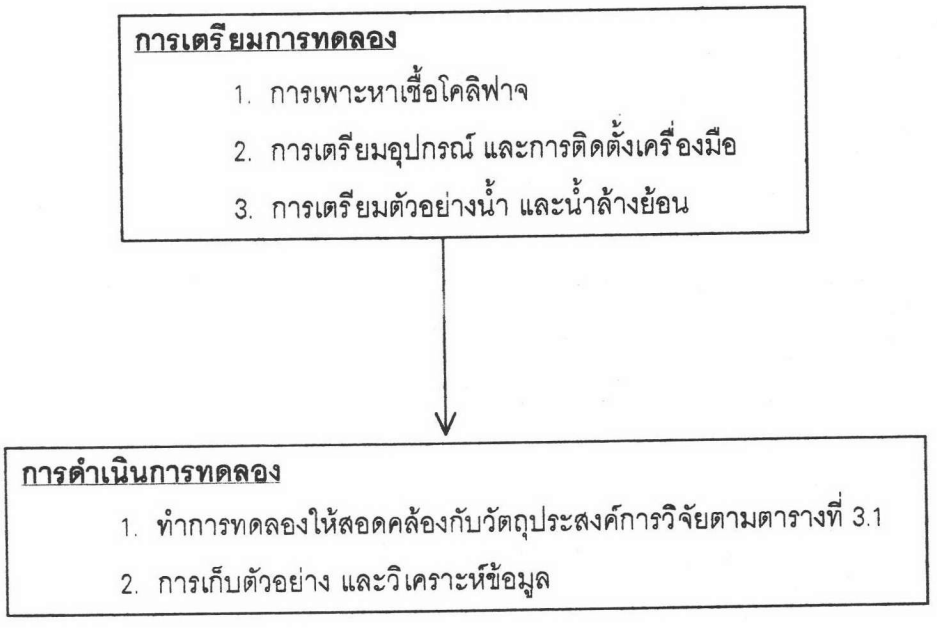
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

แผนการ และการดำเนินการวิจัย

แผนการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แผนผังการดำเนินการวิจัย แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแผนผังการดำเนินการวิจัย

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนชุดการทดลองตามวัตถุประสงค์การวิจัย

ขนาดรูเมมเบรน (ไมครอน)	ตัวอย่างน้ำ	จำนวนชุดการทดลองที่อัตรากรอง (ลิตร/นาที) ต่างๆกัน					
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5
0.1	น้ำประปาเติมโคลิฟาจ	4	4	4	4	4	4
	น้ำประปาเติมความขุ่น 20 เอ็นทียู	1	1	1	1	1	1
	น้ำประปาเติมโคลิฟาจ และ ความขุ่น 20 เอ็นทียู	1	1	1	1	1	1
0.03	น้ำประปาเติมโคลิฟาจ	4	4	4	4	4	4
	น้ำประปาเติมความขุ่น 20 เอ็นทียู	1	1	1	1	1	1
	น้ำประปาเติมโคลิฟาจ และ ความขุ่น 20 เอ็นทียู	1	1	1	1	1	1

ตัวแปรต่างๆที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

ตัวแปรอิสระ ได้แก่

1. ขนาดช่องว่างของเมมเบรน
2. อัตราการกรอง
3. ตัวอย่างน้ำ

ตัวแปรตาม ได้แก่

1. ปริมาณความเข้มข้นของโคลิฟาจของน้ำกรอง
2. ปริมาณความขุ่นของน้ำกรอง
3. ความดัน

ตัวแปรคงที่ ได้แก่

1. พื้นที่เมมเบรน 0.3 ตารางเมตร
2. ความยาวเมมเบรน 330 มิลลิเมตร
3. ชนิดของไวรัส คือ โคลิฟาจ
4. ความขุ่นสังเคราะห์ 20 เอ็นทียู โดยใช้ดินคาโอลิน
5. ความดันในการล้างย้อน 3 บาร์
6. สารที่ใช้ล้างเมมเบรน คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์
7. จุดสิ้นสุดการทดลองเมื่อความดันเท่ากับ 1 หรือ 2 บาร์

การเตรียมการทดลอง

1. <u>การเพาะหาเชื้อโคลิฟาจเพื่อใช้ในการวิจัย</u>

1.1 อาหารเพาะเชื้อ (Culture media) และสารเคมีที่ใช้

อาหารเพาะเชื้อ ประกอบด้วย

1.1.1 EMB agar เป็นอาหารสำหรับการเพาะ โคไลฟอร์ม แบคทีเรีย (Coliform bacteria)

1.1.2 Tryptic(ase) soy agar (TSA) ใช้สำหรับเก็บรักษา <u>E.Coli</u> stock โดยวิธี agar slant

1.1.3 Tryptic(ase) soy broth (TSB)

1.1.4 Agar agar

อาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเพาะเชื้อสำเร็จรูป ดังนั้นการเตรียมอาหารเพาะเชื้อดังกล่าว ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเชื้อ ประกอบด้วย

1.1.5 Glycerine

1.1.6 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TPTZ) ใช้เป็นสีย้อมช่วยในการสังเกตุพลัก (Plaque) ที่เกิดขึ้น

1.1.7 Ethyl alcohol

1.1.8 Ammonium nitrate (NH_4NO_3)

1.1.9 Strontium nitrate ($Sr(NO_3)_2$)

1.1.10 น้ำกลั่น

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะหาเชื้อโคลิฟาจ ประกอบด้วย

1.2.1 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ของ Hirayama รุ่น HA-3D

1.2.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ของ Heraeus รุ่น KB 900

1.2.3 ตู้อบ (oven) ของ WTB binder รุ่น F-115

1.2.4 เครื่องช่วยนับโคโลนี ของ American Optical รุ่น 3330

1.2.5 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.2.6 เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) ของ Scientific Industries รุ่น G 560

1.2.7 ชุดเยื่อกรอง ของ Millipore ขนาด 47 มิลลิเมตร

1.2.8 เครื่องสูบสูญญากาศ ของ Makashi Seisakusho รุ่น RP-S 50H

1.3 การเพาะแบคทีเรีย สำหรับเป็นอาหารของไวรัส (Host bacterium) มีวิธีการดังนี้

1.3.1 เลือกเก็บตัวอย่างน้ำจากสถานที่ที่จะมี E.Coli ซึ่งเป็น host ของไวรัส เช่น รางระบายน้ำใกล้กับห้องน้ำ เนื่องจาก E.Coli จะปะปนมากับอุจจาระของมนุษย์

1.3.2 ทำการ inoculate ตัวอย่างน้ำข้างต้นบน EMB agar

1.3.3 นำไปบ่มในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.4 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อ (Petri dish) จากตู้บ่มออกมาดูจะปรากฏลักษณะของโคไลฟอร์ม แบคทีเรีย เป็นแถบ จุด หรือขีดสีทอง ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียผสม (mixed culture) นอกจากการแสดงลักษณะเงาโลหะสีทองบนโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะของโคไลฟอร์มแบคทีเรียแล้ว จะทำการตรวจสอบลักษณะของ E.Coli ที่ได้ โดยการย้อมแบคทีเรียแบบแกรม (Gram stain) และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ค)โดยลักษณะเฉพาะของโคไลฟอร์มแบคทีเรีย จะมีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์

1.3.5 จากเชื้อแบบผสมที่ได้ นำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (pure culture) โดยวิธี cross streak plate (ภาคผนวก ง)

1.3.6 ทำการแยกเชื้อหลายๆ ครั้ง จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ของ E.Coli

1.3.7 ทำการ inoculate E.Coli ที่บริสุทธิ์ แล้วลงใน TSA โดยวิธี agar slant หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงนำไปเป็น host stock สำหรับใช้ในการตรวจสอบไวรัสหากจำเป็นจะต้องเก็บ ควรเก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธีพลักแอสเส (Plaque Assay)

เป็นการหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างน้ำ โดยวิธีของ AWWA (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงบ้างเพื่อให้เหมาะสม และสามารถใช้งานได้จริงดังนี้

1.4.1 การเตรียม Modified tryptic(ase) soy agar (MTSA)

TSB	30.00	gm
NH_4NO_3	1.60	gm

$Sr(NO_3)_2$	0.21	gm
agar-agar	15.00	gm
น้ำกลั่น	1.00	L

ละลายส่วนผสมข้างต้น โดยนำไปต้มให้เดือด แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว (screw-capped tube) หลอดละ 5.5 มิลลิลิตร นำไปสเตอริไลส์ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ถ้าต้องการเติมสีย้อมให้เติม TPTZ ลงไปหลังจากสเตอริไลส์แล้ว และนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้วุ้นแข็งตัว

1.4.2 การเตรียม Cell suspension

เตรียม TSB ตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วเติม glycerine 10% (W/V) ทำการอุ่นสารละลายแล้วสเตอริไลส์ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ จากนั้นทิ้งให้เย็น เก็บส่วนหนึ่งใส่หลอดฝาเกลียวไว้ทำ blank ทำการ inoculate E.Coli จาก stock (1.3) ที่เตรียมไว้ลงในสารละลาย ข้างต้น นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง สารละลายที่ได้(Cell suspension) มีค่า optical density (absorbence) เท่ากับ 0.5 ที่ 520 นาโนเมตร วัดโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ถ้าต้องการเพิ่มปริมาณ cell suspension ทำได้โดยเติม cell suspension ลงใน TSB โดยอัตราส่วน cell suspension ต่อ TSB เท่ากับ 1 ต่อ 20 โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

สำหรับ cell suspension ที่เตรียมได้ สามารถเก็บแช่แข็งในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน เพื่อใช้เตรียม cell suspension ครั้งต่อไป ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะนำมาใช้

1.4.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อให้จำนวนพลัก ที่เกิดในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 20 ถึง 200 พลัก โดยการเจือจางตัวอย่างน้ำด้วย TSB ที่ผ่านการสเตอริไลส์แล้ว

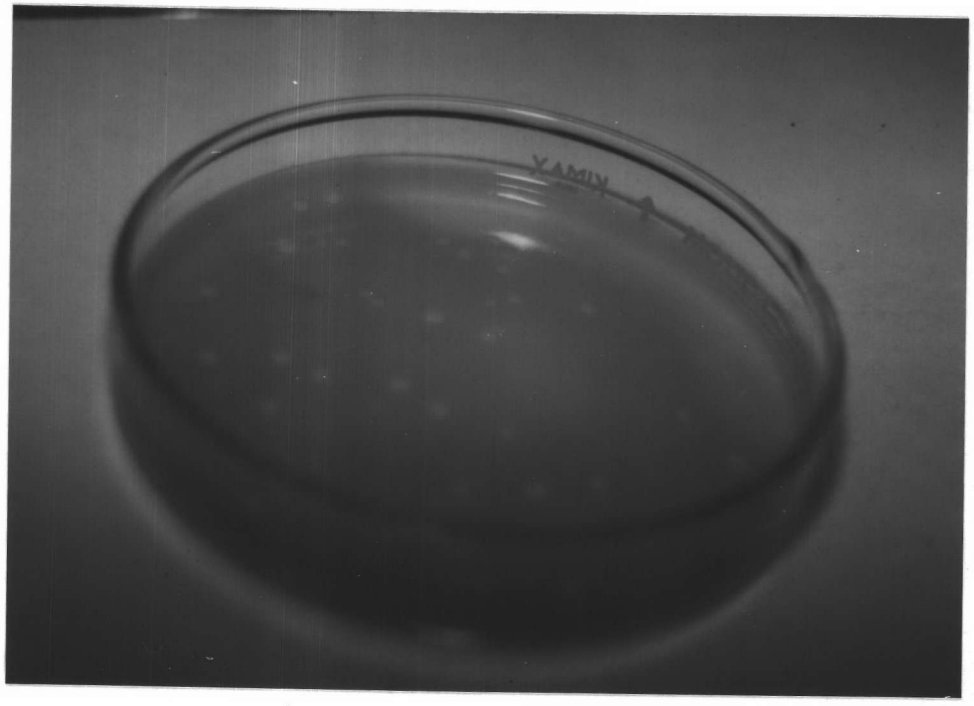
1.4.4 ผสม cell suspension 1 มิลลิลิตร และตัวอย่างน้ำ หรือ ตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมลงในหลอด MTSA ที่ทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน

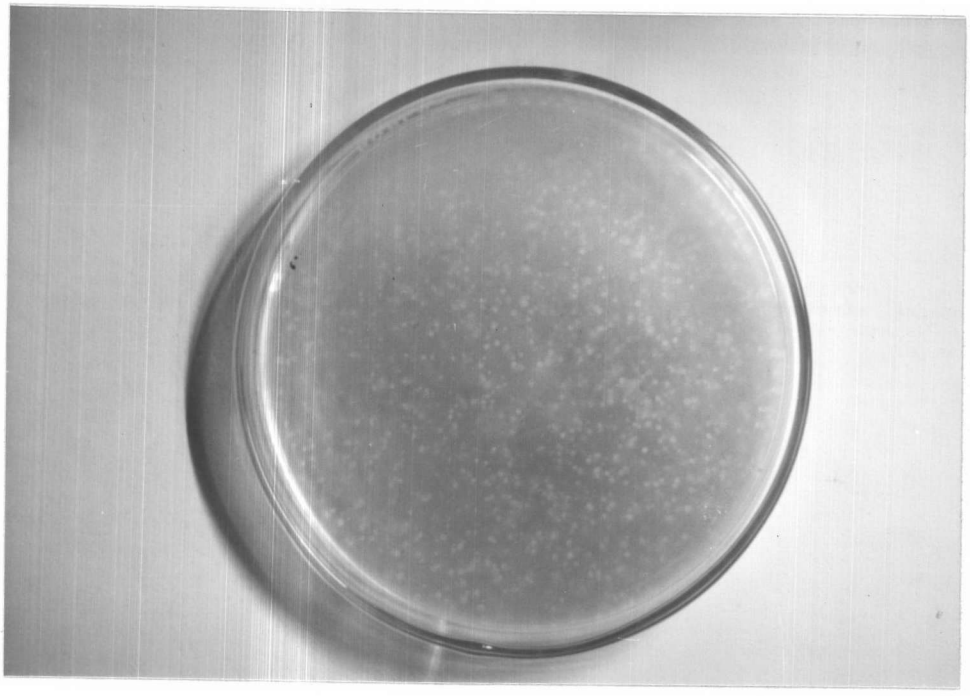
1.4.5 เทส่วนผสมในข้อ 1.4.4 ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการสเตอริไลส์แล้ว หลังจากที่ส่วนผสมในจานเพาะเชื้อแข็งตัว นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

1.4.6 นับจำนวนพลักที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ดังรูปที่ 3.2 โดยใช้เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนพลักระหว่าง 20 ถึง 200 พลักเท่านั้น

1.4.7 คำนวณหาจำนวนไวรัสในตัวอย่างน้ำตามสูตรข้างล่างนี้ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยกับค่าที่ได้จากจานเพาะเชื้อที่ใช้ตัวอย่างน้ำเหมือนกัน โดยทั่วไปจะทำซ้ำ 4 ค่า

$$\text{จำนวนไวรัสในตัวอย่างน้ำ (พีเอฟยู/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนพลัก} \times \text{อัตราการเจือจางของตัวอย่างน้ำ}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ}}$$





รูปที่ 3.2 ลักษณะของพลักที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ

บน : ลักษณะของพลักที่เกิดขึ้นระหว่าง 20 ถึง 200 พลัก

ล่าง : ลักษณะของพลักที่เกิดขึ้นมากกว่า 200 พลัก

1.5 การเตรียมสต็อกโคลิฟาจ (stock coliphage)

เป็นการเตรียมเชื้อโคลิฟาจเพื่อนำมาใช้ในการวิจัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.5.1 เก็บน้ำเสียจากท่อระบายน้ำมาทำพลักแอสเส

1.5.2 เมื่อมีไวรัสก่อรูปพลักขึ้นให้เขี่ยพลักที่เกิดขึ้นใส่ใน cell suspension นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หรือจน cell suspension ใส

1.5.3 นำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง cellulose nitrate ขนาด 0.45 ไมครอนเพื่อแยก E.Coli ออก สารละลายที่ได้ คือ สต็อกโคลิฟาจ แต่ความเข้มข้นที่ได้ไม่สูงนัก

1.5.4 เพิ่มความเข้มข้นของสต็อกโคลิฟาจ โดยนำสต็อกโคลิฟาจที่ได้จากข้อ 1.5.3 ใส่ใน cell suspension ในอัตราส่วน สต็อกโคลิฟาจ ต่อ cell suspension เท่ากับ 1 ต่อ 10 นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 ชั่วโมง หรือ cell suspension ใส นำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง และนำส่วนใสไปทำพลักแอสเส

1.5.5 ทำตามวิธีในข้อ 1.5.4 จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสต็อกโคลิฟาจตามต้องการโดยจะเตรียมได้สูงสุดประมาณ 10^{10} - 10^{11} พีเอฟยู/มิลลิลิตร

2. การเตรียมอุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย

2.1 ถังน้ำขนาด 500 ลิตร 1 ถัง

2.2 ถังน้ำขนาด 200 ลิตร 2 ถัง

2.3 กระบอกสำหรับบรรจุมัดเส้นใยกลวง (membrane housing) 2 ชุดของ Mitsubishi Rayon ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 42 มิลลิเมตร ความยาว 471 มิลลิเมตร

2.4 มัดเส้นใยกลวง (Hollow-fiber bundle) ขนาด 0.03 และ 0.1 ไมครอน ของ Mitsubishi Rayon พื้นที่เมมเบรน 0.3 ตารางเมตร ความยาว 330 มิลลิเมตร

2.5 เครื่องสูบน้ำหอยโข่ง (centrifugal pump) ของ Pentax 1 เครื่อง

2.6 เครื่องสูบน้ำแบบรีด (peristaltic pump) ของ Watson-Marlow รุ่น 604U/R 2 เครื่อง

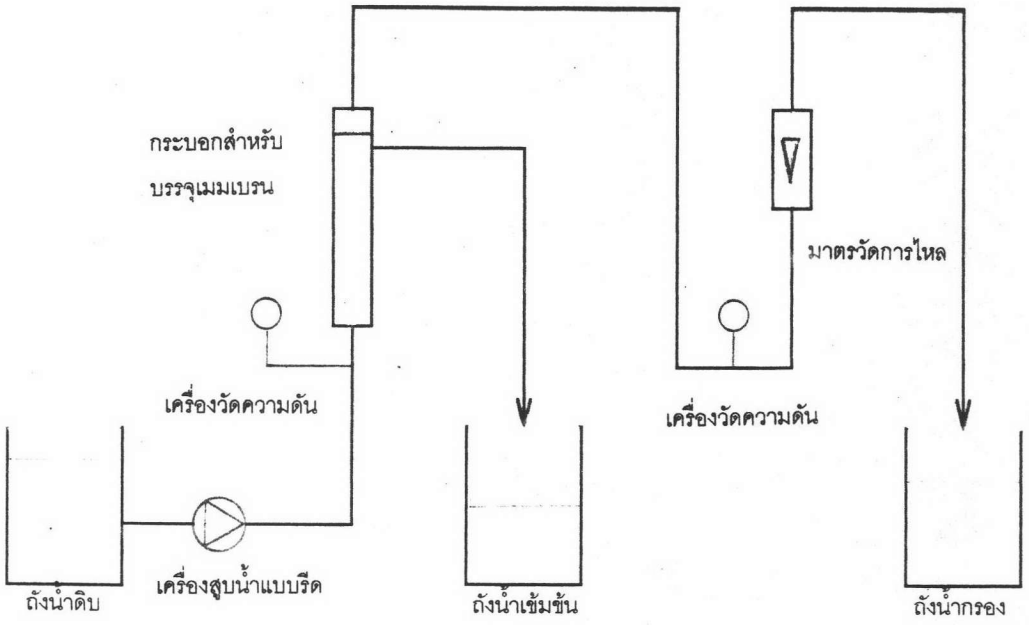
2.7 สายยางซิลิโคน 3 ขนาด คือ 6.4 มิลลิเมตร 8.0 มิลลิเมตร และ 12.7 มิลลิเมตร

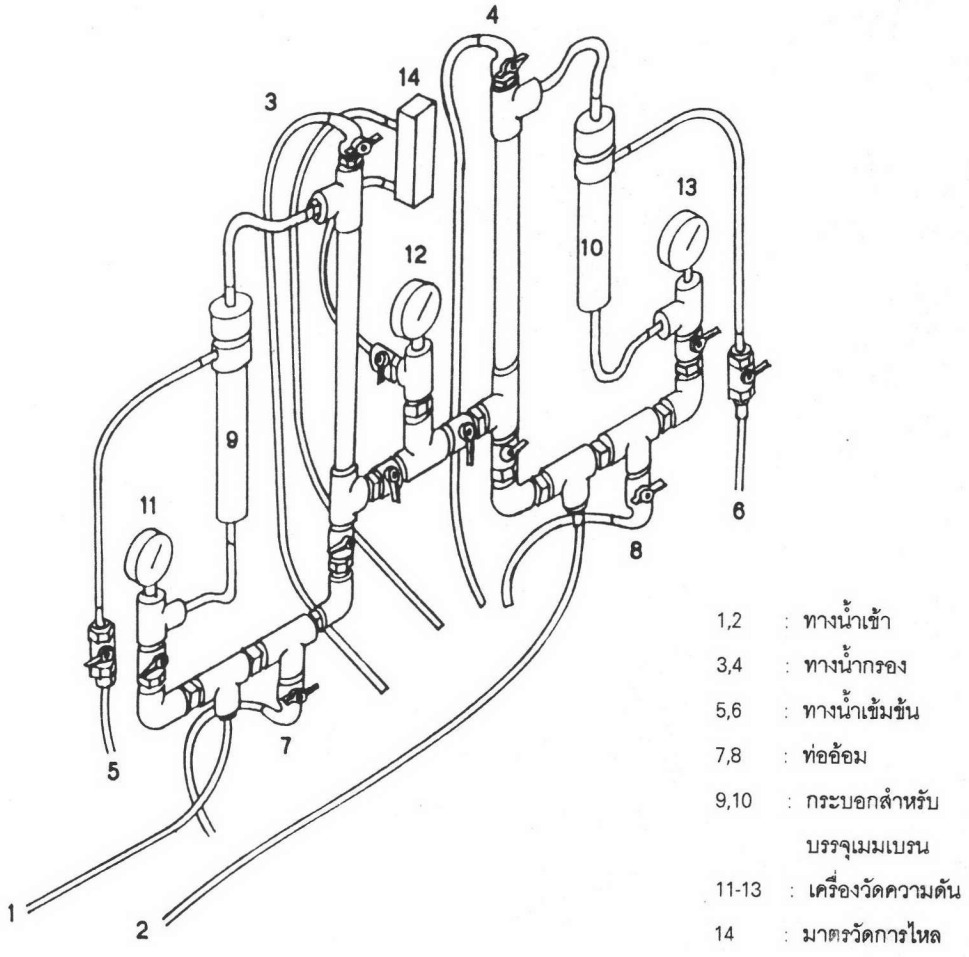
2.8 มาตรวัดการไหล (flow meter) ของ Blue White มี 2 ขนาด คือขนาด 1 ลิตร/นาที รุ่น F50250L และ ขนาด 7 ลิตร/นาที รุ่น F45376

2.9 เครื่องวัดความดัน (pressure gauge) ของ Hi-light ขนาด 3 kg/cm^2 3 ตัว

2.10 เครื่องตัดไฟ (time switch) ของ Kawamura รุ่น TM-30A

2.11 ท่อ ข้อต่อ และวาล์วต่างๆ





รูปที่ 3.1 แสดงแผนภาพการไหล(บน) และอุปกรณ์การทดลอง(ล่าง)

3. การเตรียมตัวอย่างน้ำ และน้ำล้างย้อน

3.1 ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ

3.1.1 น้ำประปาเติมโคลิฟาจ นำสต็อกโคลิฟาจที่ทราบความเข้มข้น โดยเตรียมตามหัวข้อ 1.5 มาเจือจางด้วยน้ำประปาที่กำจัดคลอรีนแล้ว ในปริมาตรที่ต้องการ และเหลือความเข้มข้นของโคลิฟาจ ประมาณ 10^6 - 10^7 พีเอฟยู/มิลลิลิตร

3.1.2 น้ำประปาเติมความขุ่น 20 เอ็นทียู เตรียมดินคาโอลิน 150 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ความขุ่นประมาณ 200 เอ็นทียู นำมาเจือจางด้วยน้ำประปาจนได้ความขุ่นประมาณ 20 เอ็นทียู ตามปริมาตรที่ต้องการ

3.1.3 น้ำประปาเติมโคลิฟาจ และความขุ่น 20 เอ็นทียู เตรียมโคลิฟาจ และความขุ่นตามข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 ตามลำดับ แล้วผสมให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

3.2 น้ำล้างย้อน ใช้น้ำประปาที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.03 ไมครอน

3.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เตรียม H_2O_2 3 % เพื่อใช้ล้างเมมเบรนทุกครั้งก่อนการเปลี่ยนค่าอัตรากรองใหม่

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยจะทำการกรองตัวอย่างน้ำ 3 ชนิด ผ่านเมมเบรนระบบอุลตราฟิลเตรชัน โดยเปลี่ยนขนาดช่องว่างเมมเบรน และอัตราการกรอง ตามตารางที่ 3.1

1. <u>การทดลอง</u>

เตรียมตัวอย่างน้ำตามหัวข้อ 3.1 จากนั้นสูบน้ำเข้าระบบการกรอง ทำการกรองด้วยเมมเบรนขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.1 และ 0.03 ไมครอน
โดยเปลี่ยนอัตราการกรอง 6 ค่า คือ - 0.2 ลิตร/นาที
- 0.4 ลิตร/นาที
- 0.6 ลิตร/นาที
- 0.8 ลิตร/นาที
- 1.0 ลิตร/นาที
- 1.5 ลิตร/นาที

ในการทดลองนี้จะทำการล้างย้อนเฉพาะตัวอย่างน้ำที่เป็นน้ำประปาเติมโคลิฟาจ โดยแต่ละอัตรากรองทำการทดลอง 4 ครั้ง คือเมื่อกรองตัวอย่างน้ำจนความดันถึง 1 หรือ 2 บาร์ จึงสิ้นสุดการทดลอง จะทำการล้างย้อนด้วยน้ำล้างย้อน โดยล้างย้อนที่ความดัน 3 บาร์ เป็นเวลา 5 นาที จึงเริ่มการทดลองชุดใหม่ ทำเช่นนี้จนครบ 4 ครั้ง แล้วล้างเมมเบรนด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์ ก่อนจึงเปลี่ยนอัตราการกรองค่าใหม่ ต่อไป

สำหรับตัวอย่างน้ำที่เป็นน้ำประปาเติมความขุ่นสังเคราะห์ 20 เอ็นทียู จะทำการทดลอง ในแต่ละอัตรากรองเพียงชุดเดียว

2. <u>การเก็บตัวอย่าง และวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.2 และวิธีการที่ใช้มีดังนี้คือ

2.1 ความเข้มข้นโคลิฟาจ ใช้การตรวจสอบด้วยวิธี Plaque assay

2.2 ความดัน ใช้เครื่องวัดความดัน

2.3 อัตราการไหล ใช้มาตรวัดการไหล

2.4 ความขุ่น ใช้เครื่องวัดความขุ่น (Turbidimeter)

I16699518

ตารางที่ 3.2 ตารางการเก็บข้อมูล

ขนาดเมมเบรน_____ไมครอน

ตัวอย่างน้ำ _____

อัตราการกรอง _____ลิตร/นาที

วันที่ทดลอง (ชุดที่)	เวลากรอง (นาที)	ความดัน (บาร์)	ความเข้มข้นของโคลิฟาจ (พีเอฟยู/มิลลิลิตร)		ความขุ่น (เอ็นทียู)	
			น้ำเข้า	น้ำกรอง	น้ำเข้า	น้ำกรอง
1	# # # ⋮ # ⋮	0 0.1 0.2 ⋮ 1.0 ⋮	#	# # # ⋮	#	#
2						
3						
4						

การเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของโคลิฟาจของน้ำกรอง จะทำการเก็บตัวอย่างชุดละ 3 ค่า สำหรับความขุ่นจะเป็นค่าเฉลี่ยของน้ำกรองทั้งหมด

เมื่อจบแต่ละชุดการทดลองทำการล้างย้อน ด้วยน้ำล้างย้อน และทำการทดลองครบ 4 ชุดการทดลอง ให้ล้างเมมเบรนด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์