ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

1.2 Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato (Infusion form)	200.0	g
Dextrose	20.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

2.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato (Infusion form)	200.0	g
Dextrose	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

2.3 Rice Starch Broth (RSB)

	20.0	g
Glucose	2.0	g
Peptone	2.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

2.4 Rice Starch Agar (RSA)

	20.0	g
Glucose	2.0	g
Peptone	2.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 5.0

ภาคผนวก ข

อาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

1. Motility Test Medium		
Tryptone	10.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	5.0	g
Distilled water	1,000	ml
2. Nitrate Broth (Difco)		
Bacto-Beef extract	3.0	g
Bacto-Peptone	5.0	g
Potassium nitrate	1.0	g
Distilled water	1,000	ml
3. Nutrient Gelatin Medium		
Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Gelatin	120.0	g
Distilled water	1,000	ml
4. Tryptone Broth		
Tryptone	10.0	g
Distilled water	1,000	ml
5. Starch Agar		
Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Potato starch	10.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
6. Simmon's Citrate Agar		
$MnSO_4$	0.2	g
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
NaCl	5.0	g
Sodium citrate	2.0	g
Bromthymol blue	0.08	g
Bacto-Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
7. Litmus Milk (Difco)		
Bacto-Skimmed milk	100.0	g
Bacto-Litmus	0.75	g
Distilled water	1,000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{o}C นาน 15 นาที ทำให้เย็นทันที

8. Christensen's Urea Medium : Basal medium ประกอบด้วย

Peptone	1.0	g
Glucose	1.0	g
K_2HPO_4	2.0	g
NaCl	5.0	g
Bacto-Agar	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

ต้มส่วนผสมทั้งจนละลาย ปรับ pH ให้เป็น 6.8 เติม phenol red (0.04%) ปริมาตร 20 ml นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งเย็นลงประมาณ 50°C เติมสารละลาย urea (20%) ที่ปลอดเชื้อด้วยการกรองแล้วในปริมาตร 10 ml เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตปลอดเชื้อ อาหารบรรจุลงในหลอดทดสอบ นำไปวางเอียดบนสันหนังสือเพื่อทำ agar slant

9. Phenol Red Broth Base

Bacto beef extract	1.0	g
Bacto proteose peptone No. 3	10.0	g
NaCl	5.0	g
Bacto phenol red	18	mg
Sugar (under test)	10	g
Distilled water	1,000	ml

pH 6.8-7.0

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิดสำหรับการทดสอบ ควรใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอาหารในปริมาตร 6 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่ 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จสิ้นการฆ่าเชื้อให้ยกออกแช่น้ำเย็นทันที เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำตาลแต่ละชนิดสลายตัว

ภาคผนวก ค

สีย้อมและน้ำยาเคมี

1. Crystal violet (1% aqueous solution)

Crystal violet	1.0	g
Distilled water	1,000	ml

2. Safranin

Safranin O	0.5	g
Ethanol 95%	10.0	ml
Distilled water	1,000	ml

3. Malachite green

Malachite green	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	5.0	g
Distilled water	1,000	ml

4. Gram's Iodine

Iodine	1.0	g
Potassium iodide	2.0	g

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ใช้โกร่งบดสารให้เข้ากัน เติมน้ำครั้งละน้อยๆ จนกระทั่งสารทั้งสองละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 ml กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 3 บรรจุในขวดสีชา

5. Kovac's solution

Para-Dimethyl-Amino Benzaldehyde	5.0	g
Amyl or butyl alcohol	75	ml
HCl, concentrated	25.0	ml

ละลาย Para-Dimethyl-Amino Benzaldehyde ลงใน amyl or butyl alcohol ที่อุณหภูมิ 50°C ใน waterbath นานประมาณ 5 นาที เมื่อสารละลายเริ่มเย็นลง ให้ค่อยๆ ริน HCl ผสมลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

6. Hydrogen Peroxide (3%)

H_2O_2	3.0	ml
H_2O	97.0	ml

7. Nitrate Test Solution (Solution A)

Sulphanilic acid	8.0	g
5 N Acetic acid	100	ml

ละลาย sulphanilic acid ใน 5N acetic acid โดยใช้ความร้อน (waterbath)

