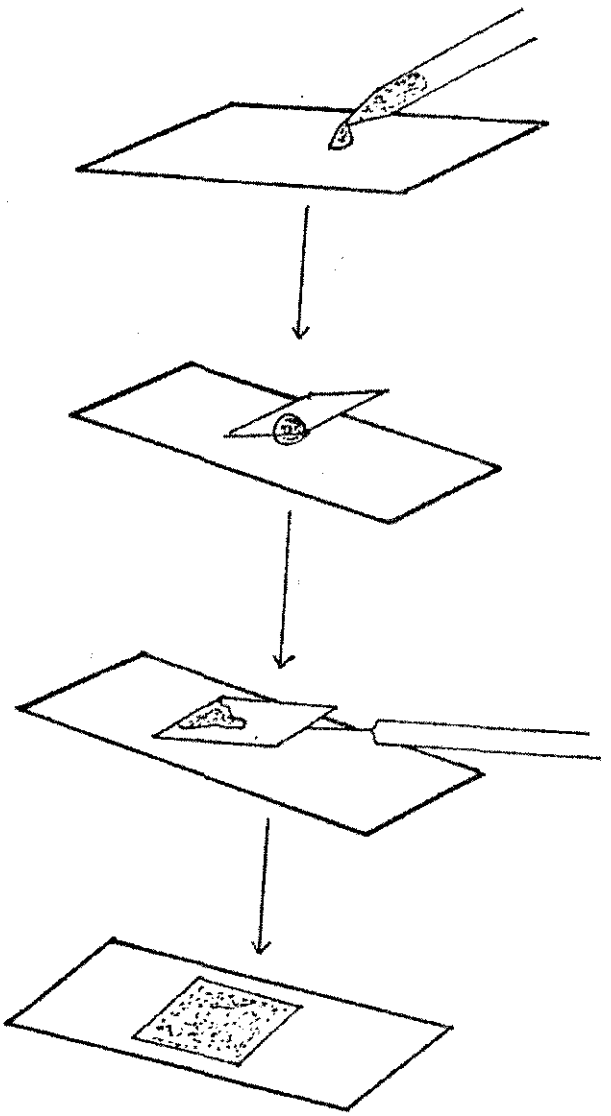
1) หยดน้ำลงบนกระจกสไลด์ 1 หยด

2) ใช้ปากคีบหยิบสิ่งต้องการจะศึกษามาวางบนหยดน้ำ หรือใช้หลอดหยดดูดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในน้ำมาหยดลงบนกระจกสไลด์ 1 หยด

3) นำกระจกปิดสไลด์มาวางทับสิ่งที่ต้องการศึกษา โดยให้ด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์แตะกับน้ำบนสไลด์โดยใช้เข็มช่วยประคองกระจกปิดสไลด์ไว้ จากนั้นค่อย ๆ เลื่อนเข็มเขี่ยออกจนกระทั่งกระจกปิดสไลด์ไว้

4) หากทำถูกต้องจะไม่เห็นฟองอากาศ เช็ดน้ำที่ล้นออกมาให้แห้ง ให้นักศึกษาเตรียมสไลด์ด้วยวิธี wet mount นี้แล้วนำไปส่องดูด้วย Compound microscope

3.3 การเตรียมสไลด์สำหรับดูด้วย Stereo microscope ให้นักศึกษาใช้หลอดหยด ดูดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในน้ำ หยดลงในสไลด์หลุม 2-3 หยด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



รูปที่ 1.3 แสดงวิธีเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (wet mount)

การบันทึกผลการทดลอง

1. ให้นักศึกษาแสดงวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์ทั้งสองแบบให้อาจารย์ผู้สอนตรวจสอบ
2. ให้นักศึกษาแสดงวิธีการเตรียมสไลด์สำหรับดูสดให้อาจารย์ผู้สอนตรวจสอบ
3. ให้นักศึกษาแสดงวิธีการใช้กล้อง
   จนสามารถมองเห็นภาพชัดจากสไลด์ที่เตรียมในการทดลองที่ 3
   ให้อาจารย์ผู้สอนตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

คลุ้ม วัชโรบล 2510 สัตววิทยาภาคปฏิบัติ ไทยวัฒนาพานิช

Bailey, P.C., D.C. Holliman, T.S. quarled, and E.D. Waits. (1970) Laboratory Guide for an Introduction to Modern Biology, International Text Book Company. An Intex Publisher, Scranton, Pensylvania.

Baret, R. (1968) Lecture Notes on the Use of the Microscope. Third Edition, Second Printing. Blackwell Scientific Publication. Oxford and Edinburgh.

Bauer, P.H., M.A. Magnoli, A. Alvarez, D. Chang-van Horn, and D.T. Gomes. (1981) Laboratory manual for Experiences in Biology. Laidlaw Brothers Publishers.

บทปฏิบัติการที่ 2
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อ
(Preparation of Culture Media and Sterilization)

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Culture medium) หมายถึงส่วนประกอบของสารอาหารที่ส่งเสริมให้ จุลินทรีย์ เจริญและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเจริญที่แตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (อาหารเลี้ยงเชื้อ) ทั่ว ๆ ไปควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ แหล่งของคาร์บอน (carbon source) แหล่งของไนโตรเจน (nitrogen source) และแหล่งของพลังงาน (energy source) รวมถึงพวกเกลือแร่และวิตามิน ด้วย
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
3. ไม่มีสารพิษ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์
4. ไม่มีสิ่งมีชีวิตใด ๆ อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์มีหลายลักษณะ ได้แก่ อาหารเหลว (Liquid medium หรือ broth) (รูปที่ 2.1) อาหารแข็ง (solid medium) โดยการเติมวุ้น (agar) 1.5-2.0% ลงไปในอาหารเหลวเพื่อทำให้แข็งตัว อาหารที่บรรจุในหลอดทดลองที่เอียงเป็นแนวลาด เรียกว่า slant agar (รูปที่ 2.1) ส่วนลักษณะที่แข็งอยู่ในแนวตรง เรียกว่า deep tube agar (รูปที่ 2.1) และอาหารลักษณะกึ่งแข็ง (semi-solid) ที่เติมวุ้นเพียง 0.3-0.5%

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามส่วนประกอบที่เตรียมขึ้น คือ

1. Synthetic medium (chemically defined medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นโดยทราบสูตรเคมีของสารองค์ประกอบต่าง ๆ อย่างแน่นอน สารทุกสารที่นำมาเตรียมอาหารเป็นสารเคมีบริสุทธิ์

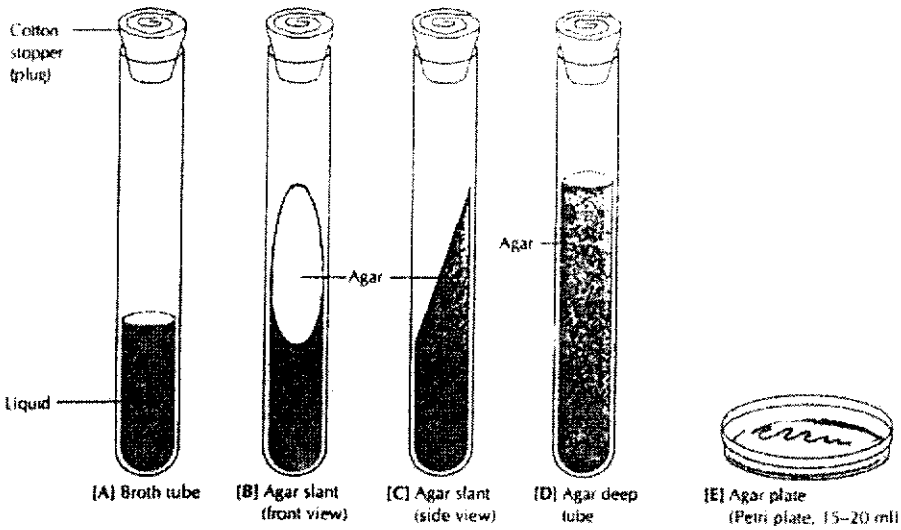
2. Non-synthetic medium (complete medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นโดยไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน สารอาหารที่เป็นองค์ประกอบอาจจะได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ผสมกัน และเป็นแหล่งของธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น malt extract สกัดได้จากข้าวมอล์ท beef extract ได้จากเนื้อวัว และ yeast extract ได้จากยีสต์ เป็นต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อยังแบ่งได้หลายชนิดตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น

1. Enrichment medium เป็นอาหารที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ จุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในธรรมชาติหรือในตัวอย่างที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยการเติมสารอาหารเอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เป็นพิเศษ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารเหลว

2. Selective medium เป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญได้เท่านั้น โดยการเติม สารอาหารที่จุลินทรีย์ที่ต้องการสามารถใช้ได้ดี ส่วนจุลินทรีย์อื่น ไม่สามารถให้ได้ หรือเติมสาร ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อาหารชนิดนี้ส่วนใหญ่เป็นอาหารแข็ง

3. Differential medium เป็นอาหารที่เมื่อจุลินทรีย์เฉพาะชนิดเจริญแล้ว สามารถเห็นความแตกต่างของลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ



รูปที่ 2.1 รูปแบบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) เป็นการกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุอุปกรณ์ หรือเครื่องแก้ว ซึ่งกระทำได้โดย

1. การใช้ความร้อนชื้น

เพื่อกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเตรียมและก่อนที่จะนำไปเพาะเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave หรือ pressure cooker) ที่ความดันไอน้ำ ที่มีค่าประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งมีอุณหภูมิ 121.5°ซ (250°ฟ) เป็นเวลา 15-30 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การใช้ความร้อนแห้ง เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเครื่องแก้ว หรือวัสดุอื่น ๆ ที่ทนความร้อนสูง ๆ ได้ โดยใช้ตู้อบ (hot-air oven) ที่อุณหภูมิ 180°ซ (350°ฟ) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

3. การกรองโดยใช้เครื่องกรองจุลินทรีย์ นิยมใช้กำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารเหลวและสารละลายที่มีส่วนประกอบซึ่งถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูง ๆ เยื่อกรอง (membrane filter) และส่วนของเครื่องกรองบางชนิดที่จะสัมผัสกับสารละลายที่นำมากรอง
ต้องการการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เรียนรู้วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์และวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อ

การทดลองที่ 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนชื้น

วัสดุและอุปกรณ์

1. ส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหาร nutrient broth (NB), nutrient agar (NA) และ plate count agar (PCA)
2. เครื่องชั่ง กระดาษไขรองชั่ง (wax paper) และช้อนตักสาร (spatula)
3. ภาชนะสำหรับเตรียมอาหารและแท่งแก้วสำหรับคนอาหาร
4. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
5. 1 N NaOH และ 1 N HCl
6. หม้อกรอกอาหารหรือบีกเกอร์
7. ขวดและหลอดทดสอบสำหรับบรรจุอาหาร
8. สำลี
9. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish หรือ plate) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อจนปลอดเชื้อแล้ว และจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ชนิดละ 4 จาน
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave หรือ pressure cooker)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหาร nutrient broth (NB)

1.1 สูตรอาหาร NB (ปริมาตร 1 ลิตร) ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

1.2 เตรียมอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หรือตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด โดยชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ได้คำนวณตามสูตรข้อ 1.1

1.3 ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่น คนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบตามสูตร

1.4 วัดความเป็นกรดด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช เมื่ออาหารเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl จนได้พีเอช ประมาณ 7.0

1.5 บรรจุอาหารตามข้อ 4

2. การเตรียมอาหาร nutrient agar (NA)

2.1 เตรียมอาหาร NA ปริมาณ 200 มิลลิลิตร หรือตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด โดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร NB แล้วปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 7.0

2.2 เติมวุ้น 1.5% ต้มพร้อมกับคนด้วยแท่งแก้ว จนวุ้นละลายหมด (ที่อุณหภูมิ ประมาณ 97°ซ จนถึงจุดเดือด)

2.3 ให้รีบบรรจุอาหารตามข้อ 4 ทันทีก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว

3. การเตรียมอาหาร plate count agar (PCA)

3.1 สูตรอาหาร PCA (ปริมาตร 1 ลิตร) ประกอบด้วย

Typtone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose (glucose)	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

3.2 เตรียมอาหาร PCA ปริมาณ 100 มิลลิลิตร หรือตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด และใช้วิธีการทำนองเดียวกับการเตรียมอาหาร NA

3.3 ปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 5 (ในกรณีเลี้ยงเชื้อรา)

3.4 ให้รีบบรรจุอาหารตามข้อ 4 ทันที ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว

4. การบรรจุอาหาร

4.1 บรรจุอาหารที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงในหม้อกรอกอาหาร หรือบีคเกอร์ กรอกอาหารใส่ขวด เพียงครึ่ง (1/2) ของขวด และหลอดทดสอบ (1/4 ของหลอด) ระวังอย่าให้มีอาหารเปื้อนปากขวด หรือปากหลอด ถ้าเป็นอาหารที่เติมวุ้นต้องรีบกรอกก่อนที่วุ้นจะแข็งตัวโดยบรรจุอาหารที่เตรียมได้ ดังนี้

อาหาร NB: ให้แบ่งบรรจุลงในหลอดทดสอบ 4 หลอด

อาหาร NA: ให้แบ่งบรรจุลงในหลอดทดสอบ จำนวน 4 หลอด รีบเอียงหลอดอาหาร 2 หลอดให้เป็นอาหารผิวเอียง และบรรจุอาหารที่เหลือลงในขวด

อาหาร PCA: ให้แบ่งบรรจุลงในหลอดทดสอบ จำนวน 4 หลอด รีบเอียงหลอดอาหาร 2 หลอด ให้เป็นอาหารผิวเอียง และบรรจุอาหารที่เหลือลงในขวด

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ปิดขวดด้วยฝากเกลียวให้สนิทแล้วคลายเกลียวออกครึ่งรอบ (ภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดเกลียวให้แน่น) ปิดหลอดอาหารด้วยจุกสำลี ให้ฝึกเทคนิคการปฏิบัติจากอาจารย์ผู้สอน

4.3 หลังจากบรรจุอาหารเรียบร้อยแล้ว แยกหลอดบรรจุ NB, NA, PCA ไว้ชนิดละ 2หลอดโดย NA และ PCA เป็นหลอดที่เตรียมให้เป็นอาหารผิวเอียง (slant agar) ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว อาหารที่เหลือนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ

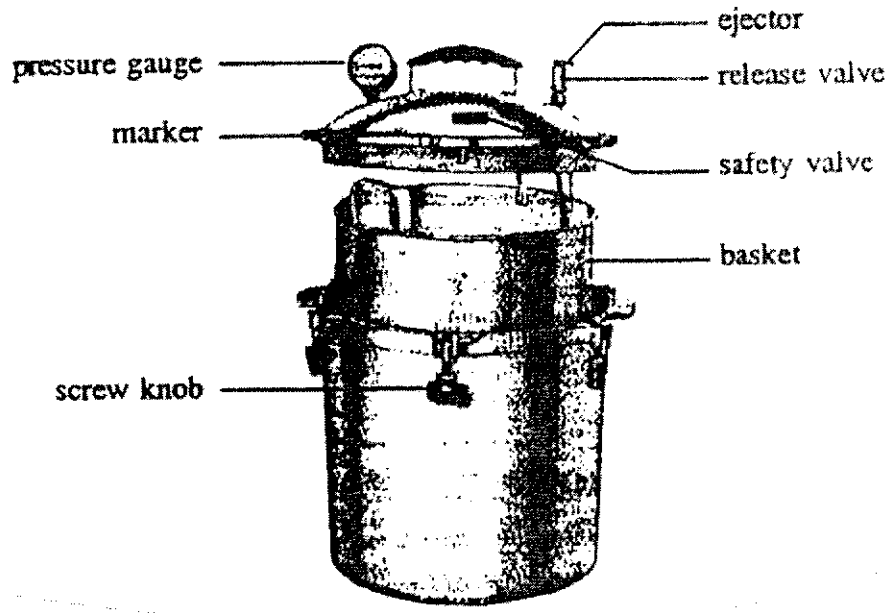
4.4 ทำความสะอาดภาชนะ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย

5. การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร

5.1 รวบรวมขวดและหลอดอาหารใส่ตะกร้า ปิดหุ้มด้วยกระดาษหนา ๆ เพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงมาเปียกสำลี

5.2 บรรจุตะกร้าลงในหม้อนึ่งความดันไอ โดยฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15-30 นาที

5.3 วิธีการให้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) นี้ ขึ้นอยู่กับรูปแบบของเครื่องมือที่มีในแต่ละห้องปฏิบัติการ สำหรับหม้อนึ่งความดันไอพื้นฐาน (รูปที่ 2.2) มีส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ ตัว หม้อซึ่งรวมถึงตะกร้าที่ใช้บรรจุอาหารที่ต้องการกำจัดเชื้อด้วย และฝาหม้อที่ขอบของตัวหม้อมีสกรู ซึ่งจะใช้ยึดฝาหม้อกับตัวหม้อเมื่อปิดฝา ที่ฝาหม้อและตัวหม้อจะมีรอยบาก (marker) ซึ่งเวลาปิดจะต้องให้รอยบากนี้ตรงกัน บนฝาหม้อจะมีส่วนประกอบ คือ มาตรวัดความดัน (pressure gauge) เป็นหน้าปัดบอกความดันภายในหม้อนึ่ง ที่ไล่อากาศ (release valve และ ejector) เป็นที่เปิดเพื่อไล่อากาศและไอน้ำออก และกักเก็บไอน้ำเพื่อเพิ่มความดันไอน้ำ และท่อนิรภัย (safety valve) เป็นท่อที่ปิดด้วยก้อนตะกั่ว ถ้าความดันสูงเกินกว่าที่หม้อจะทนทานได้ จะให้ความร้อนสูงพอที่จะละลายตะกั่วที่ปิดไว้ ทำให้กลายเป็นท่อเปิด และปล่อยไอน้ำออกเพื่อช่วยลดความดันในหม้อป้องกันไม่ให้หม้อระเบิด



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของหม้อนึ่งความดันไอ ชนิดพื้นฐาน

แนวทางปฏิบัติสำหรับหม้อนึ่งความดันไอพื้นฐาน มีดังนี้

5.3.1 วางหม้อนึ่งความดันไอบนเตาแก๊ส และเติมน้ำลงในหม้อให้มีระดับสูงพอสมควร

5.3.2 บรรจุตะกร้าอาหารลงในหม้อ

5.3.3 ปิดฝาหม้อให้สนิท โดยให้รอยบาก (maker) ที่อยู่บนฝากับของตัวหม้ออยู่ตรงกัน

5.3.4 ขันเกลียวให้แน่น โดยขันสกรูคู่ตรงกันข้ามพร้อม ๆ กัน เพื่อให้แต่ละด้านปิดสนิท เท่า ๆ กัน

5.3.5 เปิด ejector

5.3.6 ใช้ความร้อนจากเตาต้มน้ำจนเดือดเป็นไอและให้ไอน้ำเดือดไล่อากาศออกให้หมดทาง ejector ที่เปิดไว้

5.3.7 ปิด ejector ซึ่งจะทำให้ความดันไอน้ำค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นปรับไฟแก๊ส เพื่อควบคุมให้ความดันคงที่ตลอดระยะเวลาที่กำหนด (15-30 นาที)

5.3.8 เมื่อครบเวลาที่กำหนด ปิดไฟและรอจนกระทั่งขีดบอกความดันที่ pressure gauge ลดลงถึง 0 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จึงคลาย ejector เพื่อให้ไอน้ำออกจนหมด แล้วจึงเปิดฝาหม้อ นำอาหารออกจากหม้อ ปิดเกลียวขวดอาหารให้สนิท

5.3.9 เทน้ำที่เหลืออยู่ในหม้อทิ้ง เพื่อป้องกันการผุกร่อนเนื่องจากสนิม

6. อาหาร NA และ PCA ที่บรรจุในหลอด ให้เตรียมเป็นอาหารผิวเอียง (slant agar) ให้เอียงหลอดขณะกำลังร้อน และรอจนอาหารแข็งตัว

7. อาหาร NA และ PCA ที่บรรจุในขวด ภายหลังการกำจัดเชื้อ ให้เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้ออย่างละ 2 จาน และเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วอย่างละ 2 จาน ทิ้งให้อาหารแข็ง

8. นำหลอดอาหาร NB และ NA slant ทั้งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (อย่างละ 2 หลอด) และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (อย่างละ 2 ลอด) และจากอาหาร NA (NA plate) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9. นำหลอดอาหาร PCA slant ที่ผ่านการนึ่ง ฆ่า เชื้อ 2 หลอด และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 หลอด และจานอาหาร PCA (PCA plate) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

การตรวจผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบลักษณะของอาหารในหลอด NB ที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ กับหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยดูความขุ่น การตกตะกอน การเกิดเม็ดเล็ก ๆ หรือแผ่นบาง ๆ ลอยที่ผิวหน้าอาหาร

2. เปรียบเทียบลักษณะของอาหารในหลอด NA slant และ PCA slant ระหว่างหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และจานอาหาร NA และ PCA ระหว่างจานที่อบฆ่าเชื้อและจานที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้อ

การทดลองที่ 1.2 การเตรียมสารละลายและการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ส่วนประกอบของ peptone water
2. เครื่องชั่ง กระดาษไขรองชั่ง และช้อนตักสาร
3. ภาชนะสำหรับเตรียมอาหาร และแท่งแก้วสำหรับคน
4. หลอดทดลองปลอดเชื้อ 6 หลอด
5. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร
6. ชุดเครื่องกรองจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

1. ให้นักศึกษาแต่ละห้องเตรียมสารละลาย peptone water ปริมาณ 250 มิลลิลิตร หรือตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด

โดยชั่งส่วนประกอบของสารละลายภายหลังการคำนวณจากสูตรปริมาตร 1 ลิตร ดังต่อไปนี้

Peptone	10.0	กรัม

Sodium chloride 5.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.2 ± 0.2

2. ให้แต่ละกลุ่มใช้ปิเปตปลอดเชื้อปิเปต peptone water มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อ 3 หลอด

3. เตรียมเครื่องมือที่ใช้กรองสารละลาย peptone water ให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 2.3

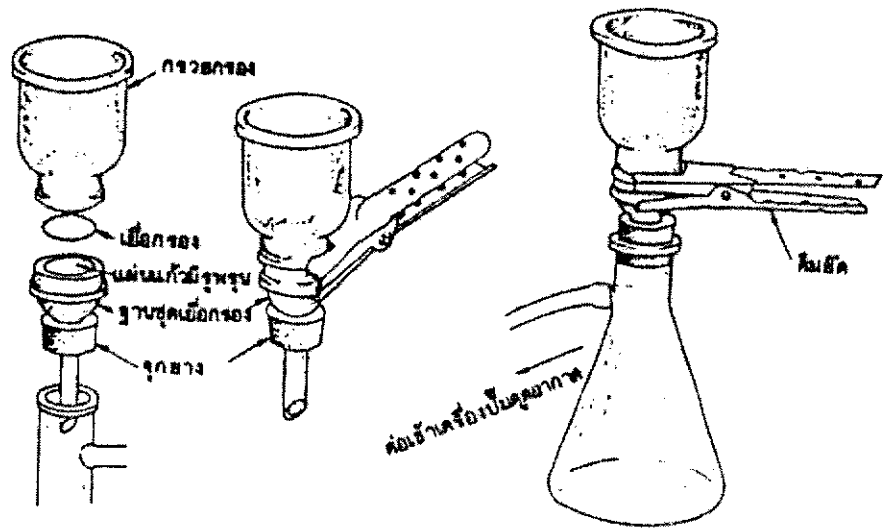
4. นำสารละลาย peptone water ที่เหลือจากการปิเปตมาทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยการกรอง

5. ให้แต่ละกลุ่มใช้ปิเปตปลอดเชื้อ ปิเปต peptone water ที่ผ่านการกรองแล้ว 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อ 3 หลอด

6. นำหลอดสารละลายทั้งหกหลอด (ข้อ 2 และ 5) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

เปรียบเทียบลักษณะของ peptone water ระหว่างหลอดที่ไม่ได้ผ่านการกรองกำจัดเชื้อกับหลอดที่ผ่านการกรองกำจัดเชื้อแล้ว โดยสังเกตความขุ่น การตกตะกอน การเกิดเม็ดเล็ก ๆ หรือแผ่นบาง ๆ ลอยที่ผิวหน้าสารละลาย



รูปที่ 2.3 เครื่องกรองจุลินทรีย์

คำถามท้ายบท

1. จงบอกหลักเกณฑ์ในการเลือกใช้ ความร้อนแห้ง ความร้อนชื้น และการกรอง ในการกำจัดจุลินทรีย์
2. วุ้น (agar) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญอย่างไร

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 2

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อ

ชื่อ-สกุล_____รหัส_____

กลุ่มปฏิบัติการ_____วันที่_____

_____

การทดลองที่ 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนชื้น

บันทึกลักษณะของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง

ชื่ออาหาร	อาหาร/จานอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	อาหาร/จานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
NB		
NA slant		
PCA slant		
NA plate		
PCA plate		

การทดลองที่ 1.2 การเตรียมสารละลายและการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

บันทึกลักษณะของ peptone water ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง

1. ไม่ผ่านการกรอง_____

_____

2. ผ่านการกรอง_____

_____

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 3

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน

(Standard Plate Count for Enumeration of Microorganisms)

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากตัวอย่างของวัสดุหรือสารละลายที่จุลินทรีย์นั้นเจริญหรือปนเปื้อนอยู่ กระทำได้หลายวิธีได้แก่

1. วิธีทางกายภาพ (physical method) ได้แก่ การนับจำนวนของจุลินทรีย์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ (direct count) การวัดความขุ่นของเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารเหลวหรือสารละลาย (turbidity method) และการวัดปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่ตกตะกอน (gravimetric method) เป็นต้น

2. วิธีการทางชีวภาพ (biological method) เป็นการตรวจนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต อาจโดยวิธี plate count, drop count, membrane filter หรือ most probable number

การนับจำนวนจุลินทรีย์จะได้ผลดีหรือค่าที่ถูกต้องเพียงใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การเก็บและการรักษาตัวอย่างวัสดุ ประเภทและชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจนับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ จำนวนซ้ำของการทดลองและความละเอียดรอบคอบของผู้ปฏิบัติ

ในบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ฝึกเทคนิคการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (standard plate count) ซึ่งเป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตวิธีหนึ่ง และสามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ วิธี pour plate และ spread plate ตัวอย่างที่นำมาตรวจนับจะผ่านการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ด้วยสารละลายที่เรียกว่า diluent หรือ dilution blank ได้แก่ น้ำ น้ำเกลือ (0.85% NaCl) สารละลาย บัฟเฟอร์และ 0.1 % peptone water ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว เป็นต้น เพื่อให้มีจำนวน จุลินทรีย์ในตัวอย่างน้อยลง สามารถตรวจนับได้ ความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมควรเป็น ความเจือจางที่มีโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญในอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 – 10 เซนติเมตร) ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หรือ colony forming unit (CFU) โดยปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (ten-fold serial dilution) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติและคำนวณจำนวนโคโลนีต่อหน่วยนับ

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบวิธีการเจือจางตัวอย่างเพื่อการตรวจนับจุลินทรีย์ และวิธีการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากหอพักสุรนิเวศ ที่เก็บจากแหล่งเก็บในวันทำการทดลอง และน้ำใช้ภายใน (น้ำประปา)

2. หลอดบรรจุ 0.1% peptone water ปลอดเชื้อ หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลอด
3. ขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) หรือ tryptone glucose yeast extract agar (TGYA) หลอดเหลว และแช่ไว้ใน water bath อุณหภูมิ 50 –55°ซ
4. จานเลี้ยงเชื้อเปล่าปลอดเชื้อ 24 จาน
5. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร
6. รางหรือภาชนะใส่ปิเปตที่ใช้แล้ว
7. แท่งแก้วงอโค้งรูปสามเหลี่ยมหรือเป็นมุมฉาก
8. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

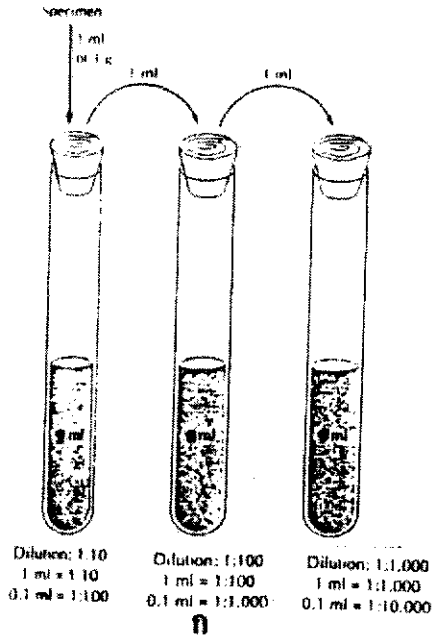
วิธีการทดลอง

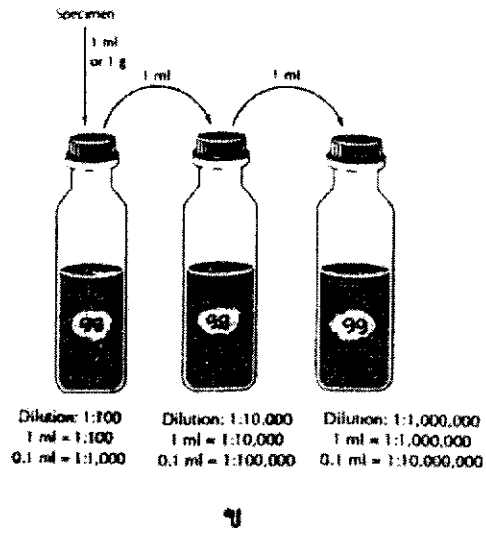
1. การเจือจางตัวอย่างน้ำที่จะตรวจนับ ด้วยวิธี serial dilution

1.1 เจือจางตัวอย่างน้ำทิ้งแต่ละตัวอย่างด้วย 0.1% peptone water ปลอดเชื้อ ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองในปริมาณ 9 มิลลิลิตร โดยปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด 0.1% peptone water หลอดที่ 1 โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน วางปิเปตที่ใช้แล้วลงในราง ใส่ปิเปต หลอดนี้จะมีความเจือจาง 1:10

1.2 ใช้ปิเปตอันใหม่ปิเปตตัวอย่างจากหลอดที่ 1 ใส่ลงใน 0.1% peptone water หลอดที่ 2 โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน หลอดนี้จะมีความเจือจาง 1:100 หรือ $1:10^2$ (ดูรูปที่ 3.1 ก. ประกอบ) ซึ่งในขั้นตอนนี้ ถ้าใช้ dilution blank ปริมาณ 99 มิลลิลิตร จะสามารถกระทำได้ โดยใส่ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งเก็บ (ไม่เจือจาง) 1 มิลลิลิตร ลงใน dilution blank ปริมาตรดังกล่าว (ดูรูปที่ 3.1 ข.)

