บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

สถานที่ที่ทำการศึกษา

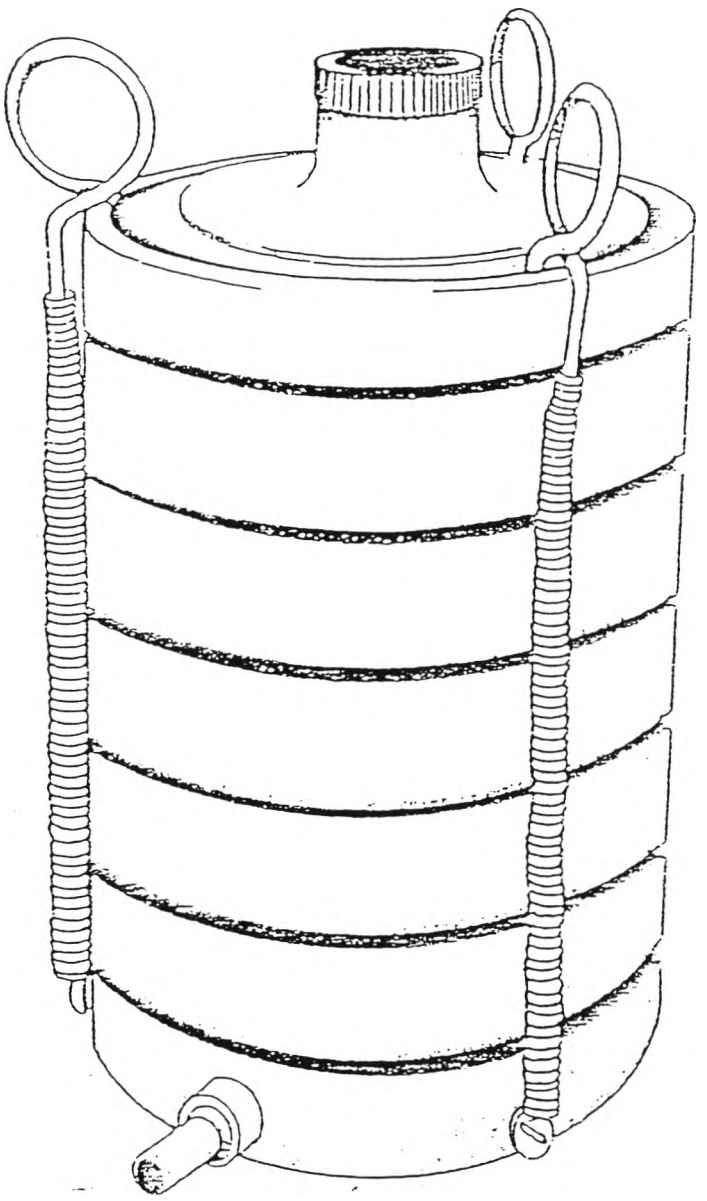
ในการทดลองจะตั้งเครื่องมือเก็บตัวอย่าง Viable microbial particle sizing samplers ทั้ง 2 เครื่อง ไว้ห่างประมาณ 1 เมตร สถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศของกองจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ฯ โดยมีจุดติดตั้ง 2 แห่ง คือ

1. บริเวณหน้าตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬา เป็นตัวแทนย่านชุมชน ที่มีการจราจรหนาแน่น ซึ่งมีทั้งอาคารสำนักงาน อาคารบ้านพักอาศัย ร้านค้า สถาบันการศึกษา ซึ่งอยู่ใกล้เคียงรัศมีของสถานีโดยรอบ และไม่มีอาคารสูงปิดกั้น

