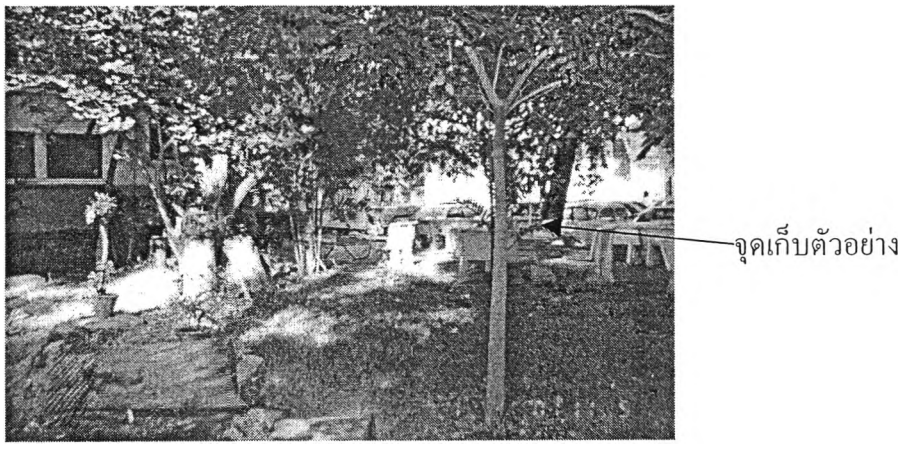
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ที่ทำการศึกษา

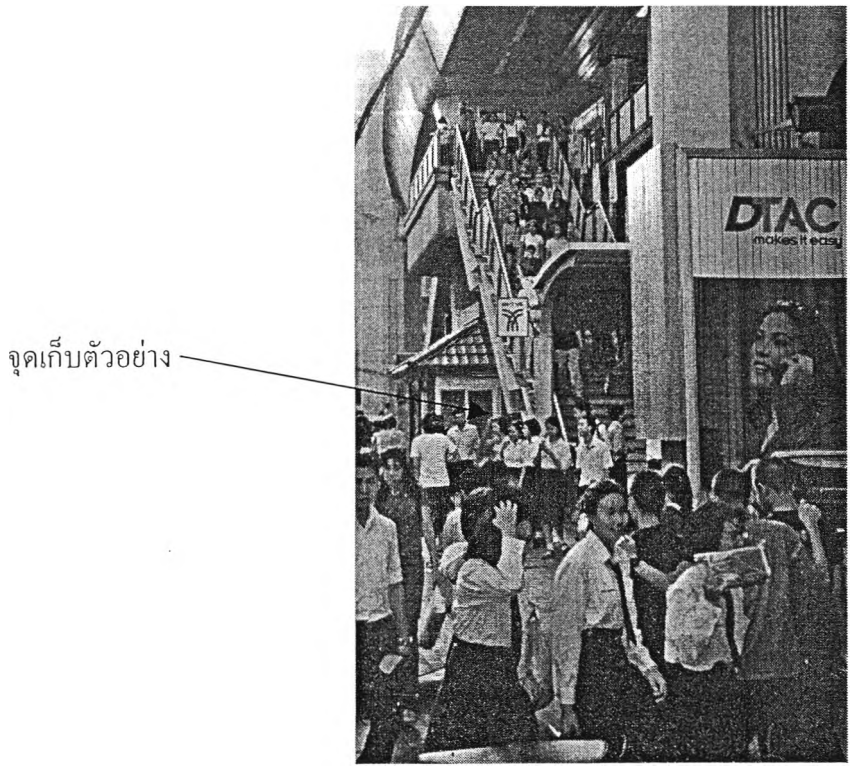
ในการดำเนินการศึกษาวิจัยนี้จะทำการเก็บตัวอย่างอากาศ ตัวอย่างละ 5 ลิตร โดยมีจุดเก็บตัวอย่าง คือ

3.1.1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นตัวแทนของพื้นที่เปรียบเทียบ(ดังรูปที่ 3.1) ซึ่งเป็นสถานศึกษาพื้นที่เปิดโล่ง มิได้ถูกปิดกั้นการระบายอากาศ บริเวณโดยรอบเป็นอาคารเรียน สำนักงานของมหาวิทยาลัย



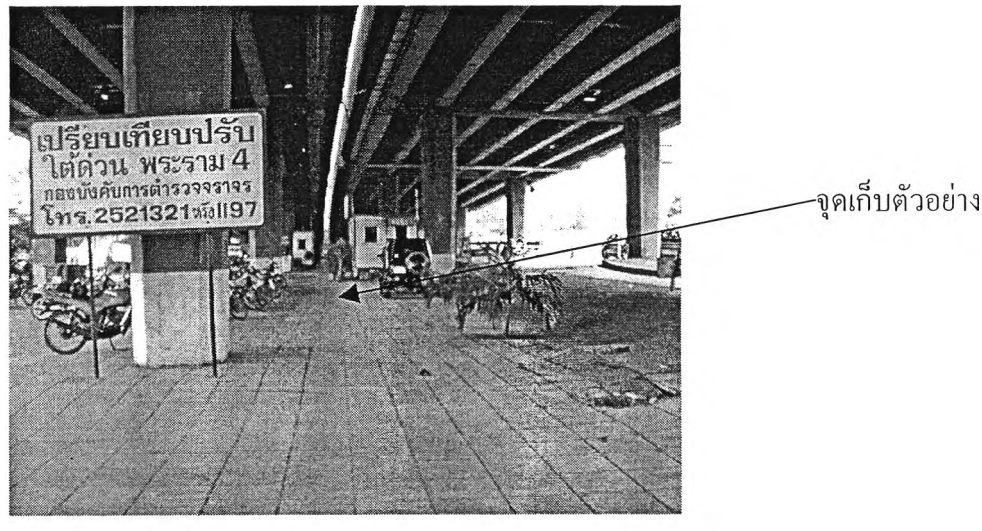
รูปที่ 3.1 บริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 บริเวณใต้สถานีรถไฟฟ้า BTS สยามสแควร์ เป็นตัวแทนของพื้นที่ศึกษาใต้สถานีรถไฟฟ้า BTS ที่ถูกปิดกั้นการระบายอากาศด้วยสถานีรถไฟฟ้ามีการจราจรหนาแน่น ถูกขนาบด้วยอาคารพาณิชย์ มีผู้คนสัญจรไปมาหนาแน่น เนื่องจากเป็นย่านการค้า มีห้างสรรพสินค้า โรงแรม และอาคารสำนักงาน (ดังรูปที่ 3.2)

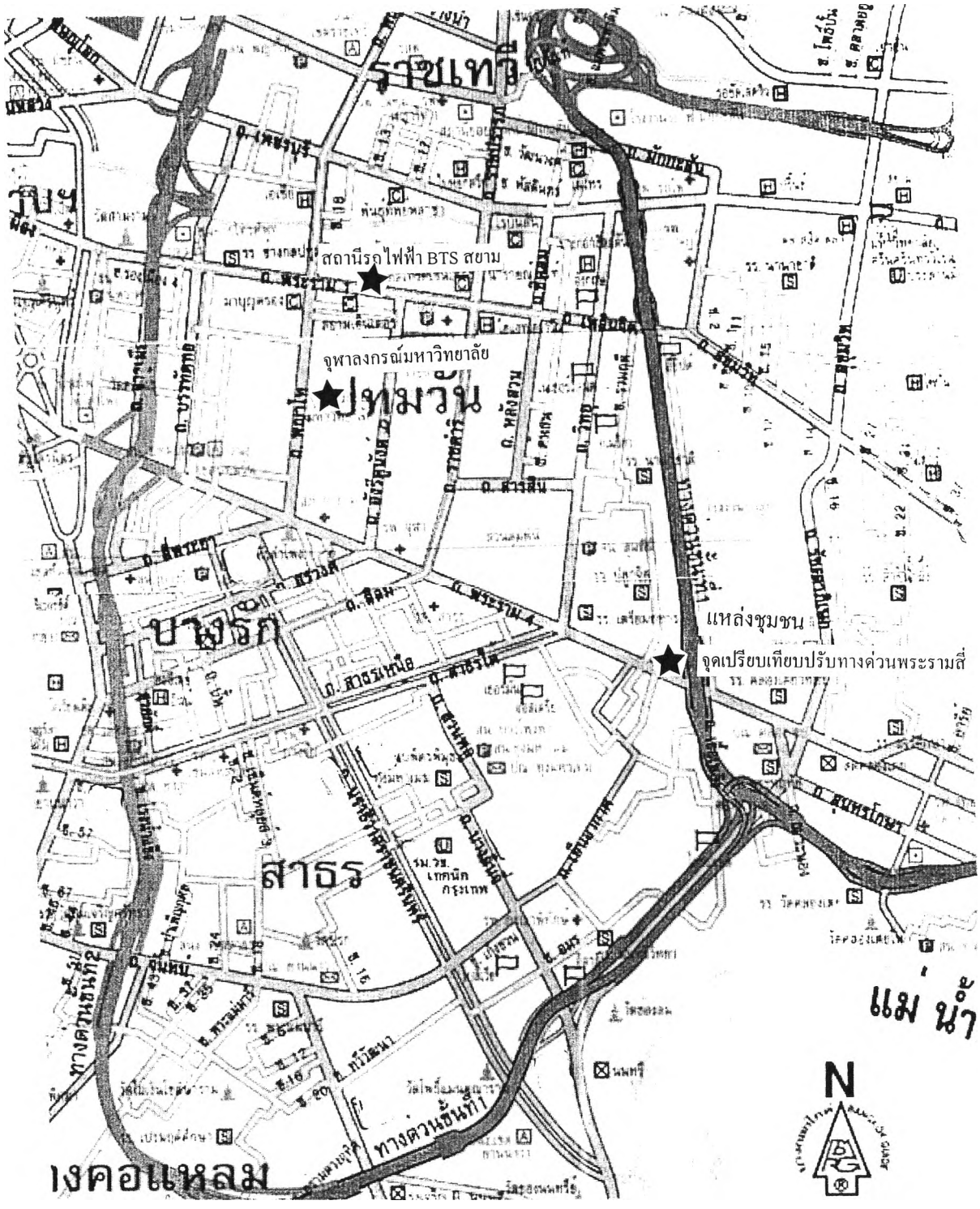


รูปที่ 3.2 บริเวณใต้สถานีรถไฟฟ้า BTS สยามสแควร์

3.1.3 บริเวณจุดเปรียบเทียบปรับใต้ทางด่วนพระรามสี่ เป็นตัวแทนของพื้นที่ศึกษาใต้ทางด่วนที่มีการจราจรหนาแน่น บริเวณโดยรอบมีบ้านพักอาศัยและอาคารพาณิชย์ ร้านค้า ใต้ทางด่วนเป็นที่ทำการของจุดเปรียบเทียบปรับใต้ทางด่วนพระรามสี่ งาน2 กองกำกับการ 1 กองบังคับการตำรวจจราจร ซึ่งมีเจ้าหน้าที่ตำรวจจราจรปฏิบัติงานภายใต้สังกัดงาน 2 กองกำกับการ 1 จำนวน 126 คน แต่โดยปกติจะมีเจ้าหน้าที่ประจำอยู่ที่จุดเปรียบเทียบปรับใต้ทางด่วนพระรามสี่ ประมาณ 20 คน (ดังรูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 จุดเปรียบเทียบปรับใต้ทางด่วนพระรามสี่



รูปที่ 3.4 แสดงที่ตั้งของจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 3 แห่ง

3. 2 ระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ แบ่งการศึกษาเป็น 2 ฤดูกาล ได้แก่

1) ฤดูฝน เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2544 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2544

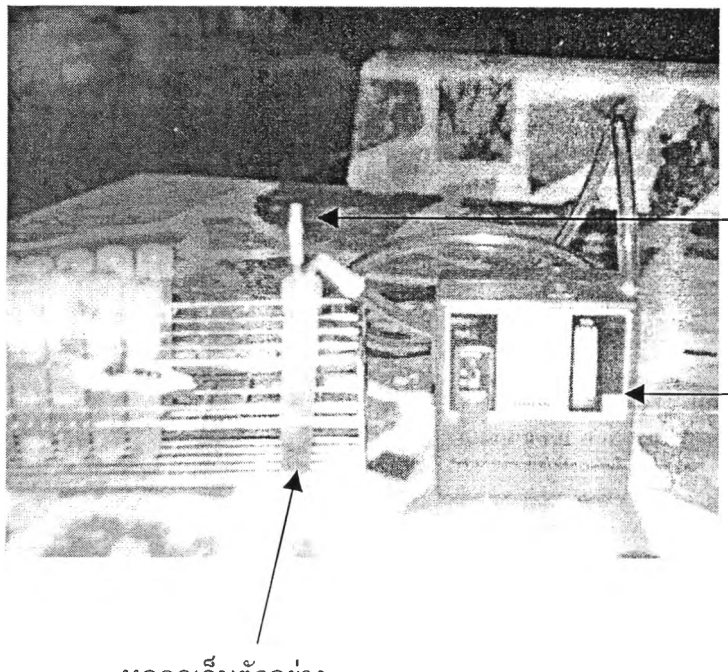
2) ฤดูแล้ง เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2544 ถึง มกราคม พ.ศ. 2545

3.3 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1) เครื่องเก็บอากาศ ชนิด Personal Air Sampler ยี่ห้อ Gilian รุ่น Gilair 5
2) หลอดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง
3) ลูกปัด
4) กระติกน้ำแข็ง
5) น้ำแข็ง
6) สายยาง
7) ตะแกรง
8) แอลกอฮอล์ 70%
9) น้ำกลั่น

ชุดเก็บตัวอย่าง ประกอบด้วยเครื่องเก็บอากาศชนิด Personal Air Sampler เป็นเครื่องมือสำหรับเก็บรวบรวมสารอนุภาคของแข็ง โดยใช้เทคนิค Liquid Impingement (Heidelberg et al.,1997, Dowd and Maier,2000) ต่อกับส่วนที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์(Microbial Aerosal) ที่เป็นหลอดพลาสติกมีฝาปิด 2 รู เพื่อต่อสายยางสำหรับให้อากาศเข้าและต่อสายยางกับปั๊มเพื่อดูดอากาศออก ดังรูปที่3.5

หลักการของการเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างอากาศที่ระดับความสูง 1.5 เมตร อากาศจะไหลผ่านเข้าเครื่องด้วยอัตราการไหล (Flow Rate) 0.5 ลิตร/นาที เป็นเวลา 10 นาที อากาศและฝุ่นละอองจะไหลลงไปในตัวกลางที่เป็นของเหลว (Phosphate Buffer) ซึ่งเป็นตัวเก็บกักฝุ่นละอองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นอากาศจะไหลออกจากระบบ



รูปที่ 3.5 แสดงชุดเก็บตัวอย่าง

3.4 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ
2) หลอดทดลอง
3) ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อ
4) ขวดรูปชมพู่
5) ตู้อบเพาะเชื้อ
6) จานเพาะเชื้อ
7) สำลี ผ้าก๊อซ พาราฟิล์ม
8) เครื่องเขย่าสาร
9) ตู้เขี่ยเชื้อ
10) ห่วงถ่ายเชื้อ
11) ตะเกียงแอลกอฮอล์

12) เครื่องชั่ง

13) ปีเปต

14) กระจกสไลด์

15) เตาไมโครเวฟ

16) กล้องจุลทรรศน์

17) ถุงพลาสติก

18) สายยาง

19) ถ้วยตวง

20) กระบอกตวง

21) บีกเกอร์

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

1) Nutrient Agar

2) Blood Agar

3) Nutrient Broth

3.6 สารเคมี

3.6.1 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1) แมกนีเซียมซัลเฟตแฮปตะไฮเดรต(Magnesium Sulfate Heptahydrate)

2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(Potassium Dihydrogen Phosphate)

3) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต (Di – Potassium hydrogen Phosphate Trihydrate)

3.6.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

1) สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet Solution)

2) สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's Iodine Solution)

3) สารละลายสีซาฟรานิน (Safranin O)

4) สารละลายแอลกอฮอล์(Alcohol 95%)

3.7 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.7.1 การหาอัตราการดูดอากาศในการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม

ทำการศึกษาหาอัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมที่จะสามารถเก็บกักปริมาณแบคทีเรียจากอากาศสูงที่สุด โดยเปรียบเทียบที่อัตราการไหลของอากาศ 0.1, 0.3, 0.5 ลิตรต่อนาที (รายละเอียดในภาคผนวก ข)

จากผลการศึกษาพบว่า ที่อัตราการไหลของอากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที สามารถเก็บกักแบคทีเรียลงสู่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ได้หมด และสามารถนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียได้มากที่สุด จึงใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.5 ลิตร/นาที ในการเก็บตัวอย่างอากาศในการศึกษาครั้งนี้

3.7.2 การเก็บตัวอย่าง

1) ใช้70%แอลกอฮอล์ทำความสะอาดฝาของหลอดเก็บตัวอย่าง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นเก็บไว้ในถุงพลาสติกผูกถุงให้แน่นจนกว่าจะนำไปใช้ที่จุดเก็บตัวอย่าง

2) ปรับแต่ง (Calibration) เครื่องเก็บอากาศก่อนเก็บตัวอย่างอากาศ ทุกครั้งโดยปรับให้มีอัตราการไหล 0.5 ลิตรต่อนาที

3) นำหลอดเก็บตัวอย่างที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาซึ่งมีช่องให้อากาศเข้าและออก ซึ่งต่อกับสายยางไปยังปั๊มดูดอากาศที่ได้ปรับอัตราการไหลไว้เรียบร้อยแล้ว

4) วางชุดเก็บตัวอย่างให้อยู่สูงจากพื้นดินประมาณ 1.5 เมตร

5) ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง จะเก็บในช่วงเวลา 16.00 – 18.00 น. ด้วยอัตราการไหล 0.5 ลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จ ปิดฝาหลอดเก็บตัวอย่าง

6) นำตัวอย่างที่เก็บได้แช่ในกระติกน้ำแข็งก่อนที่จะนำกลับห้องทดลองเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.7.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค

1) นำสารละลายที่เก็บเชื้อไปเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar และ Blood Agar

2) นำไปเพาะเชื้อไว้ที่ตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3) ตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อปริมาตรอากาศหนึ่งลูกบาศก์เมตร หรือ Colony Forming Unit / Cubicmeter (CFU/m^3) ดังสูตรคำนวณจำนวนโคโลนี

ปริมาตรอากาศทั้งหมด = 0.5 x เวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

$$\text{จำนวนโคโลนีต่ออากาศ 1 ลบ.ม.} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับในจานเลี้ยงเชื้อ x (250)(1000)}}{\text{ปริมาตรอากาศทั้งหมด}}$$

3.7.4 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย

1) สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูขนาด รูปร่าง การยกตัว ผิว ขอบ สี ความโปร่งใส เนื้อ กลิ่น และการสลายเม็ดเลือดแดง

2) ทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram Stain)

3) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูด้วยกำลังขยายต่ำ(10x) ก่อน และเปลี่ยนเป็นกำลังขยายสูง(100x) ใช้ Oil Immersion สังเกตรูปร่าง ขนาด การเรียงตัว การติดสีแกรมของแบคทีเรีย และปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar บันทึกผล

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างอากาศมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างอากาศ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยทำการเปรียบเทียบดังนี้

1) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างอากาศ ในฤดูฝนและฤดูแล้ง โดยใช้สถิติ t-test

2) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างอากาศ จากพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด โดยใช้สถิติ ANOVA

ถ้ามีความแตกต่างกัน ทำการทดสอบต่อไปโดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)