1.3 ทำเช่นนี้จนกระทั่งถึง 0.1% peptone water หลอดที่ 6 ซึ่งจะมีความเจือจางของตัวอย่างน้ำเท่ากับ $1:10^6$ นำหลอดตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ ไปตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 2 และ 3





รูปที่ 3.1 การทำ serial dilution

ก. ใช้ dilution blank ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

ข. ใช้ dilution blank ปริมาตร 99 มิลลิลิตร

2. การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี pour plate

2.1 นำตัวอย่างน้ำทิ้งที่มีความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ มาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน โดยทำการทดลองความเจือจางละสองซ้ำ

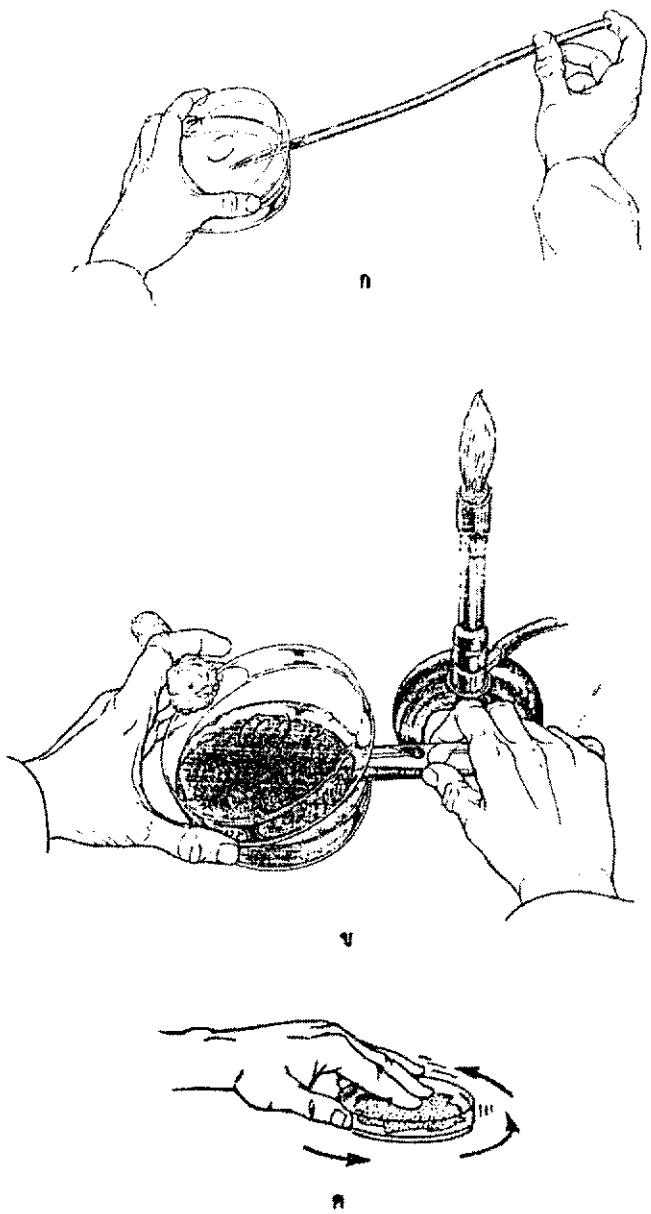
2.2 เขียนข้อมูลที่ทำการทดลองที่จานเลี้ยงเชื้อเปล่าปลอดเชื้อใบล่าง

2.3 ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้งจากหลอด 0.1% peptone water ความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่เตรียมไว้ โดยใช้มืออีกข้างหนึ่งยกฝาจานเลี้ยงเชื้อ เผยอขึ้นเพียงเล็กน้อย ยื่นปลายปิเปตเข้าไปในบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วปล่อยตัวอย่างน้ำลงไป 1 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2 ก) ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ วางปิเปตที่ใช้แล้วลงในรางหรือภาชนะสำหรับใส่ปิเปตที่ใช้แล้ว ความเจือจางละ 2 จาน (ทำการทดลองสองซ้ำ) ตามลำดับ ความเจือจางของตัวอย่างน้ำทิ้งในจานเลี้ยง ยังคงเท่ากับ $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$

2.4 นำอาหาร plate count agar (PCA) หลอมเหลวออกจาก water bath รอให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50°ซ (อาหารไม่แข็งตัวและไม่ร้อนเกินไปจนทำให้เชื้อตาย)

2.5 เทอาหาร PCA หลอมเหลวโดยใช้มือข้างหนึ่งจับขวดอาหารเปิดฝาขวด เช่นเดียวกับเทคนิคการเปิดจุกหลอดทดลอง ใช้มือข้างที่ถือฝาขวดอยู่ยกฝาจานเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย ยื่นปากขวดอาหารเข้าไปในจานเลี้ยงเชื้อเทอาหารลงไปจนอาหารแผ่เต็มผิวจานเลี้ยงเชื้อ (รูปที่3.2 ข.)

2.6 ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาขวดอาหาร โดยลนเปลวไฟปากขวดก่อนปิดฝา ถ้ายังมี



รูปที่ 3.2 ก. การปิเปตตัวอย่างน้ำลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข. การเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อ

ค. เทคนิคการหมุนจานอาหารเพื่อให้อาหารกระจายทั่วจาน และอาหารผสมกับตัวอย่างน้ำ

อาหารเหลือในขวดให้นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 50 – 55°ซ เหมือนเดิม ถ้าใช้อาหารในขวดหมดให้กรอกน้ำใส่ขวดทันที เพื่อสะดวกในการล้าง

2.7 รีบหมุนวนจานเลี้ยงเชื้อตามเข็มนาฬิกาอย่างน้อย 5 ครั้ง และทวนเข็มนาฬิกาอย่างน้อย 5 ครั้ง ให้ตัวอย่างน้ำทิ้งและอาหารกระจายทั่วกันสม่ำเสมอ (รูปที่ 3.2 ค.) ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

2.8 นำจานอาหารไปบ่มโดยคว่ำจานที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate

3.1 เทอาหาร plate count agar (PCA) หลอดเหลวที่มีอุณภูมิ 45 – 50°ซ ลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อจำนวน 6 จานต่อ 1 ตัวอย่างน้ำทิ้งโดยใช้เทคนิคเช่นเดียวกับข้อ 2.5 ทิ้งให้อาหาร แข็งตัว

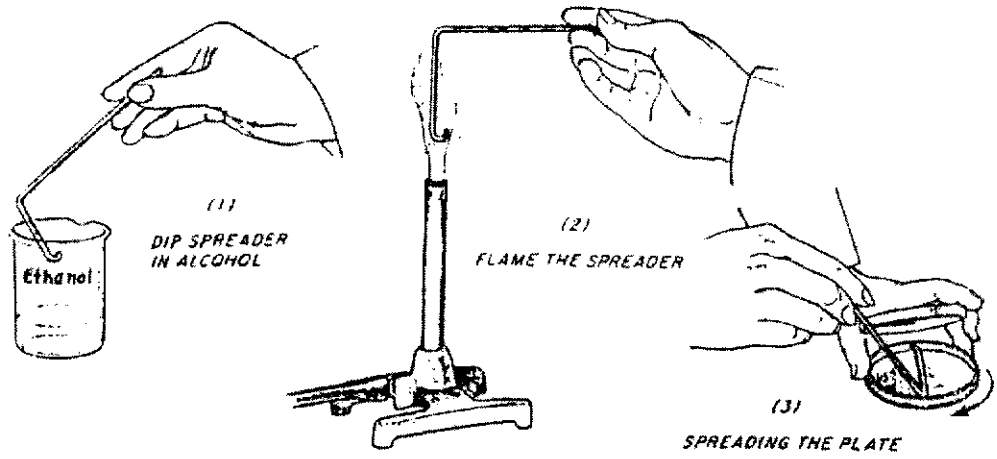
3.2 เขียนข้อมูลที่ทำการทดลองไว้ที่จานเลี้ยงเชื้อใบล่าง

3.3 ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้งความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ความเจือจานละ 2 จาน โดยใช้เทคนิคเช่นเดียวกับวิธี pour plate ดังนั้นความเจือจางของตัวอย่างน้ำทิ้งในจานเลี้ยงเชื้อจะเป็น $1:10^5$, $1:10^6$, และ $1:10^7$ ตามลำดับ

3.4 นำแท่งแก้วงอจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านไฟ ปล่อยให้แท่งแก้วเย็นรวม 10 – 15 วินาที (รูปที่ 3.3)

3.5 ใช้อีกมือหนึ่งยกฝาจานเลี้ยงเชื้อขึ้น แล้วยื่นแท่งแก้วเข้าไปเกลี่ยทาตัวอย่าง น้ำทิ้งให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ขณะเดียวกันให้หมุนจานเลี้ยงเชื้อไปพร้อม ๆ กันด้วย เพื่อการกระจายของตัวอย่างน้ำทิ้งจะได้สม่ำเสมอบนผิวหน้าอาหาร (รูปที่3.3)

3.6 วางจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้งแล้วจึงนำไปบ่ม โดยคว่ำจานที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.3 การเกลี่ยหาตัวอย่างน้ำทิ้งที่มีจุลินทรีย์ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจนับโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถือหลักเซลล์หนึ่งเซลล์ หรือกลุ่มของเซลล์ที่อยู่ใกล้ ๆ กัน จะเพิ่มจำนวนเจริญทับถมกันเป็น 1 โคโลนี

จำนวน โคโลนีที่นับได้จะเท่ากับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์

2. นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางทั้ง 2 จาน แล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30 – 300 โคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ

3. นำจำนวนจุลินทรีย์และความเจือจางที่ได้จากข้อ 2 มาคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร

4. การคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำทิ้ง

จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร = จำนวนโคโลนี x ความเจือจางของตัวอย่างน้ำทิ้ง

ตัวอย่างเช่น จำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากจานเลี้ยงเชื้อที่มีความเจือจางของตัวอย่างน้ำทิ้ง $1:10^5$ โดยวิธี pour plate เท่ากับ 120 โคโลนี

$\therefore$ จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำทิ้ง (จากแหล่งเก็บ) 1 มิลลิลิตร $= 120 \times 10^5$ โคโลนี (เซล)

$= 1.20 \times 10^7$ เซลล์

คำถามท้ายบท

1. ทำไมจึงใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณต่างกันในการทำ pour plate และ spread plate

2. ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน โดยวิธี pour plate และ spread plate วิธีใดน่าจะเหมาะสมสำหรับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งมากที่สุด เพราะเหตุใด

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 3

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน

ชื่อ–สกุล_____ รหัส _____

กลุ่มปฏิบัติการ_____วันที่ _____

_____

ผลการตรวจนับจุลินทรีย์จากจานเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างน้ำ	Pour plate method			Spread plate method		
	ความเจือจางที่ใช้	จำนวนโคโลนี	จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำทิ้ง (เซลล์/มล.)	ความเจือจางที่ใช้	จำนวนโคโลนี	จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำทิ้ง (เซลล์/มล.)
1.						
2.						

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 4

การตรวจหาจุลินทรีย์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

(Multiple-Tube [MPN] Fermentation Technique for Determination of Microorganisms)

การตรวจหาจุลินทรีย์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Most probable number [MPN] technique) นี้เป็นวิธีการประเมินจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ปรากฏให้เห็นจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมีของอาหารโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ค่า MPN เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้หลักการทางสถิติ และใช้ประเมินจุลินทรีย์เฉพาะ ซึ่งต้องการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่จำเพาะต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่จะแสดงผลการเจริญให้เห็นได้ชัดเจน วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่ง ในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำ โดยตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ในน้ำทั้งน้ำดื่ม น้ำใช้ และน้ำทิ้งทั่ว ๆ ไป

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ได้แก่ Escherichia coli และ Enterobacter aerogenes เป็นแบคทีเรียชี้แนะ (bacteriological indicator) ที่มีแหล่งกำเนิดที่สำคัญ คือ ลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นและมีความสามารถในการอยู่รอดในน้ำได้นาน ดังนั้นถ้าตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Escherichia coli) ในน้ำ ก็มีแนวโน้มว่าจะพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในน้ำนั้นด้วย

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การตรวจสอบขั้นแรก (presumpive test) เป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำโดยใช้อาหารเหลวซึ่งมีน้ำตาล lactose เป็นส่วนประกอบ แบคทีเรียโคลิฟอร์ม สามารถใช้น้ำตาล lactose แล้วเกิดกรดและแก๊ส ระบบการทดสอบในขั้นแรก นี้เรียกว่า ระบบหลอดเชื้อ ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไป นิยมใช้อยู่ 2 ระบบ คือ ระบบ “3” และ ระบบ “5” หลอด และมีการประเมินผลโดยนำผลการทดสอบที่เป็นผลบวก (หลอดที่มีกรด และแก๊สเกิดขึ้น) ไปเทียบค่า MPN จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ ระบบ “3” หลอดจะมีโอกาสผิดพลาดมากกว่าระบบ “5” หลอด แต่ประหยัดอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่า ตัวอย่างน้ำที่นำมาตรวจสอบ อาจต้องผ่านการเจือจางก่อน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำนั้น ๆ

2. การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test) ในขั้นตอนนี้จะนำหลอดอาหารที่ให้ผลบวกในขั้นตอน แรกมาทดสอบเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรด และแก๊สในอาหาร lactose นั้นเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยนำแบคทีเรียที่เจริญในหลอดอาหาร lactose นั้นแล้วเกิดกรดและแก๊สมาเลี้ยง ต่อในอาหารเหลว หรืออาหารแข็งก็ได้ แล้วแต่ผู้ปฏิบัติ กรณีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง จะใช้อาหาร eosin methylene blue (EMB) agar ซึ่งโคโลนีของ Escherichia coli ที่เจริญบนอาหารดังกล่าวจะมีสีดำ

เข้มและที่ผิวของโคโลนีจะมีสีเขียวเหลือบคล้ายรอยตัดของชิ้นโลหะ (metallic sheen) ส่วนโคโลนีของ Enterobacter aerogenes จะมีสีชมพูหรือม่วงเทา ลักษณะค่อนข้างเยิ้มและเป็นเมือก ไม่มี metallic sheen

3. การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (completed test) เป็นการทดสอบขั้นสุดท้าย เพื่อสรุปผลว่าจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในขั้นตอนข้างต้นนั้นเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยนำจุลินทรีย์จากขั้นยืนยันมาเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำตาล lactose เป็นส่วนประกอบแล้วตรวจดูการเกิดกรดและแก๊สในอาหารอีกครั้งพร้อมทั้งศึกษา สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ ภายหลังการย้อมสีแบบแกรม แบคทีเรียโคลิฟอร์มจะมี รูปร่างเซลล์เป็นท่อนสั้น ไม่สร้าง สปอร์และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ นักศึกษาจะได้เรียนรู้ถึงวิธีการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้ง 3 ขั้นตอนในบทปฏิบัติการนี้

วัตถุประสงค์

เพื่อให้สามารถตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทางชีวภาพได้

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำ ประมาณ 500 มิลลิลิตร ต่อชนิด
   1.1 น้ำทิ้งจากหอพักสุรนิเวศ
   1.2 น้ำใช้ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (น้ำประปา)
   1.3 น้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและเติม Escherichia coli และ Enterobacter aerogenes
2. หลอดบรรจุอาหาร lactose broth ที่มีความเข้มข้นของส่วนประกอบเป็นสองเท่า (double strength) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และภายในมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) คว่ำอยู่จำนวน 9 หลอด
3. หลอดบรรจุอาหาร Lactose broth (single strength) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และภายในมีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ จำนวน 24 หลอด
4. จานบรรจุหลอดอาหาร eosin methylene blue (EMB) agar จำนวน 6 จาน
5. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
6. รางหรือภาชนะสำหรับใส่ปิเปตที่ใช้แล้ว
7. ลูป (loop)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
10. ชุดสีย้อมสำหรับการย้อมสีแบบแกรม
11. แผ่นแก้วสไลด์
12. กล้องจุลทรรศน์
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 35° ซ

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบขั้นแรก (presumptive test)

ใช้ระบบ "3" หลอด

1.1 เขียนข้อมูลและวันที่ที่ทำการทดลองบนหลอด lactose broth โดยที่ในการทดสอบแต่ละตัวอย่างน้ำ ต้องใช้อาหาร lactose broth (double strength) 3 หลอด และ lactose broth single strength 6 หลอด

1.2 เขย่าขวดตัวอย่างน้ำแรง ๆ หลาย ๆ ครั้ง

1.3 ปีเปตตัวอย่างน้ำ (แต่ละตัวอย่าง) ใส่ลงในหลอด lactose broth (double strength) ทั้ง 3 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร และใส่ลงในหลอด lactose broth (single strength) หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด และหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด (ดูรูปที่ 4.1) โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

