บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่าง ๆ

เก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่างๆ จากโรงอาหาร ภายในสถาบันราชภัฏสงขลา ระหว่างเดือนมกราคม – เมษายน 2546 โดยเก็บตัวอย่างน้ำหวานชนิดต่างๆ ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง จากโรงอาหาร 4 จุดบริการ คือ

1. โรงอาหารใกล้กับหอประชุม 1 มีทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น
   - ร้านที่ 1 มีน้ำหวานชนิดต่างๆ 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาเย็น น้ำชาดำเย็น น้ำส้ม น้ำโอเลี้ยง น้ำลิ้นจี่ น้ำพุทรา น้ำชามะนาว น้ำมะพร้าว น้ำลำใย
   - ร้านที่ 2 มีน้ำหวานชนิดต่างๆ 11 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำโอเลี้ยง น้ำพุทรา น้ำมะนาว น้ำลำใย น้ำลิ้นจี่ น้ำชามะนาว น้ำชาเย็น น้ำมะพร้าว น้ำกระเจี๊ยบ น้ำส้ม น้ำชาดำเย็น
2. โรงอาหารซึ่งอยู่ติดกับเรือนพยาบาลเก่า (สโมสร) มีทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำลำใย น้ำกระเจี๊ยบ น้ำชาดำเย็น น้ำโอเลี้ยง น้ำเก็กฮวย น้ำลิ้นจี่
3. โรงอาหารใกล้กับอาคาร 9 ติดกับศูนย์อาหาร มีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาดำเย็น น้ำลิ้นจี่ น้ำส้ม น้ำมะพร้าว น้ำกระเจี๊ยบ น้ำโอเลี้ยง น้ำชามะนาว น้ำลำใย น้ำสับปะรด
4. ศูนย์อาหาร มีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาดำเย็น น้ำลิ้นจี่ น้ำลำใย น้ำส้ม น้ำมะพร้าว น้ำกระเจี๊ยบ น้ำชามะนาว น้ำโอเลี้ยง น้ำสับปะรด

3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

1. **อุปกรณ์**
   1. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาดต่างๆ
   2. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 ml. , 5 ml. , และ 10 ml.
   3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 35 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$C
   4. หลอดทดลอง (Test tube)
   5. หลอดดักก๊าซ (*Durham ' s tube*)
   6. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
   7. ตะแกรงวางหลอด (Rack)
   8. ตะเกียง
   9. ไม้ขีดไฟ
   10. ถุงพลาสติกพร้อมยางรัดถุง
   11. สำลี
   12. จานเพาะเชื้อ (Petri-dish)

2. **วัสดุ**
   1. น้ำหวานชนิดต่างๆ
   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 แสดงขั้นตอนการทดลองเพื่อตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่าง ๆ

ขั้นตอน	วิธีการทดลอง	การวิเคราะห์
1.	Presumptive test (การตรวจสอบขั้นต้น)	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 (การตรวจสอบขั้นยืนยัน)	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.

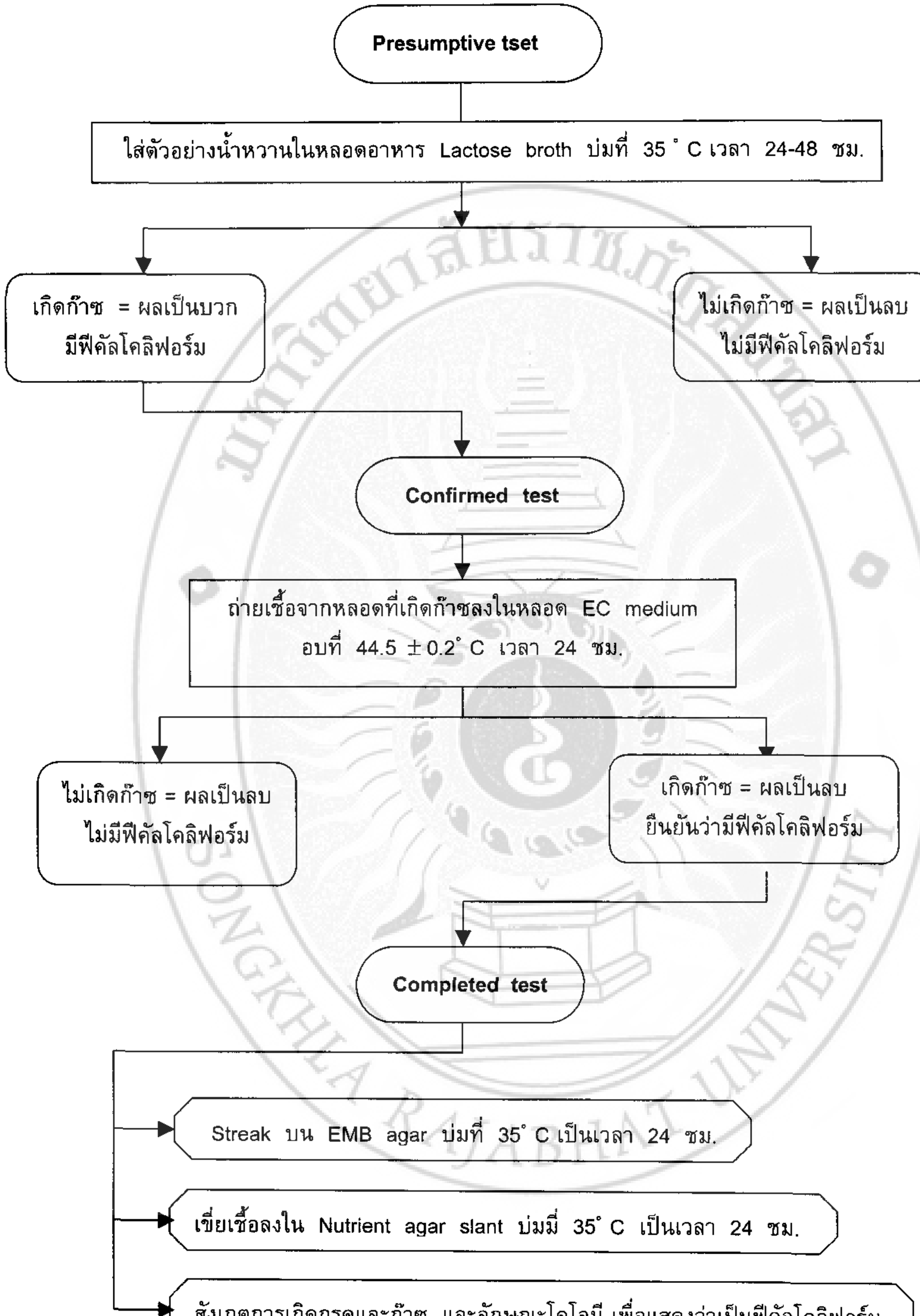
ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แสดงขั้นตอนการทดลองเพื่อตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่าง ๆ

ขั้นตอน	วิธีการทดลอง	การวิเคราะห์
3.	Completed test (*การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์*)	1. ถ่ายเชื้อ 1 ลูป จากหลอดที่ให้ผล Confirmed test เป็นบวก *Streak* ลงบน *EMB agar* 2. บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 3. ตรวจสอบผลโดยสังเกตลักษณะโคโลนีของฟีคัลโคลิฟอร์มบนอาหาร EMB agar 4. เขี่ยเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มโดยเลือกโคโลนีที่มีสีเข้มหรือมีเงาโลหะลงใน Lactose broth อีกครั้งบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 – 48 ชั่วโมง 5. ปลูกเชื้อลงใน Nutrient agar slant ที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง 6. ตรวจผลบวกโดยสังเกตการเกิดกรดและก๊าซ 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
   - หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol 's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (Mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
   - ล้างสีออก (Decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ล้างน้ำสะอาด ขั้นตอนการล้างน้ำนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี
   - หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15 – 30 วินาที ล้างน้ำ และซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลจากการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

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



ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงการตรวจสอบฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำหวานชนิดต่างๆ