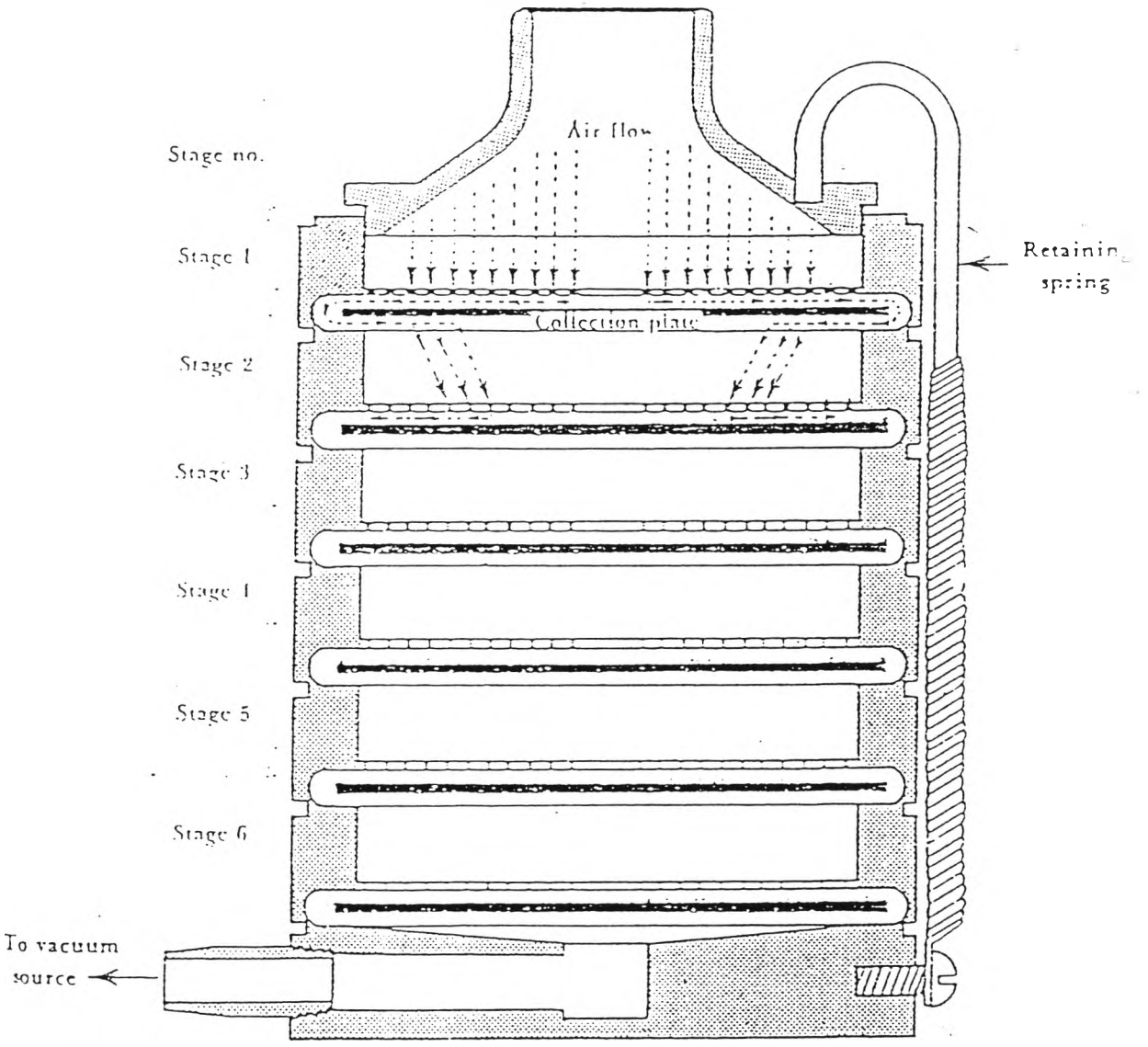
2. บริเวณวงเวียนโอเดียน เยาวราช เป็นตัวแทนย่านชุมชนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Viable microbial particle sizing samplers (Andersen 2000 INC) เป็นเครื่องมือแบบ Andersen ที่มีจำนวนชั้น (Stage) ของส่วนที่เก็บตัวอย่างและแต่ละชั้นจะมีรู (Oriffice) เปิดหลายรูสำหรับให้อากาศไหลผ่าน ตั้งแต่ขนาดใหญ่ไปหาเล็ก ซึ่งแยกขนาดของตัวอย่างที่เกาะหรือตกตัวในแต่ละชั้น แตกต่างกันไปตั้งแต่ใหญ่ไปหาเล็ก ดังแสดงโครงสร้างภายนอกในรูปที่ 3 และโครงสร้างภายในดังแสดงในรูปที่ 4 ส่วนที่ใช้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ (microbial aerosol) จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (bacteriological agar) และมีอัตราการไหลของอากาศ 28.3 ลิตร/ต่อนาที ซึ่งมีปั๊มดูดอากาศเพื่อดูดอากาศเข้าภายในเครื่องมือนี้