1.4 เขย่าหลอดเบา ๆ เพื่อให้อาหารผสมกับตัวอย่างน้ำ

1.5 บ่มหลอดอาหารทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 – 28 ชั่วโมง

1.6 ตรวจดูการเกิดกรดและแก๊สภายในหลอดดักแก๊สในหลอดอาหาร lactose broth หลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง แสดงว่าให้ผลบวก (positive test) หลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นภายหลัง 24 ชั่วโมง ให้ผลเป็นที่สงสัยให้ทดสอบในขั้นตอนต่อไปด้วย (รูปที่ 4.1) สำหรับหลอดที่ไม่มีแก๊สเกิดขึ้นเลยให้ผลเป็นลบ (negative test)

1.7 บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก นำค่าที่ได้ไปเทียบหาค่า MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร จากตารางที่ 4.1

1.8 นำหลอดที่เกิดกรดและแก๊สไปทดสอบในขั้นยืนยันต่อไป

2. การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed test)

2.1 เลือกหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้น (ข้อ 1) มาตรวจสอบขั้นยืนยันโดยเลือกที่ระดับความเจือจางของตัวอย่างน้ำ (ในหลอดอาหาร) ที่ต่างกัน ระดับความเจือจางละ 1 หลอด และทดสอบโดยใช้อาหารแข็ง eosin methylene blue (EMB) agar

2.2 หลอมอาหาร EMB agar และเทลงจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อรอให้อาหารแข็งตัว ในขั้นตอนนี้ สามารถเตรียมจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ อาหารแข็งตัว แล้วไว้ล่วงหน้าได้ภายใน 24 ชั่วโมง

2.3 ใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดอาหารที่มีแก๊ส แล้วนำไปขีดลาก streak บนผิวหน้าอาหาร EMB agar แบบ cross streak

2.4 บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.5 ตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร EMB agar

2.6 นำโคโลนีที่มีสี metallic sheen และสีชมพูเป็นเมือกเยิ้ม ไปทดสอบในขั้นสมบูรณ์ต่อไป

3. การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (completed test)

3.1 ใช้ลูปที่ผ่านการเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เลือกไว้ ใส่ลงในหลอด lactose broth (single strength) และอีกส่วนหนึ่งนำไปสเมียร์บนแผ่นแก้วสไลด์

3.2 บ่มหลอด lactose broth ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

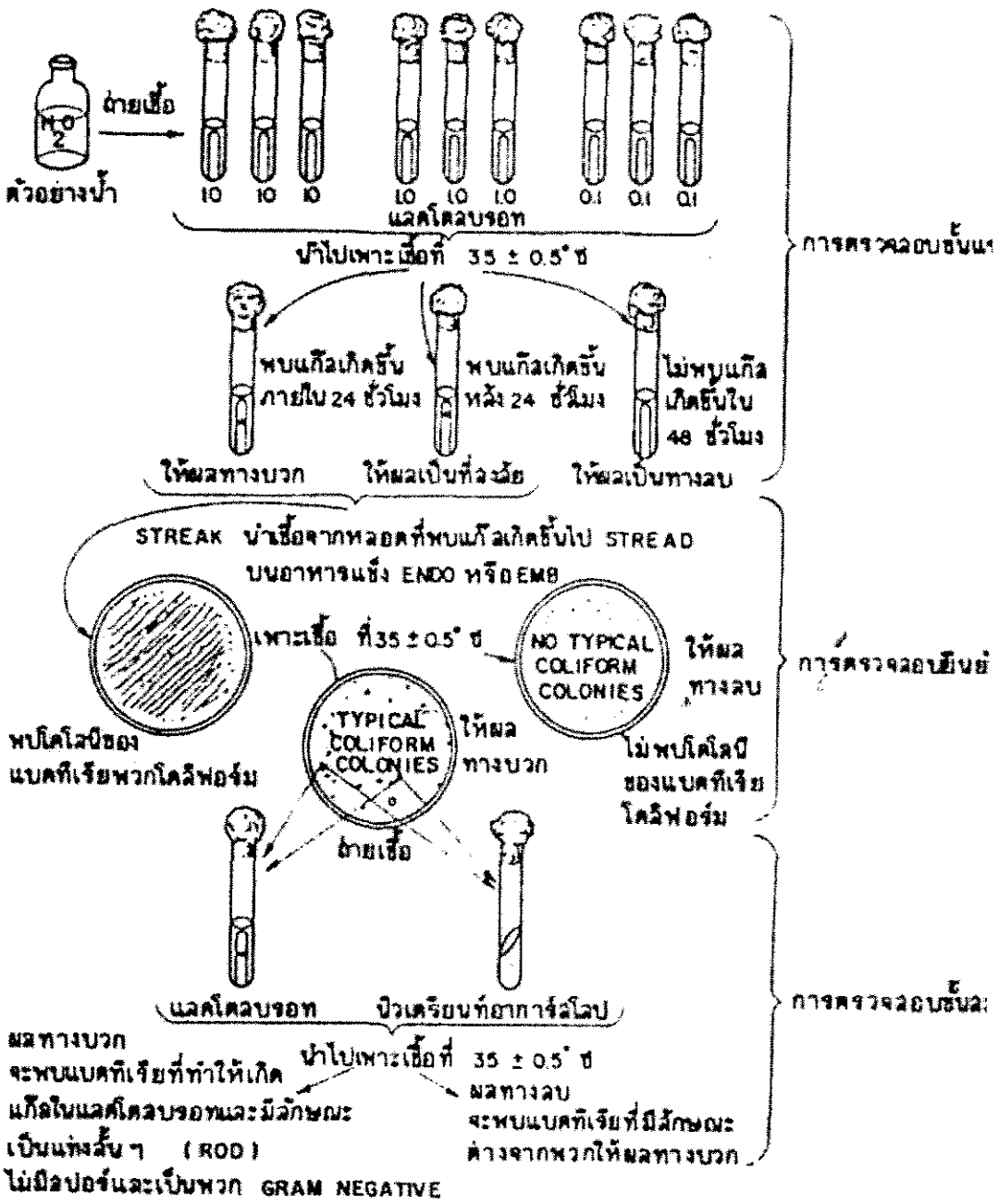
3.3 ย้อมสีรอยสเมียร์เชื้อแบบแกรม (Gram stain) และตรวจดูรูปร่างและการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

3.4 ถ้าเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จะพบแก๊สเกิดขึ้นในหลอดอาหารภายใน 24 ชั่วโมง และจากการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้นไม่มีสปอร์ และติดสีแดง ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria)

คำถามท้ายบท

1. ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ทำไมจึงไม่ใช้วิธีขีดลาก (streak) ตัวอย่างน้ำ บนอาหาร EMB agar โดยตรง (โดยไม่ผ่านการทดสอบโดยเลี้ยงในอาหารเหลว)

2. ในการตรวจสอบขั้นแรก (presumptive test) นั้น ทำไมหลอดอาหารที่มีแก๊สเกิดขึ้นภายหลัง 24 ชั่วโมงของการบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ จึงถือว่าให้ผลเป็นที่สงสัย



รูปที่ 4.1 การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

ตารางที่ 4.1 Table of most probable number (MPN) per 100 ml of sample using three tubes of each dilution (with 10, 1, and 0.1 ml per volumes.)

No of positive tube In dilutions			MPN per	No of positive tube In dilutions			MPN per
10 ml	1 ml	0.1 ml	100 ml	10 ml	1 ml	0.1 ml	100 ml
0	0	0	0	2	0	0	9.1
0	1	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	37
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	3
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29				

ตารางที่ 4.2 MPN index for various combinations of positive and negative results when five 10-ml portions, five l-ml portions, and five 0.1 – ml portions are used.

No. of tubes giving positive Reaction out of :				No of positive tube In dilutions			
5 of 10 ml each	5 of 1 ml each	5 of 0.1 ml each	MPN index Per 100 ml	5 of 10 ml each	5 of 1 ml each	5 of 0.1 ml each	MPN index Per 100 ml
0	0	0	< 2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥2400

ที่มา : Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition, American Public Health Association, Inc. New York, 1976.

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 4
การตรวจหาจุลินทรีย์โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

ชื่อ – สกุล _____ รหัส _____

กลุ่มปฏิบัติการ _____ วันที่ _____

_____

รายงานผลการทดลองลงในตารางดังต่อไปนี้

ตัวอย่างน้ำ	Presumptive test				Confirmed test	Completed test	
	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN ต่อ 100 มล.	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบน EMP agar	การเกิดแก๊ส	สัณฐานวิทยา
	10 มล.	1 มล.	0.1 มล.				
1.							
2.							
3.							

ประเมินความสะอาดของน้ำได้ดังนี้

.....

.....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 5

การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธีเยื่อกรอง

(Membrane – Filter Technique for Determination of Coliform Bacteria)

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) แบ่งได้เป็น 2 พวก ตามแหล่งที่มา คือ ฟีคัลโคลิฟอร์ม Fecal coliforms) เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น และถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งบางสายพันธุ์เป็นเชื้อสาเหตุของโรคทางเดินอาหารด้วย และ นันฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal coliforms) เป็นแบคทีเรียที่พบมากในดินและพืชไม่เป็นอันตรายเท่ากับพวกแรก แต่ใช้เป็นแบคทีเรียชี้แนะถึงความไม่สะอาดของน้ำ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* ดังนั้นถ้าตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระซึ่งเป็นที่มาของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคอีกหลายชนิด ตามมาตรฐานของน้ำซึ่งกำหนดโดย American Public Health Association ระบุว่า ในน้ำที่มีคุณภาพดี โดยเฉพาะน้ำดื่มต้องมีค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์มน้อยกว่า 2 ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า 1 ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรเมื่อตรวจโดยวิธีเยื่อกรอง (membrane-filter technique) จึงจะปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีเยื่อกรอง (membrane-filter [MF] technique) เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทางชีววิทยา วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหา ตรวจนับทั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliform bacteria) และฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) ได้โดยตรง เป็นวิธีที่ให้ผลแน่นอน และรวดเร็วกว่าวิธี MPN แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีเยื่อกรองนี้ไม่สามารถใช้กับตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นมากได้

วัตถุประสงค์

เพื่อให้สามารถตรวจหา ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำ โดยวิธีเยื่อกรอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำ ประมาณ 500 มิลลิลิตร ต่อชนิด
   - 1.1 น้ำดื่ม
   - 1.2 น้ำประปา
   - 1.3 น้ำทิ้งจากหอพักสุรนิเวศ

ที่มา : ปรับปรุงจาก ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง (2540) ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม สาขาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. ชุดเครื่องกรองปลอดเชื้อ ประกอบด้วยส่วนยึดเยื่อกรอง (filter holder) และกระบอกฉีด (syringe) ขนาดบรรจุ 50 มิลลิลิตร
3. เยื่อกรอง (membrane filter) ปลอดเชื้อ (0.45 μm pore size)
4. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
5. รางหรือภาชนะสำหรับใส่ปิเปตที่ใช้แล้ว
6. กระบอกตวงปลอดเชื้อ ขนาดบรรจุ 50 และ 100 มิลลิลิตร
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
8. จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ ขนาด 60 × 15 มิลลิลิตร
9. แผ่นซับ (absorbent pad) ปลอดเชื้อ
10. หลอดบรรจุ M-Endo medium
11. หลอดบรรจุ M-FC broth
12. ปากคีบ
13. 95% แอลกอฮอล์
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 30, 35 และ 44.5 °C
16. เครื่องนับโคโลนี (colony counter)
17. หลอดบรรจุ peptone water 9 ml 4 หลอด
18. หลอดปลอดเชื้อ 1 หลอด

วิธีการทดลอง

1. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliform bacteria)

1.1 ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการกรอง ขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำ ถ้าคาดว่าน้ำที่จะนำมาตรวจมีจำนวนแบคทีเรียมาก จะใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำน้อย ซึ่งถ้าใช้ปริมาณต่ำกว่า 20 มิลลิลิตร ควรเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ 20 มิลลิลิตร จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบบนเยื่อกรองควรมีค่าอยู่ในช่วง 50-200 โคโลนีต่อเยื่อกรองให้ใช้ปริมาณ ตัวอย่างน้ำโดยคาดคะเนตามตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปริมาตรโดยประมาณของตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการกรองเพื่อตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด

ชนิดของตัวอย่างน้ำ	ปริมาตรที่ใช้กรอง (มิลลิลิตร)							
	100	50	10	1	0.01	0.01	0.001	0.0001
น้ำดื่ม	/							
น้ำจากสระว่ายน้ำ	/							
น้ำจากทะเลสาบหรือบ่อกักน้ำ	/	/	/					
น้ำประปา			/	/	/			
น้ำในแม่น้ำ				/	/	/	/	
น้ำทิ้งที่ผ่านการเติมคลอรีน				/	/	/		
น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน					/	/	/	/

1.2 การกรองตัวอย่างน้ำ

1.2.1 ใช้ปากคีบที่จุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว คีบเยื่อกรองปลอดเชื้อวางลงบนฐานกรอง (filter holder)

1.2.2 ประกอบชุด

1.2.3 ตวงตัวอย่างน้ำในปริมาณที่คาดคะเน (ข้อ 1.1) แล้วบรรจุในกระบอกฉีด (syringe)

1.2.4 กรองน้ำผ่านเยื่อกรอง

1.2.5 ล้างกระบอกฉีด ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ ประมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อชะแบคทีเรียที่เกาะกระบอกฉีดลงบนเยื่อกรอง

1.3 ก่อนแยกชุดเครื่องกรอง ให้บรรจุแผ่นซับ (absorbent pad) ลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ และปิเปตอาหาร M-Endo medium 2 มิลลิลิตร ใส่ลงบนแผ่นซับให้ชุ่ม ใช้เทคนิคปลอดเชื้อทุกขั้นตอน

1.4 แยกชุดเครื่องกรอง ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ คีบเยื่อกรองวางลงบนแผ่นซับในจานเลี้ยงเชื้อ พยายามอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้เยื่อกรอง

1.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การตรวจนับจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms)

2.1 ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการกรอง ขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำเช่นกัน จำนวนโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์มที่ตรวจพบบนเยื่อกรองควรมีค่าอยู่ในช่วง 20 – 80 โคโลนีต่อเยื่อกรองให้ใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำโดยคาดคะเนตามตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ปริมาตรโดยประมาณของตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการกรองเพื่อตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์ม

ชนิดของตัวอย่างน้ำ	ปริมาตรที่ใช้กรอง (มิลลิลิตร)						
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001
น้ำดื่ม	/						
น้ำจากทะเลสาบหรือบ่อกักน้ำ	/	/					
น้ำประปา		/	/	/			
น้ำในแม่น้ำ				/	/	/	
น้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นตอนที่สองแล้ว			/	/	/		
น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน					/	/	/

2.2 กรองตัวอย่างน้ำและเตรียมจานเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจนับแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (ข้อ 1) แต่ใช้อาหาร M-FC medium

2.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด

1.1 นับจำนวนโคโลนีของแบคที่เรียที่เจริญบนเยื่อกรอง ซึ่ง typical colony ที่เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มจะมี 2 ลักษณะ คือ โคโลนีสีชมพูจนถึงสีแดงเข้ม (โคโลนีของเชื้อ *Enterobacter spp.)* และโคโลนีที่มีลักษณะ metallic sheen (โคโลนีของเชื้อ *E. coli)* โคโลนีสีอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียโคลิฟอร์ม ให้ใช้เครื่องช่วยนับโคโลนี (colony counter) บันทึกผลลงในรายงานผลการทดลอง

1.2 คำนวณจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดต่อตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดต่อตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำที่นำมากรอง(มิลลิลิตร)}}$$

2. ตรวจนับจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์ม

2.1 นับจำนวนโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์ม ซึ่งมีสีน้ำเงินที่เจริญบนเยื่อกรองโดยใช้เครื่องช่วยนับโคโลนี

2.2 คำนวนจำนวนโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์ม ต่อตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยใช้หลักการเดียวกับการตรวจนับแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด บันทึกผลลงในรายงานผลการทดลอง

คำถามท้ายบท

1. จงเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการใช้วิธีเยื่อกรองและวิธี MPN ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

2. ในการตรวจหาจุลินทรีย์ชนิดอื่นในน้ำ นอกเหนือจากแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จะใช้วิธีเยื่อกรองได้หรือไม่ เพราะเหตุใด

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 5

การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธีเยื่อกรอง

ชื่อ-สกุล..... รหัส.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

1. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด

ตัวอย่างน้ำ	ปริมาตรน้ำที่ใช้กรอง	จำนวนโคโลนี / จาน			จำนวนโคโลนี / น้ำ 100 มล.		
		สีชมพู, แดงเข้ม	Metallic sheen	รวม	สีชมพู, แดงเข้ม	Metallic sheen	รวม
1							
2.							
3.							

2. การตรวจนับจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์ม

ตัวอย่างน้ำ	ปริมาตรน้ำที่ใช้กรอง	จำนวนโคโลนีน้ำเงินต่อจาน	จำนวนโคโลนีสีน้ำเงินต่อน้ำ 100 มล.
1.			
2.			
3.			

บทปฏิบัติการที่ 6
สิ่งมีชีวิตในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน
(Biota in Aerobic Wastewater-Treatment System)

การบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีการทางชีววิทยาแบ่งตามปฏิกิริยาชีวเคมีออกได้เป็นสองระบบ คือ การบำบัดแบบใช้ออกซิเจนอิสระ (Aerobic treatment) และการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (anaerobic treatment) ระบบบำบัดทั้งสองนี้อาศัยหลักการเดียวกัน คือ ใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย (ต่าง ๆ ชนิดกัน) เป็นตัวกำจัดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง และการควบคุมสภาพต่าง ๆ ที่เอื้ออำนวยให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์

ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบใช้ออกซิเจนอิสระเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย) ใช้ออกซิเจนอิสระไปเผาผลาญสารอินทรีย์ เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิต ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็นสารคงตัว ไม่มีกลิ่นเหม็น ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญและพบในปริมาณมาก ในระยะการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบนี้ได้แก่ แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนเป็นหลัก เช่น แบคทีเรียบางชนิดในสกุล *Achromobacter, Alcaligenes, Caulobacter, Cytophage, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Pseudomonas,* และ *Sphaerotilus* เป็นต้น อาจพบราและยีสต์บ้างในปริมาณน้อย ภายหลังการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งแล้ว แบคทีเรียและเชื้อราจะเป็นอาหารของ โปรโตซัวพวก ciliates และสัตว์หลายเซลล์พวก โรติเฟอร์ (rotifers) และนีมาโทด (nematodes) ในน้ำทิ้งนั้น การเปลี่ยนแปลงจะเป็นไปเช่นนี้ตลอดไป

ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน อาจเป็นระบบที่แบคทีเรียอยู่ในลักษณะแขวนลอยหรือเป็นกลุ่มของตะกอน (floc) จุลินทรีย์ (ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย) ได้แก่ระบบ oxidation pond และ activated sludge หรืออาจเป็นระบบที่จุลินทรีย์ยึดเกาะกับสิ่งยึดเกาะชนิดหนึ่ง (microbial bed) ได้แก่ ระบบ trickling filter และ biological disc เป็นต้น

โดยปกติระบบบำบัดแต่ละระบบจะมีกระบวนการหลายขั้นตอน แต่ละกระบวนการก็มีหน้าที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งต้องมีการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อควบคุมการทำงานของระบบบำบัด และเพื่อตรวจสอบคุณลักษณะและคุณภาพของน้ำทิ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งก่อนการปล่อยน้ำทิ้งภายหลังการบำบัดลงแหล่งรับน้ำ ว่าได้มาตรฐานตามประกาศของมาตรฐานการบำบัดน้ำทิ้งหรือไม่

ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีทางชีววิทยาแบบใช้ออกซิเจนนั้น ปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่ต้องตรวจสอบคือ การตรวจสอบชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในระบบบำบัด ซึ่งในการตรวจสอบนิยมใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในระบบบำบัดน้ำทิ้ง สามารถในตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบได้ภายในเวลาอันสั้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมระบบได้อย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในการควบคุมระบบบำบัดแบบ

activated sludge ซึ่งจะมีการตรวจสอบตะกอน (floc) ของจุลินทรีย์ ถ้าพบลักษณะตะกอนที่มีแบคทีเรียหนาแน่น และไม่พบเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยเป็นอิสระอยู่ในน้ำมาก แสดงว่าระบบทำงานดีและมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าพบ จุลินทรีย์ที่เป็นเส้นสาย (filamentous microorganisms) เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Beggiatoa, Sphaerotilus* และ *Thiothrix* และเชื้อราพวก *Geotrichum, Cephalosporium, Cladosporium* และ *Penicillium* มาก แสดงว่าค่าพีเอชของระบบต่ำเกินไป

สิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ พวกสัตว์เซลล์เดียวและหลายเซลล์ที่เจริญเติบโตในระบบบำบัดน้ำเสียชนิดต่าง ๆ ก็เป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบด้วยเหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ชนิดของโปรโตซัว ถ้าพบพวก ciliates ที่ว่ายน้ำอย่างอิสระมากเมื่อมีจำนวนของแบคทีเรียอยู่มากด้วย แสดงถึงประสิทธิภาพการบำบัดของระบบ activated sludge จะประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าพบพวก ciliates และ ciliates ที่มีโครงสร้างยึดเกาะ (stalked ciliates) อยู่แสดงว่าประสิทธิภาพการบำบัดสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ระบบบำบัดที่ควบคุมอย่างดีและอยู่ในสภาพคงที่จะพบ stalked ciliates ไม่มากนักและจะไม่พบโปรโตซัวชนิดอื่น สำหรับ rotifers จะพบเมื่อระบบอยู่ในสภาพที่มีปริมาณ biochemical oxygen demand (BOD) ต่ำและมีประสิทธิภาพการบำบัดสูง เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทในระบบบำบัดน้ำทิ้งในแบบต่าง ๆ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่าง A น้ำเสียจากระบบบำบัดแบบ Suspended growth
   ตัวอย่าง B น้ำเสียจากระบบบำบัดแบบ Attached growth
   ตัวอย่าง C น้ำเสียจากระบบแบบไม่ใช้ออกซิเจน
2. แผ่นแก้วสไลด์
3. แผ่นแก้วปิดสไลด์
4. Pasteur pipette และลูกยาง
5. สารละลาย 3% gelatin
6. สารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0)
7. ชุดเครื่องกรองตัวอย่างน้ำ
8. กล้องจุลทรรศน์
9. น้ำมัน (immersion oil)
10. กระดาษเช็ดเลนส์

การทดลอง

1. ตรวจดูลักษณะปรากฏ วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำทิ้งของตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาศึกษา

2. ศึกษาลักษณะของตะกอน (floc) จุลินทรีย์ในน้ำทิ้งจากระบบ activated sludge ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.1 เช็ดแผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้สะอาด

2.2 เตรียม wet mount ของตะกอนจุลินทรีย์ โดยใช้ pasteur pipette ดูดส่วนที่เป็นตะกอน (floc) หยดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ และปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2.3 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำจนถึงกำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งต้องหยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

3. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งส่วนที่ไม่ใช่ตะกอนจากระบบบำบัดแบบ activated sludge

3.1 เตรียม wet mount ของน้ำทิ้ง โดยใช้ pasteur pipette ดูดเฉพาะส่วนน้ำหยดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ 1 หยด ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ หรือหยด 3% gelatin 1 หยด ลงผสมในหยดน้ำเพื่อลดการเคลื่อนที่ของแพลงก์ตอน (เช่น โปรโตซัว โรติเฟอร์) แล้วจึงปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

3.2 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4, 10, 40 และ 100 เท่า

3.3 กรณีพบแพลงก์ตอนจำนวนน้อยมากหรือไม่พบเลยในหยดน้ำ 1 หยด ให้รองน้ำทิ้ง 20-100 มิลลิลิตรด้วยเยื่อกรองหรือกระดาษกรองที่มีความละเอียดสูง แล้วนำสิ่งที่กรองได้แช่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 2-4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเตรียม wet mount และตรวจดูสิ่งมีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งจากบ่อ oxidation pond ให้ทำการทดลองตามวิธีทำนองเดียวกับข้อ 3

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ได้แก่ นีมาโทด โรติเฟอร์ โปรโตซัว แอลจี และเชื้อรา เป็นต้น ยกเว้น แบคทีเรีย) โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4, 10 และ 40 เท่า

2. ตรวจดูแบคทีเรีย โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า โดยหยดน้ำมัน cedar oil

3. สังเกตและบันทึกจำนวนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่ตรวจพบในหยดน้ำทิ้ง 1 หยด โดยประมาณ และวาดรูปลงในรายงานผลการทดลอง โดยวาดให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์ อาจเทียบรูปร่างของโปรโตซัว แอลจี โรติเฟอร์ และนีมาโทด ได้จากรูปในภาคผนวก ก สำหรับแบคทีเรียและเชื้อรา ให้บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ไม่สามารถสรุปในขณะนี้ได้ว่าอยู่ในสกุล (genus) ใด

คำถามท้ายบท

1. ในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบต่าง ๆ มีความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตพวกโปรโตซัวอย่างไรบ้าง โดยให้เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง A และ B และระหว่างตัวอย่าง C และตัวอย่าง A กับ B

2. แอลจีมีบทบาทอย่างไรในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน

3. ตะกอนที่เกิดขึ้นในบางครั้ง ในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบ suspended growth เกิดจากอะไร และมีความสำคัญต่อระบบบำบัดอย่างไร

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 6
สิ่งมีชีวิตในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน

ชื่อ-สกุล_____รหัส_____

กลุ่มปฏิบัติการ_____วันที่_____

1. รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะปรากฏและข้อมูลที่เกี่ยวข้องของน้ำทิ้งจากระบบบำบัด ที่นำมาศึกษา

   1.1 suspended growth_____

   _____

   1.2 Attached growth_____

   _____

   1.3 ระบบไม่ใช้ออกซิเจน_____

   _____

2. ผลการศึกษาสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่าง	ประเภทของสิ่งมีชีวิตที่พบ	จำนวนโดยประมาณในหยดน้ำ 1 หยด	รูปร่างของสิ่งมีชีวิตที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ และกำลังขยายของภาพที่วาด
A			
B			
C			

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 6
สิ่งมีชีวิตในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน
(Biota in Aerobic Wastewater-Treatment System)

การบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีการทางชีววิทยาแบ่งตามปฏิกิริยาชีวเคมีออกได้เป็นสองระบบ คือ การบำบัดแบบใช้ออกซิเจนอิสระ (Aerobic treatment) และการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (anaerobic treatment) ระบบบำบัดทั้งสองนี้อาศัยหลักการเดียวกัน คือ ใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย (ต่าง ๆ ชนิดกัน) เป็นตัวกำจัดสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้ง และการควบคุมสภาพต่าง ๆ ที่เอื้ออำนวยให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์

ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบใช้ออกซิเจนอิสระเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย) ใช้ออกซิเจนอิสระไปเผาผลาญสารอินทรีย์ เพื่อให้ได้พลังงานในการดำรงชีวิต ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็นสารคงตัว ไม่มีกลิ่นเหม็น ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญและพบในปริมาณมาก ในระยะการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบนี้ได้แก่ แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนเป็นหลัก เช่น แบคทีเรียบางชนิดในสกุล *Achromobacter, Alcaligenes, Caulobacter, Cytophage, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Pseudomonas,* และ *Sphaerotilus* เป็นต้น อาจพบราและยีสต์บ้างในปริมาณน้อย ภายหลังการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งแล้ว แบคทีเรียและเชื้อราจะเป็นอาหารของ โปรโตซัวพวก ciliates และสัตว์หลายเซลล์พวก โรติเฟอร์ (rotifers) และนีมาโทด (nematodes) ในน้ำทิ้งนั้น การเปลี่ยนแปลงจะเป็นไปเช่นนี้ตลอดไป

ระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน อาจเป็นระบบที่แบคทีเรียอยู่ในลักษณะแขวนลอยหรือเป็นกลุ่มของตะกอน (floc) จุลินทรีย์ (ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย) ได้แก่ระบบ oxidation pond และ activated sludge หรืออาจเป็นระบบที่จุลินทรีย์ยึดเกาะกับสิ่งยึดเกาะชนิดหนึ่ง (microbial bed) ได้แก่ ระบบ trickling filter และ biological disc เป็นต้น

โดยปกติระบบบำบัดแต่ละระบบจะมีกระบวนการหลายขั้นตอน แต่ละกระบวนการก็มีหน้าที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งต้องมีการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อควบคุมการทำงานของระบบบำบัด และเพื่อตรวจสอบคุณลักษณะและคุณภาพของน้ำทิ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งก่อนการปล่อยน้ำทิ้งภายหลังการบำบัดลงแหล่งรับน้ำ ว่าได้มาตรฐานตามประกาศของมาตรฐานการบำบัดน้ำทิ้งหรือไม่

ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีทางชีววิทยาแบบใช้ออกซิเจนนั้น ปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่ต้องตรวจสอบคือ การตรวจสอบชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในระบบบำบัด ซึ่งในการตรวจสอบนิยมใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในระบบบำบัดน้ำทิ้ง สามารถในตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบได้ภายในเวลาอันสั้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมระบบได้อย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในการควบคุมระบบบำบัดแบบ

ที่มา: ปรับปรุงจาก ปฏิบัติการ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง (2540) ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม สาขาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

activated sludge ซึ่งจะมีการตรวจสอบตะกอน (floc) ของจุลินทรีย์ ถ้าพบลักษณะตะกอนที่มีแบคทีเรียหนาแน่น และไม่พบเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยเป็นอิสระอยู่ในน้ำมาก แสดงว่าระบบทำงานดีและมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าพบ จุลินทรีย์ที่เป็นเส้นสาย (filamentous microorganisms) เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Beggiatoa, Sphaerotilus* และ *Thiothrix* และเชื้อราพวก *Geotrichum, Cephalosporium, Cladosporium* และ *Penicillium* มาก แสดงว่าค่าพีเอชของระบบต่ำเกินไป

สิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ พวกสัตว์เซลล์เดียวและหลายเซลล์ที่เจริญเติบโตในระบบบำบัดน้ำเสียชนิดต่าง ๆ ก็เป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบด้วยเหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ชนิดของโปรโตซัว ถ้าพบพวก ciliates ที่ว่ายน้ำอย่างอิสระมากเมื่อมีจำนวนของแบคทีเรียอยู่มากด้วย แสดงถึงประสิทธิภาพการบำบัดของระบบ activated sludge จะประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าพบพวก ciliates และ ciliates ที่มีโครงสร้างยึดเกาะ (stalked ciliates) อยู่แสดงว่าประสิทธิภาพการบำบัดสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ระบบบำบัดที่ควบคุมอย่างดีและอยู่ในสภาพคงที่จะพบ stalked ciliates ไม่มากนักและจะไม่พบโปรโตซัวชนิดอื่น สำหรับ rotifers จะพบเมื่อระบบอยู่ในสภาพที่มีปริมาณ biochemical oxygen demand (BOD) ต่ำและมีประสิทธิภาพการบำบัดสูง เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทในระบบบำบัดน้ำทิ้งในแบบต่าง ๆ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่าง A น้ำเสียจากระบบบำบัดแบบ Suspended growth
   ตัวอย่าง B น้ำเสียจากระบบบำบัดแบบ Attached growth
   ตัวอย่าง C น้ำเสียจากระบบแบบไม่ใช้ออกซิเจน
2. แผ่นแก้วสไลด์
3. แผ่นแก้วปิดสไลด์
4. Pasteur pipette และลูกยาง
5. สารละลาย 3% gelatin
6. สารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0)
7. ชุดเครื่องกรองตัวอย่างน้ำ
8. กล้องจุลทรรศน์
9. น้ำมัน (immersion oil)
10. กระดาษเช็ดเลนส์

การทดลอง

1. ตรวจดูลักษณะปรากฏ วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำทิ้งของตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาศึกษา

2. ศึกษาลักษณะของตะกอน (floc) จุลินทรีย์ในน้ำทิ้งจากระบบ activated sludge ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.1 เช็ดแผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้สะอาด

2.2 เตรียม wet mount ของตะกอนจุลินทรีย์ โดยใช้ pasteur pipette ดูดส่วนที่เป็นตะกอน (floc) หยดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ และปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2.3 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำจนถึงกำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งต้องหยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

3. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งส่วนที่ไม่ใช่ตะกอนจากระบบบำบัดแบบ activated sludge

3.1 เตรียม wet mount ของน้ำทิ้ง โดยใช้ pasteur pipette ดูดเฉพาะส่วนน้ำหยดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ 1 หยด ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ หรือหยด 3% gelatin 1 หยด ลงผสมในหยดน้ำเพื่อลดการเคลื่อนที่ของแพลงก์ตอน (เช่น โปรโตซัว โรติเฟอร์) แล้วจึงปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

3.2 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4, 10, 40 และ 100 เท่า

3.3 กรณีพบแพลงก์ตอนจำนวนน้อยมากหรือไม่พบเลยในหยดน้ำ 1 หยด ให้รองน้ำทิ้ง 20-100 มิลลิลิตรด้วยเยื่อกรองหรือกระดาษกรองที่มีความละเอียดสูง แล้วนำสิ่งที่กรองได้แช่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 2-4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเตรียม wet mount และตรวจดูสิ่งมีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งจากบ่อ oxidation pond ให้ทำการทดลองตามวิธีทำนองเดียวกับข้อ 3

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจดูสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ได้แก่ นีมาโทด โรติเฟอร์ โปรโตซัว แอลจี และเชื้อรา เป็นต้น ยกเว้น แบคทีเรีย) โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4, 10 และ 40 เท่า

2. ตรวจดูแบคทีเรีย โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า โดยหยดน้ำมัน cedar oil

3. สังเกตและบันทึกจำนวนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่ตรวจพบในหยดน้ำทิ้ง 1 หยด โดยประมาณ และวาดรูปลงในรายงานผลการทดลอง โดยวาดให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์ อาจเทียบรูปร่างของโปรโตซัว แอลจี โรติเฟอร์ และนีมาโทด ได้จากรูปในภาคผนวก ก สำหรับแบคทีเรียและเชื้อรา ให้บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ไม่สามารถสรุปในขณะนี้ได้ว่าอยู่ในสกุล (genus) ใด

คำถามท้ายบท

1. ในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบต่าง ๆ มีความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตพวกโปรโตซัวอย่างไรบ้าง โดยให้เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง A และ B และระหว่างตัวอย่าง C และตัวอย่าง A กับ B

2. แอลจีมีบทบาทอย่างไรในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน

3. ตะกอนที่เกิดขึ้นในบางครั้ง ในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบ suspended growth เกิดจากอะไร และมีความสำคัญต่อระบบบำบัดอย่างไร

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 6
สิ่งมีชีวิตในระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบใช้ออกซิเจน

ชื่อ-สกุล_____รหัส_____

กลุ่มปฏิบัติการ_____วันที่_____

1. รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะปรากฏและข้อมูลที่เกี่ยวข้องของน้ำทิ้งจากระบบบำบัด ที่นำมาศึกษา

   1.1 suspended growth_____

   _____

   1.2 Attached growth_____

   _____

   1.3 ระบบไม่ใช้ออกซิเจน_____

   _____

2. ผลการศึกษาสิ่งมีชีวิตในน้ำทิ้งจากระบบบำบัดต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่าง	ประเภทของสิ่งมีชีวิตที่พบ	จำนวนโดยประมาณในหยดน้ำ 1 หยด	รูปร่างของสิ่งมีชีวิตที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ และกำลังขยายของภาพที่วาด
A			
B			
C			

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 7

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

การวิเคราะห์ค่า BOD นั้น เป็นการทำงานของบักเตรีที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง เป็นวิธีทาง Bioassay ซึ่งเป็นการวัดปริมาณของออกซิเจนที่ถูกใช้โดยบักเตรีในเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 20°ซ ดังกล่าวแล้ว ดังนั้นสภาวะภายในขวดที่ทำการทดลองจะต้องพยายามให้เหมือนกับสภาวะที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และต้องเหมาะสมกับความเป็นอยู่ของบักเตรีชนิดนั้น ๆ เนื่องจากการวิเคราะห์ BOD เป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ทั้งหมดในเวลาดังกล่าว ดังนั้นจะต้องป้องกันการละลายจากออกซิเจนภายนอก และการหนีหายของออกซิเจนภายในขวดทดลอง จึงจำเป็นต้องใช้ขวดพิเศษที่เรียกว่า BOD bottle ซึ่งเป็นขวดที่มีจุกเป็นชนิด ground glass stopper และปากขวดจะบานออกเล็กน้อย เมื่อปิดจุกแล้วจะมีน้ำหล่ออยู่

เนื่องจากในน้ำทิ้งบางชนิดมีสารอินทรีย์หลายชนิดปะปนกันอยู่ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต้องการบักเตรีหลายชนิดทำงานต่อเนื่องกัน สารอินทรีย์ภายในน้ำทิ้งจึงจะถูกย่อยได้ในอัตราสูง ปฏิกิริยาในการหา BOD เป็น Wet oxidation ซึ่งมีบักเตรีเป็นตัวกลางในการย่อยสลาย ถ้าเขียนเป็น สมการฯ จะได้ดังนี้แบคทีเรีย

$$C_nH_aO_bN_c + (n + a/4 - 3c/4 - b/2.O_2) \text{ ---------> } nCO_2 + (a/2 - 3c/2).H_2O + cNH_3$$

ดังนั้น การทดสอบ BOD จะต้องถูกจัดให้อยู่สภาวะที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้ปัจจัยอื่น ๆ ส่งผลกระทบต่ออัตราการย่อยสลาย และเพื่อคงไว้ซึ่งการดำรงชีพของจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนอยู่ตลอดเวลา ปริมาณการใช้ DO ใน 5 วัน จะต้องมีมากกว่า 2 mg/L และค่า DO สุดท้ายในวันที่ 5 จะต้องมีอยู่ไม่น้อยกว่า 1 mg/L โดยปรกติที่ 20°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ BOD น้ำจะมี DO ประมาณ 8-9 mg/L ฉะนั้นเพื่อให้ DO สุดท้ายมีไม่น้อยกว่า 2 mg/L ตัวอย่างน้ำจะต้องถูกเจือจางลง น้ำที่ใช้ในการเจือจางจะประกอบด้วยแร่ธาตุสำคัญ และมีความสามารถสะเทินที่ช่วง pH เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และมีค่า DO อิ่มตัว (โดยการพ่นฟองอากาศ) ในกรณีที่น้ำเสียไม่มีจุลินทรีย์อยู่เลยอาจนำจุลินทรีย์มาเติมในน้ำเจือจาง (เรียกว่า Seeding) ซึ่งโดยปรกติจะใช้น้ำเสียชุมชนผสมกับน้ำเจือจาง

อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในการทดสอบ BOD ถูกประมาณว่าเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง (First order)

$$Y = L_0(1 - e^{-kt}) \qquad (1)$$

หรือ

$$Y = L_0(1 - 10^{-k't}) \qquad (2)$$

โดยที่

L_0 = ปริมาณสูงสุดของ DO ที่จะถูกใช้ (Ultimate BOD หรือ BOD_u) (mg/L)

Y = ปริมาณ DO ที่ใช้ไป ณ เวลาใด ๆ (BOD_t) (mg/L)

t = เวลา (วัน)

k = ค่าคงที่อันดับที่หนึ่ง (ฐาน e) ($วัน^{-1}$)

k' = ค่าคงที่อันดับที่หนึ่ง (ฐาน 10) ($วัน^{-1}$)

การวิเคราะห์สมการข้างต้นมีความซับซ้อนเนื่องจากไม่ทราบค่าคงที่ L_0 และ k (หรือ k') แต่ถ้ามีข้อมูลที่เหมาะสม ก็จะสามารถประเมินหาค่าคงที่ทั้งสองได้ ด้วยวิธี Method of Moments ซึ่งต้องเก็บข้อมูล DO เป็นระยะเวลาต่อเนื่อง อาทิเช่น ข้อมูลวันที่ 1,2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับและด้วยข้อมูลนี้ สมการ (1) จะถูกประเมินในรูปของสมการเส้นตรงคือ

$$[t/y]^{1/3} = (kL_0)^{-1/3} + \left[\frac{k^{2/3}}{6L_0^{1/3}}\right] \qquad (3)$$

เขียนกราฟระหว่าง $[t/y]^{1/3}$ กับ t จะได้เส้นตรง โดยมีความชัน $b = \frac{K^{23}}{6L_0^{1/3}}$ และจุด ตัดแกนของ $[t/y]^{1/3}$ คือ $a = (kL_0)^{-1/3}$ ดังนั้น ค่าคงที่จะเป็น $k = 6\frac{b}{a}$ และ อย่างไรก็ตาม ถ้าข้อมูล $y > 0.9L_0$ แล้ว สมมติฐานของสมการ (3) จะใช้ไม่ได้

การวัด DO

ปฏิบัติการทดลองวัด DO โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธี Winkler method ซึ่ง DO จะทำปฏิกิริยากับ Mn^{2+} ถูกลด (Reduced) ที่ pH สูง ๆ

$$4e^- + 4H^+ + O_2 \iff 2H_2O$$

$$2Mn^{2+} + 4OH^- \iff 2MnO_2(s) + 4H^+ + 4e^-$$

$$2Mn^{2+} + 4OH^- + O_2(aq) \iff 2MnO_2(s) + 2H_2O \qquad (4)$$

โดยที่ $MnO_2(s)$ เป็นตะกอนสีน้ำตาล และภายใต้สภาพกรด $MnO_2(s)$ จะ Oxidize I^-

$$4e^- + 2MnO_2(s) + 8H^+ \iff 2Mn^{2+} + 4H_2O$$

$$4I^- \iff 2I_2(aq) + 4e^-$$

$$MnO_2(s) + 4H^+ + 2I^- \iff I_2(aq) + Mn^{2+} + 2H_2O \qquad (5)$$

ณ ขั้นตอนนี้ สารละลายจะมีสีน้ำตาล-เหลืองจาก I_2 จากนั้น $I_2(aq)$ จะถูกทำ Titration กับ Thiosalfate ($S_2O_3^{2-}$) ได้ I^- และ Tetrathionate ($S_4O_6^{2}$)

$$2e^- + I_2 \iff 2I^-$$
$$2S_2O_3^{2-} \iff S_4O_6^{2-} + 2e^-$$
$$2S_2O_3^{2-} + I_2(aq) \iff S_4O_6^{2-} + 2I^- \qquad (6)$$

เมื่อรวมสมการ 4 ,5 และ 6 เข้าด้วยกันเพื่อหาความสัมพันธ์ของ $O_2(aq)$ ในตัวอย่างกับปริมาณ $S_2O_3^{2-}$ Titrant จะได้

$$4S_2O_3^{2-} + O_2(aq) + 4H^+ \iff 2S_4O_6^{2-} + 2H_2O \qquad (7)$$

ซึ่ง 4 moles ของ $S_2O_3^{2-}$ จะทำปฏิกิริยาต่อ 1 mole ของ $O_2(aq)$ [หรือ 1 equivalent ของ $S_2O_3^{2-}$ ทำปฏิกิริยากับ 1 equivalent ของ $O_2(aq)$] และจากสมการ (8) คำนวณได้ว่า 1 mL ของ 0.025 N $S_2O_3^{2-}$ จะสมมูลกับ 1 mg/L ของ O_2 ในการทำ Titration กับน้ำตัวอย่าง 200 mL

วิธีการทดลอง

Part I Method of Moment

1. เตรียมขวด BOD แบบอนุกรม 8 ขวด เพื่อใช้ทดสอบตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 จำนวน 3 ชุด ต่อนักศึกษาหนึ่งกลุ่ม (รวม 24 ขวด)

2. เช็คค่า percent mixture ที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่ได้รับมอบหมายจากอาจารย์ผู้สอน

3. เตรียมส่วนผสมตามตารางที่ 7.1 ค่า percent mixture ระหว่างตัวอย่างและน้ำเจือจางเพื่อจะนำมาวิเคราะห์หาค่า DO ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 (การวิเคราะห์ค่า DO ดูวิธีทดลอง part II)

4. นำขวด BOD ซึ่งใช้สำหรับวิเคราะห์ค่า DO ในวันที่ 0 มาวิเคราะห์ขวด BOD ที่เหลือนำเข้าตู้อบที่ 20°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่า DO ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ต่อไป ให้นักศึกษาฉีดน้ำกลั่นที่ปากขวด เพื่อเป็นการป้องกันออกซิเจนเข้าไปในขวด และในทุกวันทำการให้ตรวจดูรอบปากขวดทุกวัน ไม่ให้น้ำที่ปากขวดแห้ง

5. นำขวด BOD ออกมาวันละ 1 ชุด ทำการวัดค่า DO ของวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เพื่อนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า BOD ในแต่ละวัน ค่า DO ที่นำมาวิเคราะห์หาค่า BOD ควรมีค่า DO อย่างน้อย 1 mg/l และการลดลงของ DO มากกว่า 2 mg/l

6. นำค่า BOD ที่หาได้มาเขียนกราฟระหว่าง $(t/y)^{1/3}$ กับ t โดย t เป็นระยะเวลาในการ incubate, y เท่ากับค่า BOD จะได้กราฟเส้นตรง โดยมีความชัน $b = \frac{K^{2/3}}{6L_0^{1/3}}$ และจุดตัดบนแกน $(t/y)^{1/3}$ คือ $a = (kL_0)^{-1/3}$ และค่าคงที่จะเป็น $k = 6\frac{b}{a}$ และ $L_0 = \frac{1}{(ka)^{1/3}}$

วิธีการทดลอง

ความสามารถละลายของ Oxygen ในน้ำ (DO)

1. ทำ Standardization กับ Sodium Thiosulfate (ประมาณ 0.025 N) ด้วย 0.025 N Potassium bi-iodate $(KH(IO_3))_2$ [ดูรายละเอียด Standardization ในหัวข้อ สารเคมี]

2. Winkler method (Azide modification) : ในขวด BOD ขนาด 300 mL ที่มีน้ำตัวอย่างเต็ม ใช้ pipette เติม 2 mL $MnSO_4$ แล้วตามด้วย 2 mL ของสารละลาย alkali – iodide – azide โดยให้ปลายของ pipette จุ่มใต้ผิวน้ำปิดฝาจุกโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ข้างใน แล้วพลิกคว่ำขวดเพื่อให้สารเคมีผสมกันหลาย ๆ ครั้ง เมื่อตะกอนสีน้ำตาลตกลงสู่ก้นขวด จะปรากฏชั้นน้ำใสเหนือชั้นตะกอนสีหมอกของ Manganese hydroxide สำหรับตัวอย่างน้ำกร่อยให้ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที เมื่อตกตะกอนได้ชั้นน้ำใสอย่างน้อย 100 mL เปิดฝาจุกออกเติม 2 mL กรดเข้มข้น H_2SO_4 ทันทีปิดจุกแล้วเขย่าจนตะกอนละลายหมด ตวงน้ำตัวอย่าง 203 mL ด้วย Graduated cylinder นำไปใส่ใน erlenmeyer flask แล้วทำ titration จนได้สีน้ำตาลจาง ๆ เติมน้ำแป้ง 1 mL และทำ titration ต่อจนสีน้ำเงิน-ฟ้าหายไป

3. ให้นักศึกษาทำ standardize สาร sodium Thiosulfate ที่เตรียมไว้ โดยวิธี Standardizatin ของ Sodium Thiosulfate : ละลาย KI ประมาณ 2 g ในน้ำกลั่น 100-150 mL เติม 10 mL 3.6 N H_2SO_4 และเติมสารละลายมาตรฐาน Potassium bi-iodate 0.025 N จำนวน 20.00 mL เจือจางให้ได้ 200 mL แล้วทำ Titration กับ Sodium Thiosulfate โดยใช้น้ำแป้งเป็น indicator

