บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิลิตร
2. หลอดดักก๊าซ (Durham's tube)
3. ฝาจุกหลอดทดลอง
4. จานแก้วเพาะเชื้อปราศจากเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิลิตร
5. ขวดแก้วปราศจากเชื้อ Durans ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
6. หลอดดูดแก้วปราศจากเชื้อ ขนาด 1.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
7. ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ
8. กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
9. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
10. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

เครื่องมือ

1. ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar Flow)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (BINDER)
3. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Type 420 HERAEMO)
4. หม้อนึ่งอัดไอ (TOMY SS-325)
5. เครื่องชั่ง (Mettler Toledo)
6. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus)
7. เครื่องวัดค่า pH (Metrohm)
8. เครื่องกวนสารละลาย (Heidolph MR2002)
9. เครื่อง Stomacher
10. เครื่อง vortex

สารเคมี

1. Gram stain reagents
    - Crystal violet
    - Safranin O
    - Iodine solution
    - Decolorizer (alcohol)
2. Kovacs' reagent
3. Voges-Proskauer (VP) reagents
4. Alcohol 95%
5. Butterfield's phosphate-buffered water (PBS) (ภาคผนวก ข)
6. Distill water
7. 1 N Sodium Hydroxide (NaOH)
8. Buffered peptone water (ภาคผนวก ข)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth (Merck)
2. Lauryl tryptose (LST) broth ((Merck)
3. EC broth (Difco)
3. Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar (Difco)
4. Tryptone (tryptophane) broth (ภาคผนวก ข)
5. MR-VP broth (Difco)
6. Koser's citrate broth (Difco)
7. Plate count agar (PCA) (ภาคผนวก ข)
8. Nutrient broth (ภาคผนวก ข)
9. MacConkey agar (Difco)

2. วิธีการวิจัย

1. สำรวจและสังเกตเกี่ยวกับการปฏิบัติตามหลักสุขอนามัยของผู้สัมผัสอาหารในโรงอาหาร

ทำการสำรวจและสังเกตการปฏิบัติตัวตามหลักสุขอนามัยของผู้สัมผัสอาหารที่ทำหน้าที่เตรียม ปรุงอาหาร เสิร์ฟอาหาร และจำหน่ายอาหาร ในโรงอาหาร จำนวน 18 คน ซึ่งดัดแปลงจากเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะและผู้สัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2553 (ภาคผนวก ก)

2. วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (ภาพ 3.1)

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทำโดยการใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aspetic technique) ทุกขั้นตอน

2.1.1 เก็บตัวอย่างอาหาร ขนม เครื่องดื่ม และน้ำแข็งจากโรงอาหารโดยบรรจุถุงปราศจากเชื้อ

2.1.2 เก็บตัวอย่างจาน ชาม และช้อนด้วยวิธี swab นำไม้พันสำลีจุ่มลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย PBS (Butterfield's phosphate-buffered water) ที่มีค่า pH 7.2 ในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เช็ดจานและชาม บริเวณตรงกลางให้ได้พื้นที่ประมาณ 2x2 ตารางนิ้ว สำหรับช้อนเช็ดโดยรอบจากปลายขึ้นถึงด้ามจับประมาณ 8 เซนติเมตร นำไม้พันสำลีจุ่มลงในหลอดทดลอง หักไม้พันสำลีโดยดึงไม้ให้โผล่ขึ้นมาจากปากขวด ประมาณครึ่งหนึ่งแล้วหักไม้กับปากขวดแก้ว ปล่อยให้ส่วนที่มีสำลีอยู่ในสารละลาย ปิดหลอดทดลองแช่เย็น นำไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติ

2.2. นำตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาแบ่งชั่ง 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เท PBS (pH 7.2) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างอาหาร(อาหารจะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1:10) นำไปตีให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher นาน 1 นาที สำหรับตัวอย่างในข้อ 2.1.2 ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี PBS 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ตัวอย่างถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1:100)

2.3 เจือจางด้วยวิธี Serial Ten Fold Dilutions จนได้ dilution 1:10,000

2.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างอาหารแต่ละ dilution จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ

2.5 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 40 – 50 องศาเซลเซียส ใส่ลงในจานเพาะเชื้อในข้อที่ 2.4 จานละประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง กลับจานเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำน้ำที่ติดฝาหยดลงมาบนวุ้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.6 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อที่มี 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/g , CFU/ml ของอาหารตัวอย่าง หรือ CFU/ชิ้นภาชนะ

3. วิเคราะห์แบคทีเรียชนิด coliform, fecal coliforms และ *Escherichia coli* (ภาพ 3.2)

3.1 นำตัวอย่าง (ที่เตรียมจากข้อ 2.1-2.2) มาหาปริมาณ MPN/g หรือ MPN/100ml ของ coliform, fecal coliforms และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) ระบบ 9 หลอด (U.S. Food and Drug Administration, 2002) มีการตรวจสอบ 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1.1 การตรวจสอบขั้นต้น (Presumptive test)

เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำตัวอย่างที่เจือจางในระดับ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 3 ระดับใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth ที่มีอาหารอยู่หลอดละ 10 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซไม่น้อยกว่า 1 ใน 3 แต่ละหลอด อ่านผลหลอดที่ให้ผลบวก หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง และหากหลอดใดไม่เกิดก๊าซบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงนำมาตรวจผลอีกครั้งหนึ่ง

3.1.2 การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล (Confirmmed test)

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกในข้อ 3.1.1 (Presumptive test) แต่ละหลอดลงในอาหาร BGLB broth หลอดต่อหลอด จำนวน 1 loop นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซไม่น้อยกว่า 1 ใน 3 แต่ละหลอด อ่านผลหลอดที่ให้ผลบวก บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในแต่ละความเจือจาง นำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN/g หรือ MPN/100ml ของโคลิฟอร์มทั้งหมดในอาหารตัวอย่าง จากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกในขั้นต้น (Presumptive test) ถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth จำนวน 1 loop ลงในอาหาร EC broth หลอดต่อหลอด อีกครั้ง บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48± 2 ชั่วโมง หลอดที่มีก๊าซในหลอดดักก๊าซไม่น้อยกว่า 1 ใน 3 อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก นำไปอ่านผลจากตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN/g หรือ MPN/100ml ของฟีคอลโคลิฟอร์มในอาหารตัวอย่าง

3.1.3 การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (Complete test)

จากหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกนำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของ *E. coli* จะมีลักษณะกลม มีสีเข้มอยู่ตรงกลางและมีสีโลหะ

(Metallic sheen) เหลือบอยู่ จากนั้นถ่ายเชื้อจากโคโลนีดังกล่าวจำนวน 2 - 3 โคโลนี ต่ออาหารแข็ง EMB 1 จานลงในอาหารแข็ง PCA slant นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี IMVic Test โดยมีขั้นตอนดังนี้

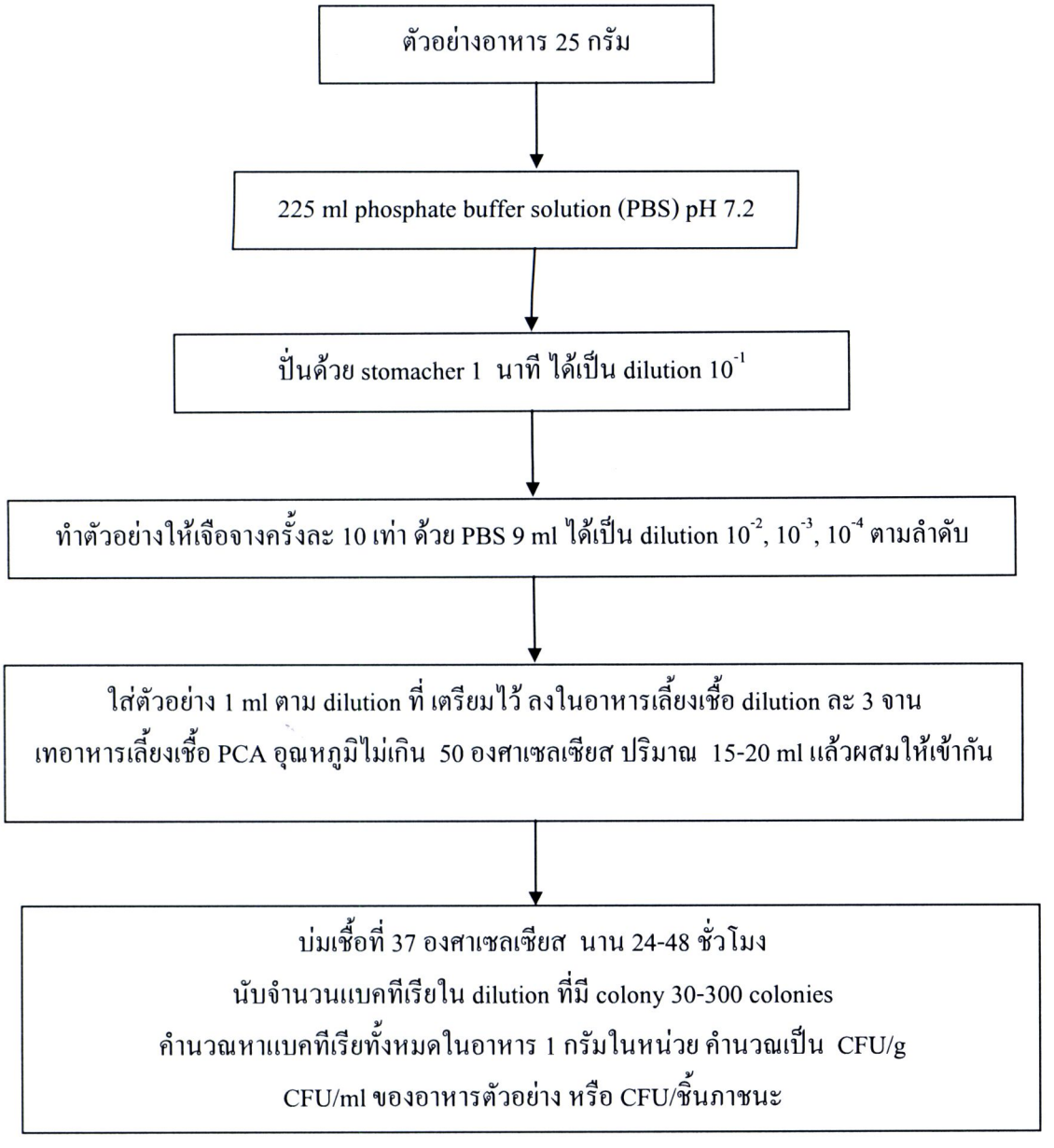
3.1.3.1 Indole production เขี่ยเชื้อลงใน 1 เปอร์เซ็นต์ tryptone broth นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ทดสอบการเกิด indole โดยการหยด Kovac's reagent ปริมาณ 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร ถ้าเป็น *E. coli* จะเกิดชั้นสีแดงที่ส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.2 Methyl red – reactive compounds เขี่ยเชื้อลงใน MR-VP medium นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ทดสอบโดยเติมสารละลาย Methyl red ประมาณ 5 หยด ถ้าเป็น *E. coli* อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

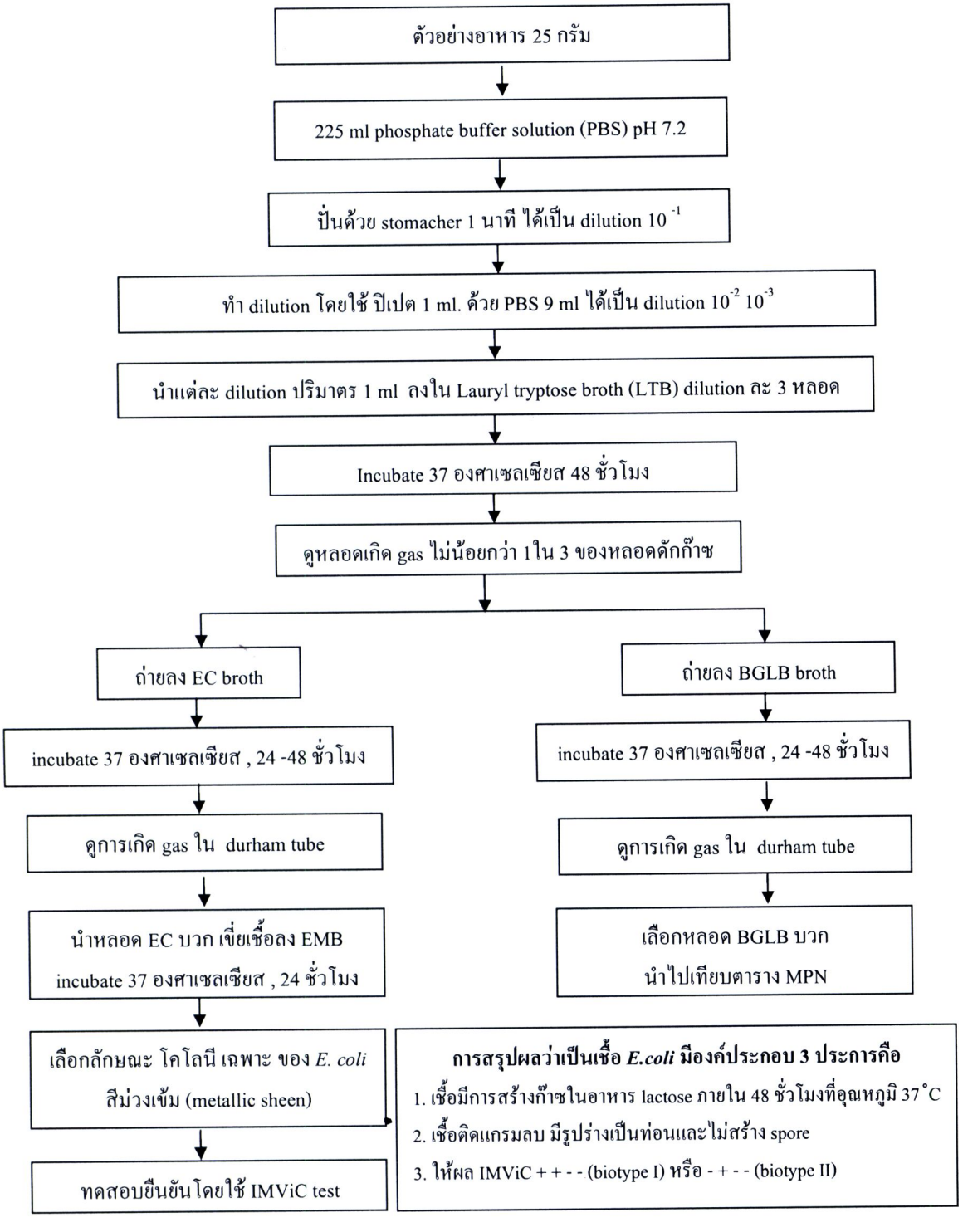
3.1.3.3 Voges - Prokanev(VP)- reaction compounds เขี่ยเชื้อลงใน MR-VP medium นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง หลังจากให้ดูดสารละลายลงในหลอดทดลองจำนวน 1มิลลิลิตร เติมสารละลาย alpha- naphthol 0.6 มิลลิลิตร และ 40%KOH จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมผลึก creatine จำนวนเล็กน้อย ถ้าเป็น *E. coli* สารละลายจะเป็นสีชมพู

3.1.3.4 Utilization of citrate เขี่ยเชื้อลงใน Koser citrate broth นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ถ้าเป็น *E. coli* อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี และไม่มีการเจริญของเชื้อ

ถ้าเป็น *E. coli* ให้ผล IMVic Test + + - - (Biotype I) หรือ - + - - (Biotype II) นำไปอ่านผลจากตาราง MPN เพื่อหาปริมาณ *E. coli* จากหลอด EC broth ที่ให้ผลบวก



ภาพ 3.1 แผนภูมิการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria Count) ด้วยวิธี standard plate count เทคนิคการ pour plate (US.FDA, 2001)



ภาพ 3.2 แผนภูมิการวิเคราะห์แบคทีเรียชนิด coliform, fecal coliforms และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี MPN (Most probable number) ระบบ 9 หลอด

4. วิเคราะห์แบคทีเรียชนิด *Salmonella* sp. เบื้องต้น

4.1 เจือจางตัวอย่างอาหาร 25 กรัมในสารละลาย Buffered peptone water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

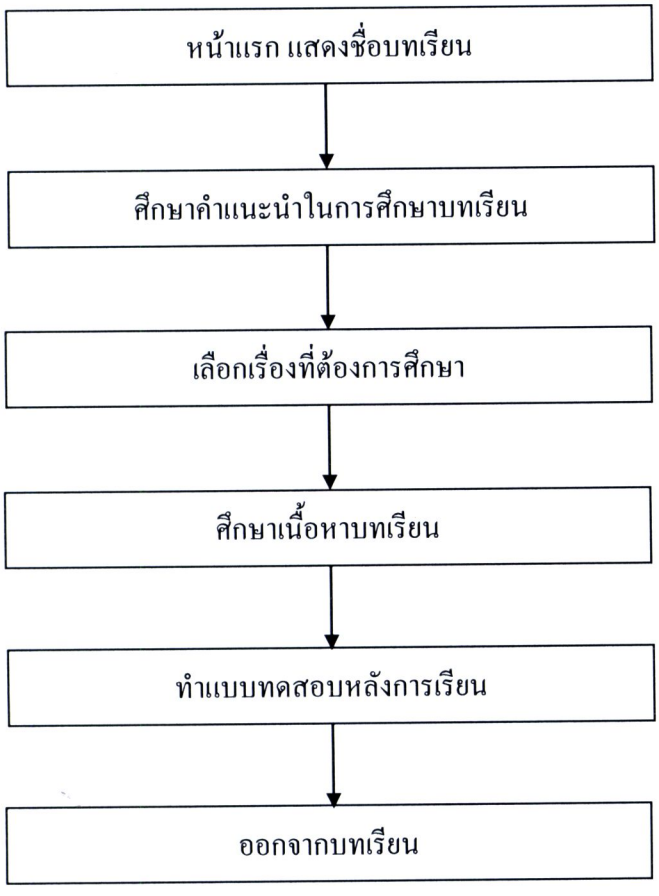
4.2 นำตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.3 ทำการ Streak เชื้อที่เลี้ยงใน Nutrient broth บนอาหาร MacConkey agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* จะมีขนาดเล็ก ไม่มีสี ส่วนโคลิฟอร์มจะมีสีชมพูเข้ม

4.4 นำเชื้อในโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาย้อมสีแกรม *Salmonella* จะมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรมลบ

5. จัดทำสื่อการสอน

5.1 ออกแบบและสร้างสื่อการสอน เรื่องความปลอดภัยของอาหาร จัดทำในรูปแบบหนังสืออิเล็กทรอนิกส์แบบสื่อประสม (Multimedia) โดยใช้โปรแกรม DeskTop Author นำเสนอข้อมูลเนื้อหาสาระในลักษณะแบบสื่อผสมระหว่างสื่อภาพ (Visual Media) เป็นทั้งภาพนิ่งและภาพเคลื่อนไหวแบบวิดีทัศน์ (Video Clips) ผู้อ่านสามารถเลือกชมศึกษาข้อมูลในส่วนต่าง ๆ ได้ และควบคุมบทเรียนได้ด้วยตนเอง โดยเนื้อหาเป็นเรื่องความปลอดภัยของอาหารด้านจุลินทรีย์, สาเหตุการปนเปื้อนของจุลินทรีย์, แหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์, แบคทีเรียที่เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อน, หลักการจัดการอันตรายด้านจุลินทรีย์, สุขอนามัยของผู้ประกอบอาหารและผู้บริโภค โดยจัดทำผังงานดังนี้



5.2 นำหนังสืออิเล็กทรอนิกส์แบบหนังสือสื่อประสมที่สร้างขึ้นให้ผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 3 ท่าน ทำการตรวจสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (Content Validity) ด้านเนื้อหาการดำเนินเรื่อง ด้านภาษา ด้านกราฟิก ด้านรูปแบบการนำเสนอ ทำการปรับแก้ตามข้อเสนอแนะของผู้เชี่ยวชาญ

5.3 นำหนังสืออิเล็กทรอนิกส์แบบหนังสือสื่อประสม ไปทดลองใช้กับนักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 จำนวน 40 คน และให้นักเรียนแสดงความคิดเห็นที่มีต่อบทเรียน (ภาคผนวก จ) โดยแบบสอบถามความคิดเห็นตามวิธีของลิเคอร์ท (Likert) โดยใช้รูปแบบมาตราส่วนประมาณค่า (rating scale) 5 ระดับ (ล้ดดาวัลย์, 2547)

5 หมายถึง มีความเห็นด้วยมากที่สุด

4 หมายถึง มีความเห็นด้วยมาก

3 หมายถึง มีความเห็นด้วยปานกลาง

2 หมายถึง มีความเห็นด้วยน้อย

1 หมายถึง มีความเห็นด้วยน้อยที่สุด

การแปลความหมายค่าเฉลี่ยน้ำหนักคะแนนโดยแบ่งออกเป็นมาตราส่วนประมาณค่า 5 ระดับ ดังนี้

คะแนนเฉลี่ย	4.50-5.00	หมายถึง	มีความเห็นด้วยมากที่สุด
คะแนนเฉลี่ย	3.50-4.49	หมายถึง	มีความเห็นด้วยมาก
คะแนนเฉลี่ย	2.50-3.49	หมายถึง	มีความเห็นด้วยปานกลาง
คะแนนเฉลี่ย	1.50-2.49	หมายถึง	มีความเห็นด้วยน้อย
คะแนนเฉลี่ย	1.00-1.49	หมายถึง	มีความเห็นด้วยน้อยที่สุด