รูปที่ 3 โครงสร้างภายนอกของ Viable microbial particle sizing samplers (Andersen Sampler 2000 INC)



รูปที่ 4 โครงสร้างภายในของ Viable microbial particle sizing samplers (Andersen Sampler 2000 INC)

2. หลักการของเครื่องมือ (Andersen 200 INC)

อากาศจะไหลผ่านโครงสร้างภายนอก และผ่านเข้ารูเปิดด้วยอัตราการไหล (flow rate) 28.3 ลิตรต่อนาที ฝุ่นละอองที่ไหลเข้ามาสู่เครื่องมือนี้ เมื่อผ่านรูเปิดแต่ละชั้นแล้ว จะมีการตกกระทบกับตัวกลาง ซึ่งเป็นตัวเก็บฝุ่นละอองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ โดยอาศัยระบบการตกกระทบนั้นขนาดของฝุ่นละอองที่ตกกระทบและเกาะติดอยู่บนตัวกลาง ซึ่งจะมีขนาดแตกต่างกันจากใหญ่ไปสู่ขนาดเล็กจากชั้นบนลงมาสู่ชั้นล่าง (โดยมีขนาดของฝุ่นละอองที่เก็บได้ในแต่ละชั้น ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ขนาดรูของลำดับชั้นกรองแต่ละชั้น และช่วงขนาดของอนุภาคที่จะพบในแต่ละชั้น

(ลำดับ) จำนวนชั้นกรอง (stage)	ขนาดรูของแต่ละชั้น (มิลลิเมตร) (orifice diameter)	ช่วงขนาดของอนุภาคฝุ่นที่จะพบได้ (ไมโครเมตร)
1	1.81	7.0 และมากกว่า
2	0.91	4.7 - 7.0
3	0.71	3.3 - 4.7
4	0.53	2.1 - 3.3
5	0.34	1.1 - 2.1
6	0.25	0.65 - 1.1

3. ส่วนประกอบของเครื่องมือ

ก. ส่วนเก็บตัวอย่าง (Sampler) ถูกออกแบบให้สามารถแยกส่วนกับส่วนโครงสร้างได้ ประกอบไปด้วยชั้น 6 ชั้น (six stages) ซึ่งมีรูเปิด (Jet nozzles layer) ในแต่ละชั้นจะมีขนาดของรูเปิดจากใหญ่ลงมาหาเล็ก ซึ่งทำให้ความเร็วของอากาศที่ไหลผ่านแต่ละชั้นแตกต่างกัน จึงทำให้เกิดการตกกระทบ และคัดเลือกฝุ่นละอองจากขนาดตั้งแต่ สูงกว่า 7 ไมโครเมตร (50% cut point 10 ไมโครเมตร) แล้วเล็กลงเรื่อย ๆ จนถึงชั้นสุดท้าย (back up

layer) ซึ่งคัดเลือกฝุ่นที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.1 ไมโครเมตรในการทดลองครั้งนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (bacteriological agar) เป็นตัวเก็บฝุ่นละออง ซึ่งจะใส่อยู่ในแต่ละชั้น

ข. ส่วนโครงสร้าง (separating body) ดังแสดงไว้ในรูปโครงสร้างภายนอกและภายใน

ค. ส่วนวัดอัตราการไหล (flowmeter) ซึ่งจะประกอบอยู่บนฐานเดียวกับส่วนเก็บตัวอย่าง (Sampler)

ง. ปั๊มดูดอากาศ (pump) ซึ่งเป็นปั๊มลมที่มีความสามารถทำให้เกิดอัตราการไหลของอากาศได้ 1 ถึง 60 ลิตรต่อนาที

4. วิธีการใช้เครื่อง

ก. นำจานเพาะเชื้อ (plate) ที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (agar) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้วใส่ในชั้นทั้ง 6 ชั้น แล้วต่อกันในแนวตั้ง ยึดด้วยที่รัดให้แน่น

ข. ติดตั้งเครื่องเก็บตัวอย่าง เครื่องวัดอัตราการไหล และปั๊มโดยต่อท่อ และข้อต่อต่าง ๆ ให้แน่น

ค. เดินเครื่องโดยปรับค่าความดันให้ pressure gage และ rotameter อ่านค่าให้มีอัตราการไหลที่ 28.3 ลิตรต่อนาทีตามกราฟการปรับแต่งซึ่งทำไว้

5. กล้องจุลทัศน์ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ขนาด รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีของแบคทีเรียที่ปรากฏ

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องชั่ง (electric balance)	ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
ตู้ไมโครเวฟ	แผ่นสไลด์
ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator)	จานเพาะเชื้อ
หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	ตะเกียงบุนเส่น
ปิเปต, กระบอกตวง	ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (bacteriological agar) และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ มี 2 ชนิด

1. Total plate count agar

Bacto - tryptone	5.0 กรัม
Bacto yeast extract	2.5 กรัม
Bacto dextrose (Glucose)	1.0 กรัม
Bacto agar	15.0 กรัม

ชั่ง plate count agar 12.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มจนเดือดนำไปทำลายเชื้อโดยนึ่งในหม้อนึ่งสำหรับฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°ซ เทลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 20-25 มิลลิลิตร ปล่อยให้แข็งตัว คว่ำจานลง นำไปเก็บในตู้เย็น จนกว่าจะนำไปใช้

2. Blood agar

Proteose peptone	15.0 กรัม
Liver digest	2.5 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Agar	12.0 กรัม

ชั่ง blood agar base 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด และนำไปทำลายเชื้อโดยนึ่งในหม้อนึ่ง สำหรับฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°ซ เติมเลือดแกะ (sheep blood) 35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 20-25 มิลลิลิตร ปล่อยให้แข็งตัว คว่ำจานลง และนำไปเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

1. Gram's reagents (Hucher Modification)

Crytal violet solution

Crystal violet	2.0 กรัม
Ethyl alcohol (95%)	20.0 มิลลิลิตร
Ammonium oxalate	0.8 กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	80.0 มิลลิลิตร

2. Iodine Solution

Iodine	1.0 กรัม
Potassium iodide	2.0 กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	100.0 มิลลิลิตร

3. Safranin O

Safranin O	0.25 กรัม
Ethye alcohol	10.00 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	100.00 มิลลิลิตร

4. Methye alcohol 90%

ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1. เตรียมเครื่องมือเก็บตัวอย่าง

ใช้ 70% Isopropyl alcohol ใช้ทำความสะอาดเครื่องมือทุกส่วนก่อนทำการเก็บตัวอย่าง และหลังจากใช้เครื่องไปแล้ว 3-4 วัน นำเครื่องมือไปทำให้ปราศจากเชื้อทุกครั้ง และผ่านอุลตราไวโอเลตทุกครั้งก่อนบรรจุจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปเก็บตัวอย่าง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Total plate count agar และ Blood agar เรียบร้อยแล้ววางบนชั้นแต่ละชั้นทั้ง 6 ชั้น โดยแยกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดละ 1 ชุด ต่อเครื่องมือ 1 ชุด ซึ่งขณะที่ใส่จานเลี้ยงเชื้อในเครื่องมือ ต้องทำในห้องปราศจากเชื้อ และลนไฟฆ่าเชื้อทุก

ครั้ง แล้วนำเครื่องมือแต่ละชุดหุ้มด้วยถุงพลาสติกสะอาดทุกครั้ง จนกว่าจะนำไปติดตั้งเก็บตัวอย่าง

2. การติดตั้งเครื่องมือเก็บตัวอย่าง ในการทดลองจะติดตั้งเครื่องมือ 2 เครื่องที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดไว้ที่จุดเดียวกัน โดยมีระยะห่างกันประมาณ 0.5 เมตร และอยู่สูงจากพื้นดิน 15 เมตร ซึ่งติดตั้งที่สถานีตรวจวัดอากาศหน้าตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และที่วงเวียนโอเดียน

3. ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง ในการทดลองเก็บตัวอย่างโดยใช้ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง อย่างละ 7 นาที ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งเก็บในช่วงเวลา 9.00-12.00 น. ของทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 80 วัน (80 ตัวอย่าง) ของแต่ละบริเวณ

4. การประกอบและปรับแต่งเครื่องมือ viable microbial particle sizing samplers ทำการต่อเชื่อมระหว่างส่วนต่าง ๆ ที่เชื่อมด้วยสายยางให้แน่น ระหว่างตัวเครื่องมือ และปั๊มดูดอากาศทุกครั้งที่เริ่มติดตั้งและหลังติดตั้งแล้ว ก่อนย้ายจุดติดตั้ง ต้องทำการปรับเช็คเครื่องมือแต่ละเครื่องทุกครั้ง แล้วจึงทำการเดินเครื่องจนครบ 7 นาที พร้อม ๆ กันทั้ง 2 เครื่อง ณ บริเวณเดียวกันต่อการทำการเก็บตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ซึ่งเครื่องหนึ่งจะเก็บตัวอย่างอากาศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar และอีกเครื่องหนึ่งสำหรับเก็บตัวอย่างอากาศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar

5. นำตัวอย่างที่เก็บได้จากอากาศในจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปเพาะเชื้อไว้ที่ตู้บ่มเชื้อ ที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและประเภทเชื้อแบคทีเรีย

1. การตรวจนับเชื้อ หลังจากบ่มเพาะเชื้อตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมาทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมดที่เจริญในอาหารดังกล่าว โดยรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อปริมาตรอากาศหนึ่งลูกบาศก์เมตรหรือ colony forming unit/m^3 (ซีเอฟยูต่อม^3) ดังสูตรคำนวณจำนวนโคโลนี ส่วนในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น blood agar นำไปวิเคราะห์แยกกลุ่มชนิดของเชื้อต่อไป

สูตรการคำนวณหาจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์

ปริมาตรอากาศทั้งหมด = 28.23 x จำนวนเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

จำนวนโคโลนีต่ออากาศ 1 ลูกบาศก์เมตร = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับในจานเลี้ยงเชื้อ x 1000}}{\text{ปริมาตรอากาศทั้งหมด}}$

2. การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ทำได้โดย

2.1 สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบน blood agar โดยดูขนาด รูปร่าง ผิว ขอบ สี ความโปร่งใส เนื้อ กลิ่น และการสลายเม็ดเลือดแดง แล้วบันทึกผล

2.2 ทำการย้อม Gram stain โดยหยดน้ำเกลือ 1 หยดบนสไลด์ ใช้เข็มหรือ loop เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ได้สังเกตลักษณะในข้อ 2.1 แล้วมา emulsify ในหยดน้ำเกลือจนเป็นเนื้อเดียวกัน ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียวเท่านั้น เมื่อ smear เรียบร้อยแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปลนบนเปลวไฟโดยผ่านไปมา 3-4 ครั้ง โดยใช้มือจับสไลด์ (fixing) และทิ้วไว้ให้เย็นก่อน นำไปย้อมสีแกรม (Gram stain) โดยนำสไลด์ที่ป้ายและตรึงไว้เรียบร้อยแล้วมาย้อมสีตามขั้นตอนต่อไปนี้

ก. หยด gentian violet นาน 1/2 - 1 นาที

ข. ล้างด้วยน้ำ

ค. หยด Gram iodine นาน 1 นาที เพื่อให้สี gentian violet ติดแน่นขึ้น

ง. ล้างด้วยน้ำ

จ. เอียงสไลด์ 40 องศา ค่อย ๆ เทแอลกอฮอล์นาน 10 วินาที หรือจนไม่มีสีหลุดออกมาอีก (decolorization)

ฉ. ล้างด้วยน้ำ

ช. Counterstain ด้วย safranin O นาน 1/2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

ซ. ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู และนำไปดูด้วยกล้องจุลทัศน์

3. การดูด้วยกล้องจุลทัศน์ (Microscopic examination) ดูด้วยเลนส์กำลังขยายต่ำ (10 x) ก่อน และเปลี่ยนเป็นกำลังขยายสูง (100 x) ซึ่งใช้ oil immersion จากนั้นบันทึกผลวาดภาพที่เห็นในกล้อง โดยสังเกตดู รูปร่าง ขนาด การเรียงตัว การติดสีแกรมของแบคทีเรียที่ปรากฏนั้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. ใช้สถิติเชิงพรรณา เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการกระจายของปริมาณ และชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ร้อยละ ค่าเฉลี่ย มัชฌิมเรขาคณิต พิสัย นำเสนอในรูปตาราง และการบรรยาย

2. ใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ หาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณ และชนิดของแบคทีเรีย กับปริมาณฝุ่นละออง PM10 โดยใช้ T-test, F-test ทดสอบความสัมพันธ์นัยสำคัญทางสถิต และใช้ Regression analysis ร่วม