บทที่ 3

แผนการและวิธีการดำเนินการวิจัย

แผนการดำเนินการวิจัย

1. ทำการเพาะหาเชื้อโคลิฟาจ ซึ่งจะนำมาใช้ในการวิจัย

2. วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถของสารต่อไปนี้ในการทำให้โคลิฟาจกระจายตัวจากการเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูงเพื่อให้ได้จำนวนใกล้เคียงกับความจริงมากที่สุด

2.1 ไกลซีน (Glycine) 0.05 โมล-โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 10.5

2.2 บีฟเอกซ์แทรกท์ (Beef extract) 3% พีเอช 9.0

2.3 บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

2.4 บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0

2.5 บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณโคลิฟาจที่ได้จากการทำให้ความเข้มข้นของโคลิฟาจสูงขึ้น เมื่อ

3.1 เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ในตัวอย่างน้ำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดโคลิฟาจบนแผ่นเยื่อกรอง

3.2 เติมอลูมินัมคลอไรด์ในตัวอย่างน้ำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดโคลิฟาจบนแผ่นเยื่อกรอง และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้โคลิฟาจหลุดออกจากแผ่นเยื่อกรอง

3.3 เคลือบแผ่นเยื่อกรองด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดโคลิฟาจบนแผ่นเยื่อกรอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้โคลิฟาจหลุดออกจากแผ่นเยื่อกรองเมื่อใช้สารต่างๆ ในข้อ 2

5. วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถของสารต่างๆ ในข้อ 2 ในการทำให้โคลิฟาจหลุดออกจากอนุภาคความขุ่น

การเตรียมการทดลอง

1. การเพาะหาเชื้อโคลิฟาจเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

1.1 วิธีการทำพลักแอชเช

เป็นการหาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำโดยอ้างอิงจากวิธีพลักแอชเชของ AWWA (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงบางส่วนเพื่อให้เหมาะสม และสามารถใช้งานได้จริง ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1.1 สารอาหารที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1.1 อาหารเหลวทริปติเคสซอยบรอธ (Tryptic(ase) soy broth (TSB)) เตรียมโดยนำสารต่อไปนี้

ทริปโทน	17.0	กรัม
ซอยโทน	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

อุ่น และคนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3±0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริกความ.

เข้มข้น 0.1 นอร์มัล หรือ 1.0 นอร์มัล เติมกลีเซอรีน (Glycerine) 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แบ่งใส่ภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นนำเข้าฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

หรือเตรียมจากอาหารสำเร็จ โดยเตรียมตามวิธีในฉลากข้างขวด

1.1.1.2 โมดิฟายทริปติเคสซอยอาการ์ (Modified trytic(ase) soy agar (MTSA)) สารที่ใช้เช่นเดียวกับทริปติเคสซอยบรอธ แต่เพิ่ม

แอมโมเนียม ไนเตรต (NH_4NO_3)	1.60 กรัม
สตรอนเทียม ไนเตรต ($Sr(NO_3)_2$)	0.21 กรัม
วุ้น (agar)	15.00 กรัม

นำไปต้มให้เดือดเพื่อให้ละลาย ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3±0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล หรือ 1.0 นอร์มัล แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 5.5 มิลลิลิตร นำเข้าฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียสเพื่อไม่ให้แข็งตัว

1.1.2 วิธีการทำพลักแอชเช

1.1.2.1 เตรียม cell suspension โดยเขี่ยเชื้อ E.coli ลงในทริปติเคสซอยบรอธ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนทริปติเคสซอยบรอธขุ่น และใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) วัด optical density ได้ 0.5 ที่ 520 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับทริปติเคสซอยบรอธ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของ E.coli ประมาณ $1x10^9$ เซล/มิลลิลิตร (ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง) ถ้าต้องการเพิ่มปริมาณ cell suspension ทำได้โดยใส่ cell suspension ลงในทริปติเคสซอยบรอธ ในอัตราส่วน 1:20 โดยปริมาตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สำหรับ cell suspension ที่เตรียมได้สามารถเก็บแช่แข็งไว้ในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน เพื่อใช้เตรียม cell suspension ครั้งต่อไป ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะนำมาใช้

1.1.2.2 เตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อให้จำนวนพลักที่เกิดในจานเพาะเชื้ออยู่ในระหว่าง 20 ถึง 200 พลัก โดยการเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยทริปติเคสซอยบรอธที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.2.3 นำโมดิฟายทริปติเคสซอยอาการ์ ที่ทำให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมแต่ละหลอดด้วย E.coli 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างน้ำ หรือตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยแต่ละตัวอย่างจะทำ 4 หลอด (ข้อแนะนำควรผสม cell suspension กับตัวอย่างน้ำ หรือตัวอย่างที่เจือจางแล้วเข้าด้วยกันก่อน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยปริมาตร แล้วจึงนำมาใส่ในโมดิฟายทริปติเคสซอยอาการ์ เพราะแบ็งตัวเร็วมาก)

1.1.2.4 นำแต่ละหลอดไปเทในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากที่อาหารในจานแข็งตัว นำเข้าตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงโดยพลิกกลับจานเพาะเชื้อให้ฝาอยู่ข้างล่าง

1.1.2.5 นับจำนวนพลักที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อดังรูปที่ 3.1 โดยใช้เฉพาะจานที่มีจำนวนพลักเกิดขึ้นระหว่าง 20 ถึง 200 พลักเท่านั้น

1.1.2.6 การคำนวณหาจำนวนโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำ ทำได้โดยการคำนวณตามสูตรข้างล่าง แล้วนำมาเฉลี่ยกับค่าที่ได้จากจานเพาะเชื้อที่ใช้ตัวอย่างน้ำเหมือนกัน

$$\text{จำนวนโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำ (พีเอฟยู/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนพลัก} \times \text{อัตราการเจือจางของตัวอย่างน้ำ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ}}$$

1.1.2.7 ตัวอย่างการคำนวณ

นับจำนวนพลักจากจานเพาะเชื้อที่เจือจางน้ำในอัตรา $1:10^4$ ได้ 80 พลัก

$$\text{จำนวนโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำ} = \frac{80 \times 10^4}{0.5}$$

$$= 1.60 \times 10^6 \quad \text{พีเอฟยู/มิลลิลิตร}$$

รูปที่ 3.1 ลักษณะของพลักที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อ ซึ่งจากรูปพลักที่เกิดขึ้นมีมากกว่า 200 พลัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเตรียมสต็อกโคลิฟาจ (stock coliphage)

เป็นการเตรียมเชื้อโคลิฟาจเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 เก็บน้ำเสียจากท่อระบายน้ำมาทำพลักแอชเช

1.2.2 เมื่อมีไวรัสก่อรูปพลักขึ้นให้เขี่ยพลักที่เกิดขึ้นใส่ใน cell suspension นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 ชั่วโมง จน cell suspension ใส

1.2.3 นำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองเพื่อแยก E.coli ออก สารละลายที่กรองได้ คือ สต็อกโคลิฟาจ ดังรูปที่ 4.1 แต่ความเข้มข้นที่ได้ยังไม่สูงมาก

1.2.4 เพิ่มความเข้มข้นของสต็อกโคลิฟาจโดยนำสต็อกโคลิฟาจที่ได้ในตอนแรกมาใส่ใน cell suspension ในอัตราส่วน 1:10 บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 ชั่วโมง ซึ่งจะสังเกตได้ว่า cell suspension จะใสขึ้นจนเกือบเท่ากับทริปติเคสซอยบรอธที่ใช้เตรียมในตอนแรก นำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง และทำพลักแอชเชเพื่อหาความเข้มข้นของสต็อกโคลิฟาจ

1.2.5 ทำตามวิธีในข้อ 1.2.4 จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสต็อกโคลิฟาจตามต้องการ คือ ประมาณ 10^{10} - 10^{11} พีเอฟยู/มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 ไกลซีน 0.05 โมล-โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 10.5

เตรียมสารละลายไกลซีน 0.05 โมล นำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นจึงปรับพีเอชให้เท่ากับ 10.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัลเติมฟีนอลเรด (phenol red) 0.0005% เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์

2.2 บีฟเอกซ์แทรกท์ 3 % พีเอช 9.0

ละลายบีฟเอกซ์แทรกท์ 30 กรัม ในน้ำ 1 ลิตรปรับพีเอชให้เท่ากับ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล นำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะของทริปติเคส ซอย บรอธ (ซ้าย) cell suspension (กลาง) และ สต็อกโคลิฟาจ (ขวา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 บีฟเอกซ์แทรกท์ 8 % พีเอช 9.0

ละลายบีฟเอกซ์แทรกท์ 80 กรัม ในน้ำ 1 ลิตรปรับพีเอชให้เท่ากับ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล นำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาที

2.4 บีฟเอกซ์แทรกท์ 3 % + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

ละลายบีฟเอกซ์แทรกท์ 60 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 2 โมล ในปริมาตรที่เท่ากันปรับพีเอชให้เท่ากับ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล นำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาที

2.5 บีฟเอกซ์แทรกท์ 8 % + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

ละลายบีฟเอกซ์แทรกท์ 160 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 2 โมล ในปริมาตรที่เท่ากันปรับพีเอชให้เท่ากับ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล นำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาที

2.6 โซเดียมคลอไรด์ 0.14 นอร์มัลพีเอช 3.5

ละลาย 8.18 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับ พีเอชให้เท่ากับ 3.5

3. <u>การเตรียมน้ำขุ่นสังเคราะห์</u>

3.1 <u>การเตรียมน้ำขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน</u>

จากการสำรวจของจุมพล และคณะ (2524) พบว่าแร่ดินที่พบมากในแหล่งน้ำของประเทศไทย คือ คาโอลิไนท์ ดังนั้นเพื่อให้น้ำขุ่นสังเคราะห์มีธรรมชาติที่ใกล้เคียงกับสภาพจริง ในการทดลองจึงใช้ดินคาโอลิน ซึ่งมีส่วนประกอบของแร่คาโอลิไนท์เป็นตัวสร้างความขุ่นให้กับน้ำดิบ โดยจะทำการคัดขนาดอนุภาคของดินในน้ำก่อน จากนั้นจึงทำการปรับน้ำให้มีความขุ่นตามต้องการ โดยปล่อยให้อนุภาคดินคาโอลินตกตะกอนในน้ำนิ่งตามเวลา และความลึกที่ประมาณได้จากสมการทั่วไปของการตกตะกอนแบบโดด (Discrete Settling) ที่ประยุกต์จากกฎของสโตค

(Stoke's Law) ดังนี้

$$V_s = g(p_s-p)d^2 / (18)\mu$$

เมื่อ V_s คือ ความเร็วในการจมตัวแบบอิสระของอนุภาค ม/วินาที

g คือ อัตราเร่งเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก ม/วินาที^{2}

p_s คือ ความหนาแน่นของอนุภาค กก(มวล)/ลบ.ม.

p คือ ความหนาแน่นของน้ำ กก(มวล)/ลบ.ม.

d คือ ขนาดของอนุภาค ม.

μ คือ ความหนืดของน้ำ นิวตัน-วินาที/ม^2

ในกรณีของดินคาโอลิน ซึ่งมีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 2.38 ความหนาแน่นเท่ากับ 2,380 กก (มวล) / ลบ.ม. แทนค่าในสมการจะได้ความเร็วในการจมตัวเท่ากับ 8.45×10^{-3} ม/วินาที หรือ 0.3 ซม./ชม. เมื่อให้เวลาในการจมตัว 43 ชม. อนุภาคที่ลอยอยู่ในระดับ 14.4 ซม. จากผิวน้ำจะมีขนาดเล็กกว่า 1 ไมครอน การเตรียมน้ำขุ่นสังเคราะห์ทำได้ดังนี้

3.1.1 นำดินคาโอลินมาผสมน้ำแล้วกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้อนุภาคดินคาโอลินกระจายอย่างทั่วถึง

3.1.2 ปล่อยให้ตกตะกอนเป็นเวลา 48 ชม.

3.1.3 ดูดน้ำออกด้วยวิธีกาลักน้ำ โดยเริ่มดูดจากตำแหน่งที่ลึกจากผิวน้ำเท่ากับ 14.4 ซม.

3.1.4 เจือจางน้ำขุ่นสังเคราะห์ด้วยน้ำประปาจนกระทั่งได้ความขุ่นตามต้องการ

3.2 การเตรียมน้ำขุ่นสังเคราะห์จากเชล E.coli

เตรียม cell suspension ของ E.coli และเจือจางด้วยทริปติเคสซอยบรอธให้ได้ความขุ่น 200 เอ็นทียู จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ

I16759332

4. ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการแยกตะกอน

เริ่มจากการนำตัวอย่างน้ำความขุ่นมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวัดค่าความขุ่น ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.3 และรูปที่ 3.4 ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ในการแยกตะกอนทั้งตะกอนจากดินคาโอลิน และตะกอนจากเชล E.coli

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.1 หม้อนึ่งอัดไอ ของ Hirayama รุ่น HA-3D

5.2 ตู้อบเพาะเชื้อ ของ Heraeus รุ่น KB 900

5.3 ตู้อบ (oven) ของ WTB binder รุ่น F 115

5.4 เครื่องช่วยนับโคโลนี ของ American Optical รุ่น 3330

5.5 เครื่องวัดความขุ่น (Turbidimeter) ของ Hach chemical รุ่น 2100A

5.6 เครื่องวัดพีเอช ที่ใช้เป็นของ Horiba รุ่น F-13

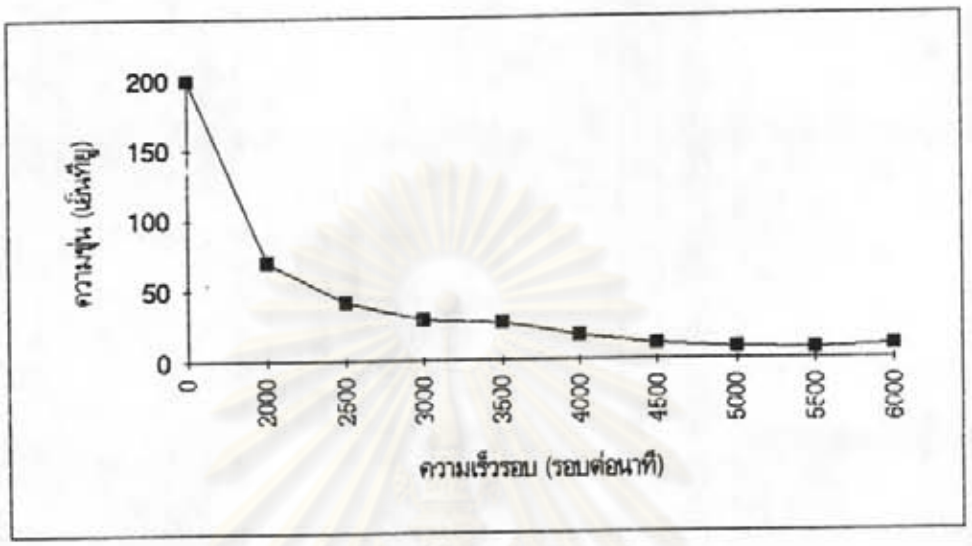
5.7 เครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก (Megnetic stirrer) ยี่ห้อ Advantec รุ่น SR 100 แท่งกวนแม่เหล็กที่ใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ยาว 25 มิลลิเมตร

5.8 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) ของ Scientific Industries รุ่น G 560

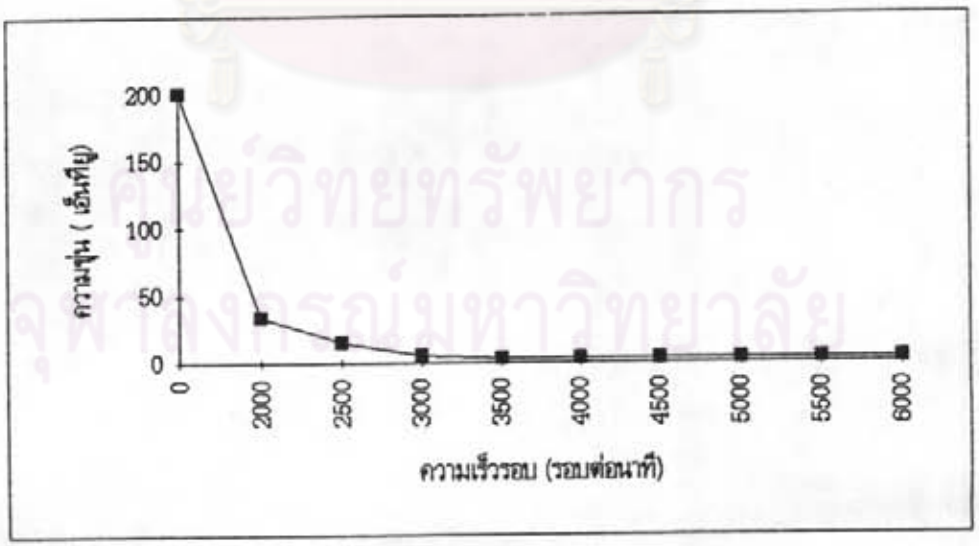
5.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง ของ Kokusan Enshinki รุ่น H-200

5.10 ชุดเยื่อกรอง ของ Millipore ขนาด 47 มิลลิเมตร

5.11 เครื่องสูบสุญญากาศ ของ Makashi Seisakusho รุ่น RP-S 50H



รูปที่ 3.3 แสดงผลของความขุ่นจากดินคาโอลินที่เหลืออยู่เมื่อนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ กัน



รูปที่ 3.4 แสดงผลของความขุ่นจากเชล E. coli ที่เหลืออยู่เมื่อนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ กัน

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้จะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดโดยสรุปดังนี้

1. วิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจสูงเป็นการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบความสามารถของสารต่อไปนี้ในการทำให้ปริมาณโคลิฟาจกระจายตัวจากการเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม เพื่อให้ได้จำนวนโคลิฟาจใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

- ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมล พีเอช 10.5
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

วิธีการทดลอง

1.1 เตรียมสต๊อกโคลิฟาจ

1.2 นำสต๊อกโคลิฟาจมาเจือจาง เพื่อให้ได้จำนวนพลักของโคลิฟาจเกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อในช่วง 20-200 พลัก โดยสารที่ใช้เจือจางคือ

1.2.1 ทริปติเคสซอยบรอธ

1.2.2 ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมล พีเอช 10.5 และทริปติเคสซอยบรอธ ในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7

1.2.3 บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% พีเอช 9.0 และทริปติเคสซอยบรอธในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7

1.2.4 บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล pH 9.0 และทริปติเคสซอยบรอธ ในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7

1.2.5 บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0 และ ทริปติเคสซอยบรอธในอัตราส่วน 1:20 1:10 และ 1:6.7

1.3 นำสต๊อกโคลิฟาจที่เจือจางแล้วมาทำการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.5 ขั้นตอนในการหาปริมาณโคลิฟาจจากสต๊อกโคลิฟาจ

2. <u>วิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นของโคลิฟาจต่ำ</u> โดยจะใช้วิธี adsorption-elution (Viradel Technique) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคลิฟาจในน้ำให้สูงขึ้นในสารชะล้างก่อนนำไปหาจำนวนโคลิฟาจซึ่งขั้นตอนต่างๆ ในการศึกษาแสดงในรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนในการหาจำนวนโคลิฟาจโดยวิธี adsorption-elution

โดยการศึกษาจะวิเคราะห์และเปรียบเทียบวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดของโคลิฟาจบนผิวแผ่นเยื่อกรองที่ทำจากเซลลูโลสไนเตรต ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

- เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 นอร์มัลในตัวอย่างน้ำ และปรับพีเอช ให้เท่ากับ 5.0
- เติมอลูมินัมคลอไรด์ 0.0002 โมล ในตัวอย่างน้ำและปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0
- การเคลือบผิวแผ่นเยื่อกรองก่อนนำมากรองด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน

นอกจากนี้ยังวิเคราะห์และเปรียบเทียบการใช้สารชะล้างต่างๆ ต่อไปนี้ในการชะโคลิฟาจที่ถูกดูดติดบนแผ่นเยื่อกรองออก

- ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมล พีเอช 10.5
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% + โซเดียมคลอไรด์ 1 โมล พีเอช 9.0

วิธีการวิเคราะห์จะใช้ Buffered water 1 ลิตร นำมาเติมโคลิฟาจให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $1x10^{8}$ พีเอฟยู/มิลลิลิตร รายละเอียดการวิจัยแบ่งได้เป็นหลายกรณีดังนี้

2.1 <u>กรณีที่ 1</u> ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นสารเคมีที่เพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดของโคลิฟาจบนผิวของแผ่นเยื่อกรอง ขั้นตอนการศึกษามีดังต่อไปนี้

2.1.1 เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ .1 นอร์มัล ลงในตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วน 1 ส่วน ต่อ ตัวอย่างน้ำ 50 ส่วน

2.1.2 นำตัวอย่างน้ำมาปรับพีเอช ให้อยู่ในช่วง 6-3.5

2.1.3 กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดเยื่อกรองที่มีแผ่นเยื่อกรองบรรจุอยู่

2.1.4 ล้างแผ่นเยื่อกรองด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.14 นอร์มัล

พีเอช 3.5 เพื่อกำจัดแมกนีเซียมคลอไรด์

2.1.5 ชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองด้วยสารชะล้างดังที่กล่าวมาแล้ว แช่แผ่นเยื่อกรองลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารชะล้างที่ต้องการศึกษา 0.45 มิลลิลิตร ต่อตารางเซนติเมตรของพื้นที่ผิวแผ่นเยื่อกรอง นาน 15 นาที โดยมีการกวนตลอดด้วยเครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก ดังรูปที่ 3.7

2.1.6 นำสารชะล้างที่ได้ไปทำการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจ

2.2 กรณีที่ 2 ใช้อลูมินัมคลอไรด์เป็นสารเคมีที่เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดติดผิว ขั้นตอนการศึกษามีดังต่อไปนี้

2.2.1 เติมอลูมินัมคลอไรด์ 0.0002 โมล ลงในตัวอย่างน้ำด้วยอัตราส่วน 1 ส่วนต่อตัวอย่างน้ำ 100 ส่วน

2.2.2 นำตัวอย่างน้ำมาปรับพีเอชเท่ากับ 5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1.0 หรือ 0.1 นอร์มัล

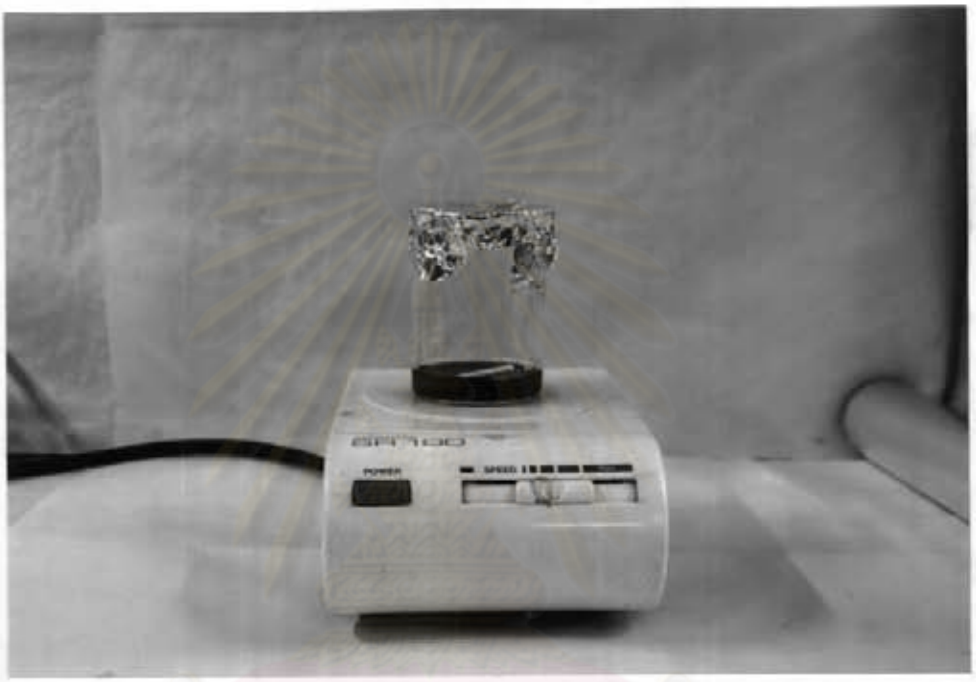
2.2.3 กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดเยื่อกรองที่มีแผ่นเยื่อกรองบรรจุอยู่

2.2.4 ล้างแผ่นเยื่อกรองด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.14 นอร์มัล เพื่อกำจัดอลูมินัมคลอไรด์

2.2.5 ชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองด้วยสารชะล้างดังที่กล่าวมาแล้วแช่แผ่นเยื่อกรองลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารชะล้างที่ต้องการศึกษา 0.45 มิลลิลิตร ต่อตารางเซนติเมตรของพื้นที่ผิวแผ่นเยื่อกรอง นาน 15 นาที โดยมีการกวนตลอด ด้วยเครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก

2.2.6 นำสารชะล้างที่ได้ไปทำการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจ

2.3 กรณีที่ 3 ใช้อลูมินัมคลอไรด์เป็นสารเคมีเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดติดผิว และเป็นสารเคมีเพิ่มประสิทธิภาพในการหลุดออกของโคลิฟาจจากแผ่นเยื่อกรอง เมื่อเพิ่มพีเอชในกระบวนการชะโคลิฟาจ โดยทำตามขั้นตอนในกรณีที่ 2 แต่ไม่มีการล้างอลูมินัมคลอไรด์ออกด้วยโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 3.7 แสดงวิธีการที่ใช้ในการชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรอง โดยการแช่แผ่นเยื่อกรองในสารชะล้างที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ และใช้เครื่องกวนแบบใช้แม่เหล็กกวนนาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 กรณีที่ 4 การเคลือบผิวแผ่นเยื่อกรองก่อนนำมากรองด้วยโพลีเอทิลีนอิมีน ขั้นตอนในการศึกษามีดังนี้

2.4.1 นำแผ่นเยื่อกรองไปแช่ในโพลีเอทิลีนอิมีน 0.5% นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้แห้ง

2.4.2 กรองตัวอย่างน้ำผ่านแผ่นเยื่อกรองที่บรรจุอยู่ในชุดเยื่อกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

2.4.3 ชะโคลิฟาจออกจากแผ่นเยื่อกรองด้วยสารชะล้างดังที่กล่าวมาแล้ว แช่แผ่นเยื่อกรองลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารชะล้างที่ต้องการศึกษา 0.45 มิลลิลิตร ต่อ ตารางเซนติเมตรของพื้นที่ผิวแผ่นเยื่อกรอง นาน 15 นาที โดยมีการกวนตลอด ด้วยเครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก

2.4.4 นำสารชะล้างที่ได้ไปทำการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำขุ่นสังเคราะห์

โดยจะแบ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟาจในตัวอย่างน้ำขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน และจากเชล E.coli ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 ตัวอย่างน้ำขุ่นสังเคราะห์จากดินคาโอลิน มีความขุ่นประมาณ 200 เอ็นทียู และมีการเติมโคลิฟาจลงไปจนมีความเข้มข้นประมาณ $1x10^8$ พีเอฟยู/มิลลิลิตร ขั้นตอนในการศึกษาดังรูปที่ 3.8

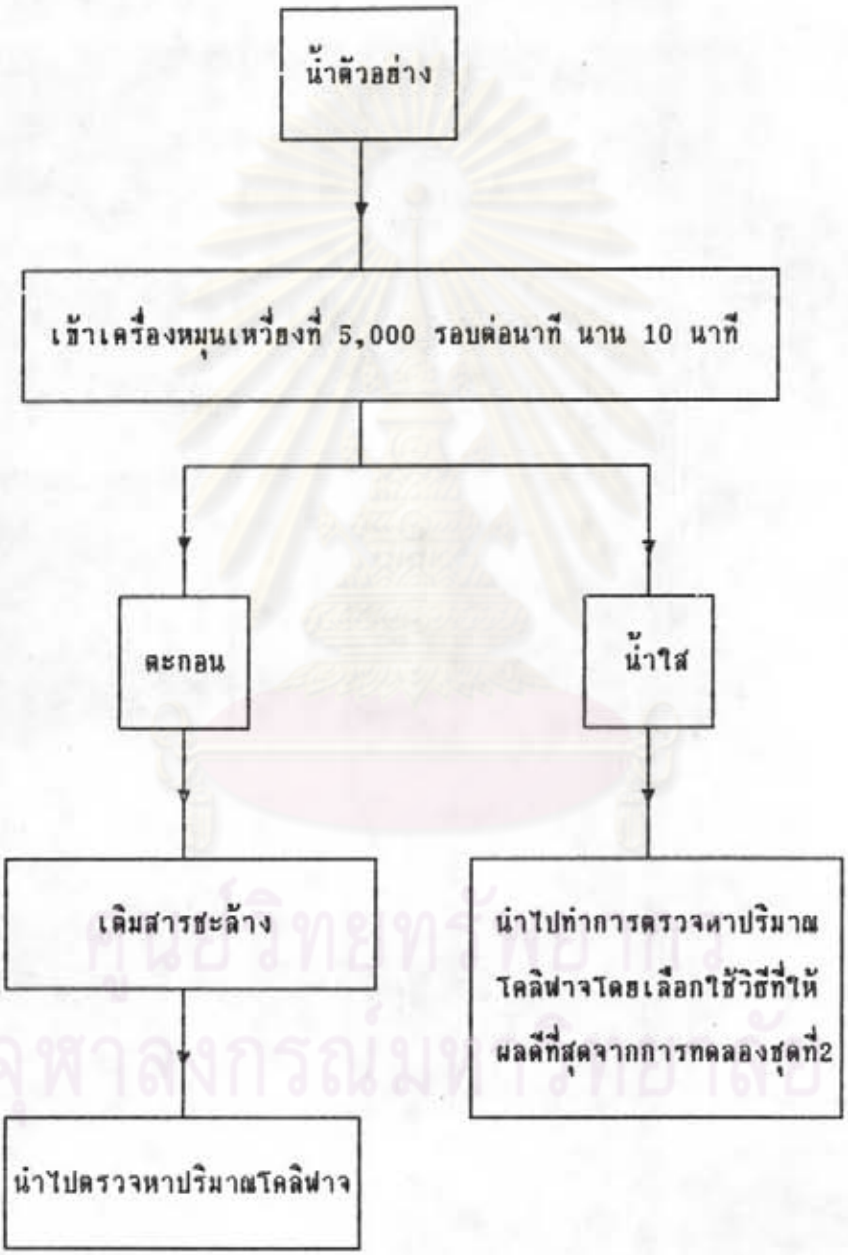
รายละเอียดขั้นตอนในการวิเคราะห์

3.1.1 นำตัวอย่างน้ำมา 10 มิลลิลิตร เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.1.2 แยกส่วนน้ำใสและตะกอนออกจากกัน

3.1.3 นำส่วนน้ำใสไปหาปริมาณโคลิฟาจโดยใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมจากการทดลองในชุดที่ 2

3.1.4 ส่วนตะกอนนำมาชะโคลิฟาจออกโดยใช้สารชะล้างดังต่อไปนี้ใส่ลงไปในส่วนของตะกอน 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้อีก 15 นาที



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนในการหาจำนวนโคลิฟาจในน้ำตัวอย่างที่มีความขุ่น

- ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมล พีเอช 10.5
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% + โซเดียมคลอไรด์ 1โมล พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% พีเอช 9.0
- บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% + โซเดียมคลอไรด์ 1โมล พีเอช 9.0

3.1.5 นำสารชะล้างที่ได้ไปทำการตรวจหาปริมาณโคลิฟาจ

3.2 ตัวอย่างน้ำความขุ่นสังเคราะห์จากเชล E.coli ความขุ่น 200 เอ็นทียู มีการเติมโคลิฟาจจนมีความเข้มข้น $1x10^{8}$ พีเอฟยู/มิลลิลิตร ขั้นตอนในการศึกษาเหมือนกับหัวข้อ 3.1

วิธีการตรวจสอบจำนวนไวรัส

ใช้วิธีพลักแอชเช แบบ single layer ดังที่ได้อธิบายไว้โดยละเอียดในหัวข้อ 1.1 ในหน้าที่ 28 แล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย