ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

เรื่อง กำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) และวิธีการเก็บตัวอย่าง และการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว

พ.ศ. ๒๕๖๑

โดยที่เป็นการสมควรกำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) และวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว

อาศัยอำนาจตามความในข้อ ๑๕ แห่งกฎกระทรวงสุขลักษณะการจัดการสิ่งปฏิกูล พ.ศ. ๒๕๖๑ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขโดยคำแนะนำของคณะกรรมการสาธารณสุข จึงออกประกาศไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ประกาศนี้เรียกว่า “ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) และวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว พ.ศ. ๒๕๖๑”

ข้อ ๒ ประกาศนี้ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดสามร้อยหกสิบวันนับแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ข้อ ๓ ในประกาศนี้

“ไข่หนอนพยาธิ” หมายความว่า ไข่หนอนพยาธิที่มีชีวิต

ข้อ ๔ ในการระบายน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว น้ำทิ้งและกากตะกอนต้องมีปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ดังนี้

รายการทดสอบ	ประเภท	เกณฑ์ปริมาณที่กำหนด
ไข่หนอนพยาธิ	น้ำทิ้ง	น้อยกว่า ๑ ฟอง ต่อ ลิตร
	กากตะกอน	น้อยกว่า ๑ ฟอง ต่อ กรัม (น้ำหนักแห้ง)
แบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli)	น้ำทิ้ง	น้อยกว่า ๑,๐๐๐ MPN (Most Probable Number) ต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร
	กากตะกอน	น้อยกว่า ๑,๐๐๐ MPN (Most Probable Number) ต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง)

ข้อ ๕ วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ดังต่อไปนี้

(๑) วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งสำหรับตรวจหาไข่หนอนพยาธิ ให้ใช้วิธีเก็บแบบจ้วง (Grab sampling) ในบ่อสุดท้ายของระบบกำจัดหรือจุดสุดท้ายก่อนระบายน้ำทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง

ที่จุดกึ่งกลางความลึกสำหรับบ่อที่มีความลึกไม่เกิน ๒ เมตร และเก็บที่ระดับความลึกจากผิวน้ำ ๑ เมตร สำหรับบ่อที่มีความลึกเกินกว่า ๒ เมตร โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งให้ได้ปริมาณ ๓ ลิตร บรรจุในภาชนะพลาสติก ขนาดความจุ ๔ ถึง ๕ ลิตร

(๒) วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งสำหรับตรวจหาแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ให้เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งที่ระดับความลึก ๓๐ เซนติเมตร ของบ่อสุดท้าย หรือภาชนะที่รองรับ ณ จุดตรวจสอบ โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งให้ได้ปริมาณ ๑๐๐ มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วขนาดความจุ ๑๒๕ มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๖๐ - ๑๘๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง ภายในมีคราบของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น ร้อยละ ๑๐ ปริมาตร ๐.๑ มิลลิลิตร หุ้มจุกขวดด้วยกระดาษอะลูมิเนียม และบรรจุในกระป๋องทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม

ในกรณีไม่สามารถทำการตรวจได้ทันที ให้เก็บรักษาตัวอย่างน้ำทิ้งในภาชนะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ ๔ ถึง ๑๐ องศาเซลเซียส และดำเนินการตรวจภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง

ข้อ ๖ วิธีการเก็บตัวอย่างกากตะกอน ให้เก็บตัวอย่างกากตะกอนจากที่กองเก็บกากตะกอน โดยสุ่มเก็บให้เป็นตัวแทน จำนวน ๑๐ จุด ๆ ละไม่น้อยกว่า ๑๐๐ กรัม คลุกผสมตัวอย่างกากตะกอนที่ได้ให้เข้ากันอย่างทั่วถึงรวมเป็นกองเดียวกัน แล้วแบ่งเป็น ๔ ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วสุ่มเลือก ๒ ส่วน ที่อยู่ตรงข้ามมารวมกัน ตักตะกอนปริมาณ ๔๐๐ กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดสำหรับตรวจหาไข่หนอนพยาธิและตักตะกอนอีกปริมาณ ๑๐๐ กรัม ใส่ในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่สะอาดและปลอดเชื้อ สำหรับตรวจหาแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli)

ในกรณีไม่สามารถทำการตรวจได้ทันที ให้เก็บรักษาตัวอย่างกากตะกอนในภาชนะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ ๔ ถึง ๑๐ องศาเซลเซียส และดำเนินการตรวจภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง

ข้อ ๗ การตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว ให้ผู้มีหน้าที่จัดการสิ่งปฏิกูลดำเนินการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในน้ำทิ้งและกากตะกอนให้เป็นไปตามคู่มือแนบท้ายประกาศนี้ และดำเนินการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียอีโคไล (Escherichia coli) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนตามวิธี Most Probable Number (MPN) หรือ Multiple Tube Fermentation Technique (Standard Method Part ๙๒๒๑) อย่างน้อยปีละ ๑ ครั้ง และรายงานผลการตรวจต่อราชการส่วนท้องถิ่น ในกรณีที่ราชการส่วนท้องถิ่นดำเนินการให้รายงานต่อคณะกรรมการสาธารณสุขจังหวัดหรือคณะกรรมการสาธารณสุขกรุงเทพมหานครแล้วแต่กรณี

ประกาศ ณ วันที่ ๑๙ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๑
ปิยะสกล สกลสัตยาทร
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

คู่มือแนบท้ายประกาศ

(ก) การตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในน้ำทิ้งที่ผ่านการกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้วให้ดำเนินการ ดังนี้

๑. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี ที่ต้องใช้ประกอบด้วย

๑.๑ ถ้วยตวงทรงกรวย (Conical cylinder) ขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

๑.๒ บีกเกอร์ (beaker) ขนาด ๒๐๐ มิลลิลิตร

๑.๓ หลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๕๐ มิลลิลิตร

๑.๔ หลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๑๕ มิลลิลิตร

๑.๕ เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

๑.๖ ซัคชั่น ปั๊ม (Suction pump) หรืออุปกรณ์อื่นที่สามารถดูดของเหลว

๑.๗ เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

๑.๘ ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic Pipette)

๑.๙ กระจกสไลด์

๑.๑๐ พาราฟิล์ม

๑.๑๑ กระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร

๑.๑๒ สารละลาย ๐.๑ เปอร์เซ็นต์ ไทรทันเอกซ์-๑๐๐ (๐.๑% TritonX-๑๐๐)

๑.๑๓ สารละลายฟอร์มัล ซาไลน์ (Formal saline) (๔๐ เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน (Formalin) ๑๐๐ มิลลิลิตร, โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ๙ กรัมต่อลิตร)

๑.๑๔ เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate)

๑.๑๕ สารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๐ (ถ.พ. ๑.๒๐) สารละลายน้ำตาลอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๗ (ถ.พ. ๑.๒๗) สารละลายซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๓.๐ (ถ.พ. ๓.๐)

๑.๑๖ สารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์

๒. วิธีดำเนินการ

การปฏิบัติงานจะแบ่งออกเป็น ๓ ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ ๑ วิธีการตรวจอย่างง่ายหรือการตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (Simple – Centrifugal sedimentation) โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งมาทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Sedimentation) แล้วนำตะกอนที่ได้มาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบไข่หนอนพยาธิให้รายงานผลโดยไม่ต้องทำขั้นตอนต่อไป แต่หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ต้องทำการทดสอบต่อในขั้นตอนที่ ๒ วิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin – Ethyl acetate sedimentation) โดยการนำตะกอนที่เหลือมาขจัดไขมันและสิ่งสกปรกอื่นๆ แล้วนำตะกอนที่ได้มาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบไข่หนอนพยาธิ ให้รายงานผลโดยไม่ต้องทำขั้นตอนต่อไป แต่หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้ทดสอบต่อไปในขั้นตอนที่ ๓ วิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation) โดยใช้สารละลายที่มีความถ่วงจำเพาะที่เหมาะสม แล้วตรวจหาไข่หนอนพยาธิที่ลอยขึ้นมาด้วยกล้องจุลทรรศน์และรายงานผล

๒.๑ การตรวจด้วยวิธีการตรวจอย่างง่ายหรือการตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (Simple – Centrifugal sedimentation)

๒.๑.๑ เตรียมถ้วยตวงทรงกรวยขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร และติดฉลากหมายเลขตัวอย่างลงบนถ้วย

๒.๑.๒ เขย่าขวดตัวอย่างน้ำแล้วเทตัวอย่างน้ำปริมาณ ๑ ลิตร ลงในถ้วยตวงทรงกรวยที่เตรียมไว้ แต่หากตัวอย่างน้ำมีเศษตะกอนขนาดใหญ่ ให้นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านผ้าก็อซ ๒ ชั้นก่อน

๒.๑.๓ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย ๑๒ ชั่วโมง แล้วดำเนินการในขั้นตอน ๒.๑.๔ ต่อไป หรือปั่นเหวี่ยงที่ ๑,๐๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๑๕ นาที เพื่อให้ตกตะกอน แล้วข้ามไปดำเนินการในขั้นตอน ๒.๑.๘

๒.๑.๔ เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสออก ให้เหลือของเหลวที่ก้นภาชนะ ๒๐๐ มิลลิลิตร

