0009

การเพิ่มความเข้มข้น และการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในน้ำ

นางสาว เนาวรัตน์ ศิรินิรันดร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ 2537

ISBN 974-631-149-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16759223

CONCENTRATION ENHANCEMENT AND DETECTION OF COLIPHAGE IN WATER

Miss Naowarat Sirinirun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering

Department of Environmental Engineering

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-149-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มความเข้มข้น และการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในน้ำ
โดย	นางสาว เนาวรัตน์ ศิรินิรันดร์
ภาควิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประแสง มงคลศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ทวี จิตไมตรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประแสง มงคลศิริ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เนาวรัตน์ ศิรินิรันดร์ : การเพิ่มความเข้มข้น และการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในน้ำ
(CONCENTRATION ENHANCEMENT AND DETECTION OF COLIPHAGE IN WATER)
อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ประแสง มงคลศิริ , 120 หน้า.ISBN 974-631-149-2

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่จะตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในน้ำเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพน้ำ โดยแบ่งเป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ 4 ประเภท คือ ตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูง ตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ ตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน และความขุ่นสังเคราะห์จากเชล Escherichia coli

ผลการวิจัยพบว่า การตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูง สามารถนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยทริปติเคสซอยบรอธแล้วนำไปทำการตรวจวัดหาปริมาณด้วยวิธีพลักแอซเซ (plaque assay) โดยไม่จำเป็นต้องมีการเติมสารชะล้างใดๆ เพื่อเพิ่มการกระจายตัวของโคลิฟาจให้ได้จำนวนใกล้เคียงกับความจริงมากขึ้น

สำหรับการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่เคลือบด้วยโพลีเอทิลีนอิมีนซึ่งบรรจุอยู่ในชุดเยื่อกรอง จากนั้นใช้บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0 หรือบีฟเอกซ์แทรกท์ 8% กับโซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0 ชะโคลิฟาจให้หลุดออกจากแผ่นเยื่อกรอง ซึ่งจะได้ประสิทธิภาพในการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจของสารชะล้างทั้งสองมีค่าเฉลี่ย 89.03% และ 87.75% ตามลำดับ

ส่วนตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน และเชล E.coli โคลิฟาจจะเกาะติดอนุภาคความขุ่นเฉลี่ย 15.29% และ 96.72% ตามลำดับ สำหรับการชะโคลิฟาจออกจากความขุ่นที่สังเคราะห์จากดินคาโอลิน และเชล E.coli โดยใช้ไกลซีน บีฟเอกซ์แทรกท์ โซเดียมคลอไรด์ จะได้ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 28.16% - 39.91% และ 1.15% - 4.95% ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต เนาวรัตน์ ศิรินิรันดร์

สาขาวิชา วิศวกรรมสุขาภิบาล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประแสง มงคลศิริ

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C517515 : MAJOR SANITARY ENGINEERING
KEY WORD: VIRUSES / COLIPHAGE / CONCENTRATION
NAOWARAT SIRINIRUN : CONCENTRATION ENHANCEMENT AND DETECTION OF COLIPHAGE IN WATER. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PRASANG MONGKOLSIRI,Ph.D. 120 pp. ISBN 974-631-149-2

The objective of this research is to find the method of coliphage detection in water for applying in the water quality control laboratory. The samples were devided into 4 groups; water with high concentration of coliphage, water with low concentration of coliphage, sythetic turbidity water from kaolin and synthetic turbidity water from Escherichia coli.

It was revealed that the detection of high concentration coliphage could be done by diluting with tryticase soy broth without any additive eluent to distribute coliphage particle following by plaque assay method.

The detection of low concentration coliphage in water could be done by filtering through the filter membrane coated with polyethyleneimine. Coliphages would be eluted from the filter membrane with 8% beef extract at pH 9.0 or 8% beef extract + 1 M NaCl at pH 9.0. The efficiency of coliphage detection were 89.03% and 87.75% respectively.

The average adsorption of coliphage in kaolin particles and E.coli cells were 15.29% and 96.72% respectively. The average efficiency of coliphages elution from kaolin and E.coli with glycine , beef extract and sodium chloride were 28.16% - 39.91% and 1.15% - 4.95% respectively.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต นาวรัตน์ ศิริณิรันดร์

สาขาวิชา วิศวกรรมสุขาภิบาล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประเสริฐ มงคลศิริ

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร. ประแสง มงคลศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ของการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ รศ. ทวี จิตไมตรี รศ.ดร. มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และ ผศ.ดร. เพ็ชรพร เชาวกิจเจริญ ที่ช่วยชี้แนะ และให้คำปรึกษาในการทำวิจัย

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับกำลังใจ และคำแนะนำจากเพื่อนๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จ และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัยจึงขอขอบคุณมา ณ.ที่นี้ด้วย

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่เป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

เนาวรัตน์ ศิรินิรันดร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

2. ทบทวนเอกสาร

ลักษณะของไวรัส 4

ไวรัสในน้ำ 4

การเลือกใช้แบคทีริโอฟาจเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของไวรัสในน้ำ 9

ลักษณะของแบคทีริโอฟาจ 10

วิธีการตรวจหาไวรัส 13

1. การทำให้ความเข้มข้นของไวรัสในน้ำสูงขึ้น 13

2. กระบวนการตรวจวัดปริมาณไวรัส 15

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดูดติดผิวของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรอง 17

1. แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก 18

2. แรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้า 18

3. การดูดติดของสารอื่นๆ 19

บทที่ หน้า

การชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรอง 19
ผลการศึกษาที่ผ่านมา 21
การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสในน้ำในประเทศไทย 25
3. แผนการและวิธีการดำเนินการวิจัย
แผนการดำเนินการวิจัย 27
การเตรียมการทดลอง 28
1. การเพาะหาเชื้อโคลิฟาจเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย 28
2. การเตรียมสารเคมี 32
3. การเตรียมน้ำขุ่นสังเคราะห์ 34
4. ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการแยกตะกอน 36
5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 36
วิธีการดำเนินการวิจัย 38
1. วิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูง 38
2. วิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ 40
3. การวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำขุ่นสังเคราะห์..... 44
วิธีการตรวจสอบจำนวนไวรัส 46
4. ผลการทดลองและการวิจารณ์
ลักษณะของโคลิฟาจที่ใช้ในการวิจัย 47
วิเคราะห์การหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูง 49
วิเคราะห์การหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ 49
1. การเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดของโคลิฟาจบนแผ่นเยื่อกรอง 49
2. การชะโคลิฟาจที่ถูกดูดติดบนแผ่นเยื่อกรองให้หลุดออก 56
3. วิธีการที่เหมาะสมในการหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

วิเคราะห์ค่าใช้จ่ายในการหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ 65

วิเคราะห์การหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่น 66

1. ตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน 66

2. ตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากเชล E.coli 70

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย 75

ข้อเสนอแนะ 76

เอกสารอ้างอิง 77

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง 80

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว 110

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายในการหาปริมาณโคลิฟาจจากตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นโคลิฟาจต่ำ 118

ประวัติผู้เขียน 120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	มาตรฐานสำหรับไวรัสในน้ำแต่ละชนิด	2
ตารางที่ 2.1	โรคต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นโดยเอนเทอริกไวรัสซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำ	7
ตารางที่ 2.2	ลักษณะและขนาดของไวรัสในแบคทีเรีย	12
ตารางที่ 2.3	แสดงผลการทำให้ความเข้มข้นของโปลิโอไวรัสสูงขึ้น	22
ตารางที่ 2.4	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นเยื่อกรอง 3 ชนิด และ Al^{+3} ในการนำโปลิโอไวรัสชนิดที่ 2 กลับคืนจากน้ำตัวอย่าง	24
ตารางที่ 2.5	แสดง % การดูดติดโคลิฟาจของแผ่นเยื่อกรองประจุลบ	26
ตารางที่ 4.1	แสดงจำนวนโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในทริปติเคสซอยบรอธที่ใช้ในการเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 20	50
ตารางที่ 4.2	แสดงจำนวนโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในทริปติเคสซอยบรอธที่ใช้ในการเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 10	50
ตารางที่ 4.3	แสดงจำนวนโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในทริปติเคสซอยบรอธที่ใช้ในการเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 6.7	50
ตารางที่ 4.4	ผลของวิธีการต่างๆ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดของโคลิฟาจบนแผ่นเยื่อกรอง	54
ตารางที่ 4.5	แสดงผลการชะล้างโคลิฟาจจากแผ่นเยื่อกรองของตัวอย่างน้ำที่มีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ไม่มีการล้างแผ่นเยื่อกรองด้วยโซเดียมคลอไรด์ และชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองโดยใช้สารชะล้างกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง	57
ตารางที่ 4.6	แสดงผลการชะล้างโคลิฟาจจากแผ่นเยื่อกรองของตัวอย่างน้ำที่มีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.0002 โมล แล้วปรับพีเอช = 5.0 ไม่มีการล้างแผ่นเยื่อกรองก่อนชะล้าง	58
ตารางที่ 4.7	แสดงผลการชะล้างโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองของตัวอย่างน้ำที่มีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.0002 โมล แล้วปรับพีเอช=0.5 และมีการล้างแผ่นเยื่อกรองก่อนชะล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.14 นอร์มัล.	59

หน้า

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการชะล้างโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองที่มีการเคลือบด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน 0.5 % 62

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพการชะล้างโคลิฟาจด้วยสารชะล้างต่างๆ จากตัวอย่างน้ำที่กรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีการเคลือบด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน 64

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับข้อมูลแบบจำแนกทางเดียวของ Anova 64

ตารางที่ 4.11 ผลการหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน 67

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบความสามารถของสารชะล้างตะกอนแต่ละชนิดในการชะโคลิฟาจออกจากตะกอนดินคาโอลิน 68

ตารางที่ 4.13 ประสิทธิภาพการชะล้างโคลิฟาจจากตะกอนดินคาโอลินด้วยสารชะล้างต่างๆ 69

ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับข้อมูลแบบจำแนกทางเดียวของ Anova 69

ตารางที่ 4.15 ผลการหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากเชล E.coli 71

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบความสามารถของสารชะล้างตะกอนแต่ละชนิดในการชะโคลิฟาจออกจากตะกอนเชล E.coli 72

ตารางที่ 4.17 ประสิทธิภาพการชะล้างโคลิฟาจจากตะกอนเชล E.coli ด้วยสารชะล้างต่างๆ 73

ตารางที่ 4.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับข้อมูลแบบจำแนกทางเดียวของ Anova 73

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ภาพวาดแสดงลักษณะของไวรัส 5

รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของไวรัสชนิดต่างๆ 6

รูปที่ 2.3 แนวทางที่เป็นไปได้ของการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสสู่มนุษย์ 8

รูปที่ 2.4 แสดงชื่อ รูปร่าง ลักษณะ ขนาด ของแบคทีริโอฟาจที่พบได้บ่อย 10

รูปที่ 2.5 รูปร่าง ลักษณะ ของแบคทีริโอฟาจชนิดต่างๆ ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน 11

รูปที่ 3.1 ลักษณะของพลักที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อ 31

รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะของทริปติเคสซอยบรอธ cell suspension และสต็อกโคลิฟาจ 33

รูปที่ 3.3 แสดงผลของความขุ่นจากดินคาโอลินที่เหลืออยู่เมื่อนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ กัน 37

รูปที่ 3.4 แสดงผลของความขุ่นจากเซล E.coli ที่เหลืออยู่เมื่อนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ กัน 37

รูปที่ 3.5 ขั้นตอนในการหาปริมาณโคลิฟาจจากสต็อกโคลิฟาจ 39

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนในการหาจำนวนไวรัสโดยวิธี adsorption-elution 40

รูปที่ 3.7 แสดงวิธีการที่ใช้ในการชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรอง 43

รูปที่ 3.8 ขั้นตอนในการหาจำนวนไวรัสในน้ำตัวอย่างที่มีความขุ่น 45

รูปที่ 4.1 ลักษณะของโคลิฟาจที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนกำลังขยาย 37,500 เท่า โดยใช้วิธี Negative straining 47

รูปที่ 4.2 ลักษณะของโคลิฟาจที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนกำลังขยาย 91,250 เท่า โดยใช้วิธี Negative straining 48

รูปที่ 4.3 ปริมาณโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7 จากการทดลองครั้งที่ 1 51

รูปที่ 4.4 ปริมาณโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7 จากการทดลองครั้งที่ 2 52

หน้า

รูปที่ 4.5 ปริมาณโคลิฟาจที่ได้จากการเติมสารชะล้างชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7 จากการทดลองครั้งที่ 3 53
รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพการชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองของตัวอย่างน้ำที่มีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ และไม่มีการล้างแผ่นเยื่อกรองด้วย NaCl 60
รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพการชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองของตัวอย่างน้ำที่มีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ และมีการล้างแผ่นเยื่อกรองด้วย NaCl 60
รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพการชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองที่เคลือบด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย