บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเก็บอากาศชนิด personal air sampler โดยใช้เทคนิค liquid impinge เป็นเครื่องมือสำหรับเก็บรวบรวมสารอนุภาคของแข็ง ประกอบไปด้วยเครื่องปั๊มอากาศที่สามารถปรับอัตราการไหลได้ ดังแสดงในรูปที่2 ส่วนที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์ (microbial aerosol) เป็นหลอดทดลองพลาสติค ที่ฝาปิดมีรู 2 รู เพื่อต่อสายยาง สำหรับให้อากาศเข้า และต่อสายยางต่อกับปั๊มเพื่อดูดอากาศออก

1.1 หลักการของเครื่องมือ

อากาศจะไหลผ่านเข้าเครื่องด้วยอัตราการไหล (Flow rate) 5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ผ่านสายยางขนาด 1 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร อากาศและฝุ่นละอองจะไหลผ่านตัวกลางที่เป็นของเหลว (phosphate buffer) ซึ่งเป็นตัวกักเก็บฝุ่นละอองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ และอากาศจะไหลออกจากระบบเมื่อผ่านตัวกลางของเหลว

1.2 . ส่วนประกอบของเครื่องมือ

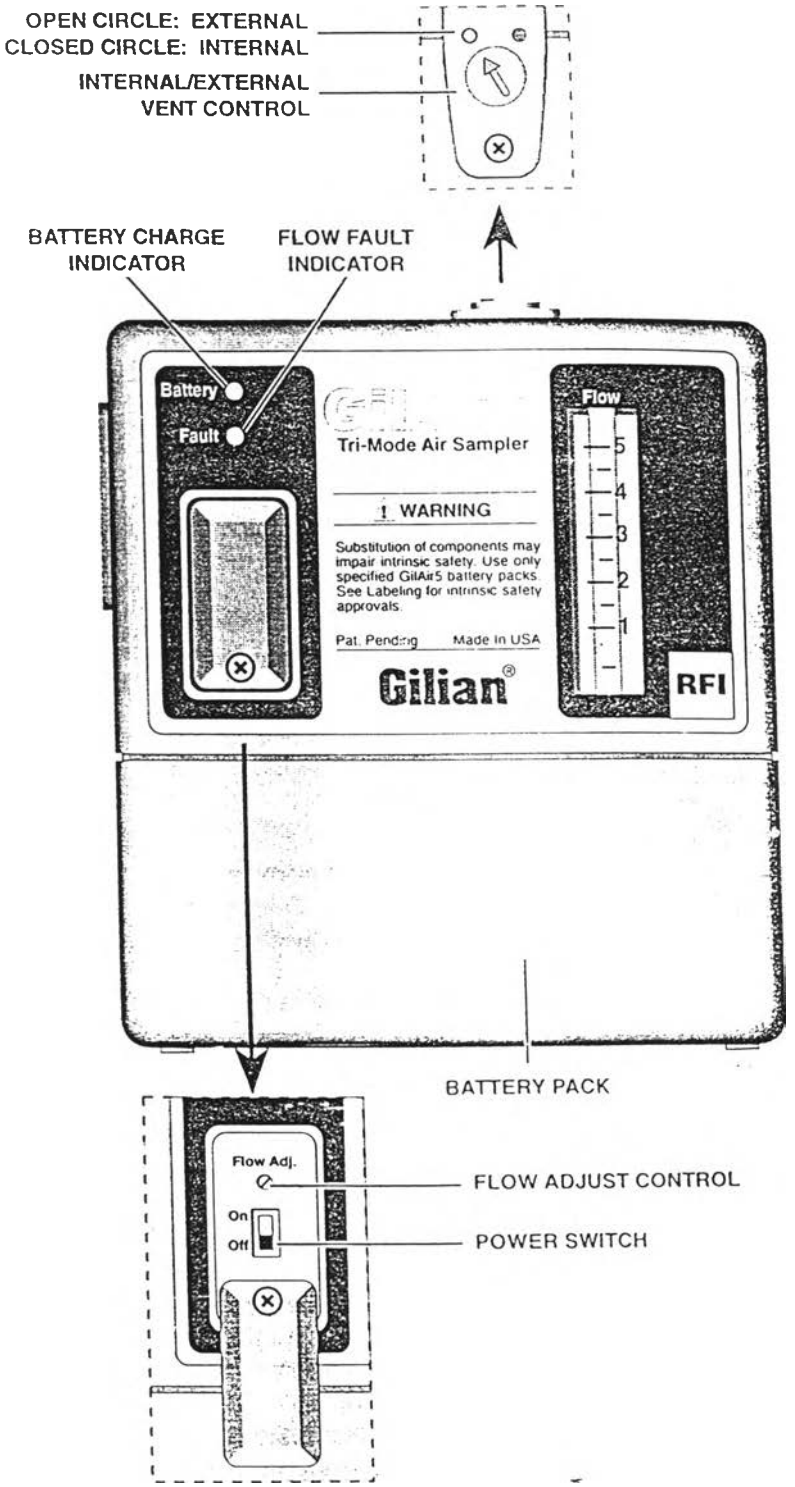
ก. เครื่องเก็บอากาศ เป็นปั๊มดูดอากาศที่มีรูเปิดให้อากาศเข้า ทำให้เกิดอัตราการไหลของอากาศได้