เครื่องมือทดลอง

- เครื่องชั่งละเอียด
- ขวด BOD ขนาด 300 ml (ประมาณ 24 ขวด ต่อนักศึกษา 1 กลุ่ม)
- ตู้อบทึบแสง (incubator) อุณหภูมิ 20 ± 1°C
- ปั๊มอากาศ
- Porous stone
- ปิเปต ขนาด 1 ml, 5 ml
- บีกเกอร์ขนาด 250 ml
- กระบอกตวงขนาด 100 ml

- บิวเรต

สารเคมี

1. เตรียมน้ำเสียเทียบความร้อนต่อไปนี้อย่างละ 1 ลิตร

1.1 COD 100 mg/l : ละลาย glucose 934.6 mg, $(NH_4)_2SO_4$ 374 mg, Yeast extract 18.8 mg, K_2Hpo_4 47 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 93.4 mg, $ZnSo_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 mg, CaCl 0.2 mg, $MaCl_2$ 0.2 mg, $FeCl_2$ 0.2 mg, $(NH_4)_6 MO_2 \cdot 4H_2O$ 0.04 mg, $CuSO_4$ 0.04 mg, $CoCl_2$ 0.04 mg ในน้ำกลั่นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร หลังจากนั้นทำการเป่าอากาศเพื่อให้ DO อิ่มตัว 1 คืน ต่อมา นำ seed $\approx$ 1 ml ใส่ลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ แล้วทำการ acclimatization seed อย่างน้อย 1 คืน

1.2 COD 500 mg/l วิธีการเตรียมเหมือนข้อ 1.1

1.3 COD 50 mg/l วิธีการเตรียมเหมือนข้อ 1.1

2. สารละลาย Manganous sulfate: ละลาย 480 g $MaSO_4.4H_2O$ หรือ 400 g $MnSo_4.2H_2O$ หรือ 364 g $MaSO_4.4H_2O$ ในน้ำกลั่น จากนั้นทำการกรอง แล้วเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

3. สารละลาย Alkali-iodide-azide : ละลาย 500 g NaOH และ 135 g NaI ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นละลาย 10 g NaN_3 ในน้ำกลั่น 40 mL แล้วผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน

4. กรดเข้มข้น Sulfuric acid

5. กรด Sulfuric acid ~ 3.6 N (1+9) : เจือจางกรดเข้มข้น H_2SO_4 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 9 ส่วน

6. สารละลายแป้ง: ละลายประมาณ 5-6 g Starch Soluble ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วจึงเติมลงไปในน้ำกลั่นที่เดือดประมาณ 1ลิตร ปล่อยให้เดือด 2-3 นาที แล้วปล่อยให้ตกตะกอนหนึ่งคืน ใช้ส่วนบนที่ใส

7. สารละลาย Sodium Thiosulfate 0.10 N: ละลาย 24.82 g $Na_2S_2O_35H_2O$ ในน้ำกลั่นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร แล้วเติม 5 mL Chloroform เพื่อป้องกันการย่อยสลาย

8. สารละลายมาตรฐาน Sodium Thiosulfate 0.025 N: นำสารละลาย Sodium Thiosulfate 0.10 N มา 250 mL เจือจางให้ได้ 1 ลิตร แล้วทำ Standardization กับสารละลายมาตรฐาน $KH(IO_3)_2$

9. สารละลายมาตรฐาน Potassium bi-iodate 0.025 N: ละลาย 0.8124 g $(KH(IO_3)_2$ ในน้ำกลั่นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

10. น้ำกลั่น

11. การเตรียมน้ำเจือจาง

สารละลายสะเทิน Phosphate : ละลาย 8.5 g KH_2PO_4 , 21.75 g K_2HPO_4 , 33.4 g Na_2HPO_4 . $7H_2O$, และ 1.7 g NH_4Cl ในน้ำกลั่นประมาณ 500 mL แล้วเจือจางให้ได้ 1 ลิตร (pH ของสารละลายควรจะได้ 7.2)

สารละลาย Magnesium sulfate: ละลาย 22.5 g $MgSO_4$. $7H_2O$ ในน้ำกลั่นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

สารละลาย Calcium chloride: ละลาย 27.5 g CaCl2 ในน้ำกลั่น เจือจางให้ได้ 1 ลิตร

สารละลาย Ferric chloride: ละลาย 0.25 g $FeCl_3$. $6H_2O$ ในน้ำกลั่น เจือจางให้ได้ 1 ลิตร

น้ำเจือจาง : เติมอย่างละ 1 mL ของสารละลาย Phosphate buffer, Magnesium sulfate, Calcium chloride, และ Ferric chloride ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการเป่าอากาศเพื่อให้ DO อิ่มตัว

การคำนวณ

$$BOD_t(mg/L) = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

โดยที่ D_1 = DO เริ่มต้นของตัวอย่าง (mg/L)

D_2 = DO ของตัวอย่าง หลังจากอบในแต่ละวัน ที่ 20°C (mg/L)

P = อัตราส่วนปริมาตรของน้ำตัวอย่างที่ใช้ต่อปริมาตรขวด BOD

ตารางที่ 7.1 BOD Measurable with various dilutions of sample *

Using percent mixtures		By direct pipetting into 300 ml bottles	
% mixture	Range of BOD	Ml	Range of BOD
0.01	20,000-70,000	0.02	30,000-105,000
0.02	10,000-35,000	0.05	12,000-42,000
0.05	4,000-14,000	0.10	6,000-21,000
0.1	2,000-7,000	0.20	3,000-10,500
0.2	1,000-3,500	0.50	1,200-4,200
0.5	400-1,400	1.0	600-2,100
1.0	200-700	2.0	300-1,050
2.0	100-350	5.0	100-420
5.0	40-140	10.0	60-210
10.0	20-70	20.0	30-105
20.0	10-35	50.0	12-42
50.0	4-14	100	6-21
100	0-7	300	0-7

*จาก Chemistry for Environmental Engineering, 3rd edition, 1985.

บทปฏิบัติการที่ 8
ระบบนิเวศสระน้ำ : ปัจจัยทางกายภาพ

(Pond Ecosystem: Physical Factors)

ระบบนิเวศสระน้ำเป็นระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดชนิดน้ำนิ่ง (Lentic water) ซึ่งมีอายุค่อนข้างน้อย รวมทั้งขนาดเล็ก และความลึกก็น้อยกว่าระบบนิเวศทะเลสาบ (Lake Ecosystem) ในระบบนิเวศจะมีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีปฏิสัมพันธ์กัน เพื่อให้ระบบนิเวศดำรงคงอยู่ในสภาวะสมดุลได้ ปัจจัยที่สำคัญอันดับแรกที่จะกล่าวถึง คือ ปัจจัยทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย

ลักษณะสัณฐานของแหล่งน้ำ (topography)

ลักษณะสัณฐานของแหล่งน้ำจะสัมพันธ์กับปัจจัยทางสภาพภูมิศาสตร์ และปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ข้อมูลในเชิงสัณฐานนี้จะช่วยให้ทราบถึงลักษณะรูปร่าง และที่มีของจุดกำเนิด การเปลี่ยนแปลงของแหล่งน้ำที่เกิดขึ้นตามอายุ และผลกระทบต่าง ๆ ที่จะเกิดต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในแหล่งน้ำนั้น สิ่งที่ควรพิจารณาได้แก่

ความกว้างที่สุด (Maximum width)

ความยาวที่สุด (Maximum length)

ความลึกที่สุด (Maximum depth)

พื้นที่ผิวหน้าน้ำ (Surface area)

ปริมาตรของน้ำในแหล่งน้ำ (Volume)

ความยาวของเส้นรอบชายฝั่ง (Shoreline length)

ชนิดของดินกันแหล่งน้ำ (Sediment type)

2. แสง (Light)

พลังงานแสงอาทิตย์ที่ส่องมายังผิวโลก พบว่าน้อยว่า 50% ของพลังงานแสงอาทิตย์ที่พืชนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และปริมาณของแสงอาทิตย์ ประมาณ 3% ที่แหล่งน้ำได้รับและนำมาใช้ประโยชน์ แสงที่ส่องลงไปในแหล่งน้ำ จะถูกดูดซึมโดยมวลน้ำ สารที่ละลายน้ำ และสารที่แขวนลอยในน้ำ นอกจากนั้นแสงยังกระจายตัวออกจากน้ำโดยขึ้นกับชนิด ปริมาณของสารแขวนลอยในน้ำ

3. อุณหภูมิ (Temperature)

เป็นความเข้มของความร้อน ที่สามารถใช้เครื่องมือวัดได้ อุณภูมิมีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ในแหล่งน้ำ ทั้งในเรื่องกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายของสิ่งมีชีวิต ความหนาแน่นของมวลน้ำและการละลายของธาตุ และก๊าซไข่เน่า

ที่มา: ปรับปรุงจาก ไพรัช สายเชื้อ, คำธร ธีรคุปต์ และ นันทนา คชเสนี (2545) คู่มือปฏิบัติการนิเวศวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ความขุ่นของน้ำ (Turbidity)

ความขุ่นของน้ำเป็นผลของอนินทรีย์สารที่แขวนลอย และอินทรีย์สารที่แขวนลอย เช่น Silt, Clay, แพลงค์ตอน และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ๆ ในน้ำ พวกสารที่แขวนลอยต่าง ๆ เหล่านี้ จะเป็นตัวการสำคัญให้แสงที่ส่องลงในน้ำเกิดการกระจายตัวออกจากน้ำ และยังดูดซึมแสงบางส่วนไว้ด้วย จึงทำให้ปริมาณแสงที่ส่องลงไปในระดับความลึกมากขึ้น มีปริมาณลดลง

การส่องผ่านของแสง (Transparency)

เป็นการส่งผ่านของแสงลงสู่แหล่งน้ำ ลงสู่ระดับความลึกที่ตาเปล่าสามารถมองเห็นได้ ซึ่ง ณ ระดับความลึกที่ตามองเห็นแผ่น Secchi disc เป็นครั้งสุดท้ายนี้ แสดงว่ามีแสงที่สะท้อนจาก Secchi disc มาเข้าตาเพียง 5% ของปริมาณแสงที่ผิวน้ำ

6. สีของน้ำ (Color of Water)

การปรากฏสีของน้ำ

เป็นผลมาจากแสงที่ส่องลงไปแล้วสะท้อนออกจากมวลน้ำมาเข้าสู่ตาเรา สารพวกที่เป็นอินทรีย์สารที่ละลายน้ำสามารถเลือกดูดซึมแสงในช่วงคลื่นสั้น และกระจายแสงสีเหลืองและแดง จึงปรากฏเห็นเป็นสีได้ชัด ในกรณีแหล่งน้ำที่มีความใสมาก แสงสีฟ้าจะเป็นแสงสีเด่น เพราะเกิดจากการกระจายของแสงโดยโมเลกุลของน้ำ

7. pH (Potential of Hydrogen Ion Activity)

อิออนต่าง ๆ ในสารละลายมีความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้า แม้แต่น้ำบริสุทธิ์ก็ยัง สามารถนำกระแสไฟฟ้าได้เล็กน้อย เพราะว่าโมเลกุลของน้ำมีการแตกตัวอยู่ในรูปอิออนได้

$$\xrightarrow{H_2O} \qquad H^+ + OH^-$$

ค่า pH ของน้ำในธรรมชาติจะมีค่าอยู่ในช่วง 4.0 – 9.0 แต่ช่วง pH ที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอยู่ในช่วง 6.0 – 8.0 น้ำธรรมชาติส่วนมากจะมี pH มากกว่า 7 ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากในน้ำจะมีปริมาณอิออนพวก HCO_3^- และ $CO_3^=$ เป็นองค์ประกอบด้วย ปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อ pH คือ อุณหภูมิ เพราะอุณหภูมิจะมีผลกระทบต่อการ Ionization ในน้ำ

8. ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen = DO.)

DO นี้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ มีผลมาจากปฏิกิริยาทางชีวภาพและชีวเคมีที่เกิดขึ้น ซึ่ง DO เป็นปัจจัยที่จะบ่งชี้ให้ทราบว่า แหล่งน้ำนั้นสามารถรองรับอินทรีย์สาร

ได้มากน้อยเพียงใด โดยไม่ทำให้เกิดผลกระทบทางลบขึ้นในแหล่งน้ำ DO นี้จะมาจากออกซิเจนในบรรยากาศลงสู่น้ำโดยตรง และมาจาก by-product ของกระบวนการสังเคราะห์แสง ของผู้ผลิตที่อยู่ในน้ำ DO นี้จะถูกใช้โดยกระบวนการหายใจ และปฏิกิริยาทางเคมีที่เกี่ยวข้อง กับสารอนินทรีย์ โดยทั่วไปความเข้มข้นของ DO ในน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต คือ 5 mg/l และถ้า DO มีค่าต่ำกว่า 3 mg/l จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำ

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษา

1. วิธีการวัดปัจจัย ทางกายภาพที่สำคัญในระบบนิเวศสระน้ำ
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพในระบบนิเวศสระน้ำ

ในช่วงเวลาต่างๆ

วัสดุอุปกรณ์

เทปวัดขนาด 25 เมตร
ไม้ลวก
เชือก
ก้อนอิฐ
Secchi disc
เทอร์โมมิเตอร์
ขวดแก้ว
ถังน้ำ
pH – paper หรือ pH meter
ขวด BOD
DO meter
ขวดน้ำกลั่น
กระดาษเช็ดมือ
เครื่องวัดความขุ่น
บีคเกอร์ ขนาด 250 ml
กระบอกตวงขนาด 1,000, 500 , 250 ml
Pipette ขนาด 10 ml

การปฏิบัติ

1. ลักษณะสัณฐานของสระน้ำ

วัดความกว้าง ความยาว ของสระน้ำโดยละเอียดวัดความลึกที่สุด ของสระน้ำ ในจุดที่ห่างจากฝั่งทุก ๆ 1 เมตร วัดความยาวของเส้นรอบชายฝั่งตักดินก้นแหล่งน้ำขึ้น มาตรวจชนิดของดินก้นแหล่งน้ำว่าเป็น sand, silt, clay โดยใช้หลักการตกตะกอนดังนี้ คือ ใช้บีคเกอร์ตักดินก้นแหล่งน้ำปริมาณ 250 ml แล้วใส่ลงในกระบอกตวงขนาด 1000 ml เติมน้ำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1000 ml คงให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วแยกส่วน supernatant โดยใช้ pipette ออกตามเวลาดังนี้ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ส่วนที่ตกตะกอน คือ อนุภาค sand แล้วนำไปคำนวณ % sand แยกส่วน supernatant ออกแล้วคนตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที พบว่าส่วนที่เป็น silt จะตกตะกอนลงมา ก็อ่านปริมาตรที่ตกตะกอนแล้วนำไปคำนวณ % silt แยกส่วน supernatant ใส่กระบอกตวง คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. พบว่าส่วนที่เป็น clay จะตกตะกอนลงมา ก็นำไปคำนวณ % clay ในที่สุดก็จะทราบถึงอัตราส่วนของอนุภาคดินก้นแหล่งน้ำ ซึ่งจะบอกถึงชนิดได้

2. อุณหภูมิ

เป็นการวัดความเข้มของความร้อนมากกว่าการวัดปริมาณความร้อน โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดที่ระดับความลึกต่าง ๆ โดยเริ่มจากอุณหภูมิของอากาศเหนือผิวน้ำ 30 ซม. ที่ผิวน้ำ, ที่ระดับความลึกทุก ๆ 50 ซม. ซึ่งจะเห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามระดับความลึกที่เพิ่มขึ้น ใช้วัดอุณหภูมิในช่วงเวลา 14.00 15.00 16.00 17.00 น. ของวันเดียวกัน

3. ความขุ่นของน้ำ

เป็นผลมาจากอนุภาคแขวนลอยต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นตัวกระจายแสงออกจากน้ำและดูดซึม แสงบางส่วนเอาไว้ ทำให้ความเข้มของแสงลดลงตามระดับความลึกที่เพิ่มขึ้น วัดโดยใช้เครื่อง Turbid meter โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น

4. การส่องผ่านของแสง

เป็นการวัดหาค่าความลึกของแหล่งน้ำที่แสงสามารถส่องถึง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Secchi disc ผูกลายไม้หย่อนลงไปจนถึงระดับที่ตามองไม่เห็น ก็ทำการวัดความลึก = a ซม. แล้วก็หย่อนแผ่น Secchi disc ให้ลงไปจนมองไม่เห็น แล้วค่อยดึงขึ้นจนเริ่มเห็นแผ่น Secchi disc ก็วัดความลึกจากผิวน้ำจนถึงจุดนั้น = b ซม. แล้วหา

ค่า Transparency depth $= \frac{a+b}{2}$

ข้อควรระวังในการวัดความลึกที่แสงส่องผ่าน ควรวัดในเวลาใกล้เที่ยงวัน เพื่อจะได้ไม่มีเงามาบดบัง และการมองจะต้องมองในแนวดิ่ง 90 องศา

5. สี

สีของน้ำเกิดมาจากสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำ และอนุภาคแขวนลอยต่าง ๆ การวัดสีมักใช้การเปรียบเทียบ กับสิ่งของ Alkaline solution ของ $CuSO_4$, K_2crO_4 หรือ Acid solution ของ Pt, Co ในกรณีที่ไม่มีตารางเปรียบเทียบสี ก็ให้ประเมินด้วยสายตา โดยใช้ขวดแกล้วใส่ตักน้ำ แล้วใช้แผ่นกระดาษสีขาว วางเป็นฉากด้านหลังขวด ก็จะเห็นว่าสีของน้ำเป็นสีใด

6. pH

วัดค่า pH ของน้ำด้วย pH-paper หรือ pH-meter ตามวิธีการใช้ที่อธิบายอยู่ที่เครื่อง ในการวัด pH ของน้ำควรวัดทันทีที่ตักน้ำขึ้นมา หรือถ้าจะนำมาวัดที่ห้องปฏิบัติการ ก็เก็บน้ำด้วยขวด BOD แล้วกลับมาวัดภายใน 2-3 ชม. ให้วัด pH ของน้ำที่ผิวน้ำ และที่ระดับความลึกทุก ๆ 50 ซม. ในช่วงเวลา 14.00 15.00 16.00 17.00 น. ของวันเดียวกัน เช่นเดียวกับการวัดอุณหภูมิ (ข้อ 2.)

7. DO.

วัดค่า DO ด้วย DO meter โดยใช้ขวด BOD เก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับใกล้ผิวน้ำโดยให้ปากขวดจมอยู่ใต้ผิวน้ำรอจนน้ำบรรจุเข้าไปจนเต็มขวดและไม่มีฟองอากาสในขวด จึงยกขวดขึ้นเหนือน้ำแล้วปิดจุกทันที (ก่อนจะเก็บน้ำทุกครั้งจะต้อง rinse ขวด BOD ด้วยตัวอย่างน้ำที่ จะเก็บก่อน) แล้วจึงเก็บน้ำที่ระดับความลึกทุก 50 ซม. เพื่อให้สอดคล้องกับการวัดค่า อุณหภูมิ pH แต่อย่างไรก็ตามก็ขึ้นกับความพร้อมของเครื่องมือด้วย เมื่อเก็บตัวอย่างน้ำเรียบร้อย แล้วก็เก็บใส่ถังน้ำ แข็ง เพื่อเป็นการรักษาสภาพให้พวก organism ต่าง ๆ ในน้ำ มี active น้อยที่สุด แล้วจึงนำมาวัดด้วย DO meter ในห้องปฏิบัติการ (เก็บน้ำเวลาเดียวกันกับข้อ 2.6)

รายงานผล

แสดงแผนภูมิของระบบนิเวศสระน้ำ แบบ Top-view และ Side-view

แสดงข้อมูลต่าง ๆ ในรูปแบบของตารางเปรียบเทียบ

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่าง pH, อุณหภูมิ, DO เปรียบเทียบกันในช่วงเวลาต่าง ๆ ของวัน และเปรียบเทียบกันในเชิงในระดับความลึกต่าง ๆ

คำถาม

1. สระน้ำที่ศึกษาเป็นธรรมชาติมากน้อยเพียงใด ใช้อะไรเป็นเกณฑ์พิจารณา
2. แสง ความขุ่น อุณหภูมิ และ DO มีผลต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตอย่างไร
3. แสง กับ ความขุ่น สัมพันธ์กันหรือไม่ อย่างไร
4. แสง กับ DO สัมพันธ์กันหรือไม่ อย่างไร
5. pH ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของวัน ต่างกันหรือไม่ เพราะเหตุใด
6. pH ที่ผิวน้ำกับ ก้นน้ำ ต่างกันหรือไม่ เพราะเหตุใด
7. pH ของดินกับของน้ำต่างกันหรือไม่ เพราะเหตุใด
8. อุปสรรคในการศึกษาครั้งนี้ คืออะไร

บทปฏิบัติการที่ 9

อัตราผลผลิตทางชีวภาพ

(Biological Productivity)

ในระบบนิเวศทุกระบบจะต้องประกอบด้วย องค์ประกอบที่สำคัญ คือ สังคมสิ่งมีชีวิต (Community) การไหลของพลังงาน(Energy flow) และวัฏจักรของสาร (Material cycle) การไหลของพลังงาน และวัฏจักรของสารในระบบนิเวศ จะดำเนินจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่สิ่งมีชีวิต หรือจากสิ่งมีชีวิตสู่สิ่งมีชีวิต โดยกระบวนการกิน หรือการย่อยสลาย การสะสมพลังงานในรูปของอินทรีย์สารในสิ่งมีชีวิต เรียกว่า **ผลผลิตทางชีวภาพ** (Biological production) วัดได้ในรูปของมวลชีวภาพ (Biomass) เป็น น้ำหนักแห้ง (Dry weight) นอกจากนั้นยังสามารถวัดความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศ ได้ในรูปของอัตราผลผลิตทางชีวภาพ คือ ผลผลิตทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในพื้นที่ที่กำหนดหรือในปริมาตรที่กำหนดในช่วงเวลาหนึ่ง มีหน่วยเป็น $gm / m^2 / yr$ หรือ $gm / m^a / yr$ หรือ $mg - C / m^3 / hr$ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของผลผลิตแต่ละชนิด อัตราผลผลิตทางชีวภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. อัตราผลผลิตอันดับแรง (primary productivity)

   ได้แก่ อัตราผลผลิตของผู้ผลิต (Producer) ที่มีกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) และกระบวนสังเคราะห์ทางเคมี (Chemosynthesis) เปลี่ยนแปลงพลังงานแสงให้เป็นอินทรีย์สาร ซึ่งเกิดขึ้นในพื้นที่ที่กำหนดให้ ณ ช่วงเวลาหนึ่งสามารถแบ่งได้เป็น

   1.1 อัตราผลผลิตรวม (Gross primary productivity)

   1.2 อัตราผลผลิตสุทธิ (New primary productivity)

2. อัตราผลผลิตอันดับที่สอง (Secondary productivity)

   ได้แก่ อัตราผลผลิตหรือการสะสมพลังงานในลำดับขั้นของผู้บริโภค (Consumer) โดยที่ผู้บริโภคได้รับพลังงานจากอาหารที่กินเข้าไป แล้วใช้พลังงานบางส่วนในกระบวนการหายใจ เปลี่ยนรูปไปเป็นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของผู้บริโภค ซึ่งจะวัดในพื้นที่ที่กำหนด ณ ช่วงเวลาหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอัตราผลผลิตอันดับแรกของระบบนิเวศแหล่งน้ำ
2. เพื่อฝึกหัดประเมินความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำ
3. เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลผลิตทางชีวภาพ กับปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ

ที่มา: ปรับปรุงจาก ไพรัช สายเชื้อ, คำธร ธีรคุปต์ และ นันทนา คชเสนี (2545) คู่มือปฏิบัติการนิเวศวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องเก็บตัวอย่างน้ำ
2. ขวด BOD. ปริมาตร 300 ml.
3. สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ DO
4. กระดาษอลูมิเนียม
5. เทปพลาสติกสีดำ
6. เทอร์โมมิเตอร์
7. เทปวัด
8. เชือก
9. บีคเกอร์
10. ขวดน้ำกลั่น
11. กระดาษชำระ
12. ถังน้ำแข็ง หรือกล่องมืด
13. Sedwick-Rafter Counting Chamber
14. Cover slide
15. Syringe ขนาด 1 ml.
16. ผ้าเช็ดมือ
17. Wisconsin Plankton Net
18. ขวดเก็บตัวอย่าง Zooplankton
19. 5% Formalin
20. กล้องจุลทรรศน์

วิธีปฏิบัติ

อัตราผลผลิตอันดับแรก

1. เก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึกต่าง ๆ ที่ต้องการ ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างน้ำ แล้วใส่ในขวด BOD โดยตัวอย่างน้ำในแต่ละระดับความลึก จะเก็บในขวด BOD ใส 2 ขวด และ BOD ทึบ 1 ขวด ซึ่งใช้เทปพลาสติกสีดำพันทับ 2 ชั้น เพื่อป้องกันไม่ให้แสงส่องเข้าไปในขวดได้ การใส่ตัวอย่างน้ำจะต้องใส่น้ำให้ล้นขวด และไล่ฟองอากาศให้หมดแล้วรีบปิดจุกทันที ควรล้างขวด BOD ด้วยตัวอย่างน้ำก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่าง
2. นำขวด BOD ทั้ง 3 ขวด เก็บไว้ในกล่องมืด หรือถังน้ำแข็ง เพื่อรอทำการทดลองต่อไป
3. ทำตามข้อ 1-2 ณ ระดับความลึกต่าง ๆ
4. วัด DO ในขวด BOD ใส ทุกระดับความลึกก็จะได้ค่า 1B (Initial bottle) = X mg/l

5. ก่อนจะนำขวด BOD ที่เหลือคือ ขวดใส และทึบ นำไปแขวนที่ระดับความลึกต่าง ๆ ที่เก็บตัวอย่างมา เพื่อเป็นการ incubation ในสภาพธรรมชาติ ให้หุ้มผ่าขวด BOD ทึบด้วยกระดาษอลูมิเนียมให้มิดชิด แล้วจึงนำไปแขวนไว้ตั้งแต่เวลา 13.00 น. ถึง 17.00 น. เมื่อครบตามกำหนดตามเวลา จึงนำขวด BOD ทั้งหมดเก็บไว้ในกล่องมือ หรือถังน้ำแข็ง เพื่อนำกลับมาตรวจวัด DO ในห้องปฏิบัติการต่อไป

6. วัดค่า DO ในขวด BOD ทั้งหมด ซึ่งจะได้ค่า

LB (Light bottle) = y mg/l

DB (Dark bottle) = z mg/l

ซึ่งค่า LB จะเกิดขึ้นจากอิทธิพลของ การสังเคราะห์แสง ซึ่งจะทำให้ทราบว่าอัตราการสังเคราะห์แสง (อัตราการผลิตออกซิเจน) มากกว่า อัตราการหายใจ (อัตราการใช้ออกซิเจน) หรือไม่ ส่วนค่า DB จะเกิดขึ้นเนื่องจาก อัตราการหายใจเพียงอย่างเดียว

การคำนวณ :

IB – DB = Respiratory activity (mg / l / time)

LB – IB = Net photosynthetic activity (mg / l / time)

(LB – IB) + (IB – DB) = Gross photosynthetic activity (mg / l / time)

ค่า Gross photosynthesis ที่ได้เป็นค่าของ O_a concentration / Volume / time ซึ่งสามารถนำมาคำนวณในรูปของ C. concentration / Volume / time โดยหาค่า PQ (photosynthetic quotient) และ RQ (respiratory quotient)

ซึ่งค่า PQ และ RQ จะเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ O_a และ C ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และการหายใจ ดังนี้

$$PQ = \frac{+\Delta O_2}{-\Delta CO_2} = \frac{\text{โมเลกุลของ } O_a \text{ ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสง}}{\text{โมเลกุลของ } CO_a \text{ ที่ถูกใช้}}$$

$$RQ = \frac{+\Delta CO_2}{-\Delta O_2} = \frac{\text{โมเลกุลของ } CO_a \text{ ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสง}}{\text{โมเลกุลของ } O_a \text{ ที่ถูกใช้}}$$

โดยทั่วไปประชากรของแพลงค์ตอนพืชที่มีสภาพแวดล้อมที่ความเข้มของแสงปานกลางจะมีค่า PQ = 1.2 และ RQ = 1.0 เนื่องจากผลผลิตจากการสังเคราะห์ของแพลงตอนพืช

มีทั้งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งค่าใกล้เคียง 1.0 แต่ในผลผลิตก็มักมีไขมันเกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้ค่า PQ = 3.0 ดังนั้นจึงประเมินค่าโดยทั่วไปของ PQ = 1.2 ($p < 0.05$)

$$\text{Gross photosynthesis} \quad (\text{mg C / m}^3\text{ / hr}) = \frac{[(O_a, LB) - (O_a, DB)]\ (1000)}{(PQ)\ (t)}$$

$$\text{Net photosynthesis} \quad (\text{mg C / m}^3\text{ / hr}) = \frac{[(O_a, LB) - (O_a, IB)]\ (1000)}{(PQ)\ (t)}$$

$$\text{Respiration} \quad (\text{mg C / m}^3\text{ / hr}) = \frac{[(O_a, IB) - (O_a, DB)]\ (RQ)(1000)}{(t)}$$

ในการวัดผลผลิตอันดับแรก (mg-C / m^3) ของน้ำที่ผิวน้ำ สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพได้ คือ มีค่าประมาณ 50% carbon และจากค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานได้ เพราะค่าแคลอรีของเนื้อเยื่อของ plankton มีค่าเท่ากับ 5.5 cal/gm dry weight อีกวิธีหนึ่งของการวัดอัตราผลผลิตอันดับแรก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Gross primary production (P)} \quad (\text{mg C/m}^3) = \frac{(375.36)(LB - DB)}{PQ}$$

$$\text{Community respiration (R)} \quad (\text{mg C/m}^3) = (375.36)\ (IB - DB)\ (RQ)$$

ซึ่งค่าทั้งสองนี้นำมาหาความสัมพันธ์ P/R ratio และตัวเลขค่า P/R ratio ต่าง ๆ สามารถหาค่าได้ ณ ความลึกระดับต่าง ๆ ของแหล่งน้ำได้ โดย P/R ratio นี้จะแสดงให้ทราบถึง community metabolism ณ จุดนั้น อยู่ภายใต้การควบคุมของ Autotrophs หรือ Heterotrophs เช่น

P / R ratio $<$ 1.0 แสดงว่าอยู่ภายใต้การควบคุมของ Heterotrophs

P / R ratio $>$ 1.0 แสดงว่าอยู่ภายใต้การควบคุมของ Autotrophs

รายงานผล

1. แสดงผลการศึกษาเรื่องต่าง ๆ ในรูปตารางให้ชัดเจน
2. เปรียบเทียบอัตราผลผลิตอันดับแรก ในแต่ละช่วงระดับความลึก
3. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตอันดับแรก ทั้งในรูปมวลชีวภาพ พลังงาน และหา P/R ratio

คำถาม

1. โดยเชิงเปรียบเทียบในสังคมสิ่งมีชีวิตเดียวกัน อัตราผลผลิตอันดับแรก
2. ในการวัดอัตราผลผลิตอันดับแรก ทำไมใช้ขวด BOD ใส และทึบ จะใช้ขวด BOD ใส อย่างเดียว และทึบอย่างเดียวจะได้ไหม
3. ทำไมการวัดค่าอัตราผลผลิตจึงใช้น้ำหนักแห้ง จะใช้น้ำหนักสดจะได้ไหม
4. gross primary production ต่างกับ net primary production อย่างไร

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี