

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ

วัสดุที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย

1.1 น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัย

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

1.1.1 น้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดสงขลา จำนวน 3 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลหาดใหญ่ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และโรงพยาบาลราชบุรียินดี

1.1.2 น้ำเสียสังเคราะห์ เป็นน้ำเสียที่สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วยสารต่าง ๆ (ระบุใน 3.3.2)

1.2 เชื้อ Q β coliphage

1.3 เชื้อ *E.coli* K-12, F⁺(A/ λ)

1.4 ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลหาดใหญ่

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ระบุในภาคผนวก)

1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Brilliant green lactose bile broth 2% (Merck : Germany)
- EC medinm (Merck : Germany)
- Lauryl thypnose broth (Merck : Germany)
- Bacto agar (Merck : Germany)
- Polypeptone (Difco : USA)
- Yeast extract (Difco : USA)
- MFC agar (Merck : Germany)

2. อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ

- ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร
- ถังพลาสติกขนาด 30 ลิตร
- ขวดแก้ว
- กล้องโพรบสำหรับแช่ตัวอย่าง

2.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

- ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ซีไอดี
- ชุดวิเคราะห์ของแข็งแขวนลอย
- ชุดวิเคราะห์แอมโมเนีย
- ชุดวิเคราะห์คลอรีนตกค้าง

2.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- pipette
- หลอดทดลอง
- Petri dish
- เครื่องผสม (Mixer) : Touch mixer Model 231
- เครื่องอังไอน้ำ (Waterbath) : Memmert
- ห่วงเย็บเชื้อ (Wire loop)
- เต้าไฟฟ้าพร้อมระบบกวนแม่เหล็กไฟฟ้า
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องปั่นความเร็วสูง

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ของน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล ซึ่งประกอบด้วยโรงพยาบาล 3 แห่ง ใน จังหวัดสงขลา ได้แก่ โรงพยาบาลหาดใหญ่ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และ โรงพยาบาลราชบุรียินดี โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำแบบ grab sampling ในจุดน้ำเสียเข้าและจุดน้ำเสียออกของบ่อเติมคลอรีน แห่งละ 1 ครั้ง เพื่อทำการศึกษาลักษณะสมบัติทาง

กายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 1 พร้อมทั้งศึกษาวิธีการเติมคลอรีนและระยะเวลาที่ใช้ในการสัมผัสคลอรีนของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลต่าง ๆ ที่ศึกษาโดยการสอบถามผู้เกี่ยวข้องและสังเกตการณ์ในภาคสนาม

ตาราง 1 วิธีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำ

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์*
- ลักษณะทางกายภาพและเคมี	
pH	pH Meter
Temperature	Thermometer
COD	Open Reflux
SS	Dried at 103-105 °C
Chlorine Residual	DPD Titrimetric Method
NH ₃ -N	Phenate Method
- ลักษณะทางชีวภาพ	
Coliform Bacteria	Multiple Tube Fermentation Technique
Fecal Coliform Bacteria	Multiple Tube Fermentation Technique
Bacteriophage	Double Layer Agar**

หมายเหตุ *: ใช้วิธีในการตรวจวิเคราะห์ที่ระบุใน Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA & WEF, 1998)

** : ใช้วิธีในการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่ระบุโดย Adams, 1959

3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการคงชีพและการทำลายเชื้อด้วยคลอรีน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการคงชีพและการทำลายเชื้อด้วยคลอรีน การศึกษาดำเนินการโดยทำการทดลองในน้ำเสีย 2 ประเภท คือ น้ำเสียสังเคราะห์ (synthetic wastewater) และน้ำเสียจริง (wastewater) ซึ่งเป็นน้ำเสียก่อนเข้าบ่อเติมคลอรีนของระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลหาดใหญ่ (ทำการเก็บตัวอย่างน้ำแบบ grab sampling) โดยนำน้ำเสียทั้ง 2 ประเภท มาทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *E. coli* และ bacteriophage เมื่อมีการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ภายใต้อุณหภูมิและความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์ (วัดในเทอม COD) ปริมาณของแอมโมเนียไนโตรเจน ความเข้มข้นของปริมาณ

คลอริน เวลาที่ใช้สัมผัส ความเป็น กรด-ด่าง และปริมาณตะกอนแขวนลอย การทดลองได้ใช้เชื้อ *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) และ Qβ coliphage เป็นเชื้อทดสอบเงื่อนไขของการศึกษาในน้ำเสีย สังกะหรณ์และน้ำเสียโรงพยาบาล ดังแสดงในตาราง 2 และ 3 ตามลำดับ

3.3 จุลินทรีย์และสารเคมีสำหรับการทดลองการอยู่รอดของจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมคลอริน

ในการทดลองประกอบด้วยจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลองในปัจจุบันต่าง ๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) : โดยนำ stock *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) ที่ได้มาจากมหาวิทยาลัยโตเกียวในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 70 °C มาเตรียมเป็น working stock bacteria นำ stock *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) มาเชยเชื้อ (streak plate) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ phage bottom agar (ภาคผนวก ค) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษา working stock bacteria ที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นเชยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ 1-2 โคโลนี ลงใน phage broth ปริมาณ 10 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 °C ใช้เวลา 3.5-4 ชั่วโมง จะได้ *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) เพื่อนำไปศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงพยาบาลที่มีการเติมคลอรินแล้วและนำไปใช้เป็นแบคทีเรียโฮสต์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ coliphage โดยมีการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของ *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) ใน phage broth ที่เตรียมได้ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.3.2 Qβ coliphage : Qβ coliphage ที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากมหาวิทยาลัยโตเกียวในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 70 °C ในการเตรียมเป็น working stock coliphage นำ Qβ coliphage มา culture ในแบคทีเรียโฮสต์ (ในข้อ 3.3.3.1) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง sterile cellulose nitrate filter (pore-size 0.45 μm) โดยใช้หลอดทดลองที่ผ่านการ sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C กรองรับส่วนที่ผ่านการกรองซึ่งเป็น Qβ coliphage สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ Qβ coliphage ทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงพยาบาล โดยทำการตรวจสอบค่าความเข้มข้นของ Qβ coliphage และทำการเก็บ Qβ coliphage ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C

ตาราง 2 แสดงเงื่อนไขการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์

ปัจจัยการทดลอง	น้ำเสียที่ใช้ในการทดลอง	เงื่อนไขการทดลอง	ภาวะการทดลอง/ การเก็บตัวอย่าง
1 ^a สารอินทรีย์ที่มีผลต่อการคงชีพของจุลินทรีย์	น้ำเสียสังเคราะห์	- ปรับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ (COD) : 0, 20, 50, 100 mg/l	ก. ทุกปัจจัยการทดลองจะทำการทดลองกับ <i>E.coli</i> K-12, F ⁺ (A/λ) และ Qβ coliphage อย่างละ 1 ชุด โดยทุกปัจจัยการทดลองจะทำการเติม <i>E.coli</i> K-12, F ⁺ (A/λ) และ Qβ coliphage ให้มีระดับความเข้มข้นระหว่าง 10 ⁴ -10 ⁵ CFU/ml และ 10 ³ -10 ⁴ PFU/ml ตามลำดับ
2 ^b ความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์	น้ำเสียสังเคราะห์ (ที่มีระดับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ให้การคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุด จากผลการทดลอง 1)	- ปรับความเข้มข้นของคลอรีน : 0, 1, 1.3, 1.5, 2 mg/l	ข. ทุกการทดลองจะตรวจสอบลักษณะสมบัติของน้ำ ทางกายภาพและเคมี เช่น pH, COD, residual chlorine
3 ^b pH ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน	น้ำเสียสังเคราะห์ (มีสถานะเช่นเดียวกับปัจจัยการทดลอง 2 และที่ระดับความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์จากผลการทดลอง 2)	- ปรับ pH 5, 6.6, 7, 8	ค. เก็บชุดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C
4 ^b สารอินทรีย์ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน	น้ำเสียสังเคราะห์ (ที่มีความเข้มข้นของคลอรีนในระดับที่ใช้ในปัจจัยการทดลอง 3)	- ปรับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ (COD) : 50, 100, 200 mg/l	ง. เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์เวลาต่าง ๆ โดยทำการเติม 0.1 ml 10% โซเดียมไฮโอซัลเฟต ที่ sterile แล้ว ในตัวอย่างเพื่อทำลายคลอรีนที่ตกค้าง
5 ^b ตะกอนแขวนลอยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน	น้ำเสียสังเคราะห์ (ที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์และคลอรีนในระดับที่ใช้ในปัจจัยการทดลอง 3)	- ปรับตะกอนแขวนลอย : 0 , 20, 50, 100 mg/l	
6 ^b NH ₃ -N ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน	น้ำเสียสังเคราะห์ (ที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์และคลอรีนในระดับที่ใช้ในปัจจัยการทดลอง 3)	- ปรับความเข้มข้นของ NH ₃ -N : 7, 14, 28 mg/l	

a = เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์เวลา 0 , 10 , 20 , 30 , 60 , 120 , 180 และ 240 นาที

b = เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์เวลา 0 , 10 , 20 , 30 และ 60 นาที สำหรับการทดลอง *E.coli* K-12,

F⁺(A/λ) จะเพิ่มเวลาในการเก็บตัวอย่างในช่วง 5 นาทีแรก เนื่องจาก *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว

ตาราง 3 แสดงเงื่อนไขการทดลองในน้ำเสียโรงพยาบาล

ชุดทดลอง	สัญลักษณ์ที่ใช้	เชื้อที่ใช้ในการทดลอง	เงื่อนไขการทดลอง		ภาวะการทดลอง/การเก็บตัวอย่าง
			สภาวะน้ำเสีย	การเติมคลอรีน	
1 (ชุดควบคุม 1)	A1	-	ไม่ปรับสภาพ	-	<p>ก.ชุดทดลองสัญลักษณ์ A สำหรับ การทดลอง <i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ) โดยทำการเติม <i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ) ให้มีระดับความเข้มข้นระหว่าง 10⁴-10⁵ CFU/ml (ยกเว้นชุดทดลอง A1 (ชุดควบคุม 1) ไม่เติม <i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ))</p> <p>ข.ชุดทดลองสัญลักษณ์ B สำหรับ การทดลอง coliphage โดยทำการเติม Qβ coliphage ให้มีระดับความเข้มข้นระหว่าง 10³-10⁴ PFU/ml (ยกเว้นชุดทดลอง B1(ชุดควบคุม 1) ไม่มีการเติม Qβ coliphage)</p> <p>ค.ชุดทดลองที่เติมคลอรีน จะทำการเติมคลอรีนให้มีความเข้มข้นเท่ากันทุกชุดทดลอง โดยให้มีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลาย จุลินทรีย์จากการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์</p> <p>ง.ทุกชุดทดลองจะตรวจสอบสภาพน้ำทางกายภาพและเคมี เช่น pH, COD, residual chlorine, SS และ NH₃-N</p> <p>จ.ชุดทดลองเก็บไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส</p> <p>ฉ.เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งสองที่ช่วงเวลา 0, 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที โดยทำการเติม 0.1 ml 10% โซเดียมไฮโอซัลเฟต ที่ sterilized แล้ว ในตัวอย่างเพื่อทำลายคลอรีนที่ตกค้าง</p>
	B1	-			
2 (ชุดควบคุม 2)	A2	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ไม่ปรับสภาพ	-	
	B2	Qβ coliphage			
3 (ชุดควบคุม 3)	A3	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ไม่ปรับสภาพ	✓	
	B3	Qβ coliphage			
4	A4	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ปริมาณสารอินทรีย์ 2 เท่า ของน้ำที่ใช้ในชุดทดลอง 1	✓	
	B4	Qβ coliphage			
5	A5	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ตะกอนแขวนลอย 2 เท่า ของน้ำที่ใช้ในการทดลอง 1	✓	
	B5	Qβ coliphage			
6	A6	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	แอมโมเนียไนโตรเจน 10 เท่า ของน้ำที่ใช้ในการทดลอง 1	✓	
	B6	Qβ coliphage			
7 (ชุดควบคุม 4)	A7	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ปรับ pH ของตัวอย่างน้ำให้มี pH 6.6	-	
	B7	Qβ coliphage			
8	A8	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ปรับ pH ของตัวอย่างน้ำให้มี pH 6.6	✓	
	B8	Qβ coliphage			
9	A9	<i>E.coli</i> K-12, F'(A/λ)	ปรับ pH ของตัวอย่างน้ำให้มี pH 8	✓	
	B9	Qβ coliphage			

3.3.2 stock น้ำเสียสังเคราะห์

น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย

- H ₂ O	2	ลิตร
- glucose	6	กรัม
- peptone	6	กรัม
- yeast extract	0.6	กรัม
- (NH ₄) ₂ SO ₄	4.8	กรัม
- KH ₂ PO ₄	0.96	กรัม
- MgSO ₄	1.2	กรัม
- MnSO ₄	0.108	กรัม
- FeCl ₃	0.006	กรัม
- CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.012	กรัม
- NaHCO ₃	0.6 – 0.8	กรัม

นำสารละลายที่ได้ไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C

3.3.3 stock แอมโมเนียไนโตรเจน : นำ (NH₄)₂SO₄ จำนวน 2.357 g ละลายในน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 250 ml นำไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C

3.3.4 stock สารละลายคลอรีน 1000 mg/l : นำแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ (Ca(OCl₂)) 64 % จำนวน 0.7812 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 500 ml เก็บไว้ในที่ที่บดแสง ใช้ภายใน 1 สัปดาห์ และทำการตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายก่อนใช้ทุกครั้ง

3.3.5 stock ตะกอน : นำตะกอนจากปอดตกตะกอนในระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลหาดใหญ่ มาปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 20 นาที เอาส่วน supernatant ทิ้ง จากนั้นนำตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่นและปั่นให้ตกตะกอน ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อชะล้างปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำที่ปนมากับตะกอนออกไป สำหรับการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์จะนำตะกอนดังกล่าวไปเติมในน้ำกลั่นที่ผ่านการนำไป sterile ใน autoclave 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C สำหรับการทดลอง

ในน้ำเสียโรงพยาบาลจะนำตะกอนดังกล่าวไปเติมในน้ำเสียจากโรงพยาบาล โดยให้มีปริมาณของตะกอนที่มีความเข้มข้นสูงแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณตะกอนแขวนลอยในน้ำ เมื่อทราบปริมาณความเข้มข้นของตะกอนแขวนลอยแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองในปัจจุบันตะกอนแขวนลอยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีนในน้ำเสีย โดยการเจือจางให้ชุดทดลองมีปริมาณตะกอนตามที่ได้กำหนดไว้ในตาราง 2 และ 3 ในการทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียโรงพยาบาลตามลำดับ

3.4 วิธีการดำเนินการทดลอง

สำหรับการดำเนินการทดลองในปัจจุบันต่าง ๆ ในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงพยาบาลมีรายละเอียดดังนี้

3.4.1 การทดลองในน้ำเสียสังเคราะห์

การทดลองเพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของ *E. coli* และ bacteriophage เมื่อมีการเติมคลอรีนในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการทดลองดังแสดงในตาราง 2 โดยเริ่มต้นจากการทดลองระดับสารอินทรีย์ในน้ำที่มีผลต่อการคงอยู่ของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์เมื่อมีปริมาณสารอินทรีย์ในเทอม COD ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการทดลองโดยเลือกระดับสารอินทรีย์ที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุด นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์เมื่อน้ำมีความเข้มข้นของคลอรีนแตกต่างกัน จากนั้นนำผลที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ไปทำการทดลองปัจจัยต่าง ๆ ต่อไป ซึ่งได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณตะกอนแขวนลอย ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน และ ปริมาณสารอินทรีย์ โดยจะเลือกความเข้มข้นของคลอรีนที่เติมลงไปใต้น้ำที่มีผลต่อการทำลายเชื้อ และระดับสารอินทรีย์ที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุด เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่เอื้อต่อการทำลายจุลินทรีย์ หรือปัจจัยที่ขัดขวางการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน โดยมีรายละเอียดของการทดลองปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

3.4.1.1 การทดลองปัจจัยของปริมาณสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการคงอยู่ของจุลินทรีย์

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 4 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในเทอม COD 0 (ชุดควบคุม), 20, 50 และ 100 mg/l โดยนำ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์ในเทอม COD 7000 mg/l มาจำนวน 0, 2, 5 และ 10 ml ลงในขวดแก้วขนาด 1000 ml หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ sterile ด้วยความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาทีให้ได้

ปริมาตร 700 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำชุดทดลอง พร้อมกับขวดน้ำสำหรับตรวจสอบอุณหภูมิของน้ำโดยเฉพาะไปตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างน้ำชุดละ 200 ml ไปทำการตรวจสอบอุณหภูมิ, pH และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ ส่วนตัวอย่างน้ำที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาเริ่มต้น, 10, 20, 30, 60, 120, 180 และ 240 นาที

3.4.1.2 การทดลองปัจจัยความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 5 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีการเติมคลอรีนให้ความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 0 (ชุดควบคุม), 1, 1.3, 1.5 และ 2 mg/l ซึ่งตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองทุกชุดทดลองจะมีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.1 โดยนำ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยแต่ละชุดทดลองทำการเตรียมตัวอย่าง 700 ml จากนั้นนำชุดทดลอง พร้อมกับขวดน้ำสำหรับตรวจสอบอุณหภูมิของน้ำโดยเฉพาะไปตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกชุดละ 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ของตัวอย่างน้ำในแต่ละชุดทดลอง ส่วนตัวอย่างน้ำที่เหลือจำนวนชุดละ 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน แล้วเติม stock สารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l ในปริมาณ 0, 0.5, 0.65, 0.75 และ 1 ml ใช้แท่งแก้วคนอย่างรวดเร็ว ทำการเก็บตัวอย่างในเวลาเริ่มต้น, 10, 20, 30 และ 60 นาที สำหรับการทดลองของ coliphage ในขณะที่การทดลอง *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) เพิ่มการเก็บตัวอย่าง ณ เวลา 5 นาที เนื่องจาก *E.coli* K-12, F⁺(A/λ) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดยในระหว่างการศึกษทำการเก็บชุดทดลองไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C และวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีนตกค้าง ณ เวลาเริ่มต้นและ 30 นาที ตามลำดับ

3.4.1.3 การทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 4 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีการปรับ pH ด้วย 6 N NaOH และ 6 N H₂SO₄ ให้ตัวอย่างน้ำมี pH 5, 6.6, 7 และ 8 ซึ่งตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองทุกชุดทดลองจะมีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.1 และนำไปเติม

คลอรีนให้มีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากันทุกชุดทดลองโดยควบคุมให้มีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.2 โดยนำ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่มีการคงอยู่ของของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลอง 3.4.1.1 โดยแต่ละชุดทดลองทำการเตรียมตัวอย่าง 700 ml จากนั้นนำชุดทดลอง พร้อมกับขวดน้ำสำหรับตรวจสอบอุณหภูมิของน้ำโดยเฉพาะ ไปตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกชุดละ 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ของตัวอย่างน้ำในแต่ละชุดทดลอง ส่วนตัวอย่างน้ำที่เหลือจำนวนชุดละ 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำไปเติม stock สารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l ให้ชุดทดลองมีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.2 ใช้แท่งแก้วคนอย่างรวดเร็ว ทำการเก็บตัวอย่างในเวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.1.2

3.4.1.4 การทดลองปัจจัยสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 3 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่ใช้การทดลองในข้อ 3.4.1.2 (ชุดควบคุม) และที่มีปริมาณสารอินทรีย์ 0.5 และ 2 เท่าของชุดควบคุม ซึ่งทุกชุดทดลองจะทำเติมสารละลายคลอรีนให้มีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากัน โดยมีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 โดยนำ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณสารอินทรีย์ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยแต่ละชุดทดลองทำการเตรียมตัวอย่าง 700 ml จากนั้นนำชุดทดลอง พร้อมกับขวดน้ำสำหรับตรวจสอบอุณหภูมิของน้ำโดยเฉพาะ ไปตั้งทิ้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกชุดละ 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ของตัวอย่างน้ำของแต่ละชุดทดลอง ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวนชุดละ 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำไปเติม stock สารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l ให้ชุดทดลองมีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์และมีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 ทำการเก็บตัวอย่างในเวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.1.2

3.4.1.5 การทดลองตะกอนแขวนลอยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 4 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีตะกอนแขวนลอย 0 (ชุดควบคุม), 20, 50 และ 100 mg/l ซึ่งตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองทุกชุดทดลองจะมีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.1 และมีการเติมคลอรีนให้มีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับทุกชุดทดลองโดยควบคุมให้มีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 โดยนำ stock ของตะกอน และ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์มาปรับให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของตะกอนแขวนลอย 0 (ชุดควบคุม), 20, 50 และ 100 mg/l และมีปริมาณสารอินทรีย์ที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.1 โดยแต่ละชุดทดลองทำการเตรียมตัวอย่าง 700 ml จากนั้นนำชุดทดลอง ไปตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกชุดละ 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ และปริมาณตะกอนแขวนลอยของตัวอย่างน้ำในแต่ละชุดทดลอง ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวนชุดละ 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E. coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำไปเติม stock สารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l ให้ชุดทดลองมีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์และมีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 ให้แก่แกวคนอย่างรวดเร็ว ทำการเก็บตัวอย่างในเวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลอง ในข้อ 3.4.1.2

3.4.1.6 การทดลองปัจจัยแอมโมเนียไนโตรเจนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยคลอรีน

ดำเนินการทดลองโดยแบ่งชุดทดลองสำหรับ *E. coli* และ coliphage อย่างละ 3 ชุดทดลอง ประกอบด้วยชุดทดลองที่มีแอมโมเนียไนโตรเจน 7 (ชุดควบคุม), 14 และ 28 mg/l ซึ่งตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลอง ทุกชุดทดลองจะมีปริมาณสารอินทรีย์ในระดับที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.1 และมีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับทุกชุดทดลองโดยควบคุมให้มีความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 โดยนำ stock ของแอมโมเนียไนโตรเจน และ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์มาปรับให้มีปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนเท่ากับ 7 (ชุดควบคุม), 14 และ 28 mg/l และมีปริมาณสารอินทรีย์ที่มีการคงอยู่ของจุลินทรีย์มากที่สุด โดยแต่ละชุดทดลองทำการเตรียมตัวอย่าง 1000 ml จากนั้นนำชุดทดลอง ไปตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 15 นาที แล้วแบ่ง

ตัวอย่างน้ำออกซุดละ 500 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียในโตรเจน (โดยวิธี titrimetric method) และ ปริมาณสารอินทรีย์ ของน้ำตัวอย่างในแต่ละซุดทดลอง ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวนซุดละ 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน แล้วนำไปเติม stock สารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l ให้ซุดทดลองมีความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์และมีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดลองปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในข้อ 3.4.1.3 ใช้แท่งแก้วคนอย่างรวดเร็ว ทำการเก็บตัวอย่างในเวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลอง ในข้อ 3.4.1.2

3.4.2 การทดลองในน้ำเสียโรงพยาบาล

การทดลองถึงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในน้ำเสียจากโรงพยาบาล ซึ่งได้นำตัวอย่างน้ำจากระบบบำบัดน้ำเสียโดยเป็นน้ำเสียก่อนเข้าสู่บ่อเติมคลอรีนจากโรงพยาบาลขนาดใหญ่ มาทำการศึกษา โดยทำการวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของน้ำเสีย แล้วนำมาทำการทดลองการเปลี่ยนแปลงของ *E. coli* และ coliphage ซึ่งแบ่งซุดทดลองสำหรับการทดลอง *E. coli* และ coliphage อย่างละ 8 ซุดทดลอง ดังแสดงในตาราง 3 โดยทุกการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างในเวลาเริ่มต้น, 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที และทำการวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีนทั้งหมดตกค้างในเวลาเริ่มต้น และ 30 นาที โดยมีรายละเอียดในการทดลองดังนี้

ซุดทดลอง 1 (ซุดควบคุม 1) นำตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 500 ml ใส่ขวดแก้วตั้งทิ้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที ทำการตรวจสอบอุณหภูมิ และ pH แล้ววิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ซุดทดลอง 2 (ซุดควบคุม 2) นำตัวอย่างน้ำเสียประมาณ 700 ml ใส่ขวดแก้วตั้งทิ้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที ทำการตรวจสอบอุณหภูมิ และ pH จากนั้นนำตัวอย่างมาจำนวน 500 ml ไปเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml แล้ววิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ซุดทดลอง 3 (ซุดควบคุม 3) นำตัวอย่างน้ำเสีย 700 ml ใส่ขวดแก้วตั้งทิ้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกจำนวน 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ของตัวอย่างน้ำ ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, F⁺(A/λ) หรือ Qβ coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเติมคลอรีนให้มีระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองปัจจัยของ pH ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ในน้ำเสีย

สังเคราะห์จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1.4 แล้วทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ในเวลาต่าง ๆ

ชุดทดลอง 4 นำ stock ของน้ำเสียสังเคราะห์ (จาก 3.3.2) มาเจือจางด้วยตัวอย่างน้ำเสียให้มีปริมาตรทั้งหมด 700 ml โดยทำการเจือจางให้มีระดับสารอินทรีย์ในน้ำประมาณ 2 เท่าของน้ำตัวอย่างใส่ขวดแก้วตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกจำนวน 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของตัวอย่างน้ำ ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน และนำไปเติมคลอรีนที่มีความเข้มข้นที่ใช้ในชุดทดลอง 3 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ชุดทดลอง 5 นำ stock ตะกอน (จาก 3.3.5) มาเจือจางด้วยตัวอย่างน้ำเสียให้มีปริมาตรทั้งหมด 700 ml โดยให้ความเข้มข้นของตะกอนแขวนลอยน้ำประมาณ 2 เท่าของน้ำตัวอย่างใส่ขวดแก้วตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกจำนวน 200 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของตัวอย่างน้ำ ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน และนำไปเติมคลอรีนที่มีความเข้มข้นที่ใช้ในชุดทดลอง 3 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ชุดทดลอง 6 นำ stock ของแอมโมเนียในโตรเจน (จาก 3.3.3) มาเจือจางด้วยตัวอย่างน้ำเสียให้มีปริมาตร 1000 ml โดยให้ปริมาณแอมโมเนียในโตรเจนมีน้ำประมาณ 10 เท่าของน้ำตัวอย่างใส่ขวดแก้วตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกจำนวน 500 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ นำไปตรวจวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของตัวอย่างน้ำ ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน และนำไปเติมคลอรีนให้มีระดับความเข้มข้นที่ใช้ในชุดทดลอง 3 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ชุดทดลอง 7 (ชุดควบคุม 4) นำตัวอย่างน้ำเสียมาปรับ pH ด้วย 6 N NaOH และ 6 N H₂SO₄ ให้ตัวอย่างน้ำมี pH 6.6 โดยเตรียมตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดประมาณ 1500 ml แล้วนำไปตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แบ่งตัว

อย่างน้ำออกเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 500 ml ส่วนแรกจะนำไปทำการตรวจสอบอุณหภูมิ และ pH และ ตรวจวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของตัวอย่าง สำหรับส่วนที่สองนำไปเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ ศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml แล้วทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไป วิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ ขณะที่ตัวอย่างน้ำเสียที่เหลือ (ส่วนที่สาม) นำไป ทดลองในการทดลองที่ 8 ต่อไป

ชุดทดลอง 8 นำตัวอย่างน้ำเสียที่ได้ผ่านการปรับ pH ที่เหลือจากชุดทดลอง 7 ไป ตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ ชนิดที่ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน และนำไป เติมคลอรีนให้มีระดับความเข้มข้นที่ใช้ในชุดทดลอง 3 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไป วิเคราะห์หาปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

ชุดทดลอง 9 นำตัวอย่างน้ำเสียมาปรับ pH ด้วย 6 N NaOH และ 6 N H₂SO₄ ให้ ตัวอย่างน้ำมี pH 8 โดยเตรียมตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองประมาณ 1000 ml ใส่ขวดแก้ว ตั้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างน้อย 15 นาที แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำออกจำนวน ประมาณ 500 ml เพื่อทำการตรวจสอบอุณหภูมิ pH และ ตรวจวิเคราะห์หาลักษณะสมบัติของตัว อย่างน้ำ ส่วนน้ำตัวอย่างที่เหลือจำนวน 500 ml จะทำการเติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการชนิดที่ ต้องการศึกษา (*E.coli* K-12, $F^+(A/\lambda)$ หรือ Q β coliphage) 0.5 ml คนให้เข้ากัน และนำไปเติม คลอรีนให้มีความเข้มข้นที่ใช้ในชุดทดลอง 3 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หา ปริมาณของจุลินทรีย์ ในเวลาต่าง ๆ

อนึ่ง สำหรับชุดทดลองที่เติมคลอรีน จะใช้คลอรีนปริมาณเท่ากันทุกชุดทดลอง โดย เลือกความเข้มข้นของคลอรีนที่มีผลในการทำลายจุลินทรีย์และมีระดับความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ใน การทดลองปัจจัย pH, แอมโมเนียไนโตรเจน, ปริมาณตะกอนแขวนลอย ในการทดลองในน้ำเสีย สังกะหรณ์