

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่าง ๆ จากโรงอาหาร ภายในสถาบันราชภัฏสงขลา ระหว่างเดือนมกราคม – เมษายน 2546 โดยเก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง จากโรงอาหาร 4 จุดบริการ คือ

1. โรงอาหารใกล้กับหอประชุม 1 มีทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น
 - ร้านที่ 1 มีน้ำหวานชนิดต่าง ๆ 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาเย็น น้ำชาดำเย็น น้ำส้ม น้ำโผลียง น้ำล้นจี น้ำพุทรา น้ำชามะนาว น้ำมะพร้าว น้ำลำไย
 - ร้านที่ 2 มีน้ำหวานชนิดต่าง ๆ 11 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำโผลียง น้ำพุทรา น้ำมะนาว น้ำลำไย น้ำล้นจี น้ำชามะนาว น้ำชาเย็น น้ำมะพร้าว น้ำกระเจียบ น้ำส้ม น้ำชาดำเย็น
2. โรงอาหารซึ่งอยู่ติดกับเรือนพยาบาลเก่า (สโมสร) มีทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำลำไย น้ำกระเจียบ น้ำชาดำเย็น น้ำโผลียง น้ำเก็กฮวย น้ำล้นจี
3. โรงอาหารใกล้กับอาคาร 9 ติดกับศูนย์อาหาร มีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาดำเย็น น้ำล้นจี น้ำส้ม น้ำมะพร้าว น้ำกระเจียบ น้ำโผลียง น้ำชามะนาว น้ำลำไย น้ำสับปะรด
4. ศูนย์อาหาร มีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาดำเย็น น้ำล้นจี น้ำลำไย น้ำส้ม น้ำมะพร้าว น้ำกระเจียบ น้ำชามะนาว น้ำโผลียง น้ำสับปะรด

3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

1. อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาดต่าง ๆ
2. ปิปेट (Pipette) ขนาด 1 ml. , 5 ml. , และ 10 ml.
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 35 ± 0.5 °C
4. หลอดทดลอง (Test tube)
5. หลอดดักก๊าซ (Durham ' s tube)
6. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
7. ตะแกรงวางหลอด (Rack)
8. ตะเกียง
9. ไม้ขีดไฟ
10. ถังพลาสติกพร้อมยางรัดถุง
11. สำลี
12. จานเพาะเชื้อ (Petri-dish)

2. วัสดุ

1. น้ำหวานชนิดต่าง ๆ
2. น้ำกลั่น (Distillation)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.1 Lactose broth
 - 3.2 EC medium
 - 3.3 Eosin Methylene Blue agar (EMB)
 - 3.4 Nutrient Agar (NA)

3.3 วิธีการทดลอง

1. ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่างๆ จากโรงอาหารทั้ง 4 จุดบริการ
2. ตรวจหาจำนวน Fecal coliform ด้วยวิธี Multiple tube technique โดยมีวิธีการ ดังนี้ คือ

ตารางที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการทดลองเพื่อตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่างๆ

ขั้นตอน	วิธีการทดลอง	การวิเคราะห์
1.	Presumptive test (การตรวจสอบ ขั้นต้น)	<ol style="list-style-type: none"> 1. เขียนปริมาณตัวอย่างน้ำที่จะใส่ในหลอดอาหาร Lactose broth 2. เขย่าขวดตัวอย่างน้ำขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง 3. ดูดน้ำที่จะตรวจใส่ใน Lactose broth (Double strength) หลอดละ 10 ml ทั้ง 5 หลอด และดูดตัวอย่างน้ำหลอดละ 1 ml 5 หลอด และหลอดละ 0.1 ml 5 หลอด 4. เขย่าหลอดอาหารทั้งหมดที่ใส่น้ำแล้ว เพื่อให้น้ำผสมกับอาหารแล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง 5. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตรวจดูก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้ามีก๊าซทำ Confirmed test ต่อไป ถ้าไม่มีอบเพาะเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง ถ้าไม่มีก๊าซอีกแสดงว่า Presumptive test ให้ผลลบ หลอดที่มีก๊าซ ให้ทำ Confirmed test ต่อ
2.	Confirmed test (การตรวจสอบขั้น ยืนยัน)	<ol style="list-style-type: none"> 1. เขียนสัญลักษณ์บนหลอดอาหาร EC ให้ได้จำนวนเท่ากับหลอด Lactose broth ที่ให้ผลบวก 2. ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อจากหลอด Lactose broth ที่ทำให้ผลบวกหลอดต่อหลอด 3. เขย่าหลอด EC medium แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส ใน Water bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 4. หลังจากครบ 24 ชั่วโมง มาตรวจดูก๊าซในหลอดดักก๊าซ แล้วบันทึกผลและหาปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม ในตาราง มีหน่วยเป็น MPN/100 ml.

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แสดงขั้นตอนการทดลองเพื่อตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่าง ๆ

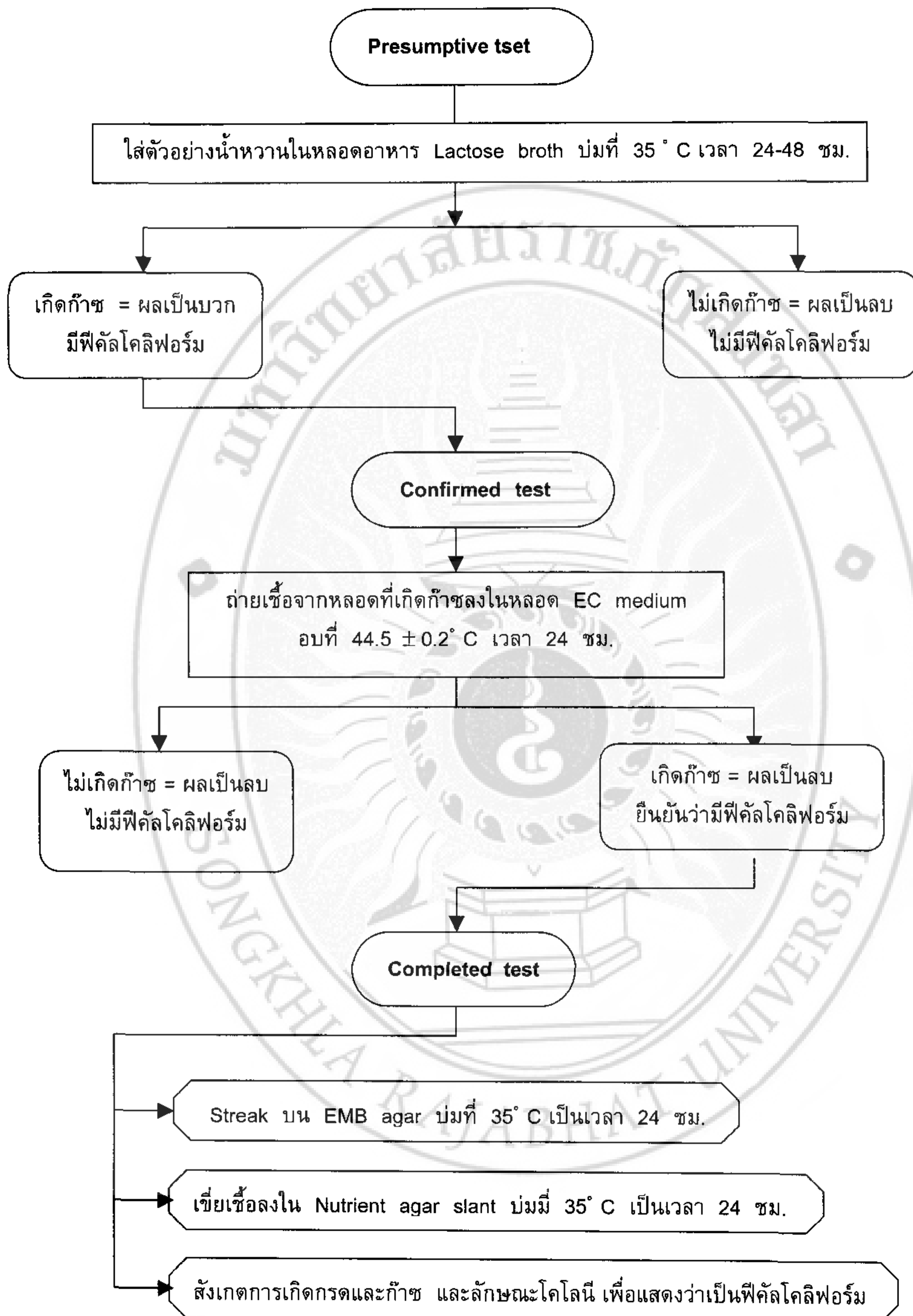
ขั้นตอน	วิธีการทดลอง	การวิเคราะห์
3.	Completed test (การตรวจสอบขั้น สมบูรณ์)	<ol style="list-style-type: none"> 1. ถ่ายเชื้อ 1 ลูบ จากหลอดที่ให้ผล Confirmed test เป็นบวก Streak ลงบน EMB agar 2. บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 3. ตรวจสอบผลโดยสังเกตลักษณะโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์มบนอาหาร EMB agar 4. เชื้อเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มโดยเลือกโคโลนีที่มีสีเข้มหรือมีเงาโลหะ ลงใน Lactose broth อีกครั้งบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 – 48 ชั่วโมง 5. ปลุกเชื้อลงใน Nutrient agar slant ที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง 6. ตรวจสอบผลบวกโดยสังเกตการเกิดกรดและก๊าซ ในอาหาร Lactose broth และลักษณะโคโลนี เพื่อแสดงว่าเป็นฟีคัลโคลิฟอร์มอย่างสมบูรณ์

3. ย้อมสีแกรมโคโลนี โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

- ทำความสะอาดสไลด์ แล้วเช็ดให้แห้ง
- การเกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (Air dry)
- การตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ทำให้ไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วไปบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 – 3 ครั้ง
- หยดสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง
- หยดสารละลายลูกลูไอโอดีน (Lugol 's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (Mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสี ย้อมได้ดีขึ้น
- ล้างสีออก (Decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ล้างน้ำสะอาด
- ขั้นตอนการล้างน้ำนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี
- หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15 – 30 วินาที ล้างน้ำ และซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลจากการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

4. เปรียบเทียบการตรวจหาจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มของแต่ละจุดบริการและแต่ละชนิดของ น้ำหวานมาเปรียบเทียบ โดยใช้หน่วย MPN /100 ml. แล้วบันทึกผลเปรียบเทียบ
5. วิเคราะห์ผลที่ได้จากการทดลอง



ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงการตรวจสอบฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่างๆ