๒.๑.๕ แกว่งถ้วยตวงทรงกรวย เพื่อผสมน้ำกับตะกอนให้เข้ากันและชะตะกอนที่ติดข้างถ้วย จากนั้นเทใส่ในบีกเกอร์ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร

๒.๑.๖ ฉีดสารละลาย ๐.๑ เปอร์เซ็นต์ ไทรทันเอกซ์-๑๐๐ เพื่อชะตะกอนที่ติดข้างถ้วยแล้วเทรวมกับตัวอย่างน้ำในบีกเกอร์

๒.๑.๗ เทตัวอย่างน้ำจากบีกเกอร์ลงในหลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๕๐ มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว ๑,๐๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๑๕ นาที

๒.๑.๘ ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วปั่นตัวอย่างน้ำซ้ำจนกว่าจะหมด

๒.๑.๙ หลังจากปั่นรอบสุดท้าย ให้ดูดส่วนใสทิ้งจนเหลือส่วนใสประมาณ ๓ เท่าของปริมาตรตะกอนแล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติ โดยตัดปลายปิเปต ทิป (Pipette tip) ให้เป็นรูกว้าง ดูดส่วนผสมมาใส่รวมกันในหลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๑๕ มิลลิลิตร วัดปริมาตรส่วนผสมตะกอนเป็นหน่วยมิลลิลิตร

๒.๑.๐ นำตัวอย่างมาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

๒.๑.๑๐.๑ เตรียมกระจกสไลด์ จำนวน ๒ สไลด์ และเขียนหมายเลขกำกับลงบนกระจกสไลด์

๒.๑.๑๐.๒ หยดสารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ ๕๐ ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์

๒.๑.๑๐.๓ ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดตัวอย่าง ๕๐ ไมโครลิตร โดยตัดปลายปิเปต ทิป (Pipette tip) ให้เป็นรูกว้าง แล้วหยดลงบนกระจกสไลด์ คนตัวอย่างกับน้ำเกลือให้เข้ากัน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร

๒.๑.๑๐.๔ นำสไลด์ไปตรวจหาไข่หนอนพยาธิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทั้ง ๒ สไลด์

- หากกรณีไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้นำตัวอย่างที่เหลือในบีกเกอร์มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin – Ethyl acetate sedimentation) ตามขั้นตอน ๒.๒ ต่อไป

- หากกรณีที่พบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้ และปริมาตรส่วนผสมตะกอนในขั้นตอน ๒.๑.๙ ในหน่วยมิลลิลิตร ($V_๑$) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อน้ำ ๑ ลิตร = จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๒ สไลด์ x $V_๑$ x ๑๐

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้ดำเนินการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในข้อ ๒.๒ ต่อไป แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร

๒.๒ การตรวจด้วยวิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin - Ethyl acetate sedimentation)

๒.๒.๑ นำตะกอนที่เหลือจากขั้นตอนที่ ๒.๑.๑๐ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๑,๐๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๑๕ นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๒.๒ เติมสารละลายฟอร์มัล ซาไลน์ (Formal saline) ๔ มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

๒.๒.๓ เติมเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ๒ มิลลิลิตร โดยใช้หลอดดูดพลาสติกที่มีกระเปาะ ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มหรือปิดฝา จากนั้นเขย่าแรงๆ ประมาณ ๓๐ ครั้ง เพื่อผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ ๑๐ นาที

๒.๒.๔ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๑,๐๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๑๕ นาที จากนั้นนำไม้เขี่ยตะกอนที่อยู่บริเวณข้างหลอดซึ่งมีรอยต่อระหว่างชั้นเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) และ ฟอร์มาลิน (Formalin) ให้หลุดออกแล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๒.๕ เติมสารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร ๓ เท่าของปริมาตรตะกอน ใช้ไม้กวนผสมน้ำเกลือและตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจดบันทึกปริมาตรส่วนผสมตะกอนเป็นหน่วยมิลลิลิตร

๒.๒.๖ นำตัวอย่าง ๒.๒.๕ มาตรวจหาไข่หนอนพยาธิ ตามขั้นตอน ๒.๑.๑๐.๑ ถึง ๒.๑.๑๐.๔ แล้วนำมาคำนวณตามสูตร

- หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้นำตะกอนที่เหลือจากขั้นตอน ๒.๒.๖ มาตรวจด้วยวิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation) ตามขั้นตอน ๒.๓ ต่อไป
- หากพบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้และปริมาตรส่วนผสมตะกอนในขั้นตอน ๒.๒.๕ ($V_๒$) ในหน่วยมิลลิลิตร โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อน้ำ ๑ ลิตร = จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๒ สไลด์ x $V_๒$ x ๑๐

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้ดำเนินการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในข้อ ๒.๓ ต่อไป แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร

๒.๓ การตรวจด้วยวิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation)

๒.๓.๑ นำตัวอย่างตะกอนจากขั้นตอน ๒.๒.๖ มาทำขั้นตอนต่อไป

๒.๓.๒ เทน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในหลอดก้นแหลม ให้ถึงระดับ ๑๔ มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มหรือปิดฝา เขย่าหลอดแบบกลับไปมา (Invert) ๕ ครั้ง เพื่อผสมตะกอนกับน้ำเกลือ

๒.๓.๓ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๑,๐๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๑๕ นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๓.๔ ทำขั้นตอน ๒.๓.๒ ถึง ๒.๓.๓ ซ้ำอีก ๑ ครั้ง เพื่อล้างตะกอนและกำจัดฟอร์มาลิน (formalin) และเอทิล อะซิเตต (ethyl acetate) ออกให้หมด

๒.๓.๕ เติมสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๐ (ถ.พ. ๑.๒๐) หรือน้ำตาลอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๗ (ถ.พ. ๑.๒๗) หรือ ซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๓.๐ (ถ.พ. ๓.๐)

ลงในหลอดก้นแหลมให้ถึงระดับ ๖ มิลลิลิตร ใช้ไม้กวนให้เข้ากันและเติมสารละลายให้ถึงขอบบนของหลอด

๒.๓.๖ วางกระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร จำนวน ๒ แผ่น โดยนำแต่ละสไลด์มาวางไว้บนปากหลอด อย่าให้มีช่องว่างหรือฟองอากาศที่กระจกปิดสไลด์ กรณีที่ใช้น้ำเกลืออิ่มตัวหรือน้ำตาลอิ่มตัว ให้รอ ๑๕ นาที หรือกรณีใช้ซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัว ให้รอ ๑๐ นาที แล้วตรวจหาไข่หนอนพยาธิที่ลอยขึ้นมาติดที่กระจกปิดสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

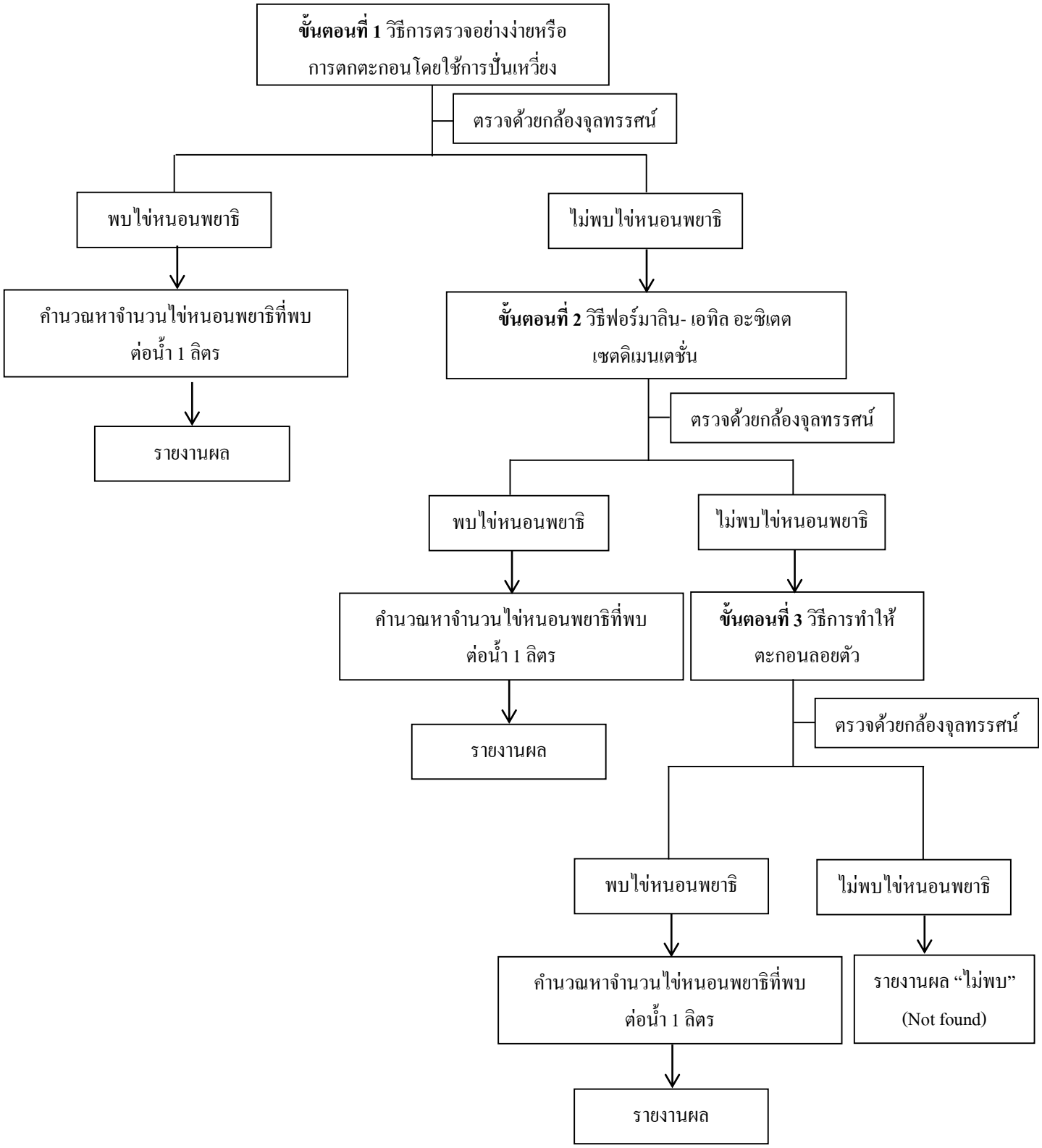
๒.๓.๗ นำตัวอย่างมาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ และรายงานผล

- หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้รายงานว่า “ไม่พบ” (Not found)
- หากพบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้ โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อน้ำ ๑ ลิตร = จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๒ สไลด์

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้รายงานว่า “ไม่พบ” (Not found) แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อลิตร ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อน้ำ ๑ ลิตร

ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในน้ำทิ้งที่ผ่านการกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว



(ข) การตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในกากตะกอนที่ผ่านการกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้วให้ดำเนินการ ดังนี้

๑. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี ที่ต้องใช้ประกอบด้วย

๑.๑ ถ้วยตวงทรงกรวย (Conical cylinder) ขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

๑.๒ บีกเกอร์ (beaker) ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร

๑.๓ กระบอกตวง ๕๐๐ มิลลิลิตร

๑.๔ หลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๑๕ มิลลิลิตร

๑.๕ เครื่องชั่ง (balance analytical)

๑.๖ ซัคชั่น ปั๊ม (Suction pump) หรืออุปกรณ์อื่นที่สามารถดูดของเหลว

๑.๗ เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

๑.๘ ไม้เขี่ยปลายแหลม

๑.๙ ผ้าก็อซ

๑.๑๐ พาราฟิล์ม

๑.๑๑ ถุงพลาสติก

๑.๑๒ กรรไกร

๑.๑๓ แท่งแก้ว

๑.๑๔ พลาสเจอร์ปิเปต

๑.๑๕ ปิเปตพลาสติกแบบมีกระเปาะ

๑.๑๖ ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic Pipette)

๑.๑๗ กระจกสไลด์

๑.๑๘ กระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร

๑.๑๙ น้ำกลั่น

๑.๒๐ โซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น ๕ เปอร์เซ็นต์ (Sodium hypochlorite ๕%)

๑.๒๑ สารละลายฟอร์มัล ซาไลน์ (Formal saline) (๔๐ เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน (Formalin) ๑๐๐ มิลลิลิตร, โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ๙ กรัมต่อลิตร)

๑.๒๒ เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate)

๑.๒๓ สารละลาย Floatation เช่น น้ำเกลืออิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๐ (ถ.พ. ๑.๒๐) น้ำตาลอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๗ (ถ.พ. ๑.๒๗) ซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๓.๐ (ถ.พ. ๓.๐)

๑.๒๔ สารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์

๒. วิธีดำเนินการ

การปฏิบัติงานจะแบ่งออกเป็น ๓ ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ ๑ วิธีการตรวจอย่างง่ายหรือการตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (Simple – Centrifugal sedimentation) โดยนำตัวอย่างกากตะกอนมาทำให้ละลายแล้วกรองเพื่อกำจัดเศษขยะขนาดใหญ่ และทำให้ตกตะกอนโดยการตั้งทิ้งไว้นาน ๑๒ ชั่วโมง หรือการปั่นเหวี่ยง และนำกากตะกอนที่ได้มาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบไข่หนอนพยาธิให้รายงานผลโดยไม่ต้องทดสอบด้วยขั้นตอนต่อไป แต่หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ต้องทำการทดสอบต่อในขั้นตอนที่ ๒ วิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin – Ethyl acetate sedimentation) โดยการนำตะกอนที่เหลือมาขจัดไขมันและสิ่งสกปรกอื่นๆ แล้วนำตะกอนที่ได้มาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบไข่หนอนพยาธิ ให้รายงานผลโดยไม่ต้องทำขั้นตอนต่อไป

แต่หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้ทดสอบต่อไปในขั้นตอนที่ ๓ วิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation) โดยใช้สารละลายที่มีความถ่วงจำเพาะที่เหมาะสม แล้วตรวจหาไข่หนอนพยาธิที่ลอยขึ้นมาด้วยกล้องจุลทรรศน์และรายงานผล

๒.๑ การตรวจด้วยวิธีการตรวจอย่างง่ายหรือการตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (Simple – Centrifugal sedimentation)

๒.๑.๑ เตรียมถ้วยตวงทรงกรวยขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร และติดฉลากหมายเลขตัวอย่างลงบนถ้วย

๒.๑.๒ ชั่งตัวอย่างตะกอนจำนวน ๕๐ กรัม ใส่ลงในถ้วยตวงทรงกรวยที่เตรียมไว้

๒.๑.๓ ตวงน้ำกลั่น ๑๗๕ มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวงแล้วเทน้ำลงถ้วยตวงทรงกรวยที่มีตัวอย่างตะกอนอยู่

๒.๑.๔ ตวงโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น ๕ เปอร์เซ็นต์ (Sodium hypochlorite ๕%) จำนวน ๗๕ มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวงแล้วเทลงถ้วยตวงทรงกรวยที่มีตัวอย่างตะกอนอยู่

๒.๑.๕ ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนและสารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน อย่างน้อย ๓๐ นาที แล้วนำส่วนผสมดังกล่าวมากรองผ่านผ้าก็อซ ๒ ชั้น ซึ่งวางอยู่บนถ้วยตวงทรงกรวย ขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

๒.๑.๖ เทน้ำกลั่นปริมาณ ๑๐๐ มิลลิลิตร ลงในภาชนะเดิม เพื่อชะตะกอนที่เหลืออยู่ในภาชนะ แล้วค่อยๆเทผ่านผ้าก็อซ ๒ ชั้น เพื่อล้างตะกอน

๒.๑.๗ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย ๑๒ ชั่วโมง หรือปั่นเหวี่ยงที่ ๘๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๓ นาที เพื่อให้ตกตะกอน

๒.๑.๘ เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสออก ให้เหลือของเหลวที่ก้นภาชนะในปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรตะกอน แล้วจดบันทึกปริมาตรส่วนผสมตะกอนเป็นหน่วยมิลลิลิตร

๒.๑.๙ แกว่งถ้วยตวงทรงกรวยเพื่อผสมน้ำกับตะกอนให้เข้ากันและชะตะกอนที่ติดข้างถ้วย จากนั้นเทใส่ในบีกเกอร์ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร

๒.๑.๑๐ นำตัวอย่างมาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

๒.๑.๑๐.๑ เตรียมกระจกสไลด์ จำนวน ๒ สไลด์ และเขียนหมายเลขกำกับลงบนกระจกสไลด์

๒.๑.๑๐.๒ หยดสารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ ๕๐ ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์

๒.๑.๑๐.๓ แกว่งบีกเกอร์เพื่อผสมตะกอนให้เข้ากัน ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดตัวอย่าง ๕๐ ไมโครลิตร โดยตัดปลายปิเปต ทิป (Pipette tip) ให้เป็นรูกว้าง แล้วหยดลงบนกระจกสไลด์ คนตัวอย่างกับน้ำเกลือให้เข้ากัน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร

๒.๑.๑๐.๔ นำสไลด์ไปตรวจหาไข่หนอนพยาธิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทั้ง ๒ สไลด์

- หากกรณีไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้นำตะกอนที่เหลือในบีกเกอร์มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin – Ethyl acetate sedimentation) ตามขั้นตอน ๒.๒ ต่อไป

- หากกรณีที่พบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้ และปริมาตรส่วนผสมตะกอนในขั้นตอน ๒.๑.๘ ในหน่วยมิลลิลิตร ($V_๑$) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อกากตะกอน ๑ กรัม = จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๒ สไลด์ x $V_๑$ x ๐.๒

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้ดำเนินการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในข้อ ๒.๒ ต่อไป แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม

๒.๒ การตรวจด้วยวิธีฟอร์มาลิน – เอทิล อะซิเตต เซตดิเมนเตชั่น (Formalin - Ethyl acetate sedimentation)

๒.๒.๑ นำตะกอนที่เหลือจากขั้นตอนที่ ๒.๑.๑๐ เขย่าตะกอนให้เข้ากัน แล้วเทลงในหลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด ๑๕ มิลลิลิตร จำนวน ๒ หลอด โดยเทจนเกือบเต็มหลอด ประมาณ ๑๔ มิลลิลิตร

๒.๒.๒ นำตัวอย่างตะกอนทั้ง ๒ หลอด ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๘๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๒.๓ เติมสารละลายฟอร์มัล ซาไลน์ (Formal saline) ลงในหลอดจนปริมาณสารละลายถึงระดับ ๙ มิลลิลิตร แล้วใช้ไม้เขี่ยตะกอนที่ก้นหลอดให้แตกออก

๒.๒.๔ เติมเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ลงในหลอด ให้ถึงระดับ ๑๓ มิลลิลิตร โดยใช้หลอดดูดพลาสติกที่มีกระเปาะ ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มหรือปิดฝา จากนั้นเขย่าแรงๆ ประมาณ ๓๐ ครั้งเพื่อผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ ๑๐ นาที

๒.๒.๕ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๘๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นนำไม้เขี่ยตะกอนที่อยู่บริเวณข้างหลอด ซึ่งมีรอยต่อระหว่างชั้นเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) และฟอร์มาลิน (Formalin) ให้หลุดออกแล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๒.๖ เติมสารละลายน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร ๓ เท่า ของปริมาตรตะกอน ใช้ไม้กวนผสมน้ำเกลือและตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจดบันทึกปริมาตรส่วนผสมตะกอนรวม ๒ หลอด เป็นหน่วยมิลลิลิตร

๒.๒.๗ นำตัวอย่าง ๒.๒.๖ มาตรวจหาไข่หนอนพยาธิ ตามขั้นตอน ๒.๑.๑๐.๑ ถึง ๒.๑.๑๐.๔ โดยตรวจหลอดละ ๒ สไลด์

- หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้นำตะกอนที่เหลือจากขั้นตอน ๒.๒.๖ มาตรวจด้วยวิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation) ตามขั้นตอน ๒.๓ ต่อไป
- หากพบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้ ปริมาตรส่วนผสมตะกอนในขั้นตอน ๒.๑.๘ ($V_๑$) และขั้นตอน ๒.๒.๖ ($V_๒$) ในหน่วยมิลลิลิตร โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อกากตะกอน ๑ กรัม} = \frac{\text{จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๔ สไลด์} \times V_๑ \times V_๒}{๒๘๐}$$

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้ดำเนินการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในข้อ ๒.๓ ต่อไป แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม

๒.๓ การตรวจด้วยวิธีการทำให้ตะกอนลอยตัว (Floatation)

๒.๓.๑ นำตัวอย่างตะกอนทั้ง ๒ หลอดจากขั้นตอน ๒.๒.๖ มาทำขั้นตอนต่อไป

๒.๓.๒ เทน้ำเกลือ ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในหลอดก้นแหลม ให้ถึงระดับ ๑๔ มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มหรือปิดฝา เขย่าหลอดแบบกลับไปมา (Invert) ๕ ครั้ง เพื่อผสมตะกอนกับน้ำเกลือ

๒.๓.๓ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ๘๐๐ จี (xg) เป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

๒.๓.๔ ทำขั้นตอน ๒.๓.๒ ถึง ๒.๓.๓ ซ้ำอีก ๒ ครั้ง เพื่อล้างตะกอนและกำจัดฟอร์มาลิน (Formalin) และเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ออกให้หมด

๒.๓.๕ เติมสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๐ (ถ.พ. ๑.๒๐) หรือน้ำตาลอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๗ (ถ.พ. ๑.๒๗) หรือซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัวความถ่วงจำเพาะ ๓.๐ (ถ.พ. ๓.๐) ลงในหลอดก้นแหลมให้ถึงระดับ ๖ มิลลิลิตร ใช้ไม้กวนให้เข้ากันและเติมสารละลายให้ถึงขอบบนของหลอด