Nitrate Test Solution (Solution B)

α-Napthylamine	5.0	g
5 N Acetic acid	100	ml

ภาคผนวก ง

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีในการจำแนกแบคทีเรียระดับสกุล

1. การย้อมสีแกรม

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ทำ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งสไลด์ให้แห้ง ทำ heat fix ทำการย้อมสี Gram ด้วยการหยดสี crystal violet ทับรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปา หยดสาร Gram iodine บนรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ล้างสีย้อมออกด้วย 95% ethanol ด้วยการหยด ethanol ลงบนรอย smear ทีละหยด จนกว่าจะไม่เห็นสีย้อมหลุดตามมา ล้างด้วยน้ำประปา หยดสี safranin บนรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษ tissue paper นำไปดูลักษณะการติดสี Gram ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

2. การย้อมสี endospores

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 36-48 ชั่วโมง ทำ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งสไลด์ให้แห้ง ทำ heat fix ทำการย้อมสี endospores ด้วยการหยดสี malachite green ลงบนรอย smear นำสไลด์ไปวางบนไอน้ำเดือดนาน 5 นาที โดยต้องเติมสี malachite green ลงบนรอย smear อย่างสีให้แห้งล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปา หยดสาร Gram iodine บนรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ล้างสีย้อมออกด้วย 95% ethanol ด้วยการหยด ethanol ลงบนรอย smear ทีละหยด จนกว่าจะไม่เห็นสีย้อมหลุดตามมา ล้างด้วยน้ำประปา หยดสี safranin บนรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษ tissue paper นำไปดูลักษณะการติดสี Gram ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

3. การทดสอบ Catalase Test

หยดสาร 3% H_2O_2 และน้ำกลั่นลงบนสต์สะอาดจุดละหยดโดยแยกจากกัน ใชลูปแตะเชื้อแบคทีเรีย ทำ smear ลงในหยด H_2O_2 และลงในหยดน้ำ สังเกตผลทดสอบ ผลบวกมีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหยด H_2O_2 ผลบลบไม่เกิดฟองแก๊ส

4. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility Test)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย stab ลงในอาหาร motility test medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยดสาร 3% H_2O_2 และน้ำกลั่นลงบนสต์สะอาดจุดละหยดโดยแยกจากกัน ใชลูปแตะเชื้อแบคทีเรีย ทำ smear ลงในหยด H_2O_2 และลงในหยดน้ำ สังเกตผลทดสอบ ผลบวกมีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหยด H_2O_2 ผลบลบไม่เกิดฟองแก๊ส

5. การทดสอบ Indole Test

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent ปริมาณ 3-4 หยด เขย่าหลอดเบาๆ สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกจะเห็นวงแหวนสีแดงที่ผิวชั้นบนของอาหาร tryptone broth ผลลบจะไม่มีสีที่วงแหวน

6. การทดสอบ Starch Hydrolysis Test

ใช้ลูบ streak เชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Starch Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ราดผิวหน้าด้วย iodine solution สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกจะเห็นวงใสรอบๆ โคโลนี ส่วนที่เหลือของอาหารจะเป็นสีน้ำเงิน ผลลบจะเห็นผิวหน้าอาหารทั้งหมดเป็นสีน้ำเงิน

7. การทดสอบ Nitrate Reduction Test

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Nitrate Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดสารละลาย Salifanilic acid และ α-naphylamine สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกเป็นตะกอนอาหารสีแดง หรือในกรณีไม่มีสี เมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่เกิดสีแดง ผลลบเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปจะเกิดสีแดง

8. การทดสอบ Gelatin Liaquefaction Test

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว แทงลงในบนอาหาร Nitrient Gelatin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที สังเกตผลการทดสอบ ผลบวก อาหาร nutrient gelatin จะเหลว ผลลบอาหาร nutrient gelatin จะไม่เหลว

9. การทดสอบ Urease Test

ใช้ลูบ streak เชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร urea agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีบายเย็น ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี

10. การทดสอบ Citrate Utilization Test

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Simmon's Citrate agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ผลบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี

11. การทดสอบการเจริญใน Litmus Milk

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร Litmus milk บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีขาว แสดงว่าเกิดการ reduction ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างกรด ถ้าอาหารเกิดการตกตะกอน และจับเป็นก้อนโปรตีน เนื่องจากเป็นกรด แสดงว่าเกิด acid curd และถ้าเชื้อสลายโปรตีนได้ อาหารจะใสปนสีม่วงอ่อน แสดงว่าเกิดกระบวนการ peptonization

12. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีในการสร้างกรดจากน้ำตาลบางชนิด

ใช้ลูบเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร PRBB (Phenol Red Broth Base) ที่มีน้ำตาล glucose, lactose, xylose, manitol และ arabinose บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้กรดเกิดขึ้น (A) ถ้าพบว่ามีแก๊สในหลอดดักแก๊สด้วย แสดงว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้กรดและแก๊ส (AG) ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี หรือเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นได้

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงการคำนวณค่า Percentage Fungal Inhibition (%) สำหรับเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici

แหล่งที่	หมายเลขไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear Zone ที่เชื้อราไม่เจริญรอบหลุมที่หยอดสารออกฤทธิ์ (C) = mm	เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมที่เจาะด้วย cork borer (T) = mm	Percentage fungal inhibition (%) I = [(C-T)/C]x100
1	WWPB 06	8.2	7.0	15
	WWPB 25	17.3		60
	WWPB 30	15.1		54
	WWPB 45	7.8		10
	WWPB 53	8.3		16
	WWPB 69	9.5		26
2	WWPB 76	18.5		62
	WWPB 79	15.2		54
	WWPB 87	8.9		21
	WWPB 91	8.4		17
	WWPB 103	9.2		24

ตารางแสดงการคำนวณค่า Percentage Fungal Inhibition (%) สำหรับเชื้อ *Colletotrichum anthraxnose*

แหล่งที่	หมายเลขไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear Zone ที่เชื้อราไม่เจริญรอบหลุมที่หยอดสารออกฤทธิ์ (C) = mm	เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมที่เจาะด้วย cork borer (T) = mm	Percentage fungal inhibition (%) I = [(C-T)/C]x100
1	WWPB 06	7.0	7.0	0
	WWPB 25	16.1		57
	WWPB 30	17.8		61
	WWPB 45	8.2		15
	WWPB 53	7.5		7
	WWPB 69	8.3		16
2	WWPB 76	18.0		61
	WWPB 79	12.3		43
	WWPB 87	8.2		15
	WWPB 91	7.0		0
	WWPB 103	7.2		3

หมายเหตุ แหล่งที่ 1: โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น

แหล่งที่ 2: โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ตารางแสดงเกณฑ์การวัดค่า Percentage Fungal Inhibition (%) ของแบคทีเรียไอโซเลท WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่ถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35^0 และระยะเวลาการ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

หมายเลขไอโซเลท	ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	เส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear Zone ที่เชื้อราไม่เจริญรอบหลุมที่หยอดสารออกฤทธิ์ (C) = mm	เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมที่เจาะด้วย cork borer (T) = mm	Percentage fungal inhibition (%) I = [(C-T)/C]x100
WWPB 25	24	7.0	7	0
	48	12.3		43
	72	16.7		58
	96	16.6		58
WWPB 30	24	7.0		0
	48	13.3		47
	72	17.5		60
	96	17.2		59
WWPB 76	24	7.0		0
	48	12.2		43
	72	17.8		61
	96	17.5		60

ตารางแสดงเกณฑ์การวัดค่า Percentage Fungal Inhibition (%) ของการเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici

หมายเลขไอโซเลท	อุณหภูมิ (°C)	เส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear Zone ที่เชื้อราไม่เจริญรอบหลุมที่หยอดสารออกฤทธิ์ (C) = mm	เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมที่เจาะด้วย cork borer (T) = mm	Percentage fungal inhibition (%) I = [(C-T)/C]x100
WWPB 25	40	20.1	7.0	65
	50	17.5		60
	60	13.2		47
	70	10.5		33
	90	7		0
WWPB 30	40	21.5		67
	50	18.3		62
	60	14.1		50
	70	9.8		29
	90	7		0
WWPB 76	40	19.8		65
	50	17.5		60
	60	13.2		47
	70	9.5		26
	90	7		0