ข. ส่วนวัดอัตราการไหล (flowmeter) ซึ่งจะประกอบอยู่ในส่วนของส่วนเก็บตัวอย่าง (sampler)

ค. ส่วนเก็บตัวอย่าง (sampler) เป็นหลอดเก็บอากาศ (tube) เป็นหลอดพลาสติกที่ฝาปิดมีรู 2 รู เพื่อต่อสายยางให้อากาศเข้าและออก

ง. สายยางขนาด 1 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เป็นทางเดินอากาศจากเครื่องดูดอากาศมาส่วนเก็บตัวอย่าง

รูปที่ 2 ลักษณะของเครื่องเก็บอากาศชนิด personal air sampling



1.3 วิธีการ เก็บตัวอย่าง

ก. นำหลอดเก็บตัวอย่าง (tube) ที่ใส่สารละลายตัวกลางสำหรับเก็บเชื้อ (phosphate buffer) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ต่อกับสายยางให้อากาศเข้าและออก

ข. ติดตั้งเครื่องเก็บตัวอย่างที่ได้ปรับอัตราการไหลและตั้งเวลาแล้ว ต่อกับสายยาง และนำไปต่อกับหลอดเก็บตัวอย่าง

ค. เดินเครื่อง เป็นเวลา 5 นาที เปลี่ยนหลอดเก็บตัวอย่างทุกครั้ง หลังครบเวลาเก็บตัวอย่าง เพื่อเก็บตัวอย่างอื่นต่อไป

ง. กล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์จำนวน ขนาด รูปร่าง การติดสีของเชื้อที่ปรากฏ

2. แบบสอบถามความเจ็บป่วย ในภาคผนวก

วัสดุอุปกรณ์

จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ตะเกียงแอลกอฮอล์

ปิเปต, ไมโครปิเปต, กระบอกตวง, บีกเกอร์, ขวดรูปชมพู่, แท่งแก้วคน

แผ่นสไลด์ ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator)

ตู้ไมโครเวฟ กระติกใส่น้ำแข็ง

ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Bacteriological agar)

Total plate count agar วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ก.

พิมพ์ต้นฉบับ สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเชื้อและตรวจวิเคราะห์

1. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเชื้อ

   - phosphate buffer

   K_2HPO_4 100 mM

   KH_2PO_4 30 mM

   $MgSO_4$ 0.4 mM

2. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

   Gram's reagents(Hucher Modification) ในภาคผนวก ข.

สถานที่ทำการศึกษา

ในการวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์และสำรวจแบบสอบถามประชาชนในพื้นที่บริเวณรอบๆศูนย์รวบรวมขยะหนองแขมในรัศมี 1 กิโลเมตร โดยจัดตั้งเครื่องมือเก็บอากาศชนิด personal air sampler โดยใช้เทคนิค liquid impinge 3 เครื่อง ไว้ห่างประมาณ 1 เมตร ในสถานีเก็บอากาศที่กำหนดขึ้น โดยมีจุดติดตั้งเครื่องมือและเก็บข้อมูลความเจ็บป่วยประชาชนไว้ 6 แห่ง คือ

1. บริเวณที่ทำการเขตหนองแขม เป็นตัวแทนชุมชนที่อยู่ห่างจากสถานีกำจัดมูลฝอยหนองแขมมากกว่า 1 กิโลเมตร ห่างจากถนนเพชรเกษม เป็นระยะทาง 20 เมตร

2. เขตโทรศัพท์นครหลวง3.1 อยู่ในซอยเพชรเกษม108 อยู่ทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของสถานีสถานีรวบรวมขยะหนองแขม ซึ่งห่างประมาณ 1 กิโลเมตร

3. ซอยเพชรเกษม 106 ห่างจากถนนเพชรเกษม 50 เมตร อยู่ทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของสถานีกำจัดมูลฝอยหนองแขม ในระยะ 1 กิโลเมตร

4. บริเวณหน้าโรงผลิตปุ๋ย อยู่ทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของสถานีรวบรวมขยะหนองแขม 600 เมตร

5. คลองทวีวัฒนา อยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของสถานีรวบรวมขยะหนองแขม 1 กิโลเมตร

6. โรงเรียนอัสสัมชัญ ธนบุรี อยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีระยะห่างจากสถานีมากกว่า 1 กิโลเมตร

รูปที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างอากาศ

1 = ที่ทำการเขตหนองแขม

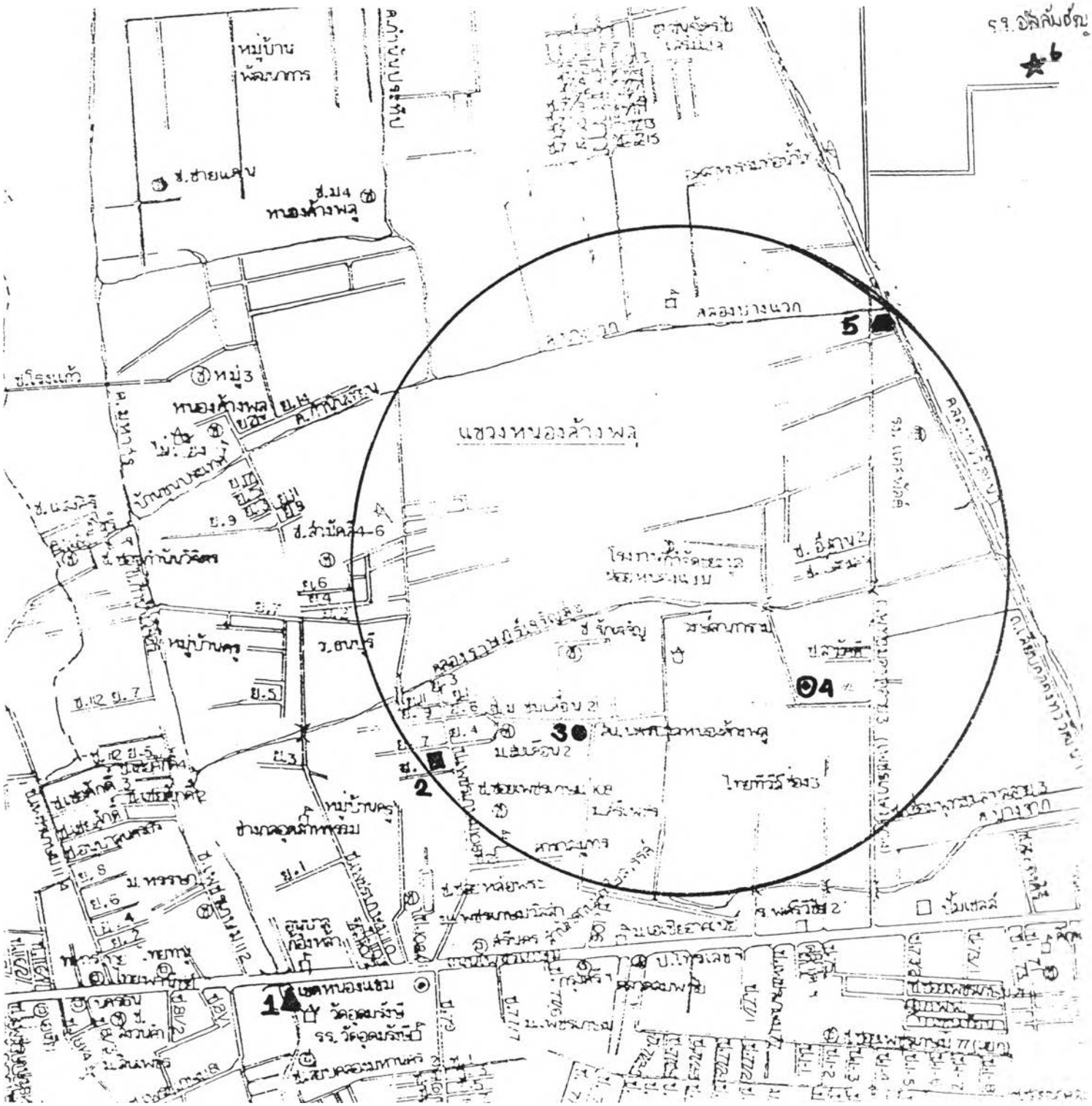
2 = เขตโทรศัพท์นครหลวง 3.1

3 = ซอยเพชรเกษม106

4 = โรงผลิตปุ๋ย

5 = คลองทวีวัฒนา

6 = ร.ร.อัสสัมชัญ ธนบุรี



ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1. เตรียมเครื่องมือเก็บตัวอย่าง

ใช้ 70% ethyl alcohol ทำความสะอาดเครื่องมือทุกส่วนก่อนทำการเก็บตัวอย่าง โดยกำหนดให้อัตราไหล(flow rate) 5 ลิตรต่อนาที

2. การติดตั้งเครื่องมือเก็บตัวอย่าง

ในการทดลองจะติดตั้งเครื่องมือ 3 เครื่องที่ต่อเข้ากับหลอดทดลองเก็บอากาศที่บรรจุสารละลายตัวกลางสำหรับเก็บเชื้อ โดยได้ผ่านการนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยระยะห่างของเครื่อง 1 เมตร และสูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร

3. ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่าง ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่าง 5 นาที ต่อ 1 หลอดทดลอง ซึ่งจะเก็บในช่วงเวลา 10.00-15.00 น. ของทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 เดือน รวมทั้งหมด 126 ตัวอย่าง

4. การประกอบและปรับแต่งเครื่องมือ

ทำการต่อเชื่อมเครื่องมือระหว่างส่วนต่างที่เชื่อมด้วยสายยางให้แน่นทุกครั้ง แล้วจึงเดินเครื่องเป็นเวลา 5 นาที พร้อมๆกันทั้ง 3 เครื่อง

5. นำตัวอย่างอากาศที่เก็บได้เก็บในกระติกน้ำแข็ง ก่อนนำกลับห้องทดลองเพื่อทำการทดลองต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและประเภทเชื้อแบคทีเรีย

1. การตรวจนับเชื้อ โดยทำการย้อม gram strain เชื้อจากสารละลายที่เก็บเชื้อโดยหยดสารละลาย0.01 มิลลิลิตร ขนาด 1 ตารางเซนติเมตรบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปลนบนเปลวไฟโดยผ่านไปมา 3-4 ครั้ง และทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม (gram stain) วิธีทำในภาคผนวก ก และนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic

examination) โดยใส่ตารางสำหรับนับจุลินทรีย์ลงบน eye piece โดยดูด้วยเลนส์กำลังขยายต่ำ (10x) ก่อน และเปลี่ยนเป็นกำลังขยายสูง (100x) ซึ่งใช้ Oil immersion จากนั้นบันทึกผลที่นับได้

สูตรการคำนวนหาจำนวนของจุลินทรีย์

จำนวนเซลล์ต่ออากาศ 1 ลูกบาศก์เมตร

$$=\frac{(\text{จำนวนเชื้อเฉลี่ยที่นับได้ต่อfield})(\text{จำนวนfieldใน1ตารางเซนติเมตร})(300)1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างอากาศ}}$$

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อดูลักษณะโคโลนีและลักษณะเชื้อดังนี้

ก. หยดเชื้อจากสารละลายที่เก็บเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ทาให้ทั่วบนผิวสารอาหาร

ข. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

ค. ตรวจนับเชื้อ หลังจากบ่มเชื้อตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมดที่เจริญในอาหาร โดยรายงานผลเป็นโคโลนีต่อหนึ่งลูกบาศก์เมตร ตามเวลาที่กำหนดแล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมดที่เจริญในอาหาร โดยรายงานผลเป็นโคโลนีต่อปริมาตรอากาศหนึ่งลูกบาศก์เมตร หรือ colony forming unit/m^3 (ซีเอฟยูต่อลูกบาศก์เมตร) ดังสูตรคำนวณจำนวนโคโลนี

จำนวนโคโลนีต่ออากาศ 1 ลูกบาศก์เมตร

$$=\frac{(\text{จำนวนโคโลนีที่นับในจานเลี้ยงเชื้อ})(300)1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างอากาศ}}$$

3. การวิเคราะห์เชื้อ ทำโดย

2.1 สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบน nutrient agar โดยดูขนาด รูปร่าง ผิว สี

2.2 ทำการย้อม Gram stain โดยหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ใช้เข็มหรือ Loop เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สังเกตได้ ในข้อ 2.1 แล้วมา emulsify ในหยดน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ให้เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียวเท่านั้น เมื่อ smear เรียบร้อยแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปลนบนเปลวไฟโดยผ่านไปผ่านมา 3-4 ครั้ง แล้วทิ้งให้เย็นก่อน นำไปย้อมสีแกรม (Gram stain) (ในภาคผนวก ก)

วิธีการสำรวจแบบสอบถาม

แบบสอบถาม ซึ่งได้สร้างขึ้นจากการศึกษาข้อมูล เอกสารต่างๆ โดยได้ดัดแปลงมาจากแบบสอบถามของ National institute for occupation safty and health ซึ่งเป็นแบบสอบถามเกี่ยวกับความเจ็บป่วยทางเดินหายใจ ในภาคผนวก โดยแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ เพื่อใช้ในการแบ่งกลุ่มและคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ตอนที่ 1 เป็นคำถามเกี่ยวกับข้อมูลทั่วไปของประชาชน ได้แก่ อายุ เพศ อาชีพ ที่อยู่ สถานที่ทำงาน ระยะเวลาที่อยู่ในพื้นที่ เคยทำงานใกล้กองขยะ และเคยได้กลิ่นจากกองขยะ

ตอนที่ 2 ความเจ็บป่วย โดยเป็นคำถามแบบปลายเปิดเกี่ยวกับจำนวนการไอหรือมีเสมหะต่อวัน มีเกณฑ์ให้คะแนนดังนี้

ตอนที่ 3 ความเจ็บป่วยในอดีต

ตอนที่ 4 ประวัติการสูบบุหรี่

ตอนที่ 5 ประวัติความเจ็บป่วยในครอบครัว

การรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลกระทำโดยผู้วิจัยได้เก็บรวบรวมข้อมูลจากประชาชนที่อยู่ในบริเวณที่ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างอากาศ และเจ้าหน้าที่ที่ทำงานในสถานที่ราชการที่ใช้เป็นสถานีเก็บอากาศ ทั้ง 2 ฤดู คือ เดือนกันยายน 2542 และเดือนกุมภาพันธ์2543 การเก็บข้อมูลได้ใช้วิธีแจกแบบสอบถามให้ทำ และสัมภาษณ์ หลังจากทำเสร็จ นำแบบสอบถามที่ได้มาตรวจดูความเรียบร้อย เพื่อให้ได้คำตอบที่ครบถ้วนสมบูรณ์ โดยคัดเลือกกลุ่มเป้าหมายเฉพาะที่ไม่มีปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดปัญหาสุขภาพ โดยแบ่งคนป่วยออกเป็น 4 กลุ่ม

ไม่ไอเลย

ไอและมีเสมหะ 1-2 ครั้ง ต่อวัน

ไอและมีเสมหะ 2-5 ครั้ง ต่อวัน

ไอและมีเสมหะ 5-10ครั้ง ต่อวัน

ไอและมีเสมหะ มากกว่า 10 ครั้ง ต่อวัน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1.ใช้สถิติเชิงพรรณนา เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการกระจายของปริมาณและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ร้อยละ ค่าเฉลี่ย นำเสนอในรูปตาราง และการบรรยาย

2.ใช้สถิติวิเคราะห์ Linear regression ในการหาความสัมพันธ์ปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศกับปัญหาสุขภาพ