คำนิยามและหลักการทางจุลชีววิทยา

พารามิเตอร์ (Parameters)	วิธีวิเคราะห์ (Method)
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Total Coliform)	APHA (Part 9221 B.)
แบคทีเรียฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform)	APHA (Part 9221 E.)
แบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*)	AHPA (Part 9221 F.)
ไวรัส MS2 (Bacteriophage MS2)	EPA (Part 1601)
แบคทีเรียคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	ISO 7937 และ 14189
ไข่พยาธิและปรสิต (Helminth eggs and Nematodes)	SOP Helminth Test (Ascaris, Trichuris and Taenia), University of Kwazulu-Natal
การสกัด DNA (DNA extraction)	Phenol- chloroform method and DNeasy PowerSoil kit

1. แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Total coliform), แบคทีเรียฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform) และแบคทีเรียอีโคไล (*E. coli*)

นิยาม

โคลิฟอร์มแบคมีเรียถูกใช้เพื่อกำหนดคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำสำหรับการอุปโภคบริโภค โดย *E. coli* และกลุ่มโคลิฟอร์มอื่นๆ อาจปนเปื้อนมาจากอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่างๆ สู่สิ่งแวดล้อมได้

หลักการ

Most probable number (MPN) เป็นวิธีการวิเคราะห์แบคทีเรียโดยการประมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียซึ่งจะแสดงผลบวกจากการเกิดแก๊สในหลอดทดลอง และใช้ตารางทางสถิติมาตรฐานหรือ MPN Index ในการคำนวณ โดยสามารถใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างคุณภาพน้ำจากน้ำดื่ม น้ำเค็ม หรือน้ำกร่อย รวมถึง โคลน กากตะกอนอุจจาระ และกากตะกอนแห้งหรือปุ๋ยหมัก

Colony forming unit (CFU) เป็นวิธีที่ใช้วัดจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง ซึ่งจะนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งตามวิธีมาตรฐาน

NATS LAB

2. ไวรัส MS2 (Bacteriophage MS2)

นิยาม

Coliphage คือ ไวรัสที่อาศัยแบคทีเรีย *E. coli* เป็น Host เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน และอีกหนึ่งวิธีการที่สามารถเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะอาศัยการตรวจจับ Male- specific (F^+) Coliphage เพื่อหาปริมาณของ MS2 Coliphage ในน้ำเสีย หรือ น้ำทิ้ง, กากตะกอนอุจจาระ และกากตะกอนแห้งหรือปุ๋ยหมัก

หลักการ

เป็นการหาปริมาณของ Bacteriophage โดยการใช้ Host ที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของ coliphage ที่ต้องการหา โดยกระตุ้นการเจริญในอาหารแข็ง TSA ที่มี antibiotic เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นที่ไม่พึงประสงค์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. และนับจำนวณปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้น

3. ไข่พยาธิและหนอนพยาธิ (Helminth Egg and Nematode)

นิยาม

ในการตรวจหาไข่พยาธิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคของระบบบำบัดน้ำเสีย และสามารถบ่งบอกถึงความชุกของพยาธิสายพันธุ์ต่างๆ รวมถึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงการติดเชื้อในชุมชน ในการตรวจวิเคราะห์ไข่พยาธิและหนอนพยาธิสามารถวิเคราะห์และตรวจหาปริมาณของไข่พยาธิได้ทั้งในน้ำเสียหรือน้ำทิ้ง ตัวอย่างตะกอนเปียก อุจจาระ และกากตะกอนแห้ง โดยใช้วิธีการทำให้ลอยโดย $ZnSO_4$ และวิธีการตกตะกอน

หลักการ

การตรวจหาไข่พยาธิและหนอนพยาธิ จะใช้วิธีการในตรวจสอบที่แตกต่างกันตามลักษณะของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์และนำมานับจำนวณผ่านกล้องจุลทรรศน์ หากพบไข่พยาธิ จะนำไปบ่มใน 0.1 N H_2SO_4 โดยจำลองสภาวะตามระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เพื่อเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบบำบัดว่าสามารถกำจัดพยาธิได้หรือไม่

4. แบคทีเรียคลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*Clostridium perfringens*)

นิยาม

Clostridium perfringens ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและสิ่งแวดล้อม รวมถึงภายในลำไส้ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียแกรมบวกเหล่านี้มีสปอร์ซึ่งทนต่อความร้อนเมื่อเทียบกับเซลล์พืช การตรวจสอบ *C. perfringens* มีประโยชน์สำหรับการประเมินคุณภาพของแหล่งน้ำ รวมถึงกากตะกอน และเพื่อตรวจสอบขั้นตอนของการบำบัดน้ำเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของระบบบำบัด

NATS LAB

หลักการ

การวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* จะแบ่งวิธีตามลักษณะของตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นของแข็งและของเหลว โดยทั้งสองลักษณะจะต้องบ่มในสภาวะที่เป็น anaerobic ซึ่งในตัวอย่างของแข็งจะดูการเกิดแก๊สในอาหาร LS medium ใน Durham tube ส่วนในตัวอย่างของเหลว จะนับจำนวณโคโลนีสีดำที่เกิดบน TSC agar

5. การสกัด DNA (DNA extraction)

นิยาม

การสกัดแยก DNA จากดินหรือตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถแยกจีโนมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำเสีย ตะกอนปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียหรือระบบบำบัดสิ่งปฏิกูล เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

หลักการ

การสกัด DNA จะอาศัยการทำลายผนังเซลล์โดยใช้สาร lysozyme หรือ สาร Detergent ในการทำให้เซลล์แตก จากนั้นจึงทำการย่อยโปรตีนและ RNA โดยใช้ Protease และ RNase ขั้นตอนสุดท้ายคือการตกตะกอน DNA โดยใช้ cool absolute ethanol ซึ่งจะเป็นการแยกสาย DNA ออกมาเป็นสายเดี่ยว และจะนำไปวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดในทาง Bioinformatic ต่อไป

NATS LAB

Definition and Principle of Microbiology Parameters

1. Total coliform, Fecal coliform and *E. coli*

Definition

Coliform bacteria have been used for many years to determine the quality and safety of water for human consumption. *Escherichia coli* and other groups of coliforms may be present where there has been fecal contamination originating from warm-blooded animals which can be contaminated in various water sources to the environment.

Significance

The most probable number (MPN) of bacteria present can then be estimated from the number of tubes inoculated and the number of positive tubes obtained in the confirmatory test, using specially devised statistical tables. It is applicable to the analysis of water of drinking water quality, salt or brackish water as well as muds, sediments, and fecal sludge.

Colony forming unit (CFU) is a method which measures the number of viable bacterial cell in sample. The method which counts colony forming units is referred as standard plate count. The viable colonies that appear on the agar plates are expressed as CFU per 1 ml (colony forming unit per milliliter) of the sample for liquids or CFU per 1 g (colony forming unit per one gram) of the sample for solids.

2. Male-specific (F^+) Coliphage (Bacteriophage MS2)

Definition

Coliphage are viruses (bacteriophage) that infect *E. coli* and are indicators of fecal contamination. This method can detect male-specific (F^+) Coliphage. The adoption of this method standard describes the detection and quantification of MS2 Coliphage in wastewater or effluent, fecal sludge and dried or composted sludge.

NATS LAB

Significance

Quantitation of Bacteriophage, use the specific host for coliphage and was activated by TSA with antibiotics and then incubate at 37 degree Celsius, 24 Hr. After that, Count the plaque that appear on the agar.

3. Helminth Egg and Nematode

Definition

The viable helminth ova count is indication of the effectiveness of the disinfection process of the wastewater treatment facility and generate data on the prevalence of the different species, as well as provide some indication of the incidence of infection in communities serviced.

The helminth ova and nematode count. NATS laboratory can detection, identification and quantification of total and viable helminth ova in wastewater or effluent, wet sludge or stool sample, faecal sludge and dried or composted sludge.

Significance

Helminth Egg and Nematode use the different method from characteristic of sample and count by microscope. If it was detected and then incubate in 0.1 N H_2SO_4 with simulate intestine of humans for verify wastewater treatment system can remove Helminth egg and nematode or not.

4. *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*)

Definition

Clostridium perfringens is widely recognized as a valuable indicator for faecal and food pollution. Intestinal tract of animals and man, these Gram-positive bacteria from spores which are resistant to heating compared with vegetative cells. Monitoring of *C. perfringens* has proven useful for the assessment of the quality of water resources include fecal sludge and to check the stages of water treatment to evaluate the treatment-works performance.

Significance

The quantitation analysis of *C. perfringens,* analyzed by characteristic of sample. Solid sample can observe the gas generation in LS medium and liquid sample can count the black colony on TSC agar.

NATS LAB

5. DNA Extraction

Definition

This method can isolate microbial genomic DNA from even tough compost, sediment, manure, biomass and fecal sludge from water treatment system samples for study the biodiversity.

Significance

DNA extraction is based on the destruction of cell walls using lysozyme or detergent to break cells first. Then digest the proteins and RNA using protease and RNase. Final step is precipitate the DNA using cool absolute ethanol, which separates the DNA into a single strand and will be analyzed by Bioinformatic tool further.

NATS LAB