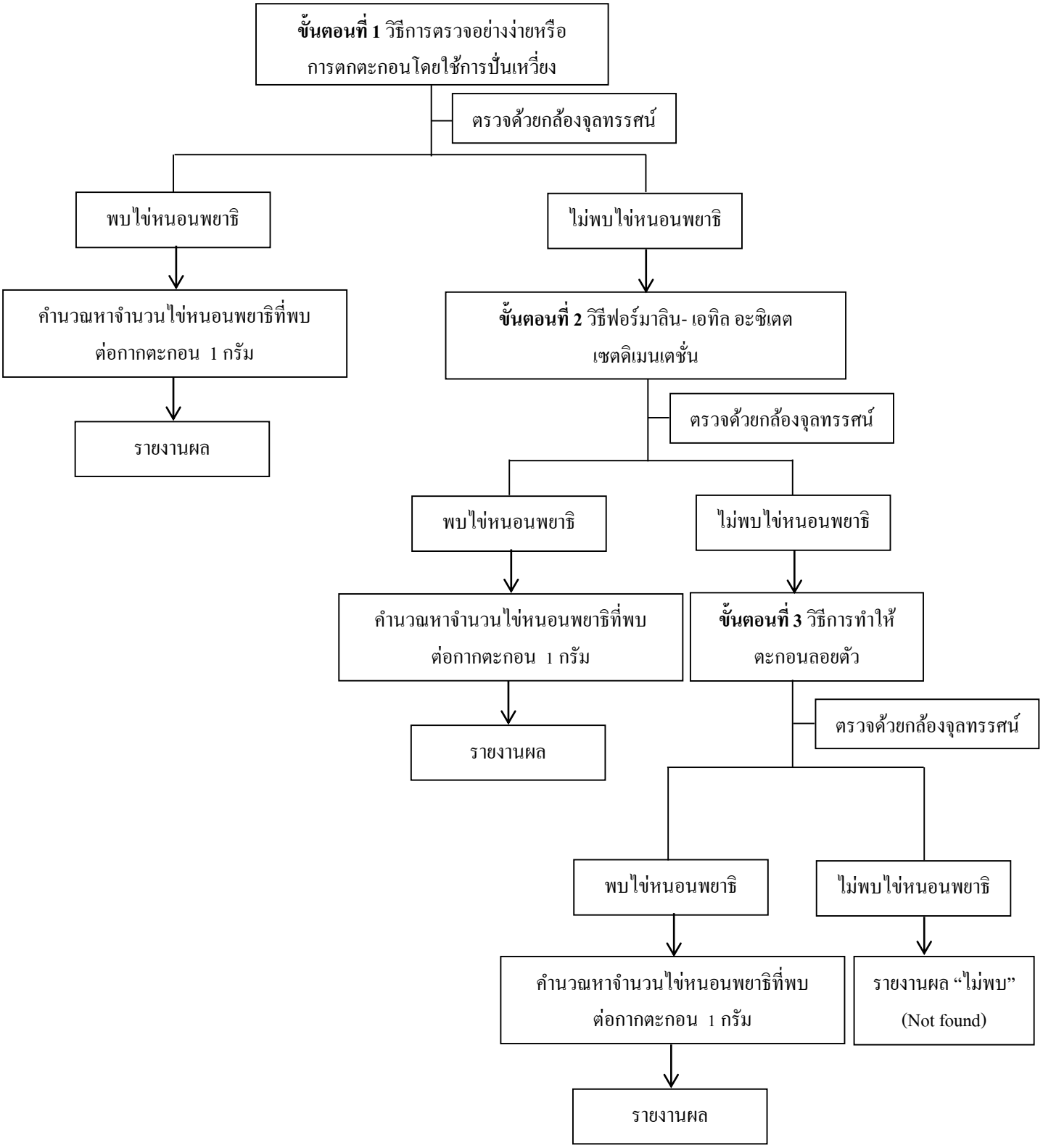
๒.๓.๖ วางกระจกปิดสไลด์ขนาด ๒๒x๒๒ มิลลิเมตร จำนวน ๒ แผ่น โดยนำแต่ละสไลด์มาวางไว้บนปากหลอด อย่าให้มีช่องว่างหรือฟองอากาศที่กระจกปิดสไลด์ กรณีที่ใช้น้ำเกลืออิ่มตัวหรือน้ำตาลอิ่มตัว ให้รอ ๑๕ นาที หรือกรณีใช้ซิงค์ซัลเฟตอิ่มตัว ให้รอ ๑๐ นาที แล้วตรวจหาไข่หนอนพยาธิที่ลอยขึ้นมาติดที่กระจกปิดสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

๒.๓.๗ ทำขั้นตอน ๒.๓.๖ ซ้ำกับหลอดตัวอย่างที่เหลืออีก ๑ หลอด

๒.๓.๘ นำตัวอย่างมาตรวจหาไข่หนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ และรายงานผล

- หากไม่พบไข่หนอนพยาธิ ให้รายงานว่า “ไม่พบ” (Not found)
- หากพบไข่หนอนพยาธิ ให้คำนวณหาจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม จากจำนวนไข่หนอนพยาธิที่นับได้ ปริมาตรส่วนผสมตะกอนในขั้นตอน ๒.๑.๘ ในหน่วยมิลลิลิตร ($V_๑$) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ปริมาณไข่หนอนพยาธิต่อกากตะกอน ๑ กรัม} = \frac{\text{จำนวนรวมของไข่หนอนพยาธิที่นับได้จาก ๔ สไลด์} \times V_๑}{๑,๔๐๐}$$

ถ้าผลการคำนวณได้ค่าน้อยกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้รายงานว่า “ไม่พบ” (Not found) แต่ถ้าผลการคำนวณได้ค่ามากกว่า ๑ ฟองต่อกรัม ให้รายงานจำนวนไข่หนอนพยาธิที่พบต่อกากตะกอน ๑ กรัม

ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณไข่หนอนพยาธิในกากตะกอนที่ผ่านการกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว