



การคัดลอกจากหนังสือและการผลิตไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์สำหรับไปรษณีย์

นางสาวกนกภรณ์ ศรีรัมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของเอกสารศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมนิเวศภาค ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตโปรไบโอติกบราซิลสำหรับไก่กระทง
โดย นางสาวกนกภรณ์ ศรีแย้ม

ได้รับอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมชีวภาพ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.มงคล หวังสถิตย์วงศ์)

17 พฤษภาคม 2555

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล รังสาดทอง)

กรรมการ

(อาจารย์ ดร.วิชัย ดำรงโกภักดิ์)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนิต ผิวน้ำ)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมจิตร ถนอมวงศ์วัฒน์)

600256389

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



250792

การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตโปรไบโอติกบาซิลัสสำหรับไก่กระทอง



นางสาวกนกภรณ์ ศรีเยี่ยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ชื่อ : นางสาวกนกภรณ์ ศรีแย้ม
ชื่อวิทยานิพนธ์ : การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตโปรไบโอติกบาศิลล์
สำหรับไก่กระทง
สาขาวิชา : เทคโนโลยีอุตสาหกรรมชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.วิชัย คำรงโกคณัท
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิด พิวนิม
ปีการศึกษา : 2554

บทคัดย่อ

250792

Escherichia coli และ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Cellulitis ในไก่กระทง ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงคัดแยกโปรไบโอติกซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้อและผลิตเอนไซม์ช่วยย่อย พบว่า *Bacillus* spp. จำนวน 85 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่สุภาพดีจำนวน 40 ตัวอย่าง *Bacillus* B04 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.58 ± 0.21 และ 1.35 ± 0.07 เซนติเมตร ตามลำดับ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion และผลิตเอนไซม์ช่วยย่อย ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส บนอาหาร Skim Milk Agar, Starch Agar, Carboxymethyl Cellulose Agar และ Tributyrin Agar ด้วยวิธี Agar Well Diffusion นอกจากนั้น *Bacillus* B04 มีความสามารถทนต่อสภาวะกรดต่างได้ตั้งแต่ 2 ถึง 6.5 เป็นระยะเวลา 60 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับในทางเดินอาหารของไก่ เมื่อส่งเชื้อเพื่อจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่า *Bacillus* B04 เป็นสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 2057 สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารราคาถูก การใช้ Molasses ที่เติม Monosodium Glutamate ในอัตราส่วน 40 g/l : 8 g/l ให้ปริมาณเซลล์ที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* B04 โดยให้ปริมาณเซลล์จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses และอาหาร Nutrient Broth ปริมาณ 6.750×10^8 และ 2.900×10^8 cfu/ml ค่ากรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารนี้ เท่ากับ 6.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การผลิต *Bacillus subtilis* B04 แห่งทั้งในรูปแบบผงและเม็ดด้วยวิธีอบแห้งแบบถาด ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยได้ปริมาณเซลล์มีชีวิตและความชื้นใกล้เคียงกัน แต่ *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้งทำได้ง่ายกว่า สำหรับการเก็บรักษาผงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าการเก็บรักษาผงเชื้อที่อุณหภูมิต่ำให้ผลดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงเล็กน้อย ให้ปริมาณเซลล์มีชีวิต 4.750×10^9 และ 4.100×10^9 cfu/g ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อใช้เป็น

250792

หัวข้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้งผงยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และผลิตภัณฑ์ไขมันช่วยย่อยได้
(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 139 หน้า)

คำสำคัญ : โปรไบโอติก บาซิลลัส เอสเซอริเชีย โคไล สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส

กวี ตรี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Name : Miss Kanogporn Sriyam
Thesis Title : Strain Selection and Production of Probiotic *Bacillus* spp. for Broiler
Chicken
Major Field : Bio-Industrial Technology
King Mongkut's University of Technology North Bangkok
Thesis Advisor : Dr.Vichai Domrongpookaphan
Co-Advisor : Associate Professor Dr.Thanit Pewnim
Academic Year : 2011

Abstract

250792

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* are known the causative bacteria of the avian Cellulitis in broiler chickens, resulting in the large economic loss of the chicken farming industry. In order to screen the probiotic for antimicrobial activity against broiler chicken pathogen and for producing digestive enzyme, eighty-five of *Bacillus* spp. were isolated from the intestine of forty healthy broiler chickens. In agar-well diffusion assay, *Bacillus* spp. B04 was presented to be strong antibacterial activity to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with the inhibition zones of 1.58 ± 0.21 cm and 1.35 ± 0.07 cm in average diameter, respectively. In addition, this strain was found to produce the digestive enzymes, e.g. protease, amylase, cellulase and lipase, from different media such as skim milk agar, starch agar, carboxymethyl cellulose agar and tributyrin agar, respectively. This strain was stable during pH from 6.5 to 2.0 for 60 minutes which was similar to the condition in an intestinal tract of broiler chicken. This strain was identified as *Bacillus subtilis* TISTR 2057 by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). The medium with molasses and monosodium glutamate ratio of 40 g/l : 8 g/l was used as a cheap alternative media for the growth of *Bacillus subtilis* B04. The viable cell of this strain grew on the modified media and the nutrient broth were 6.750×10^8 and 2.900×10^8 cfu/ml, respectively. The optimal pH and temperature for *Bacillus subtilis* B04 in this medium were pH 6.5 and 37°C, respective. *Bacillus subtilis* B04 was dried in both powder and tablet forms at temperature of 80°C for 40 minutes. The viable cells and moisture contents in both forms were in the same range. However, *Bacillus subtilis* B04 was more easily processed in powder forms. *Bacillus subtilis* B04 powder was stored at 4°C and 30°C for 3 months. The strain could survive in low temperature (4.750×10^9 cfu/g) slightly better than in high temperature (4.100×10^9 cfu/g) When *Bacillus*

250792

subtilis B04 powder was used as inoculums, this culture could retain the antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and also produced the digestive enzymes.

(Total 139 pages)

Keywords : Probiotic, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Richard Demroz

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร.วิชัย ดำรงโกภักดิ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ธนิต ผิวนิยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิไล รังสาดทอง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ ที่กรุณาสละเวลามาเป็น คณะกรรมการในการสอบรวมทั้งให้คำแนะนำ และข้อคิดอันเป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาท วิชาความรู้ และให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาการเรียนที่ภาควิชานี้ และการวิจัยนี้ได้รับ ทุนอุดหนุนบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ และสำนักวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ (STRl) จึงขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยและ STRl ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคุณอุทร ชิขุนทด และคุณวันเพ็ญ น้อยเมือง ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด และเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกให้ งานวิจัยนี้ผ่านพ้นได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาโท MBIT และคุณนพดล แสงคำ ที่คอยให้ กำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการเรียนและทำงานวิจัย ขอขอบคุณน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเรียน และให้ กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบพระคุณคุณย่า และขอขอบคุณน้อง ๆ ที่ให้ ความรัก ความห่วงใย และกำลังใจมาโดยตลอด และหากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์แก่ผู้ใด ข้าพเจ้าขอ มอบความดีทั้งหมดให้แก่ทุกท่านที่กล่าวมาข้างต้น

กนกภรณ์ ศรีเยี่ยม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ของผลการวิจัย	2
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
1.6 ระยะเวลาการทำวิจัย	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	5
2.1 ไก่เนื้อ	5
2.2 โรคที่พบในการเพาะเลี้ยงไก่เนื้อ	7
2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)	12
2.4 การศึกษาโพรไบโอติกสำหรับไก่เนื้อ	20
2.5 แบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	22
2.6 การผลิต <i>Bacillus</i> spp.	32
2.7 การทำเชื้อในรูปผงแห้ง	36
2.8 รายงานการทำ <i>Bacillus</i> ในรูปผงแห้ง	37
2.9 การทำเชื้อในรูปผงแห้งด้วยวิธีการอบแห้งด้วยวิธี Tray Drying	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	39
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	39
3.2 สารเคมีและวัตถุดิบ	40
3.3 เชื้อจุลินทรีย์	41
3.4 แผนการดำเนินงาน	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	51
4.1 ผลการคัดแยก <i>Bacillus spp.</i> จากลำไส้ไก่เนื้อ	51
4.2 ผลการคัดเลือก <i>Bacillus spp.</i> ที่ยับยั้ง <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	52
4.3 ผลการคัดเลือก <i>Bacillus spp.</i> ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ด้วยวิธี Agar Well Diffusion	55
4.4 การตรวจลักษณะของ <i>Bacillus B04</i> และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น	58
4.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ <i>Bacillus subtilis B04</i>	60
4.6 การทดสอบความทนต่อสภาวะกรดของ <i>Bacillus subtilis B04</i>	62
4.7 ผลการผลิต <i>Bacillus subtilis B04</i> ในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก	63
4.8 การหาสูตรที่เหมาะสมของอาหาร Molasses สำหรับการเจริญ การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของ <i>Bacillus subtilis B04</i>	73
4.9 ผลการศึกษาการเจริญของ <i>Bacillus subtilis B04</i> ในอาหาร Molasses	78
4.10 ผลการผลิต <i>Bacillus subtilis B04</i> ในรูปเม็ดและผงโดยวิธีการอบแห้งด้วยวิธี Tray Drying	79
4.11 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อ <i>Bacillus subtilis B04</i> ในรูปผงแห้ง	81
4.12 ผลการศึกษาการใช้ <i>Bacillus subtilis B04</i> ผงแห้งเป็นหัวเชื้อ เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน	82
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	85
5.1 สรุปผลการทดลอง	85
5.2 ข้อเสนอแนะ	86
บรรณานุกรม	87
ภาคผนวก ก	105
อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี	106
ภาคผนวก ข	113
การวิเคราะห์	114
ภาคผนวก ค	117
การทดลองและผลการทดลอง	118

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการส่งเสริมเพื่อจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง ประเทศไทย (วว.)	135
ประวัติผู้วิจัย	139

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	7
4-1	53
4-2	55
4-3	62
4-4	72
4-5	72
4-6	73
4-7	75
4-8	77
4-9	80
4-10	82
4-11	84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก-1	ลักษณะของผง <i>Bacillus subtilis</i> B04 หลังทำแห้งด้วยวิธี Tray Drying และเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน
	133

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ไก่เนื้อ	5
2-2 ทางเดินอาหารของไก่เนื้อ	6
2-3 ลักษณะของลำไส้ไก่	6
2-4 คุณลักษณะเบื้องต้นของโปรไบโอติกเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตามทฤษฎีเบื้องต้นในการคัดเลือก	13
2-5 Photomicrographs โดยการ Wet Mounts จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ของ <i>Bacillus azotofixans</i> A) Strain F-100, B) Strain BE-4, C) Strain P3L-5T, D) Strain TE-10, Bar = 10 ไมโครเมตร	22
2-6 เซลล์ <i>Bacillus megaterium</i> ที่คัดแยกจาก Phyllosphere ของหญ้า (<i>Tillandsia bartramii</i>) แสดงสปอร์ และ Spheric Stores (Polyhydroxybutyrate) ที่ชัดเจน (TEM Photography 18,000X)	23
2-7 Fixed Smears ของ <i>Bacillus</i> ย้อมด้วย Sudan Black B แล้วล้างด้วย Xylol และ ย้อมทับ Safranin แสดง Intracellular Lipid Material (Dark Granules และ Areas) หลังการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง บน Plain Tryptose Agar Slants (กำลังขยาย 2500X) : 1) <i>Bacillus megaterium</i> , 2) <i>Bacillus mycoides</i> , 3) <i>Bacillus cereus</i> และ 4) <i>Bacillus anthracis</i>	24
2-8 Fixed Smears หลังการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมงบน Plain Tryptose Agar Slant ของ Intracellular Lipid Material ด้วย Sudan Black B-Safranin โดยที่ 1) <i>Bacillus licheniformis</i> , 2) <i>Bacillus subtilis</i> , 3) <i>Bacillus brevis</i> และ 4) <i>Bacillus sphaericus</i>	24
2-9 การย้อม Spores ของ <i>Bacillus brevis</i> ด้วย Dyar's Cell Wall Stain เกิดสีของ Congo Red รอบ ๆ Spore (Light Micrograph 2,000X)	25
2-10 <i>Bacillus fusiformis</i> เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (1000X)	25
2-11 การตัดขวาง Partly Disrupted Spores ของ <i>Bacillus stearothermophilus</i> แสดงความสัมพันธ์กันของตำแหน่งและโครงสร้างของ Outer (OC) และ Inner Coats (IC), Cortex (CX), Membrane (M) และ Spore Protoplasmic Membrane (PM) (130,000X)	26
2-12 การเกิด ไบโอฟิล์มของ <i>Bacillus coagulans</i> บน Granular Activated Carbon (SEM)	26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
3-1	ลักษณะซากไก่เนื้อที่ใช้ในการคัดเลือก <i>Bacillus</i> spp.	42
3-2	ตัวอย่างลำไส้ไก่เนื้อที่ได้จากไก่เนื้อที่มีสุขภาพดี	42
4-1	เชื้อที่ให้ลักษณะของ <i>Bacillus</i> spp. และเชื้อเดี่ยวที่ได้จากการ Cross Streak Plate	51
4-2	การคัดเลือก <i>Bacillus</i> spp. B02, B04 และ B26 (control บนซ้าย) แสดงบริเวณยับยั้งได้แก่ <i>Escherichia coli</i> (ก) และ <i>Staphylococcus aureus</i> (ข) บริเวณใส ได้แก่ อะไมเลส (ค) โปรติเอส (ง) เซลลูเลส (จ) และไลเปส (ช)	56
4-3	ลักษณะโคโลนี <i>Bacillus</i> B04 บนอาหาร Nutrient Agar	59
4-4	ลักษณะ <i>Bacillus</i> B04 ที่กำลังขยาย 40x และ 100x ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	59
4-5	การเคลื่อนที่ <i>Bacillus</i> B04 ในอาหาร Motility Test	59
4-6	<i>Bacillus</i> B04 บนอาหาร Mannitol Salt Agar หลังเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	60
4-7	ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีชีวิตในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	60
4-8	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> B04 มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายหลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	63
4-9	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> B04 มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	65
4-10	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> B04 มีชีวิตในอาหารที่เตรียมจากผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตร หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	67
4-11	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> B04 มีชีวิตในอาหารที่ถูกคัดเลือกหลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth	71
4-12	ปริมาณ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่มีชีวิตจากการเพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ที่ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่ากรดต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-13 การศึกษาการเจริญของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ในอาหาร Molasses	79
4-14 ลักษณะเม็ดยeast <i>Bacillus subtilis</i> B04 หลังทำแห้งด้วยวิธี Tray Drying	80
4-15 ลักษณะผง yeast <i>Bacillus subtilis</i> B04 หลังทำแห้งด้วยวิธี Tray Drying	80
ค-1 ลักษณะไก่เนื้อที่ใช้ในการคัดเลือก <i>Bacillus</i> spp. จากตลาดสะพานใหม่และตลาดลำลูกกา	118
ค-2 การชุบเชื้อบริเวณภายในลำไส้ และล้าง Normal Saline	118
ค-3 การวางตัวอย่างที่ได้จากการชะล้างไส้ลงในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	118
ค-4 การทดสอบการทนกรดต่างของ <i>Bacillus subtilis</i> B04	119
ค-5 อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย	119
ค-6 อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	119
ค-7 อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์	120
ค-8 อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	120
ค-9 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร	120
ค-10 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตรที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	120
ค-11 บริเวณการยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ในอาหารที่ถูกคัดเลือก	121
ค-12 บริเวณใสจากการสร้างเอนไซม์ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ในอาหารที่ถูกคัดเลือกจากการทดสอบบนอาหาร Nutrient Agar ที่ผสม Skim Milk, Starch, Carboxymethyl Cellulose และ Tributyrin	122
ค-13 อาหารที่เตรียมจาก Molasses 10 g/l และ Monosodium Glutamate ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 g/l	123
ค-14 อาหารที่เตรียมจาก Molasses 10 g/l และ Monosodium Glutamate ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 g/l ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> spp. อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	123

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ค-15 บริเวณการยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่เพาะเลี้ยงใน Molasses ผสม Monosodium Glutamate ที่อัตราส่วนต่าง ๆ	124
ค-16 บริเวณใสจากการสร้างเอนไซม์ ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่เพาะเลี้ยงใน Molasses ผสม Monosodium Glutamate ที่อัตราส่วนต่าง ๆ จากการทดสอบบนอาหาร Nutreint Agar ที่ผสม Skim Milk, Starch, Carboxymethyl Cellulose และ Tributyrin	125
ค-17 อาหารที่เตรียมจาก Molasses และ Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	126
ค-18 อาหารที่เตรียมจาก Molasses และ Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผ่านการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus subtilis</i> B04 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	126
ค-19 บริเวณการยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 เพาะเลี้ยงใน Molasses ผสม Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	127
ค-20 บริเวณใสจากการสร้างเอนไซม์ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่เพาะเลี้ยงใน Molasses ผสม Monosodium Glutamate อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบบนอาหาร Nutreint Agar ที่ผสม Skim Milk, Starch, Carboxymethyl Cellulose และ Tributyrin	128
ค-21 อาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l โดยปรับค่ากรดต่างในอาหารให้มีค่า 5.54 (ไม่ปรับ), 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8	129
ค-22 อาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างในอาหารให้มีค่า 5.54 (ไม่ปรับ), 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus subtilis</i> B04 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	129
ค-23 บริเวณการยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่เพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ที่ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่าความเป็นกรดต่างกรดต่างเท่ากับ 5.5 และ 6.5	130

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
ค-24	บริเวณใสจากการสร้างเอนไซม์ของ <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่เพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ที่ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และ 6.5 จากการทดสอบบนอาหาร Nutreint Agar ที่ผสม Skim Milk, Starch, Carboxymethyl Cellulose และ Tributyrin	131
ค-25	การยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Escherichia coli</i> และการสร้างเอนไซม์ จากสารสกัด <i>Bacillus subtilis</i> B04 ที่ผลิตจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 และ Nutrient Broth ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ไม่ผ่านการกรองและผ่านการกรอง	132
ค-26	การยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Escherichia coli</i> และการสร้างเอนไซม์ จากสารสกัด <i>Bacillus subtilis</i> B04 ผงแห้งที่ผลิตจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate ค่ากรดต่าง 6.5 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน	134

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของท่านรองศาสตราจารย์ ดร.สบสันต์ อุตกฤษฎ์ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และรองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล อุดมพิริยาศักย์ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านทั้งสองได้ให้ความกรุณา แนะนำ ช่วยเหลือ ปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยด้วยความเมตตาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและประทับใจต่อท่านทั้งสองมาก จึงกราบขอบพระคุณท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ท่านหัวหน้าภาควิชา คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชา บริหารเทคนิคศึกษา และเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า พระนครเหนือ ท่านผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบแบบสัมภาษณ์ และคู่มือครู ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณ มูลนิธิช่วยคนตาบอดแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชินูปถัมภ์ ท่านผู้อำนวยการ ครูที่ให้สัมภาษณ์ ครูที่ทดลองสอน เพื่อนร่วมงาน นักเรียนชั้นประถมศึกษา ปีที่ 4 โรงเรียนสอนคนตาบอดกรุงเทพ และหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการทำวิจัยครั้งนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้ให้กำเนิด รวมทั้งภรรยาและบุคคลในครอบครัวที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด จนสำเร็จการศึกษา

เชวง ดุริยางคเศรษฐ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ	5
1.5 ประโยชน์ของผลการวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 การจัดการศึกษาสำหรับเด็กตาบอดในประเทศไทย	7
2.2 ความหมายของเด็กที่มีความบกพร่องทางการเห็น	8
2.3 พฤติกรรมของเด็กที่มีความบกพร่องทางการเห็น	9
2.4 หลักสูตรการฝึกทักษะการทำความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและ การเคลื่อนไหว	11
2.5 วัตถุประสงค์การฝึกทักษะการทำความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและ การเคลื่อนไหว	15
2.6 เทคนิคการสอนทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	16
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 การศึกษาสภาพการสอนเดิม	23
3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	23
3.3 การจัดทำเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย เพื่อรวบรวมข้อมูลเบื้องต้น	24
3.4 การรวบรวมข้อมูลโดยแบบสอบถาม และการสัมภาษณ์	24
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	25
3.6 การจัดทำคู่มือเทคนิคการสอนเพื่อฝึกทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	25
3.7 การนำคู่มือเทคนิคการสอนเพื่อฝึกทักษะการใช้ไม้เท้าขาวไปทดลองสอน	26
3.8 การประเมินผลหลังการทดลองสอน	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลแบบสอบถามและแบบสัมภาษณ์ของครูผู้ใช้ไม้เท้าขาว	29
4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลแบบสอบถามและแบบสัมภาษณ์ของครูผู้สอนทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	36
4.3 การออกแบบคู่มือครู	42
4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลหลังการประเมินทดลองสอน	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	47
5.1 สรุปผลการวิจัย	47
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	49
5.3 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย	51
5.4 ข้อเสนอแนะจากการวิจัยครั้งต่อไป	51
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก ก	57
หนังสือแต่งตั้งอาจารย์ปริกษาวิทยานิพนธ์	58
หนังสืออนุมัติหัวข้อวิทยานิพนธ์	59
หนังสือแต่งตั้งผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบแบบสัมภาษณ์	60
หนังสือขอความอนุเคราะห์เก็บข้อมูล	65
หนังสือแต่งตั้งผู้เชี่ยวชาญตรวจคู่มือ	69
หนังสือขออนุญาตทดลองสอน	74
แบบสัมภาษณ์เพื่อการวิจัย	75
ภาคผนวก ข	109
คู่มือพัฒนาเทคนิคการสอนเพื่อฝึกทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	110
แบบสังเกตพฤติกรรมทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	153
ประวัติผู้วิจัย	175

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	จำนวนครูผู้ใช้ไม้เท้าขาวจำแนกข้อมูลตามสถานภาพของผู้ตอบแบบสอบถาม	29
4-2	สรุปผลการสัมภาษณ์ของครูผู้ใช้ไม้เท้าขาวในการดำรงชีวิต	33
4-3	จำนวนครูผู้สอนทักษะการใช้ไม้เท้าขาวจำแนกข้อมูลตามสถานภาพของผู้ตอบแบบสอบถาม	36
4-4	สรุปสัมภาษณ์ของครูผู้สอนทักษะการใช้ไม้เท้าขาวจำแนกข้อมูลตามเทคนิคการสอนทักษะการใช้ไม้เท้าขาว	39
4-5	สรุปแบบประเมินพฤติกรรมทักษะการแกว่งไม้เท้า ทักษะการเลาะแนว ทักษะปะทะวัตถุ ทักษะการเดินขึ้น-ลงบันได ทักษะการใช้ไม้เท้าช่วงสั้น	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3-1	แผนภูมิขั้นตอนการวิจัย	27
ข-1	ฝึกการจับและการแกว่งไม้เท้าด้วยเครื่องมือ Smart Cane	121
ข-2	ฝึกการเดินใช้ไม้เท้าแกว่ง 2 จุดบนทางเดินขนาดกว้าง 1 เมตรในห้องฝึก	122
ข-3	ฝึกการแกว่งไม้เท้ากับขาเก้าอี้ในห้องฝึก	123
ข-4	ฝึกการใช้ไม้เท้าทแยงขวางลำตัวเลาะแนวและการป้องกันส่วนบนในห้องฝึก	128
ข-5	ฝึกการใช้ไม้เท้าเดินเลาะแนวในห้องฝึก	129
ข-6	ฝึกการใช้ไม้เท้าเดินเลาะแนวในห้องฝึก	130
ข-7	ฝึกการใช้ไม้เท้าปะทะวัตถุในห้องฝึก	138
ข-8	ฝึกการใช้ไม้เท้าเดินขึ้นบันไดในห้องฝึก	140
ข-9	ฝึกการใช้ไม้เท้าเดินลงบันไดในห้องฝึก	142
ข-10	การแกว่งไม้เท้าช่วงสั้นในย่านการสัญจรแออัด	148