

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุ

วัสดุที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย กลุ่ม Coliform , Fecal Coliform, *Staphylococcus aureus* และ Total Bacterial Count สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer Solution) และทดสอบทางชีวเคมี มีรายละเอียดดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- Lactose Broth , Merck : Germany
- Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% , Merck : Germany
- EC Medium. Merck : Germany
- Eosin Methylene Blue Agar (EMB) , Merck : Germany
- Mannitol Salt Phenol Agar , Merck : Germany
- Trypticase Soy Broth , Difco : U.S.A.
- Brain Heart Infusion Broth , Difco : U.S.A.
- Simmons Citrate Agar , Difco : U.S.A.
- Plate Count Agar, Merck : Germany

2. สารเคมี

- แอลกอฮอล์ ฆ่าเชื้อโรค 70% , วิทยาศาสตร์
- Potassium Dihydrogen Phosphate , Merck :Germany
- Magnesium Sulfate , Merck : Germany
- Sodium Chloride , Carlo
- Sodium Hydroxide , Merck : Germany
- Plasma
- Kovac's Reagent

- Methyl Red Test Reagent
- Voges-Proskauer Test Reagent

3. อื่น ๆ

- น้ำกลั่น (Distilled Water)
- Autoclave Tape
- ฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminum Foil)
- สำลี

1.2 อุปกรณ์

เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในการ
 สวอป (Swab) ไทรศัพท์และอุปกรณ์ทางการวิเคราะห์แบคทีเรีย ดังนี้

1. อุปกรณ์สวอปไทรศัพท์

- หลอดแก้วเลี้ยงเชื้อ (Culture tube) พร้อมฝาพลาสติกบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์
10 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- กระจกน้ำแข็งสำหรับรักษาอุณหภูมิตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ทางด้านแบคทีเรียวิทยา

- หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave), Tomy SS 325 : Japan
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), Memmert
- ตู้เย็น (Refrigerator), Samsung SR – V39
- เครื่องอิงน้ำ (Water Bath), Memmert
- ตู้อบความร้อน (Hot Air Sterilizing Oven), Contherm
- เตาไฟฟ้า พร้อมระบบแม่เหล็ก (Hot Plate/ Magnetic Stirrer), Framo รุ่น
M21/1
- ตู้ปลอดเชื้อ, Super Clean รุ่น 120 BSD ,DWYer : U.S.A.
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง, Mettler Toledo รุ่น AB 204 : Switzerland
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง, Mettler Toledo รุ่น PB 1502 : Switzerland
- เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ ขนาด 10 มิลลิลิตร, Nichiro Model 2100 DG
- เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Touch Mixer), Fisher Scientific รุ่น 231 : U.S.A.
- ห่วงเปียเชื้อ (Wire Loop) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร

- เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)
- หลอดทดลอง (Test Tube) พร้อมจุกพลาสติก
- หลอดดักแก๊ส (Durham Tube) ขนาด 6x50 มิลลิเมตร
- ที่วางหลอดทดสอบ (Rack)
- ปิเปต (Pipette)
- ปากกาเขียนฉลากบนเครื่องแก้ว
- เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

2. วิธีดำเนินการ

2.1 การคัดเลือกตัวอย่าง

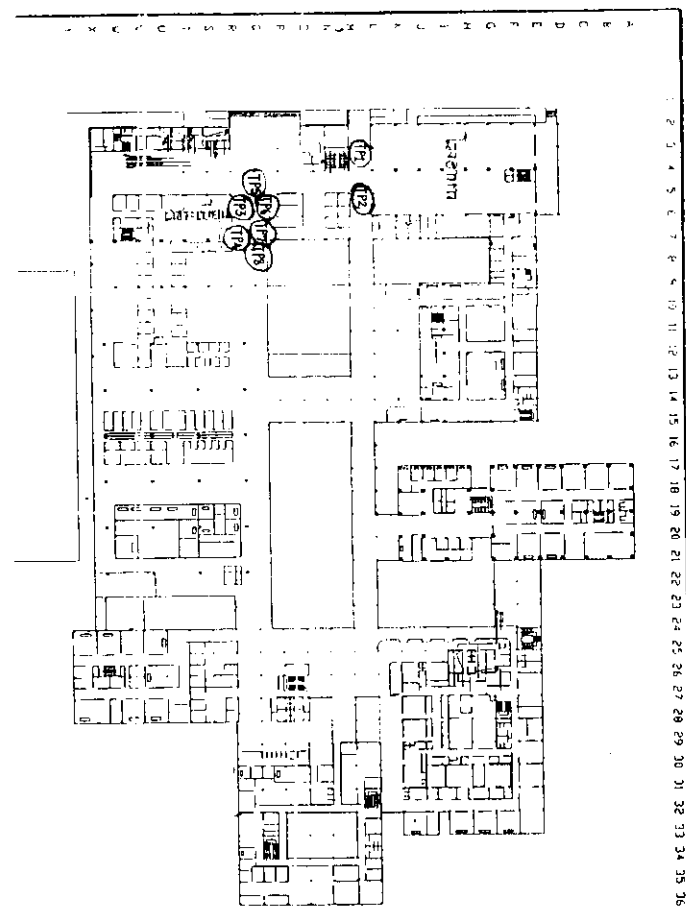
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่ โทรศัพท์สาธารณะในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ซึ่งมีทั้งหมด 10 เครื่อง เป็นเครื่องแบบหยอดเหรียญจำนวน 8 เครื่อง และเครื่อง แบบใช้บัตรโทรศัพท์ จำนวน 2 เครื่อง

ตาราง 1 จำนวนและตำแหน่งติดตั้งโทรศัพท์สาธารณะในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
จังหวัดสงขลา

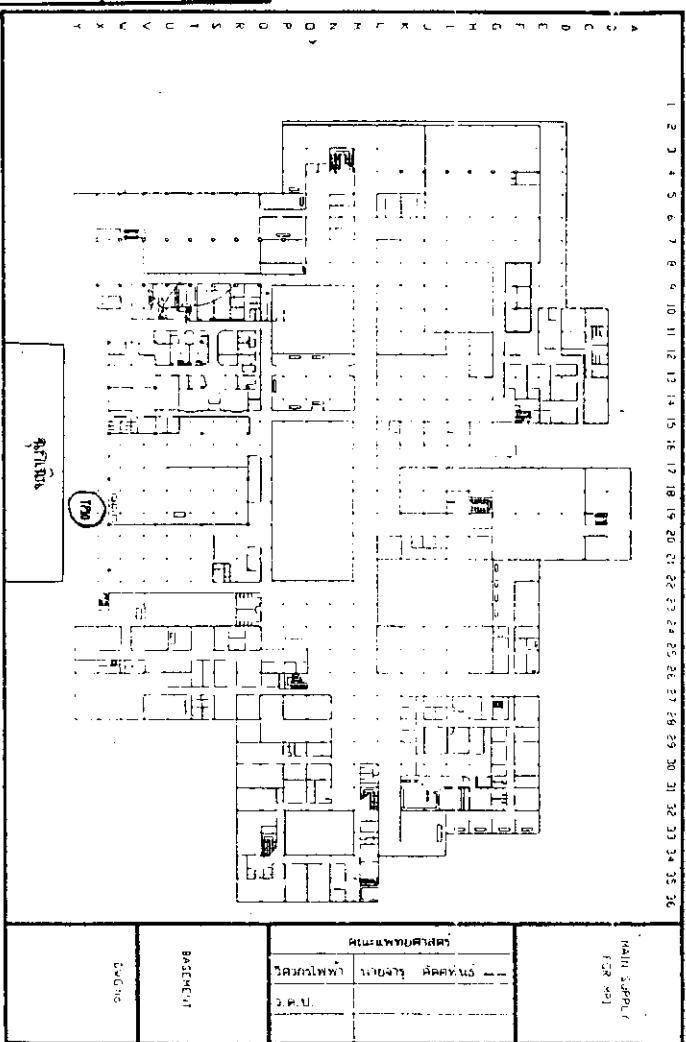
อันดับ	รหัส (Code)	ตำแหน่งติดตั้งโทรศัพท์ สาธารณะ	ชนิดของโทรศัพท์สาธารณะ
1	TP 1	หน้าโรงอาหาร	หยอดเหรียญ
2	TP 2	ติดเสาหน้าโรงอาหาร	หยอดเหรียญ
3	TP 3	ติดผนังด้านข้างห้องเวชระเบียน	ใช้บัตร
4	TP 4	ติดผนังด้านข้างห้องเวชระเบียน	หยอดเหรียญ
5	TP 5	ติดเสาใกล้ตู้ ATM	หยอดเหรียญ
6	TP 6	ติดเสาใกล้ตู้ ATM	ใช้บัตร
7	TP 7	ติดเสาใกล้ห้องโทรศัพท์	หยอดเหรียญ
8	TP 8	ติดเสาใกล้ห้องโทรศัพท์	หยอดเหรียญ
9	TP 9	หน้าห้องไอซียู	หยอดเหรียญ
10	TP 10	ติดผนังหน้าห้องฉุกเฉิน	หยอดเหรียญ

ภาพประกอบที่ 1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างโพสคัพพัสตาธารณะ

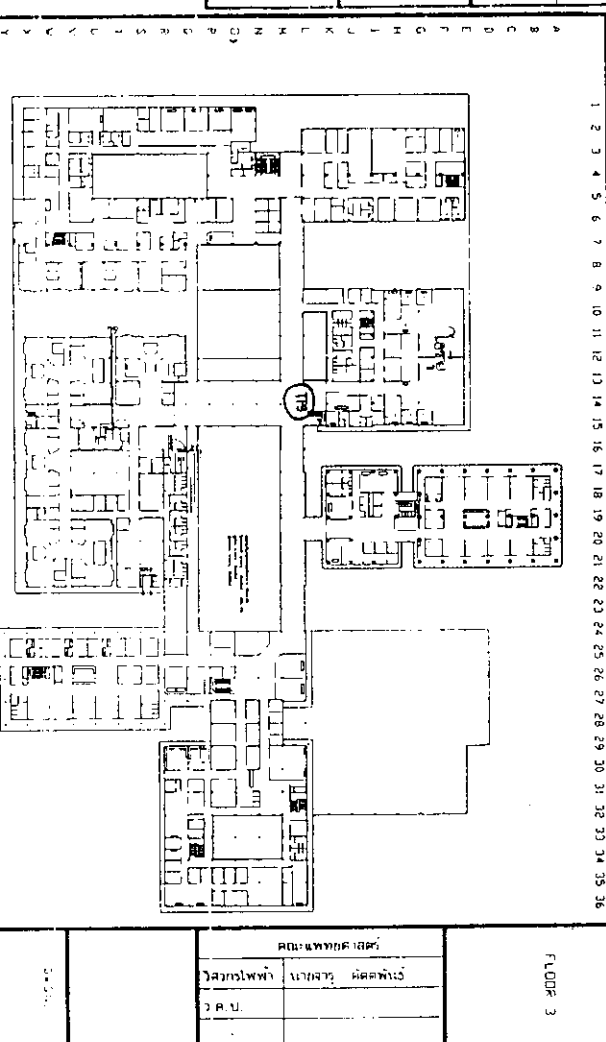
ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา



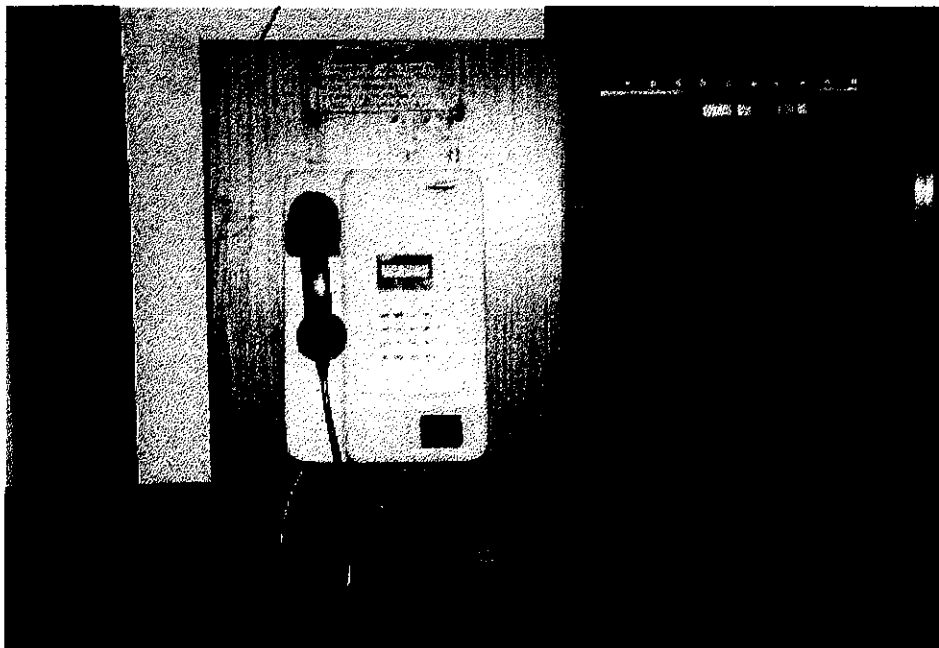
FLOOR 1	
จุดเก็บตัวอย่าง	จุดเก็บตัวอย่าง
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36
DUGING	



FLOOR 2	
จุดเก็บตัวอย่าง	จุดเก็บตัวอย่าง
11	11
DUGING	



FLOOR 3	
จุดเก็บตัวอย่าง	จุดเก็บตัวอย่าง
11	11
DUGING	



ภาพประกอบที่ 2 โทรศัพท์สาธารณะหน้าโรงอาหาร (TP1)



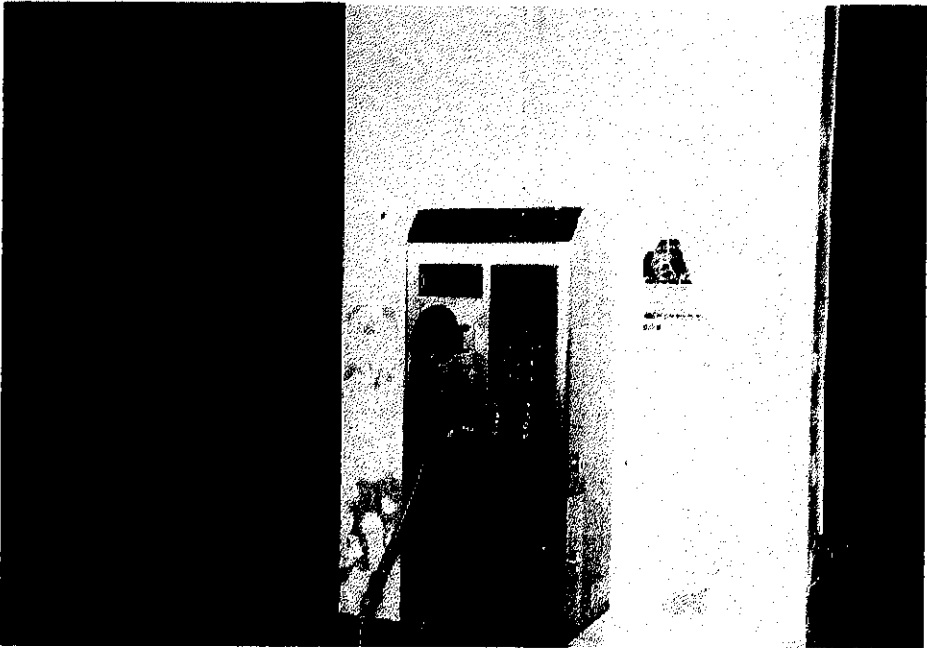
ภาพประกอบที่ 3 โทรศัพท์สาธารณะติดเสาหน้าโรงอาหาร (TP2)



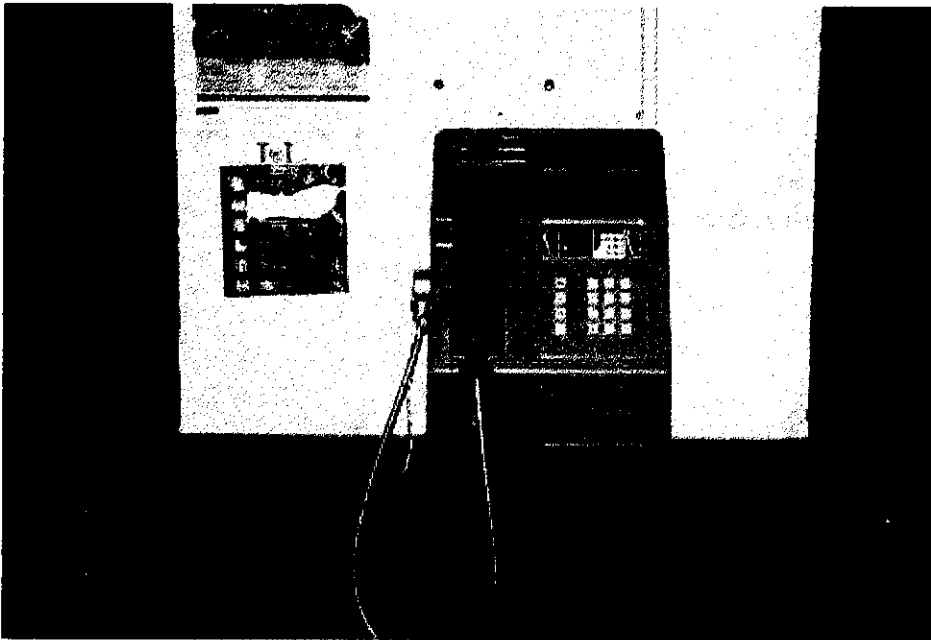
ภาพประกอบที่ 4 โทรศัพท์สาธารณะติดผนังด้านข้างห้องพระเบี่ยน (TP3)



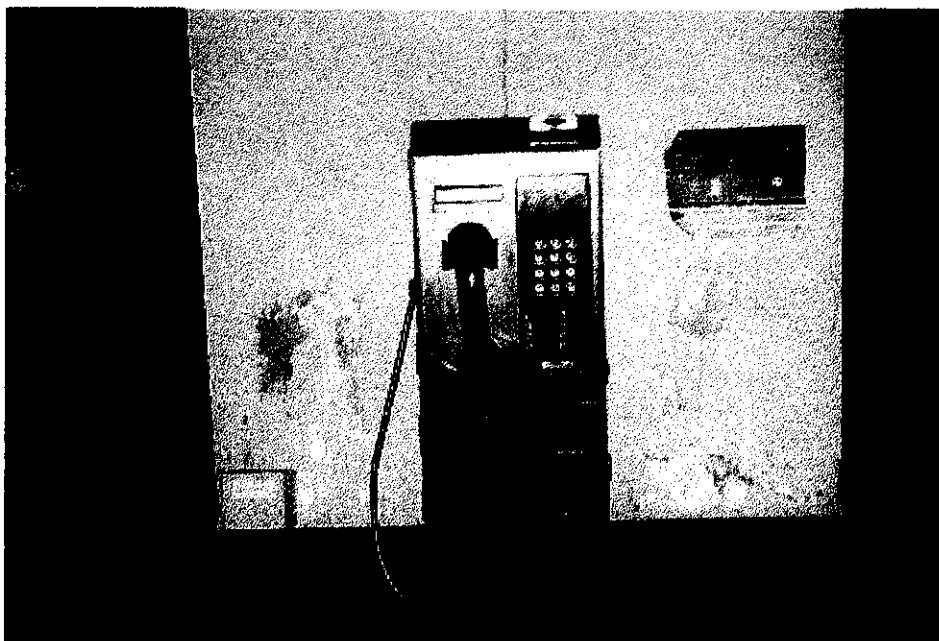
ภาพประกอบที่ 5 โทรศัพท์สาธารณะติดผนังด้านข้างห้องพระเบี่ยน (TP4)



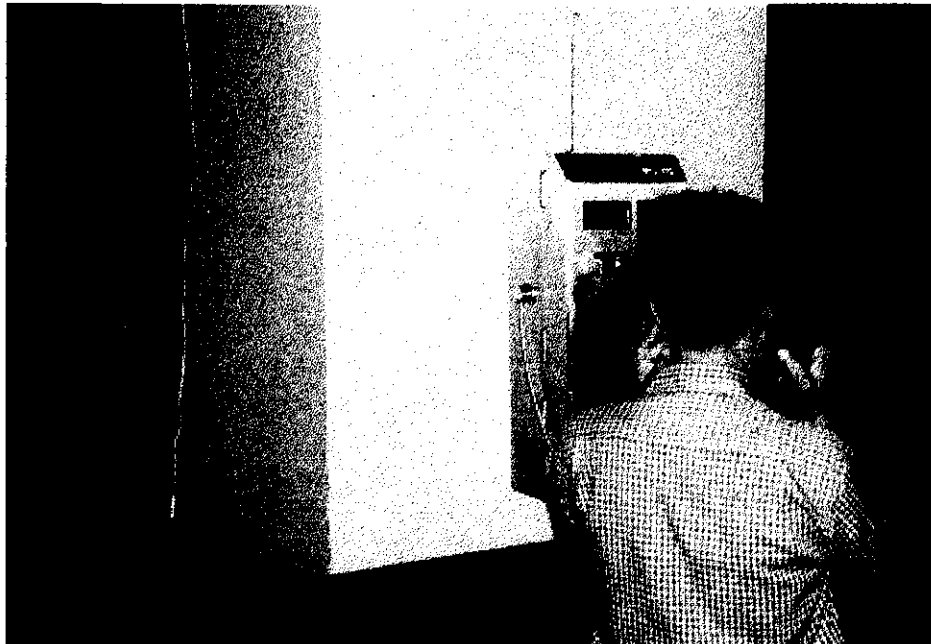
ภาพประกอบที่ 6 โทรศัพท์สาธารณะติดเสาใกล้ตู้ ATM (TP5)



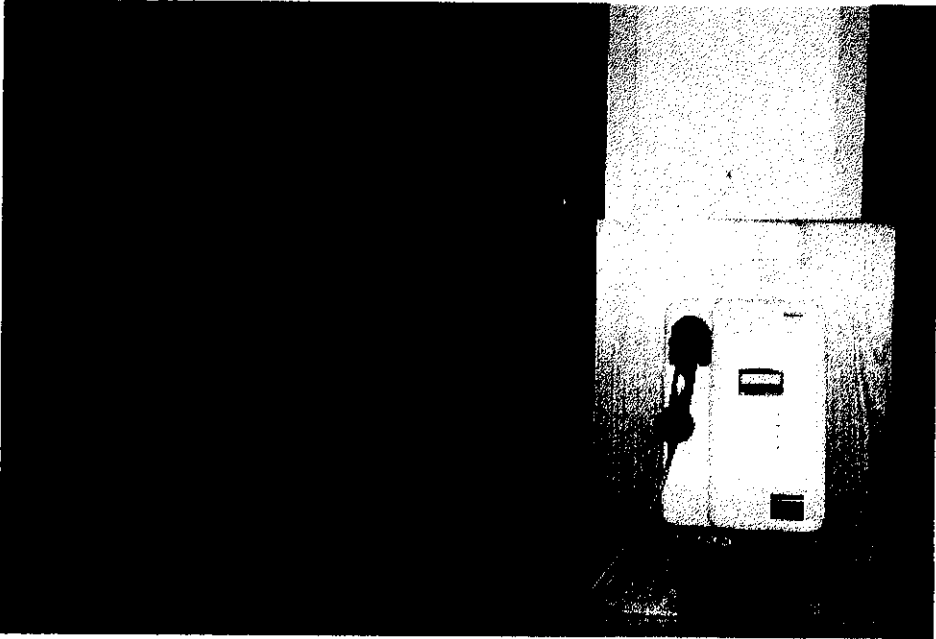
ภาพประกอบที่ 7 โทรศัพท์สาธารณะติดเสาใกล้ตู้ ATM (TP6)



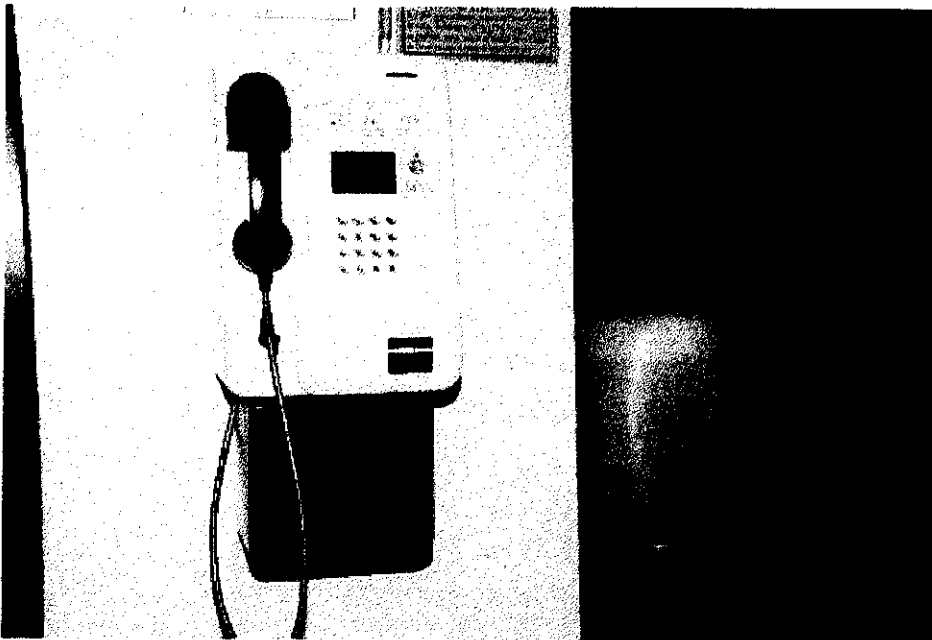
ภาพประกอบที่ 8 โทรศัพท์สาธารณะติดเสาใกล้ห้องโทรศัพท์ (TP7)



ภาพประกอบที่ 9 โทรศัพท์สาธารณะติดเสาใกล้ห้องโทรศัพท์ (TP8)



ภาพประกอบที่ 10 โทรศัพท์สาธารณะหน้าห้องไอซียู (TP9)



ภาพประกอบที่ 11 โทรศัพท์สาธารณะติดผนังหน้าห้องฉุกเฉิน (TP10)

2.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนโทรศัพท์สาธารณะโดยวิธีการสวอป (Swab) (Speck, 1976) เพื่อทำการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacterial Count), Coliform Bacteria, Fecal Coliform Bacteria, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา, 2540, APHA, AWWA and WEF, 1992 และ AOAC, 1995) ต้องกระทำอย่างถูกวิธี เพื่อให้ได้คุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด ตั้งแต่อุปกรณ์ในการเก็บ เทคนิควิธีการเก็บ และการเก็บรักษา เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างจากโทรศัพท์สาธารณะทั้งหมดในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ซึ่งมีทั้งหมด 10 เครื่องโดยการสวอปเชื้อจากตำแหน่งต่าง ๆ ของ โทรศัพท์สาธารณะโดยวางกระดาษที่ตัดให้มีช่องว่างพื้นที่เป็นวงกลมขนาด -20 ตารางเซนติเมตร และผ่านการฆ่าเชื้อ (Sterile) แล้วไปทาบบนตำแหน่งต่าง ๆ ที่ต้องการสวอปบนโทรศัพท์สาธารณะ แต่ละเครื่องดังนี้ คือ

1. หมายเลข (Dial)
2. มือจับ (Handle Piece)
3. ที่ฟัง (Ear Piece)
4. ที่พูด (Mouth Piece)

ทำการสวอปตำแหน่งละ 3 ครั้ง รวมทั้งสิ้น 120 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวิเคราะห์ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacterial Count) โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) สำหรับ Coliform Bacteria, Fecal Coliform Bacteria, *E. coli* และ *S. aureus* ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique

การเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งต้องนำตัวอย่างจากจุดเก็บมาตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวิเคราะห์ภายใน 6 ชั่วโมง และป้องกันการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ภายในกระติกน้ำแข็ง และนำไปตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทางแบคทีเรีย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ให้เร็วที่สุดเท่าที่สามารถทำได้ วิธีการเก็บตัวอย่าง (Sampling Procedure) และการสวอปโทรศัพท์สาธารณะ (Swab Test) มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1. การเตรียมไม้พันสำลี (Cotton Swab)
 - 1.1 ห่อไม้พันสำลีด้วยกระดาษห่อของสีน้ำตาล แล้วปิดผนึกให้สนิทด้วยฟอลซ์อลูมิเนียมกันชื้น
 - 1.2 นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer Solution)
 - 2.1 ละลาย 34.0 กรัม ของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ในน้ำกลั่น (Distilled Water) 500 มิลลิลิตร ปรับสภาพพีเอชให้ได้ 7.2 ± 0.5 ด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (ใช้ NaOH 40.0 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) เก็บไว้ในตู้เย็น
 - 2.2 ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ด้วยปิเปตจำนวน 1.25 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย แมกนีเซียมซัลเฟต 5.0 มิลลิลิตร (เตรียมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตโดยการละลาย $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร)
 - 2.3 ตวงใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 และ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. วิธีการสอบ
 - 3.1 การสอบปิโรศัพท์ต้องทำโดยความระมัดระวังโดยการใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (Aseptic Technique) อย่างจับต้องส่วนที่จะทำการสอบ
 - 3.2 ใช้ไม้พันสำลี (Sterile Cotton Swab) 1 อัน ต่อดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Solution) 1 หลอด 10 มิลลิลิตร และต่อตำแหน่งสอบ 1 ตำแหน่ง โดยที่การเปิดห่อไม้พันสำลีให้เปิดที่ปลายไม้ส่วนที่มือจับห้ามเปิดด้านที่พันสำลีและใช้ให้หมดห่อในคราวเดียวกันถ้าใช้ไม่หมดห้ามนำกลับมาใช้อีกจนกว่าจะเปลี่ยนห่อบรรจุแล้วนำไปฆ่าเชื้อโรคใหม่
 - 3.3 เปิดฝาจุกหลอดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วโดยต้องจับที่ก้นหลอดเปิดฝาจุกโดยให้ใช้นิ้วก้อยจับฝาจุกขณะที่เปิด แล้วลบปลายหลอดด้วยไฟจากตะเกียงอัลกอฮอล์ เสร็จแล้วใช้ไม้พันสำลีจุ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ ตะหรือปิดกับผิวด้านในหลอดแก้วเพื่อให้สำลีเปียกพอหมาด ๆ

- 3.4 เอาไม้พินสำลีทำการป้ายหรือถูพื้นผิวหน้าของตำแหน่งของโทรศัพท์ที่ต้องการสวอป โดยถูกลับไปกลับมา 3 ครั้งซ้ำๆ พร้อมกับหมุนไม้ไปด้วย
- 3.5 เมื่อป้ายหรือถูตำแหน่งโทรศัพท์ที่ต้องการเรียบร้อยแล้วเอาไม้พินสำลีดังกล่าวเก็บไว้ในหลอดบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์เดิม โดยหัด้ามไม้พินสำลีส่วนที่เหนมือจับกับปากหลอดแก้ว ทิ้ง หลนไฟที่รอบปากหลอดแล้วปิดจุกให้แน่นสนิท
- 3.6 เขียนสัญลักษณ์บนหลอดแก้วเพื่อระบุประเภทของตัวอย่าง สถานที่และวัน เดือน ปี ที่เก็บ
- 3.7 เก็บหลอดบรรจุตัวอย่างใส่ที่วางหลอดทดลอง (Rack) บรรจุไว้ในคูเลอ์หรือกระติกน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทางแบคทีเรีย

2.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างทางแบคทีเรียวิทยา

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางด้านแบคทีเรีย ใช้วิธี Pour Plate Method และ Multiple Tube Fermentation Technique และการทดสอบทางด้านชีวเคมี โดยรายละเอียดดังนี้

1. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนี (Colony) จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) เป็นการตรวจวิเคราะห์หาค่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างโดยมีสมมุติฐานว่าโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar) ซึ่งมีสารอาหารสำหรับให้แบคทีเรียเจริญเติบโตในระหว่างการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียสในเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง หนึ่งโคโลนี เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหนึ่งเซลล์จำนวนโคโลนีที่นับได้บนจานเพาะเชื้อคูณกับส่วนกลับของอัตราเจือจางที่ใช้จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร ซึ่งรายงานผลเป็น Colony Forming Units (CFU/ ml) และเมื่อคูณกับจำนวนปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก็จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อพื้นที่ทั้งหมดในที่นี้คือ 20 ตารางเซนติเมตร การตรวจวิเคราะห์ Total Bacterial Count (Standard Plate Count) มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

- 1.1 เตรียมจานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) โดยการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยตู้อบความร้อน (Hot Air Sterilizing Oven) ที่อุณหภูมิ 150–160 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium) โดยใช้ Plate Count Agar (Tryptone Glucose Yeast Agar) โดยชั่ง Plate Count Agar ปริมาณ 22.5 กรัม หลอมละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งภาชนะด้วยหม้อน้ำอัดไอที่อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที สภาพที่เอชหลังจากฆ่าเชื้อ (Steriled) ควรเป็น 7.0 ± 0.1 นำไปควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 44-46 องศาเซลเซียส ในเครื่องอังน้ำ (Water Bath)

- 1.3 ทำการเจือจางตัวอย่าง โดยการเขย่าหลอดบรรจุตัวอย่างขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง ด้วยมือหรือเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Touch Mixer) แล้วใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ (Steriled Pipette) ดูดตัวอย่างในหลอด 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที เพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม ตัวอย่างจะถูกเจือจางเป็น 1:10
- 1.4 ใช้ปิเปตอันใหม่ ดูดตัวอย่างที่ถูกเจือจาง 1:10 จากข้อ 1.3 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที จะได้ความเจือจางเท่ากับ 1:100
- 1.5 เขียนสัญลักษณ์ 1, 1:10 ถึง 1:100 ตามลำดับ บนฝาจานเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเจือจางอย่างละ 2 จาน
- 1.6 เขย่าหลอดตัวอย่างที่ถูกเจือจางที่ระดับ 1:100 ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ นาน 2 นาที แล้วใช้ปิเปตอันใหม่ดูดตัวอย่างดังกล่าวจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่เขียนสัญลักษณ์ 1:100 มิลลิลิตร 2 จาน
- 1.7 เท Melted Plate Count Agar ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 15 - 20 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วหมุนจานเลี้ยงเชื้อในทิศทางตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทิศทางขึ้นลง 5 ครั้ง และไปทางซ้ายและทางขวา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจานเลี้ยงเชื้อ
- 1.8 ทำซ้ำตามข้อ 1.6 และ 1.7 จนถึงตัวอย่างที่ไม่เจือจาง ปล่อยให้อาหารแข็งแล้วคว่ำจานนำเข้าตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Air Incubator) ที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.9 หลังจากครบกำหนดนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมานับจำนวนโคโลนี (Colony Counting) โดยเลือกนับจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยมีหน่วยเป็น CFU/ml (CFU = Colony Forming Unit)

2. การตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform Bacteria) โดยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique ระบบ 3 หลอด เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก วิธีนี้สามารถหาปริมาณแบคทีเรียเป็นค่า MPN (Most Probable Number) ของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในเชิงปริมาณโดยเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณเชื้อต่ำ และการใช้วิธีอื่นยุ่งยากกว่าการใช้วิธีนี้ ใช้ตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย ชนิด Coliforms ซึ่งต้องการ ออกซิเจน (Aerobes) ในการเจริญ และที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobes) เป็นแบคทีเรียชนิดแท่งแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ และใช้น้ำตาลแลคโทส ให้เกิดกรด และก๊าซภายใน 48 ± 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth วิธีวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การตรวจสอบในขั้นแรก (Presumptive Test) เป็นการค้นหาแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียสนาน 24-48 ชั่วโมง แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดและแก๊สโดยคาดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และการตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed Test) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth 2 % เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลโดยการถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในหลอดแลคโทสบรอก มาใส่ในอาหารเหลว บริลเลียนท์กรีนโบล์ 2% นำผลที่ได้จากการตรวจสอบขั้นยืนยันมาหาค่า MPN จากตารางดัชนีค่า MPN มีหน่วยเป็น MPN/100 ml โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total Coliform Bacteria) การตรวจวิเคราะห์ใช้เทคนิค Multiple Tube Fermentation Technique ระบบ 3 หลอด 3 แถว รวม 9 หลอด การตรวจวิเคราะห์มีขั้นตอนปฏิบัติดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive Test)

- 2.1.1 เตรียมหลอดทดลอง (Test Tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham Tube) ซึ่งวางในลักษณะคว่ำภายในหลอดทดลอง วางหลอดทดลองในที่วางหลอดทดลอง (Rack) 3 แถว ๆ ละ 3 หลอด
- 2.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth 13 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมละลาย แล้วบรรจุอาหารหลอดละ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที อาหารเมื่อฆ่าเชื้อภายในอุณหภูมิ ความดัน และเวลาที่กำหนดแล้วไม่ควรปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในหม้อนึ่งอัดไอ เพราะจะทำให้อาหารพวก Lactose เสื่อมสลายตัวไป
- 2.1.3 เขียนสัญลักษณ์และปริมาตรของตัวอย่างบนหลอดทดลอง
- 2.1.4 เขย่าหลอดบรรจุตัวอย่างด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติให้ผสมเข้ากัน

- 2.1.5 ดูตัวอย่างโดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic Technique) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 1 ซึ่งบรรจุ Buffer Solution 9 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากันดี และใช้ปิเปตอันใหม่ดูตัวอย่าง จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร , ใส่ในหลอดที่ 2 บรรจุ Buffer Solution 9 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นเป็น 1:10 และ 1:100 ตามลำดับ
- 2.2 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูตัวอย่างที่ความเข้มข้นเป็น 1, 1:10 และ 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Lactose Broth
- 2.3 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างเสร็จแล้ว เพื่อให้ผสมเข้ากันดี นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มเชื้อ (Incubate) ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 2.4 การอ่านผลการทดลองเมื่อบ่มเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ก่อนอ่านผลต้องเขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเสียก่อนตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดมีก๊าซเกิดขึ้นไม่ว่าจะมีก๊าซขึ้นมากน้อยเท่าไร แสดงว่าการตรวจสอบขั้นแรกให้ผลบวก บันทึกผลและนำไปทำการตรวจสอบขั้นยืนยันทุกหลอด ส่วนหลอดที่ยังไม่มีก๊าซให้บ่มเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผล ถ้ามีก๊าซให้ทำการตรวจสอบขั้นยืนยันต่อ ถ้าไม่มีก๊าซแสดงว่าการตรวจสอบขั้นแรกให้ผลลบ บันทึกผล
- 2.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed Test)
- 2.2.1 นำหลอดตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอดมาทำการทดลองในขั้นยืนยันต่อไป
- 2.2.2 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ เพื่อบรรจุอาหารเหลว Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% (BGLB) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร หลอมละลายแล้วบรรจุอาหารหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ
- 2.2.3 เขียนสัญลักษณ์บนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารดังกล่าว และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้จำนวนเท่ากับจำนวนหลอด Lactose Broth ที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรก
- 2.2.4 เลือกหลอดที่เกิดก๊าซจากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบา ๆ แล้วใช้ห่วงเย็บเชื้อ (Wire Loop) ซึ่งลนไฟฆ่าเชื้อจนแดง ทิ้งให้เย็นสักครู่ จุ่มห่วงเย็บเชื้อลงในตัว อย่างหลอดที่เกิดก๊าซจากนั้นใส่ลงในหลอดที่มีอาหาร Lactose Broth แต่ละหลอดลงในหลอด BGLB หลอดต่อหลอด และต้อง Sterile Loop ทุกครั้งที่ใช้

- 2.2.5 เขย่าหลอด BGLB ที่ถ่ายเชื้อลงไปให้ผสมเข้ากันดี นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 2.2.6 อ่านผลการทดลองหลังจากครบ 24 ชั่วโมงแรก นำมาตรวจดูการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้ายังไม่มีก๊าซให้บ่มเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมง และนำมาอ่านผลใหม่ ถ้าเกิดก๊าซจะให้ผลบวกบันทึกผลว่าหลอดที่มีก๊าซจำนวนกี่หลอด
- 2.2.7 นำผลของหลอดที่ให้ผลบวกและลบในแต่ละการเจือจาง ไปคำนวณหาค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากตารางดัชนีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number Index) ซึ่งค่านี้จะบอกถึงจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้บ่อยกว่าตัวอื่น ๆ สำหรับตัวอย่างนั้น ๆ ในรูปของ MPN/ml.

3. การตรวจวิเคราะห์ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal Coliform Bacteria) โดยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique ระบบ 3 หลอด เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ของ Coliform Bacteria เพียงแต่ในขั้นยืนยัน (Confirmed Test) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EC Medium แทน Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% และเปลี่ยนอุณหภูมิการบ่มจาก 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) เป็น 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส ในเครื่องอังน้ำ (Water Bath) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal Coliform Bacteria) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiple Tube Fermentation Technique ขึ้นตอนวิธีปฏิบัติการดังต่อไปนี้

- 3.1 การตรวจสอบขั้นแรก ใช้เทคนิควิธีการเดียวกับการวิเคราะห์หาโคลิฟอร์มแบคทีเรียทุกประการ
- 3.2 การตรวจสอบขั้นยืนยันใช้อาหารเหลว EC Medium 37 กรัม หลอมละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ภายใน หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ
- 3.3 เขียนสัญลักษณ์บนหลอดอาหาร EC Medium ให้ได้จำนวนเท่ากับหลอด Lactose Broth ที่ให้ผลบวก
- 3.4 ใช้หวงเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเชื้อจากหลอด Lactose Broth ที่ให้ผลบวกทุกหลอด หลอดต่อหลอด ให้เขย่าหลอด Lactose Broth เมา ๆ ก่อนถ่ายเชื้อทุกครั้ง โดยทำพร้อม ๆ กับการตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรียในขั้นยืนยันที่ใช้อาหาร BGLB
- 3.5 นำหลอดอาหารเหลว EC Medium ที่ได้รับการถ่ายเชื้อแล้วไปบ่มเชื้อในเครื่องอังน้ำภายใน 30 นาที หลังจากถ่ายเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงโดยให้ระดับน้ำในเครื่องอังน้ำท่วมสูงเกินระดับผิวบนของอาหารในหลอด

3.6 การอ่านผลการทดลอง หลอดที่พบว่าเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซหรือเกิดความขุ่นให้อ่านผลเป็นบวก แสดงว่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในตัวอย่างตรวจ เป็นฟีคัลโคลิฟอร์ม ที่ถูกขับถ่ายออกมาถึงอุจจาระของคน และสัตว์เลื้อยคืบ หลอดที่ไม่เกิดก๊าซหรือความขุ่นใน 24 ชั่วโมงให้อ่านผลเป็นลบ แสดงว่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในตัวอย่างตรวจเป็นพวกนอนฟีคัลโคลิฟอร์มซึ่งมาจากพืชหรือดิน

3.7 นำผลการอ่านไปคำนวณหาค่าจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จากตารางดัชนีเอ็มพีเอ็น (MPN Index) จะได้ค่าของฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียในรูป MPN /ml

4. การตรวจวิเคราะห์ อี.โคไล (*Escherichia coli*) โดยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique ระบบ 3 หลอด 3 แถว เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์หา Fecal Coliform Bacteria นำหลอด EC Medium ที่เกิดก๊าซในขั้นยืนยันไปทดสอบขั้นต่อไปคือการตรวจขั้นสมบูรณ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar และนำไปตรวจสอบผลทางชีวเคมีที่เรียกว่า IMViC Test การตรวจวิเคราะห์ อี.โคไล (*E. coli*) ใช้วิธี Multiple Tube Fermentation Technique โดยมีขั้นตอนวิธีปฏิบัติดังนี้

4.1 นำหลอดตัวอย่างที่เกิดก๊าซมาถ่ายเชื้อโดย Streak ลงบน EMB Agar

4.2 อบอุ่นเชื้อในตู้อบอุ่นอุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.3 ดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น ถ้าโคโลนีมีสีเข้ม ผิวหน้ามันวาวคล้ายโลหะ (Metallic Sheen) จะเป็น *E. coli*

4.4 นำไปตรวจสอบผลทางชีวเคมี ซึ่งเรียกว่า IMViC Test

- การทดสอบ IMViC Test

IMViC Test เป็นการทดสอบ 4 ชนิดด้วยกันคือ

I= Indole Test

M= Methyl Red Test (MR Test)

V= Voges- Proskauer Test (VP Test)

C= Citrate Test

1. Indole Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน Tryptohan เป็น Indole ได้หรือไม่ Tryptohan เป็น Amino Acid ชนิดหนึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Peptone Casein

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน 1% Peptone Broth
2. Incubate ที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. หยด Kovacs' Reagent 5 หยด
4. เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ 2-3 ครั้ง
5. สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ Medium

การแปลผล

ผลบวก : มีสีแดงที่ผิวของ Medium (Red Ring)

ผลลบ : สีเหมือน Kovacs' Reagent คือสีเหลือง

2. Methyl Red Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose ได้มากหรือน้อย โดยการตรวจดู pH ของอาหารนั้น เชื้อที่สร้างกรดได้มากจะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสี Indicator ของ Methyl Red เป็นสีแดงได้

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน MRVP Broth
2. Incubate ที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. หยด Methyl Red Test Reagent 5 หยด
4. สังเกตการเปลี่ยนสีของ Medium ทันทีหลังจากหยด Indicator

การแปลผล

ผลบวก : Medium เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ : Medium มีสีเหลือง

3. Voges – Proskauer Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสาร Acethyl Methyl Carbinol จาก Glucose

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไป ใน MRVP Broth
2. Incubate ที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. หยด 5% Naphthol ลงไป 6 หยดเขย่า
4. หยด 40% KOH ลงไป 2 หยด

5. เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 10-15 นาที

6. สังเกตการเปลี่ยนสีของ Medium

การแปลผล

ผลบวก : Medium สีแดง

ผลลบ : Medium สีเหลือง

4. Citrate Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ Citrate เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Source) ได้หรือไม่

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการ Streak บนผิว Simmon's Citrate Agar

2. Incubate ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. สังเกตการเปลี่ยนสีของ Medium และการเติบโตของแบคทีเรีย

การแปลผล

ผลบวก : มีแบคทีเรียขึ้นและ Medium เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : ไม่มีแบคทีเรียขึ้นและ Medium ไม่เปลี่ยนสี (สีเขียว)

5 การตรวจวิเคราะห์นับจำนวน *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Multiple

Tube Fermentation Technique ระบบ 3 หลอด 3 แถวเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์หาจำนวน Coliform Bacteria เพียงแต่ในการตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive Test) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth การตรวจสอบขั้นยืนยันใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Salt Agar (MSA) และการตรวจสอบขั้นสมบูรณ์เป็นการทดสอบว่าโคโลนีสีเหลืองทองบน MSA เป็น *S. aureus* จริง โดยการทดสอบทางชีวเคมีที่เรียกว่า Coagulase Test

การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ใช้วิธี Multiple Tube Fermentation Technique หา ค่า MPN (Most Probable Number) โดยใช้ระบบแถวละ 3 หลอด 3 แถวรวม 9 หลอด โดยที่แต่ละแถวใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างต่างกัน 10 เท่ามี 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive Test)

2. การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed Test)

3. การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (Completed Test)

● การตรวจสอบขั้นแรก ปฏิบัติดังนี้

ใช้อาหารเหลว Trypticase Soy Broth เตรียมโดยชั่ง Trypticase Soy Broth 30 กรัม Sodium Chloride 95 กรัม Sodium Pyruvate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น

1000 มิลลิลิตร แล้วบรรจุอาหารลงในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ

2. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1:100, 1:10 และ 1 ใส่ลงในอาหาร Trypticase Soy Broth หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด
3. เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วเพื่อให้ผสมเข้ากันดี นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มเชื้อ (Incubate) ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่ขุ่นไปทดสอบขั้นยืนยัน หลอดที่ไม่ขุ่นให้เพาะเลี้ยงต่อจนครบ 48 ชั่วโมง นำหลอดที่ขุ่นทั้งหมดไปปฏิบัติในการตรวจสอบขั้นยืนยัน

●การตรวจสอบขั้นยืนยัน ปฏิบัติดังนี้

1. นำตัวอย่างน้ำที่ขุ่นใน Trypticase Soy Broth มาถ่ายเชื้อโดยการ Streak บน Mannitol Salt Agar (MSA)
2. อบเลี้ยงเชื้อในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. บันทึกผลที่เกิดขึ้นบน MSA โดยที่ *S. aureus* จะสลายน้ำตาล แมนนิทอลได้คู่ได้จากการเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลืองและให้โคโลนีสีเหลืองทอง

●การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ปฏิบัติดังนี้

เป็นการตรวจสอบว่าโคโลนีสีเหลืองทองที่เกิดขึ้นบน MSA เป็น *S. aureus* จริง โดยการทำ Coagulase Test ดังนี้

1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดพลาสมา (Plasma) จำนวน 0.5 มล.ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ที่ปราศจากเชื้อ
2. ใช้หวงเขี่ยเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีที่สงสัยบน MSA มา 1 โคโลนี ถ่ายเชื้อลงในหลอดที่มีพลาสมาเตรียมไว้ นำไปอบเลี้ยงเชื้อในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-24 ชั่วโมงถ้าเป็นโคโลนีของ *S. aureus* จะเกิดการจับตัวของพลาสมาเป็นก้อน

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่

- ค่าร้อยละ (%)
- ค่าเฉลี่ย (\bar{X})
- Analysis of Variance for Factorial Experiment