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณ

1. การคำนวณ % Similarity

% Similarity = (a/a+b) x 100

a = จำนวนผลการทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน
b = จำนวนผลการทดสอบที่ให้ผลการทดสอบต่างกัน

ตัวอย่าง : การคำนวณของเชื้อแบคทีเรีย isolate S32
ผลการทดสอบ

	คุณสมบัติทางชีวเคมี											
เชื้อแบคทีเรีย	Motility	Starch	Nitrate	Gelatin	Citrate	Catalasse	Lactose	Glucose	Xylose	Manitol	Arabinose	% Similarity*
B. subtilis	±	+	+	+	+	+	-	A	A	A	A	91
Isolate S32	+	+	+	+	+	+	-	-	A	A	A	

หมายเหตุ : + = positive; - = negative; A = acid; A/G = acid and gas

การคำนวณ % Similarity

a = 10
b = 1

% Similarity = a/a+b x 100
= 10/(10+1) x 100
= 91%

% similarity มีค่า = 91% หมายความว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 เทียบเคียงได้กับเชื้อ *Bacillus subtilis*

การแปรผล :

% similarity = 65-85% ถือได้ว่าเป็นแบคทเรียที่อยู่ใน Genus เดียวกัน
% similarity = 86-100% ถือได้ว่าเป็นแบคทเรียที่อยู่ใน Genus และ species เดียวกัน

2. การคำนวณค่า Chemical Oxygen Demand (COD)

โดยใช้วิธี **Open Reflux Method** (Pitwell, 1983)

Principle: Most types of organic matter are oxidized by a boiling mixture of chromic and sulfuric acids. A sample is refluxed in strongly acid solution with a known excess of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$). After digestion, the remaining unreduced $K_2Cr_2O_7$ is titrated with ferrous ammonium sulfate to determine the amount of $K_2Cr_2O_7$ consumed and the oxidizable matter is calculated in terms of oxygen equivalent. Keep ratios of reagent weights, volumes, and strengths constant when sample volumes other than 50 mL are used. The standard 2-h reflux time may be reduced if it has been shown that a shorter period yields the same results. Some samples with very low COD or with highly heterogeneous solids content may need to be analyzed in replicate to yield the most reliable data. Results are further enhanced by reacting a maximum quantity of dichromate, provided that some residual dichromate remains.

Apparatus

a. Reflux apparatus, consisting of 500- or 250-mL erlenmeyer flasks with ground-glass 24/40 neck and 300-mm jacket Liebig, West, or equivalent condenser with 24/40 ground-glass joint, and a hot plate having sufficient power to produce at least 1.4 W/cm^2 of heating surface, or equivalent.

b. Blender.

c. Pipets, Class A and wide-bore.

Reagents

a. Standard potassium dichromate solution, 0.04167*M*: Dissolve 12.259 g $K_2Cr_2O_7$, primary standard grade, previously dried at 150°C for 2 h, in distilled water and dilute to 1000 mL. This reagent undergoes a six-electron reduction reaction; the equivalent concentration is 6 X 0.04167*M* or 0.2500*N*.

b. Sulfuric acid reagent: Add Ag_2SO_4, reagent or technical grade, crystals or powder, to conc H_2SO_4 at the rate of 5.5 g Ag_2SO_4/kg H_2SO_4. Let stand 1 to 2 d to dissolve. Mix.

c. Ferroin indicator solution: Dissolve 1.485 g 1,10-phenanthroline monohydrate and 695 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in distilled water and dilute to 100 mL. This indicator solution may be purchased already prepared.*

d. Standard ferrous ammonium sulfate (FAS) titrant, approximately 0.25*M*: Dissolve 98 g $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ in distilled water. Add 20 mL conc H_2SO_4, cool, and dilute to 1000 mL. Standardize this solution daily against standard $K_2Cr_2O_7$ solution as follows:

Dilute 25.00 mL standard $K_2Cr_2O_7$ to about 100 mL. Add 30 mL conc H_2SO_4 and cool. Titrate with FAS titrant using 0.10 to 0.15 mL (2 to 3 drops) ferroin indicator.

$$\text{Molarity of FAS solution} = \frac{\text{Volume 0.04167}M\ K_2Cr_2O_7\ \text{solution titrated, mL}}{\text{Volume FAS used in titration, mL}} \times 0.2500$$

e. Mercuric sulfate, $HgSO_4$, crystals or powder.

f. Sulfamic acid: Required only if the interference of nitrites is to be eliminated (see 5220A.2 above).

g. Potassium hydrogen phthalate (KHP) standard, $HOOCC_6H_4COOK$: Lightly crush and then dry KHP to constant weight at 110°C. Dissolve 425 mg in distilled water and dilute to 1000 mL. KHP has a theoretical COD[1] of 1.176 mg O_2/mg and this solution has a theoretical COD of 500 µg O_2/ mL. This solution is stable when refrigerated, but not indefinitely. Be alert to development of visible biological growth. If practical, prepare and transfer solution under sterile conditions. Weekly preparation usually is satisfactory.

Procedure

a. Treatment of samples with COD of >50 mg O_2/L: Blend sample if necessary and pipet 50.00 mL into a 500-mL refluxing flask. For samples with a COD of >900 mg O_2/L, use a smaller portion diluted to 50.00 mL. Add 1 g $HgSO_4$, several glass beads, and very slowly add 5.0 mL sulfuric acid reagent, with mixing to dissolve $HgSO_4$. Cool while mixing to avoid possible loss of volatile materials. Add 25.00 mL 0.04167*M* $K_2Cr_2O_7$ solution and mix. Attach flask to condenser and turn on cooling water. Add remaining sulfuric acid reagent (70 mL) through open end of condenser. Continue swirling and mixing while adding sulfuric acid reagent. CAUTION: *Mix reflux mixture thoroughly before applying heat to prevent local heating of flask bottom and a possible blowout of flask contents.*

Cover open end of condenser with a small beaker to prevent foreign material from entering refluxing mixture and reflux for 2 h. Cool and wash down condenser with distilled water. Disconnect reflux condenser and dilute mixture to about twice its volume with distilled water. Cool to room temperature and titrate excess $K_2Cr_2O_7$ with FAS, using 0.10 to 0.15 mL (2 to 3 drops) ferroin indicator. Although the quantity of ferroin indicator is not critical, use the same volume for all titrations. Take as the end point of the titration the first sharp color change from blue-green to reddish brown that persists for 1 min or longer. Duplicate determinations should agree within 5% of their average. Samples with suspended solids or components that are slow to oxidize may require additional determinations. The blue-green may reappear. In the same manner, reflux and titrate a blank containing the reagents and a volume of distilled water equal to that of sample.

b. Alternate procedure for low-COD samples: Follow procedure of ¶ 4*a*, with two exceptions: (*i*) use standard 0.004167*M* $K_2Cr_2O_7$, and (*ii*) titrate with standardized 0.025*M* FAS. Exercise extreme care with this procedure because even a trace of organic matter on the glassware or from the atmosphere may cause gross errors. If a further increase in sensitivity is required, concentrate a larger volume of sample before digesting under reflux as follows: Add all reagents to a sample larger than 50 mL and reduce total volume to 150 mL by boiling in the refluxing flask open to the atmosphere without the condenser attached. Compute amount of $HgSO_4$ to be added (before concentration) on the basis of a weight ratio of 10:1, $HgSO_4$:Cl^-, using the amount of Cl^- present in the original volume of sample. Carry a blank reagent through the same procedure. This technique has the advantage of concentrating the sample without significant losses of easily digested volatile materials.

Hard-to-digest volatile materials such as volatile acids are lost, but an improvement is gained over ordinary evaporative concentration methods. Duplicate determinations are not expected to be as precise as in 5220B.4*a*.

c. Determination of standard solution: Evaluate the technique and quality of reagents by conducting the test on a standard potassium hydrogen phthalate solution.

Calculation

$$\text{COD as mg/L} = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{\text{mL sample}}$$

where:

A = mL FAS used for blank,
B = mL FAS used for sample,
M = molarity of FAS, and
8000 = milliequivalent weight of oxygen X 1000 mL/L.