# การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งและช้อนจากโรงอาหาร

# Microbial quality analysis in ice and eating apparatus from cafeteria

ณัฏฐริกา สาลี
นฤพล จันทร์สว่าง
นันทิยา ทองมะณี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

# การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งและช้อนจากโรงอาหาร

# Microbial quality analysis in ice and eating apparatus from cafeteria

ณัฏฐริกา สาลี
นฤพล จันทร์สว่าง
นันทิยา ทองมะณี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# MICROBIAL QUALITY ANALYSIS IN ICE AND EATING APPARATUS FROM CAFETERIA

NATTARIKA SALEE
NARUEPON CHANSAWANG
NUNTIYA THONGMANEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งและช้อนจากโรงอาหาร<br>Microbial quality analysis in ice and eating apparatus from cafeteria | |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวณัฏฐริกา สาลี | รหัสนักศึกษา 56050986 |
| | นายนฤพล จันทร์สว่าง | รหัสนักศึกษา 56051011 |
| | นางสาวนันทิยา ทองมะณี | รหัสนักศึกษา 56051015 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) | |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา | |
| **ปีการศึกษา** | 2559 | |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา | |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ.ลินจง สุขลำภู<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งและซ้อนจากโรงอาหาร
**ชื่อนักศึกษา** นางสาวณัฏฐริกา สาลี รหัสนักศึกษา 56050986
นายนฤพล จันทร์สว่าง รหัสนักศึกษา 56051011
นางสาวนันทิยา ทองมะณี รหัสนักศึกษา 56051015
**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
**ภาควิชา** ชีววิทยา
**คณะ** วิทยาศาสตร์
**มหาวิทยาลัย** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
**ปีการศึกษา** 2559
**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

## บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งจากร้านค้าภายในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจำนวน 6 ตัวอย่างจาก 2 ร้านซึ่งน้ำแข็งมาจากแหล่งผลิตเดียวกันแต่มีการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยวิธี MPN และวิเคราะห์หาเชื้อ *Escherichia coli* ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างน้ำแข็งทั้งหมดมีการปนเปื้อนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และเชื้อ *E. coli* เกินเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด โดยร้าน A มีค่าเฉลี่ยการปนเปื้อนเท่ากับ $5.0\times10^2$, 3.3 และ 2.7 MPN/100 ml ตามลำดับ ส่วนร้าน B มีค่าเฉลี่ยการปนเปื้อนเท่ากับ $8.6\times10^2$, 7.7 และ 5.3 MPN/100 ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่าร้าน B มีการปนเปื้อนสูงกว่าร้าน A บ่งชี้ว่าน้ำแข็งจากทั้งสองร้านมีการปนเปื้อนแบคทีเรียที่อาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค ควรมีการแก้ไขปรับปรุงด้านสุขาภิบาลอาหารที่ดีเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และโครงงานพิเศษนี้ยังทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร โดยป้ายสารละลายเชื้อ *E. coli* ในรูปสารแขวนลอยลงบนช้อน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเชื้อก่อนและหลังการจุ่มลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3, 5 และ 10 วินาที ช่วงเวลาละ 4 ตัวอย่าง โดยวิธี swab แล้วนำมา spread plate ลงบนอาหาร TSA ผลการศึกษาพบว่า เชื้อก่อนการจุ่มลวกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.5\times10^4$, $5.3\times10^4$ และ $6.7\times10^4$ CFU ตามลำดับ แต่หลังการจุ่มลวกที่เวลา 3 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.6\times10^3$ CFU ซึ่งยังมีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน แต่ที่เวลา 5 และ 10 วินาที ปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าการลวกช้อนยิ่งใช้เวลามากก็ยิ่งสามารถลดการปนเปื้อนได้มากขึ้น แต่น้ำที่ใช้ในการจุ่มลวกต้องมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป

**คำสำคัญ :** การจุ่มลวกช้อน โคลิฟอร์มแบคทีเรีย น้ำแข็ง ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย วิธีMPN *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **Title** | Microbial quality analysis in ice and eating apparatus from cafeteria | |
| **Students** | Miss Nattarika Salee | Student ID 56050986 |
| | Mr. Naruepon Chansawang | Student ID 56051011 |
| | Miss Nuntiya Thongmanee | Student ID 56051015 |
| **Degree** | Bachelor of Science (Industrial Microbiology) | |
| **Department** | Biology | |
| **Faculty** | Science | |
| **University** | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) | |
| **Academic Year** | 2016 | |
| **Advisor** | Asst.Prof.Dr.Chokchai Kittiwongwattana | |


## Abstract


This special project studied the microbiological qualities of six ice samples collected from two stores at the cafeteria of the Faculty of Science, King Mongkut's Institute of technology Ladkrabang. Samples of the two stores was from the same supplier but kept under different conditions. The analysis of coliform and fecal coliform bacteria was done by the MPN method. The presence of *Escherichia coli* was also examined. The results showed that all samples were contaminated with coliform and fecal coliform bacteria as well as *E. coli*. The result also showed that the number of these bacteria was over the safety limits. The average number of the three groups of bacteria from store A was $5.0\times10^2$, 3.3 and 2.7 MPN/100 ml, respectively. The average number of the three groups of bacteria from store B was $8.6\times10^2$, 7.7 and 5.3 MPN/100 ml, respectively. This indicated that samples from store B contained a higher number of bacteria. Sanitation should be applied to prevent bacterial contamination. Additionally, This project studied the reduction of *E. coli* on spoons by blanching in water heated to 70 °C, *E. coli* was swabbed on to spoons which were blanched in the water for 3, 5 and 10 seconds. The average numbers of *E. coli* before blanching were $1.5\times10^4$, $5.3\times10^4$ and $6.7\times10^4$ CFU. Blanching spoons for three minutes reduced the bacteria number to $6.6\times10^3$ CFU. However, the five-second and ten-second treatments reduced the bacterial numbers to zero. This suggested that the longer time for spoon blanching is better, and the water temperature must be 70 °C or higher.



**Keywords :** blanching spoon, coliform bacteria, ice, fecal coliform bacteria, MPN method, *E. coli*



เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งโครงงานพิเศษนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำโครงการ รวมทั้งได้ตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผศ.ลินจง สุขลำภู และ ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการและกรรมการตามลำดับ ที่กรุณาแก้ไขข้อบกพร่อง รวมถึงให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์เพิ่มเติมในการปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการเบิกสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้โอกาสได้มาศึกษาเล่าเรียน ทั้งยังคอยสนับสนุนเป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ รวมถึงบุคคลอื่นๆ ที่มิได้กล่าวมา ณ ที่นี้ ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมาจนทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จสมบูรณ์ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ณัฏฐริกา สาลี
นฤพล จันทร์สว่าง
นันทิยา ทองมะณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ ..... 2
1.3 ขอบเขต ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2
**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3
2.1 น้ำแข็งบริโภค ..... 3
2.1.1 กระบวนการผลิตน้ำแข็ง ..... 3
2.1.2 การเก็บรักษาและภาชนะบรรจุ ..... 4
2.1.3 เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำแข็ง ..... 4
2.2 โคลิฟอร์มแบคทีเรีย ..... 5
2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยวิธี multiple tube technique ..... 5
2.4 เชื้อ *E. coli* ..... 7
2.5 หลักการด้านสุขาภิบาลอาหาร ..... 8
2.5.1 ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหารและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร ..... 8
2.5.2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาบนภาชนะสัมผัสอาหาร ..... 8
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 9
**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 12
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 12
3.2 สารเคมี ..... 12
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 12
3.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ..... 13
3.5 ขั้นตอนการดำเนินการ ..... 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 14
3.5.1.1 การเก็บตัวอย่าง..... 14
3.5.1.2 การตรวจสอบขั้นประมาณการณ์ (Presumptive test)..... 14
3.5.1.3 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed test)..... 14
3.5.1.4 การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Completed test) สำหรับการตรวจหา *E. coli*..... 15
3.5.1.5 การทดสอบการย้อมแกรม..... 15
3.5.1.6 การทดสอบทางชีวเคมี (การทดสอบปฏิกิริยา IMViC)..... 16
3.5.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร..... 16
3.5.2.1 การเตรียม McFarland Standard..... 16
3.5.2.2 การเตรียมตัวอย่างและการป้าย (swab) ตัวอย่างช้อน..... 17
3.5.2.3 การทดสอบปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำที่ใช้ลวกช้อน..... 18
3.5.2.4 การเจือจางตัวอย่าง..... 18
3.5.2.5 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ด้วยเทคนิค spread plate..... 18
3.5.3 การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์..... 18
**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล**..... 20
4.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 20
4.1.1 ปริมาณจำนวน Total coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 20
4.1.2 ปริมาณจำนวน Total fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 21
4.1.3 ผลการทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Complete test) สำหรับการตรวจหา *E. coli*..... 24
4.1.4 ผลการทดสอบการย้อมแกรม..... 25
4.1.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (การทดสอบปฏิกิริยา IMViC)..... 26
4.1.6 ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 31
4.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร..... 32
**บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ**..... 38
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 38
5.1.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร..... 38
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 39
เอกสารอ้างอิง..... 40
ภาคผนวก ก..... 43
ภาคผนวก ข..... 46
ภาคผนวก ค..... 47
ภาคผนวก ง..... 54
ภาคผนวก จ..... 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


**ตารางที่** **หน้า**

2.1 ตารางมาตรฐาน MPN (5 หลอด)..... 6

3.1 แสดงอัตราส่วนในการทำ MCFarland Standard..... 17

4.1 ผลการศึกษา Total coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 21

4.2 ผลการศึกษา Total fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 22

4.3 แสดงผลการศึกษาทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 30

4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค..... 31

4.5 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังการจุ่มลวกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 5 และ 10 วินาที..... 33

ค.1 ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ LTB..... 47

ค.2 ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB..... 48

ค.3 ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium..... 49

ค.4 แสดงผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อ *E.coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง..... 50

ค.5 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA ก่อนการจุ่มลวกช้อน..... 51

ค.6 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA หลังการจุ่มลวกช้อน..... 52

ค.7 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA ในตัวอย่างน้ำก่อนต้ม น้ำก่อนจุ่มลวก และน้ำหลังจุ่มลวก..... 53

ง.1 คะแนนประเมินวีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็ง จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน..... 56

ง.2 คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อน รูปแบบที่ 1 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน..... 58

ง.3 คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อน รูปแบบที่ 2 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน..... 60

ง.4 คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อน รูปแบบที่ 3 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน..... 62

จ.1 แสดงค่าดัชนี MPN และขีดจำกัดความเชื่อมั่น 95% ของหลอดที่ให้ผลบวกเมื่อใช้ระบบ 5 หลอด..... 64


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ลักษณะของเซลล์ *E. coli* | 7 |
| 4.1 | ตัวอย่างผลการตรวจยืนยันหาเชื้อ coliform bacteria ของตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภคในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB | 20 |
| 4.2 | แสดงตัวอย่างผลตรวจยืนยันหาเชื้อ fecal coliform bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Medium | 21 |
| 4.3 | แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภค จากร้าน A และร้าน B | 23 |
| 4.4 | (ก) จานควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป (ข) ตัวอย่างโคโลนีที่ต้องสงสัยว่าเป็นโคโลนีของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB (ค) ตัวอย่างโคโลนี fecal coliform bacteria ทั่วไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB | 25 |
| 4.5 | (ก) จานควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป (ข) การเจริญของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA | 26 |
| 4.6 | (ก) ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลต A5 ที่ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดเล็ก (ข) ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลต A2 ที่ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดใหญ่ | 26 |
| 4.7 | การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเปลี่ยน Tryptophan เป็น Indole | 27 |
| 4.8 | การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose | 28 |
| 4.9 | การทดสอบความสามารถในการสร้าง Acethyl Methyl Carbinol จาก Glucose | 29 |
| 4.10 | การทดสอบความสามารถใช้ citrate เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน | 30 |
| 4.11 | ตัวอย่างการเจริญของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA | 33 |
| 4.12 | เปรียบเทียบจำนวนโคโลนี (CFU/ml) ของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังการจุ่มลวก ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3, 5 และ 10 วินาที | 34 |
| 4.13 | สื่อประชาสัมพันธ์หัวข้อลวกช้อนอย่างไรให้ได้ผลดีก่อนการประเมิน | 36 |
| 4.14 | สื่อประชาสัมพันธ์หัวข้อลวกช้อนอย่างไรให้ได้ผลดีที่ปรับปรุงแก้ไข | 37 |
| ง.1 | แบบฟอร์มแบบสอบถามเรื่องวีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็ง | 54 |
| ง.2 | แบบฟอร์มแบบสอบถามเรื่องโปสเตอร์การจุ่มลวกช้อนเพื่อลดการปนเปื้อน | 55 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนอบอ้าวและนับวันจะยิ่งร้อนมากขึ้นทุกที สภาพอากาศที่ร้อนเช่นนี้ น้ำแข็งจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้ในการคลายร้อน หากน้ำแข็งที่ใช้รับประทานโดยตรงไม่สะอาดพอและมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคปนเปื้อนอยู่ก็อาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการป่วยจากโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ ซึ่งภายในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเป็นอีกหนึ่งสถานที่ที่มีร้านจำหน่ายเครื่องดื่มจำนวนมาก เพื่อให้บริการแก่นักศึกษาและบุคลากร จากการสังเกตการเก็บน้ำแข็งของร้านจำหน่ายเครื่องดื่มแต่ละร้านภายในคณะพบว่า มีลักษณะการเก็บน้ำแข็งที่แตกต่างกัน เช่น ระดับความสูงในการวางถังบรรจุน้ำแข็ง หรือการนำสิ่งอื่นแช่รวมกับน้ำแข็งสำหรับบริโภค เป็นต้น การสังเกตพฤติกรรมดังกล่าวทำให้เกิดข้อสงสัยว่าสุขลักษณะในการจัดเก็บน้ำแข็งที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งหรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม ตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุขที่ได้กำหนดไว้ โดยผลจากงานวิจัยชิ้นนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการแก้ไขปัญหา และหาแนวทางป้องกัน เพื่อลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคของระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากเชื้อก่อโรคต่อไป

นอกจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภคแล้ว การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารก็เป็นอีกหนึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ เช่น โรคท้องร่วง โรคอาหารเป็นพิษ เป็นต้น ซึ่งศูนย์จำหน่ายอาหารต่างๆได้หาวิธีเพื่อป้องกันและลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ วิธีที่พบเห็นบ่อยคือ การต้มน้ำร้อนโดยใช้หม้อหุงข้าว ที่วางไว้ให้ผู้บริโภคใช้จุ่มลวกช้อนก่อนนำมาใช้ในการตักอาหารรับประทาน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันตามศูนย์อาหารในศูนย์การค้า หรือแม้กระทั่งโรงอาหารต่างๆในสถาบัน รวมถึงโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ก็มีหม้อหุงข้าวต้มน้ำไว้ให้บริการแก่นักศึกษาและบุคลากรเช่นกัน และจากการสังเกตพฤติกรรมของผู้มาใช้บริการที่นำช้อนมาจุ่มลวกนั้นพบว่า ผู้มาใช้บริการส่วนใหญ่ใช้เวลาในการจุ่มลวกเพียงไม่กี่วินาที และอุณหภูมิในหม้อต้มอาจจะต่ำเกินไป จึงเกิดเป็นความสงสัยว่าเวลาที่ใช้ในการจุ่มลวกช้อน และอุณหภูมิของน้ำในหม้อหุงข้าวนั้นเพียงพอในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้จริงหรือไม่ ผู้วิจัยจึงสนใจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนช้อนทั้งก่อนและหลังการจุ่มน้ำร้อน โดยการศึกษานี้มุ่งประเด็นไปที่เวลาที่ใช้ในการจุ่มลวกจากการสังเกตพฤติกรรมของผู้ใช้บริการว่าสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้มากน้อยเพียงใด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการป้องกัน และลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณจำนวน Total coliform bacteria และ Total Fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภคโดยวิธี MPN

2) เพื่อตรวจและวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

3) เพื่อตรวจและวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *E. coli* จากภาชนะสัมผัสอาหารได้แก่ ช้อน ก่อนและหลังการจุ่มน้ำร้อนเพื่อฆ่าเชื้อโรค

4) เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขและป้องกันปัญหาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งสำหรับบริโภคจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มภายในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 2 ร้านที่รับน้ำแข็งมาจากแหล่งผลิตเดียวกัน และศึกษาปริมาณเชื้อ *E. coli* บนช้อน ทั้งก่อนและหลังการจุ่มด้วยน้ำร้อน โดยระยะเวลาที่ทดสอบคือ 3, 5 และ 10 วินาที ตามลำดับ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม Coliform bacteria, Fecal Coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

2) ทราบถึงความเหมาะสมของระยะเวลาและอุณหภูมิของน้ำที่ใช้จุ่มลวกช้อนเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli*

3) เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงสุขลักษณะที่ดีในการบริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 น้ำแข็งบริโภค (สำนักงานอาหารและยา, 2545)

"น้ำแข็ง" หมายถึง น้ำที่นำมาผ่านกระบวนการทำให้เยือกแข็งจนกลายเป็นก้อนๆ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปัจจุบันนิยมนำมาบริโภคกันเป็นจำนวนมากเพื่อคลายความร้อน น้ำแข็งมี 2 ประเภทหลักๆคือ น้ำแข็งซอง และน้ำแข็งหลอด น้ำแข็งซองนิยมนำมาบริโภคโดยตรงและแช่อาหารเพื่อรักษาความสดใหม่ ส่วนน้ำแข็งหลอดนิยมนำมาบริโภคโดยตรงเช่นกัน เช่น ใส่ในเครื่องดื่มเพื่อเพิ่มความเย็น เนื่องจากน้ำแข็งนั้นสามารถนำมาบริโภคได้โดยตรง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำแข็งนั้นไม่ถูกทำลายก่อนนำมาบริโภค สาเหตุหนึ่งของการปนเปื้อนเกิดจากกระบวนการผลิตและกระบวนการจัดเก็บที่ไม่ถูกสุขลักษณะ รวมถึงพนักงานหรือเจ้าของร้านเครื่องดื่มมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่เหมาะสม ไม่ล้างมือให้สะอาดหลังจากเข้าห้องน้ำหรือก่อนที่จะสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *Escherichia coli* หรือเชื้ออื่นๆที่สามารถก่อโรคได้โดยเชื้อปนเปื้อนมากับอุจจาระ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายก็จะเพิ่มจำนวนและทำให้ผู้บริโภคมีอาการป่วยเกิดขึ้นได้

### 2.1.1 กระบวนการผลิตน้ำแข็ง

กระบวนการเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็ง โดยการปนเปื้อนอาจเกิดจากน้ำ สถานที่ หรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การป้องกันการปนเปื้อนที่ดีคือ ควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตและตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำแข็งตามมาตรฐานประกาศกระทรวงสาธารณะสุขว่าด้วยเรื่องน้ำบริโภค การล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ทุกครั้งทั้งก่อนและหลังการผลิต พนักงานควรมีการฝึกอบรมก่อนเข้าปฏิบัติงาน มีร่างกายที่พร้อม ไม่ป่วยเป็นโรค เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในน้ำแข็งได้ รวมทั้งการรักษาความสะอาดร่างกายก่อนเข้าปฏิบัติงานทุกครั้งก็สามารถที่จะช่วยลดการปนเปื้อนลงได้

ขั้นตอนการผลิตน้ำแข็งประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. กระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำ เป็นกระบวนการปรับปรุงน้ำดิบ ให้มีคุณภาพเทียบเท่าน้ำบริโภค น้ำที่นำมาผลิตน้ำแข็งที่ใช้ในการรับประทานนั้นต้องเป็นน้ำสะอาด ที่มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และคุณสมบัติที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์เป็นไปตามมาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณะสุขกำหนดไว้

2. กระบวนการแช่แข็งน้ำ ในการผลิตน้ำแข็งซองนั้นจะแช่น้ำในบ่อน้ำเกลือ โดยมีสารทำความเย็นซึ่งจะทำหน้าที่หล่อน้ำเกลือให้เย็นและกระจายความเย็นไปยังซองน้ำแข็ง ส่วนน้ำแข็งหลอดกระบวนการแช่แข็งน้ำให้กลายเป็นน้ำแข็งนั้นจะใช้เครื่องผลิตระบบปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กระบวนการบรรจุและขนส่ง น้ำแข็งซองจะไม่มีการบรรจุในถุงพลาสติกมีเพียงการล้างทำความสะอาดภายนอกแล้วนำขึ้นรถขนส่ง สำหรับร้านจำหน่ายเครื่องดื่มนิยมใช้น้ำแข็งซองที่ผ่านการบดแล้วบรรจุลงในกระสอบก่อนการขนส่ง ส่วนน้ำแข็งหลอดนั้นจะมีการบรรจุลงถุงพลาสติกหรือกระสอบ หลังจากนั้นจัดเก็บขึ้นรถขนส่งเพื่อรอจำหน่ายต่อไป

การผลิตน้ำแข็งนั้นควรมีการควบคุมการผลิตให้ถูกหลัก GMP รวมทั้งมาตรฐานต่างๆที่กระทรวงสาธารณะสุขได้กำหนดไว้ เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคให้ลดลงได้

**2.1.2 การเก็บรักษาและภาชนะบรรจุ (กระทรวงสาธารณะสุข, 2527)**

ร้านจำหน่ายเครื่องดื่มนิยมใช้น้ำแข็งประเภทซองที่ผ่านการบดแล้วมาจำหน่าย โดยจะมีถังเก็บน้ำแข็งที่ทำจากพลาสติกอย่างหนาเพื่อรักษาอุณหภูมิ ซึ่งทางกระทรวงสาธารณะสุขได้มีการกำหนดมาตรฐานในการจัดเก็บน้ำแข็งและภาชนะที่ใช้บรรจุ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็ง โดยกำหนดว่าสถานที่เก็บรักษาน้ำแข็งนั้นต้องสะอาดและมีระดับสูงกว่าทางเดิน สามารถทำความสะอาดได้ง่าย ส่วนภาชนะที่ใช้ในการบรรจุน้ำแข็งนั้นต้องสะอาด ไม่มีโลหะหนักหรือสารอื่นออกมาปนเปื้อนกับน้ำแข็งในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค วัสดุที่ใช้ทำต้องไม่มีอันตรายและลักษณะต้องเป็นพื้นผิวเรียบเพื่อง่ายต่อการทำความสะอาด ไม่แช่ผลิตภัณฑ์อื่นรวมกับน้ำแข็งที่ใช้บริโภค ภาชนะต้องปิดไว้เพื่อไม่ให้สิ่งหนึ่งสิ่งใดมาปนเปื้อนน้ำแข็งได้

**2.1.3 เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำแข็ง (กระทรวงสาธารณะสุข, 2527)**

ทางกระทรวงสาธารณะสุขได้กำหนดเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องตรวจวิเคราะห์ในน้ำแข็งเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค สำหรับเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำแข็งตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) ได้แก่

1) แบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)

2) ต้องไม่พบแบคทีเรียชนิด อี. โคไล (*E. coli*)

3) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

การตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มนั้นหมายถึงการจัดการด้านสุขาภิบาลไม่เหมาะสม เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถปนเปื้อนมากับอุจจาระและมีอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อม และเชื้อ *E. coli* ปกติจะเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคน มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้โคลิฟอร์มแบคทีเรียและ *E. coli* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ถ้าตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียและ *E. coli* นั้นก็แสดงว่าอาจมีเชื้อก่อโรคอื่นๆปนเปื้อนอยู่ในน้ำได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2 โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (มาริสา, 2553)**

ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำแข็งนั้นจะใช้โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria) เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ (indicator microorganism) ถึงความสกปรกที่ปนเปื้อนมาจากสิ่งขับถ่ายของคนและสัตว์ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ปกติเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นและจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับอุจจาระ หากพบแบคทีเรียชนิดนี้จำนวนมากอาจเป็นไปได้ว่าแหล่งน้ำนั้นมีโอกาสที่จะมีเชื้อก่อโรคบางชนิดที่มีแหล่งกำเนิดมาจากอุจจาระแพร่กระจายปะปนอยู่ในแหล่งน้ำเช่นกันเนื่องจากมีลักษณะที่คล้ายกัน ดังนั้นถ้ามีการตรวจพบโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำแข็งก็เป็นการบ่งบอกว่าอาจมีโอกาสพบแบคทีเรียก่อโรคได้ ด้วยเหตุนี้เราจึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำแข็งเพื่อป้องกันเชื้อโรคที่เป็นอันตรายได้ระดับหนึ่งก่อนถึงมือผู้บริโภค ลักษณะของโคลิฟอร์มแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) หายใจได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศ (facultative anaerobes) สร้างกรดและแก๊สจากการหมักน้ำตาลแลคโตส แบ่งตามแหล่งกำเนิดได้ 2 ชนิด คือ 1) ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น มีแหล่งกำเนิดมาจากอุจจาระ สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ภายใน 24 ชั่วโมง ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Escherichia* และ *Klebsiella* เช่น *E. coli* และ 2) นอนฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Non-fecal coliform bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ตามสิ่งแวดล้อมที่ไม่ใช่มาจากอุจจาระ เช่น *Enterobacter aerogenes*

**2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยวิธี multiple tube technique (กัญจนา และคณะ, 2547)**

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำแข็ง หรือตัวอย่างที่เป็นของเหลวต่างๆนั้น นิยมใช้วิธี multiple tube technique โดยเลือกใช้ความเจือจาง 3 ระดับ ระดับละ 5 หลอด เพื่อหาค่า MPN ที่ย่อมาจาก Most Probable Number ซึ่งเป็นจำนวนสูงสุดของเชื้อกลุ่มโคลิฟอร์มที่อาจมีได้ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อสร้างกรดและแก๊ส จำนวนของหลอดที่ให้ผลบวกถูกนำไปอ่านค่าในตารางดัชนี MPN (MPN index) ซึ่งจะบอกจำนวนของโคลิฟอร์มที่มีอยู่ในน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยค่าในตารางดัชนี MPN นี้เป็นค่าที่ได้จากการประเมินโดยใช้หลักการทางสถิติ ดังนั้นปริมาณของโคลิฟอร์มที่ประเมินได้จึงเป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์ที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเท่านั้น

เนื่องจากการอ่านค่าในตารางดัชนี MPN นับจากจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละระดับความเจือจางแล้วนำไปอ่านค่าในตาราง ยกตัวอย่างเช่น ระดับความเจือจาง 10, 1 และ 0.1 ml จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกคือ 5, 4 และ 2 หลอด ตามลำดับ จะได้ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เท่ากับ 220 MPN/100 ml ดังที่แสดงในตาราง 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1 ตารางมาตรฐาน MPN (5 หลอด)** (APHA, 1999)

| No. of tubes giving positive reaction out of | | | MPN index per 100 ml | No. of tubes giving positive reaction out of | | | MPN index per 100 ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 of 10 ml each | 5 of 1 ml each | 5 of 0.1 ml each | | 5 of 10 ml each | 5 of 1 ml each | 5 of 0.1 ml each | |
| 0 | 0 | 0 | <2 | 4 | 2 | 1 | 26 |
| 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 3 | 0 | 27 |
| 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 3 | 1 | 33 |
| 0 | 2 | 0 | 4 | 4 | 4 | 0 | 34 |
| 1 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 23 |
| 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 0 | 1 | 30 |
| 1 | 1 | 0 | 4 | 5 | 0 | 2 | 40 |
| 1 | 1 | 1 | 6 | 5 | 1 | 0 | 30 |
| 1 | 2 | 0 | 6 | 5 | 1 | 1 | 50 |
| 2 | 0 | 0 | 4 | 5 | 1 | 2 | 60 |
| 2 | 0 | 1 | 7 | 5 | 2 | 0 | 50 |
| 2 | 1 | 0 | 7 | 5 | 2 | 1 | 70 |
| 2 | 1 | 1 | 9 | 5 | 2 | 2 | 90 |
| 2 | 2 | 0 | 9 | 5 | 3 | 0 | 80 |
| 2 | 3 | 0 | 12 | 5 | 3 | 1 | 110 |
| 3 | 0 | 0 | 8 | 5 | 3 | 2 | 140 |
| 3 | 0 | 1 | 11 | 5 | 3 | 3 | 170 |
| 3 | 1 | 0 | 11 | 5 | 4 | 0 | 130 |
| 3 | 1 | 1 | 14 | 5 | 4 | 1 | 170 |
| 3 | 2 | 0 | 14 | 5 | 4 | 2 | 220 |
| 3 | 2 | 1 | 17 | 5 | 4 | 3 | 280 |
| 3 | 3 | 0 | 17 | 5 | 4 | 4 | 350 |
| 4 | 0 | 0 | 13 | 5 | 5 | 0 | 240 |
| 4 | 0 | 1 | 17 | 5 | 5 | 1 | 300 |
| 4 | 1 | 0 | 17 | 5 | 5 | 2 | 500 |
| 4 | 1 | 1 | 21 | 5 | 5 | 3 | 900 |
| 4 | 1 | 2 | 26 | 5 | 5 | 4 | 1600 |
| 4 | 2 | 0 | 22 | 5 | 5 | 5 | ≥1600 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.4 เชื้อ *E. coli***

*E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ตัวเซลล์มีลักษณะรูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เชื้อ *E. coli* ถูกจัดอยู่ในจำพวก mesophillic bacteria เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 7-50 องศาเซลเซียส (Eley, 1996) เชื้อ *E. coli* นั้นสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้เกิดเป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาอยู่ในช่วง 24-48 ชั่วโมง (กัญจนา และคณะ, 2547) และถ้าเรานำเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงบนอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) โคโลนีของ *E. coli* จะมีลักษณะสีมันวาวคล้ายโลหะ (นงลักษณ์, 2547)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของเซลล์ *E. coli*
ที่มา : http://vcharkarn.com/varticle/44027 (สืบค้นวันที่ 4/4/2560)

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายมีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถก่อโรคได้ เช่น โรคท้องร่วง เกิดจากการบริโภคน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากอุจจาระเข้าไป โดยเป็นเชื้อกลุ่ม Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้ายสารพิษชิกา (Shiga like toxin) จากเชื้อบิดชิเกลลา (*Shigella*) ตัวอย่างของ *E. coli* ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *E. coli* 0157:H7 ซึ่งสร้างสารพิษ Verotoxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ถ่ายเป็นน้ำและเลือด เลือดออกในทางเดินอาหาร และภาวะเลือดออกที่ไต (Griffin and Tauxe, 1991)

ในการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* นั้นวิธีที่ใช้ทดสอบคือปฏิกิริยา IMViC คือการทดสอบ 4 ปฏิกิริยา ได้แก่ การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole test) การทดสอบเมทิลเรด (methyl red test) การทดสอบ Voges-Proskauer และการทดสอบการใช้ซิเตรต (Citrate utilization) โดยเชื้อ *E. coli* นั้นจะให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวกในปฏิกิริยาการสร้างอินโดลและเมทิลเรด ส่วนการทดสอบ Voges-Proskauer และการใช้ซิเตรตจะให้ผลเป็นลบ (กัญจนา และคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่ถูกกำหนดไว้ว่าห้ามตรวจพบในน้ำแข็ง เนื่องจากการตรวจพบเชื้อ *E. coli* แสดงว่าน้ำแข็งนั้นอาจมีการปนเปื้อนอุจจาระ เนื่องจากเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ ดังนั้นการพบเชื้อ *E. coli* นั้นจึงแสดงว่าอาจมีเชื้อก่อโรคชนิดที่มาจากระบบทางเดินอาหารที่อาจปนเปื้อนมากับอุจจาระได้เช่นกัน ดังนั้นจึงนิยมใช้เชื้อ *E. coli* เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำแข็ง

**2.5 หลักการด้านสุขาภิบาลอาหาร (สำนักงานสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย, 2557)**

การสุขาภิบาลอาหาร หมายถึง การทำให้อาหารสะอาดปลอดภัยจากเชื้อโรค พยาธิ และสารเคมีที่มีพิษ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อร่างกายและสุขภาพอนามัย โดยการจะทำให้อาหารสะอาดและปลอดภัยนั้นทำได้โดยการควบคุมปัจจัยที่สำคัญ 2 ปัจจัย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารไม่สะอาด ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 บุคคล เช่น ผู้สัมผัสอาหาร ผู้จำหน่ายอาหาร ผู้เก็บและทำความสะอาดภาชนะอุปกรณ์ เป็นต้น และปัจจัยที่ 2 อาหาร เช่น อาหารที่นำมาปรุง อาหารสด อาหารแห้ง อาหารกระป๋อง รวมทั้งน้ำแข็ง น้ำดื่ม และสารปรุงแต่งอาหาร เป็นต้น ซึ่งถ้าไม่มีการจัดการหรือควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้ดีพอจะทำให้อาหารนั้นไม่สะอาดเมื่อรับประทานเข้าไปแล้วอาจก่อให้เกิดโรคได้

**2.5.1 ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหารและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร**

อีกหนึ่งส่วนสำคัญที่ต้องควบคุมดูแลให้ปลอดภัยนั่นคือ ภาชนะรวมถึงอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ใส่อาหารหรือภาชนะสัมผัสอาหาร เช่น จาน ชาม ช้อน ส้อม ตะเกียบ มีด เป็นต้น เนื่องจากอาหารที่ผ่านการเตรียมและการปรุงที่สะอาดแล้ว เมื่อนำมาบรรจุในภาชนะที่ไม่สะอาด อาจส่งผลให้อาหารนั้นเกิดการปนเปื้อนทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้ สาเหตุที่ทำให้ภาชนะหรืออุปกรณ์นั้นไม่สะอาดเพียงพอที่จะนำมาใช้กับอาหารมี 2 ประการ คือ 1. เกิดจากตัวภาชนะอุปกรณ์เอง 2. เกิดจากภาชนะอุปกรณ์ถูกปนเปื้อน เพราะฉะนั้นผู้ใช้ต้องรู้จักวิธีการเลือกชนิดภาชนะอุปกรณ์ให้เหมาะสมกับประเภทอาหาร รู้จักวิธีการล้างทำความสะอาดและการเก็บรักษาภาชนะให้ถูกต้องเพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อโรค

วิธีที่นิยมใช้ทดสอบการปนเปื้อนคือวิธีสุ่มเช็ด (swab) ภาชนะ โดยวิธีนี้จะทำให้เราทราบถึงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวในบริเวณที่กำหนดและสามารถประเมินได้ถึงปริมาณการปนเปื้อนถ้าอาหารสัมผัสกับพื้นผิวนี้ โดยการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์บนช้อนนั้นจะเช็ดส่วนที่สัมผัสอาหารทั้ง 2 ด้าน (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

**2.5.2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาบนภาชนะสัมผัสอาหาร**

กระทรวงสาธารณะสุขได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร ในประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2553) โดยกำหนดว่า จำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมต่อชิ้นภาชนะต้องมีค่าน้อยกว่า 1,000 CFU/ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่ และต้องไม่ตรวจพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Salmonella* spp. บนภาชนะสัมผัสอาหาร เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถก่อโรคกับคนได้ และยังแสดงถึงการจัดการด้านสุขาภิบาลที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

**2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

กรรณิการ์ (2558) ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โคลิฟอร์มแบคทีเรียและฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำแข็งสำหรับบริโภคซึ่งเก็บจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มรอบมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยนำมาวิเคราะห์หาจำนวน Total bacteria ด้วยวิธี standard plate count และวิเคราะห์หาปริมาณ Total Coliform bacterial และ Fecal Coliform bacterial ด้วยวิธี MPN โดยผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างน้ำแข็งทั้งหมดมีการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐานโดยมีค่าอยู่ระหว่าง $14.3\times10^8$ – $61.3\times10^8$ cfu/ml มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $54.3\times10^8$ cfu/ml สำหรับโคลิฟอร์มแบคทีเรียพบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 15-1100 MPN/100 ml และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 9-1100 MPN/100 ml ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าน้ำแข็งนั้นมีการปนเปื้อนแบคทีเรียที่อาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค

Falcão *et al.* (2002) ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภคและแช่อาหาร เนื่องจากน้ำแข็งทั้งแบบที่ใช้บริโภคหรือแช่อาหารนั้นถ้ามีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งทำโดยเก็บตัวอย่างจำนวน 60 ตัวอย่าง จากสถานที่ 6 แห่งภายในเมืองอาราราา ประเทศบราซิล การศึกษาวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Vibrio cholerae* และ *Aeromonas* spp. ใช้วิธี total plate count ส่วนการวิเคราะห์เชื้อ total coliform, fecal coliform และ *E. coli* นั้นใช้วิธี MPN ผลการทดลองตรวจพบเชื้อ *E. coli* มากถึง 50 สายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงถึงการจัดการด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม และยังตรวจพบ *Yersinia enterocolitica* 1A/O:5,27/Xz และ *Salmonella enteritidis* PT1 ส่วนเชื้อ *V. cholerae*, *Shigella* spp. และ *Aeromonas* spp. ไม่พบในตัวอย่างน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์ และการวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม coliform นั้นพบว่ามีการปนเปื้อนในปริมาณสูงทั้งในตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภคและแช่อาหาร เชื้อกลุ่ม coliform เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากการจัดการด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม เมื่อปนเปื้อนอยู่ในน้ำแข็งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

Gerokomou *et al.* (2011) ศึกษาคุณภาพน้ำแข็งที่ใช้สำหรับเครื่องดื่มและแช่อาหารโดยวิเคราะห์คุณภาพทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างน้ำแข็งทั้งแบบที่ใช้ในการบริโภคและแช่ปลาหรืออาหารทะเลต่างๆ จำนวน 100 ตัวอย่างจาก 6 สถานที่ภายในเมืองอีไพรัสประเทศกรีซ โดยการวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์นั้นวิเคราะห์ เชื้อ *Yerinia* spp., *Campylobacter* sp., *Vibrio cholera*, total coliform, fecal coliform, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfrigens* จากการศึกษาวิเคราะห์ตรวจพบเชื้อ *E. coli* คิดเป็น 22% ของตัวอย่าง เชื้อ *C. perfrigens* คิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35% ของตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อกลุ่ม coliform คิดเป็น 31% ของตัวอย่าง ซึ่งปริมาณเชื้อ coliform ที่ตรวจพบนั้นมีค่าเกินมาตรฐาน ส่วนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa, Yerinia* spp., ตรวจพบจากเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้น ไม่พบเชื้อ *Aeromonas* sp., *Shigella* spp., และ *V. cholera* ในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งการตรวจพบเชื้อกลุ่ม coliform ในปริมาณสูงและเชื้อก่อโรคอื่นในน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์นี้ อาจส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งควรมีการกำกับดูแลการผลิตน้ำแข็งและการตรวจสอบอยู่เสมอ

รวีวรรณ และภารดี (2556) ศึกษาจำนวนแบคทีเรียบนช้อนส้อมหลังการลวกในน้ำร้อนที่ต้มด้วยหม้อหุงข้าว โดยเก็บตัวอย่างจากโรงอาหารของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และโรงอาหารของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ การศึกษาอุณหภูมิของน้ำเพื่อศึกษาอุณหภูมิที่สามารถลดปริมาณเชื้อบนช้อนส้อมพบว่าอุณหภูมิที่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ต้องสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้นก็สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้มากขึ้น ส่วนการศึกษาระยะเวลาจุ่มช้อนส้อมในน้ำ ได้กำหนดระยะเวลาในการจุ่มตั้งแต่ 1 ถึง 30 วินาที และนำมาหาค่า total bacteria count ของตัวอย่างช้อนส้อมหลังการจุ่ม พบว่ายิ่งจุ่มช้อนส้อมนานขึ้นจำนวนแบคทีเรียบนช้อนส้อมยิ่งลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างวันจะทำให้จำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆถึงแม้ว่าอุณหภูมิของน้ำจะมากกว่า 90 องศาเซลเซียสอยู่ตลอดเวลา และการจุ่มลวกช้อนส้อมในน้ำที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียอยู่นั้นทำให้เกิดการปนเปื้อนจากน้ำสู่ช้อนส้อมได้

Poonnoy *et al.* (2014) ศึกษาเวลาและอุณหภูมิเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* บนช้อนโดยการจุ่มลวกด้วยน้ำร้อน เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ชี้วัดของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตอาหาร เพราะสามารถก่อให้เกิดอันตรายด้านสุขภาพต่อผู้บริโภคได้ เช่น ขับถ่ายเป็นเลือด ปวดท้องและมีไข้ เป็นต้น โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาคือ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละอุณหภูมินั้นจะใช้เวลาในการจุ่มช้อน 5, 10, 15, และ 20 วินาที พบว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาจุ่มนาน 5 วินาที และอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใช้เวลาจุ่มนาน 10 วินาที สามารถกำจัดเชื้อ *E. coli* บนช้อนได้ทั้งหมด และช่วงอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* บนช้อนลงได้แต่ยังมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ถึงแม้ว่าจะใช้เวลานานถึง 20 วินาที และจากการเก็บข้อมูลของอุณหภูมิน้ำร้อนที่ใช้ลวกช้อนจากโรงอาหารมหาวิทยาลัยแม่โจ้ พบว่าน้ำอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ผู้มาใช้บริการใช้เวลาจุ่มลวกอยู่ในช่วง 3-7 วินาที จากอุณหภูมิและเวลาดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อ *E. coli* บนช้อนได้ทั้งหมด

Maori and De (2009) ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียบนถ้วยชามและช้อนส้อมจากซุ้มจำหน่ายอาหารภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีแห่งชาติโยลา ประเทศไนจีเรีย โดยเก็บตัวอย่างจากซุ้มจำหน่ายอาหารจำนวน 7 ซุ้ม ทั้งหมด 147 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถ้วย ส้อม จาน ช้อน มีด นำมาวิเคราะห์ค่า total bacterial count โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar, chocolate agar, blood agar และ MacConkey agar พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างถ้วยมีค่าอยู่ในช่วง $1.1\times10^4$ - $3.0\times10^5$ cfu/ml ตัวอย่างส้อมมีค่าอยู่ในช่วง $2.2\times10^4$ – $1.6\times10^5$ cfu/ml ตัวอย่างมีดมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าอยู่ในช่วง $1.1\times10^4$ – $3.3\times10^5$ cfu/ml ตัวอย่างจานมีค่าอยู่ในช่วง $1.2\times10^4$ – $2.5\times10^5$ cfu/ml และตัวอย่างช้อนมีค่าอยู่ในช่วง $1.5\times10^4$ – $4.7\times10^5$ cfu/ml ซึ่งค่า total bacterial count ของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุที่ทำให้มีการปนเปื้อนบนอุปกรณ์สูงมาจากการเก็บอุปกรณ์ในตะกร้าหรือถาดที่สัมผัสกับอากาศโดยตรงทำให้มีแนวโน้มที่จะปนเปื้อนแบคทีเรียในอากาศ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Shigella* sp., *Klebseilla* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Salmonella typhi* และ *E. coli* เชื้อเหล่านี้ทำให้เกิดอันตรายเมื่อเข้าสู่ร่างกาย แม้ว่า *E. coli* ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายแต่แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนอุจจาระ การพบเชื้อเหล่านี้แสดงถึงการจัดการทางด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม สรุปได้ว่าเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในอาหารต้องตรวจสอบคุณภาพอาหารพร้อมกับตรวจสอบด้านสุขอนามัยของชุ้มจำหน่ายอาหารพร้อมๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)

## 3.2 สารเคมี

3.2.1 Ethanol 70%

3.2.2 Ethanol 95%

3.2.3 Crystal violet

3.2.4 Gram's Iodine

3.2.5 Safranin

3.2.6 Kovac's reagent

3.2.7 Methyl red

3.2.8 40% KOH

3.2.9 Alpha-napthol

3.2.10 Peptone

3.2.11 1% sulfuric acid

3.2.12 1% barium chloride

## 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 Lauryl Tryptose Broth

3.3.2 Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

3.3.3 *Escherichia coli* Medium (EC Medium)

3.3.4 Levine Eosin Methylene Blue Agar (L-EMB agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 Trypticase Soy Agar (TSA)

3.3.6 Plate Count Agar (PCA)

3.3.7 Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP) Broth

3.3.8 Koser's Citrate Broth

3.3.9 Tryptone Broth

**3.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ**

3.4.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า

3.4.3 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar air flow)

3.4.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.4.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

3.4.6 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)

3.4.7 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.4.9 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)

3.4.10 จานเพาะเชื้อ

3.4.11 เครื่องแก้ว (หลอดทดลอง, บีกเกอร์ ฯลฯ)

3.4.12 อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปต, ไมโครปิเปต, กระบอกตวง ฯลฯ)

3.4.13 ช้อนสแตนเลส

3.4.14 หลอดดักก๊าซ (Durham tube)

3.4.15 หลอดแก้วพร้อมฝาปิด (Test tube) ขนาด 15 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.5 ขั้นตอนการดำเนินการ**

**3.5.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค**

**3.5.1.1 การเก็บตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านค้าภายในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 2 ร้าน สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำแข็งร้านละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่างต่อ 1 ร้าน โดยแบ่งบริเวณตักน้ำแข็งออกเป็น 5 จุด ตักน้ำแข็งจุดละ 1 ช้อน ความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ใส่ในขวดปิดฝาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้น้ำแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

**3.5.1.2 การตรวจสอบขั้นประมาณการณ์ (Presumptive test)** (APHA, 1999)

1) นำน้ำแข็งที่ละลายแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด

2) นำน้ำแข็งที่ละลายแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด

3) นำน้ำแข็งที่ละลายแล้วปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด

4) นำหลอดอาหารทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดมาตรวจผล สังเกตก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ ให้รายงานผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดก๊าซหรือเกิดก๊าซน้อยกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ รายงานผลเป็นลบ นำหลอดที่ให้ผลบวกไปตรวจขั้นยืนยันต่อไป

**3.5.1.3 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed test)**

1) การทดสอบยืนยันสำหรับโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (APHA, 1999)

ใช้ลูปถ่ายเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร Lauryl Tryptose Broth ที่เกิดก๊าซในขั้นประมาณการณ์แต่ละหลอดลงในอาหาร Brilliantgreen Lactose Bile Broth (BGLB) หลอดต่อหลอด จำนวน 1 loop บ่มหลอดอาหาร BGLB ไว้ที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทั้งหมดมาตรวจผล สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ แสดงว่า ผลในขั้นยืนยันเป็นบวก ยืนยันว่าเป็น Coliform bacteria ถ้าไม่เกิดก๊าซหรือเกิดก๊าซน้อยกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ รายงานผลเป็นลบ นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของแต่ละความเจือจาง นำผลที่ได้ไปเทียบตาราง MPN เพื่ออ่านค่า MPN ค่าที่ได้คือ ปริมาณของ Coliform bacteria ต่อตัวอย่างน้ำแข็ง 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การทดสอบยืนยันสำหรับฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (APHA, 1999)

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร Lauryl Tryptose Broth ที่เกิดก๊าซในขั้นประมาณการณ์แต่ละหลอดลงในอาหาร EC Medium หลอดต่อหลอดจำนวน 1 loop นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5±0.2 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทั้งหมดมาตรวจผลโดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ แสดงว่า ผลในขั้นยืนยัน เป็นบวก ถ้าไม่เกิดก๊าซหรือเกิดก๊าซน้อยกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ รายงานผลเป็นลบ นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของแต่ละความเจือจาง นำไปเทียบตาราง MPN เพื่ออ่านค่า MPN ค่าที่ได้คือ ปริมาณของ Fecal coliform bacteria ต่อตัวอย่างน้ำแข็ง 100 มิลลิลิตร

**3.5.1.4 การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Completed test) สำหรับการตรวจหา *E. coli*** (สุรีย์, 2557)

เขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร EC Medium ลากลงบนผิวหน้าอาหาร L-EMB Agar ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli* โคโลนีของ *E. coli* จะมีขนาดเล็กลักษณะกลมสีเข้มตรงกลางเกือบมีสีดำและที่ผิวอาจมีหรือไม่มีสีเขียวเหลือบเป็นเงาโลหะ (metallic sheen) เขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ต้องสงสัยว่าเป็น *E. coli* จากอาหาร L-EMB มาลากลงบนผิวอาหารใน PCA slants นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และใช้สำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป จากนั้นนำเชื้อที่เจริญบนอาหาร PCA มาย้อมแกรม สังเกตรูปร่างของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ ถ้าหากเชื้อที่ทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนสั้น นำเชื้อไปทดสอบปฏิกิริยา IMViC ต่อไป

**3.5.1.5 การทดสอบการย้อมแกรม** (สุรีย์, 2557)

1) เกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

2) ตรึงเชื้อ (fix) นำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อให้ติดแน่นกับสไลด์

3) หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง

4) หยดสารละลายไอโอดีน (gram's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น

5) ล้างสีออก (decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ภายในเวลา 20 วินาที ล้างน้ำสะอาด ขั้นตอนการล้างนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี

6) หยดสีซาฟรานิน (safranin) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำ และซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) ผลจากการย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

**3.5.1.6 การทดสอบทางชีวเคมี (การทดสอบปฏิกิริยา IMVic)** (สุรีย์, 2557)

**1) การทดสอบการสร้างอินโดล**

ถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงในอาหาร Tryptone Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง จากนั้นเติมโคแวกซ์รีเอเจนท์ลงไป 0.2–0.3 มิลลิลิตร ถ้าผลการสร้างอินโดลเป็นบวกจะเกิดชั้นสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร

**2) การทดสอบ Voges-Proskauer**

ถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงในอาหาร MR-VP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารที่บ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเปล่าที่ปราศจากเชื้อ และเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน ถ้าต้องการเร่งปฏิกิริยาให้เติมครีเอติน 2-3 เกล็ด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดสีชมพู ถ้าเกิดสีชมพูแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวกคือมีการสร้าง acetylmethyl carbinol และ 2,3-butylene glycol

**3) การทดสอบเมทิลเรด**

การทดสอบเมทิลเรดทำโดยบ่มอาหาร MR-VP ที่เหลือหลังจากการทำ VP test แล้วต่อไปอีก 48±2 ชั่วโมง จากนั้นหยดเมทิลเรด 5 หยดลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าให้ผลบวก การเกิดสีแดงชี้ให้เห็นว่าอาหารมีค่า pH 4.2 หรือต่ำกว่า 4.2 แต่ถ้าเกิดสีเหลืองแสดงว่าให้ผลลบ

**4) การทดสอบการใช้ซิเตรต**

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อที่จะทดสอบใส่ในอาหาร Koser's citrate Broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ถ้าอาหารขุ่นอย่างชัดเจนคือให้ผลบวก

**3.5.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร**

**3.5.2.1 การเตรียม McFarland Standard**

McFarland Standard เบอร์ 0.5-10 ใช้สำหรับเปรียบเทียบความขุ่นกับความขุ่นของของสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์เพื่อใช้ประมาณความหนาแน่นของเซลล์หรือจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร การเตรียม McFarland Standard เบอร์ 0.5-10 ทำได้ดังนี้

1) เตรียมหลอดทดลองที่ทำด้วยแก้วใสทนสารเคมีและมีฝาปิดสนิทจำนวน 10 หลอดที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการอาจเป็นหลอดฝาเกลียวหรือหลอดที่มีจุกยางอุดล้างให้สะอาดอบให้แห้งเขียนหมายเลข 1-10 กำกับที่หลอด

2) เตรียมสารละลาย 1% (v/v) sulfuric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย 1% (w/v) barium chloride ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ในหลอดทดลองแต่ละหมายเลข ปิเปตสารละลายทั้งสองชนิดลงในหลอดทดลองแต่ละหมายเลข โดยใช้ micropipette ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 3.1 ผสมให้เข้ากันดีแล้วปิดฝาให้แน่นสนิท

**ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนในการทำ McFarland Standard**

| หมายเลขของ McFarland Standard | 1% sulfuric acid (ml) | 1% barium chloride (ml) |
|---|---|---|
| 0.5 | 9.95 | 0.05 |
| 1 | 9.9 | 0.1 |
| 2 | 9.8 | 0.2 |
| 3 | 9.7 | 0.3 |
| 4 | 9.6 | 0.4 |
| 5 | 9.5 | 0.5 |
| 6 | 9.4 | 0.6 |
| 7 | 9.3 | 0.7 |
| 8 | 9.2 | 0.8 |
| 9 | 9.1 | 0.9 |
| 10 | 9.0 | 1.0 |

**3.5.2.2 การเตรียมตัวอย่างและการป้าย (swab) ตัวอย่างซ้อน**

1) เตรียมน้ำที่จะใช้ในการจุ่มลวก โดยนำน้ำประปาใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้ววางลงบนเตาให้ความร้อน (hot plate) ตั้งอุณหภูมิให้ได้ 70 °C ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2) เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ *E. coli* ให้ได้ความขุ่นที่ต้องการโดยเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard เบอร์ 0.5

3) นำตัวอย่างซ้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) แล้วมาป้าย (swab) เชื้อ *E. coli* โดยเริ่มจากใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.2.2 ข้อ 1) พอหมาด แล้วนำมาป้ายทั้งด้านหน้าและด้านหลังตัวอย่างซ้อนตรงบริเวณที่สัมผัสอาหารให้ทั่ว ซึ่งในการทดสอบนี้แบ่งบริเวณการป้ายซ้อนออกเป็นสองบริเวณตามแนวตั้ง โดยบริเวณที่ 1 เป็นการป้ายก่อนการจุ่มลวกน้ำร้อน และบริเวณที่ 2 เป็นการป้ายหลังการจุ่มลวกน้ำร้อน

4) นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1% peptone ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พอหมาด นำมาป้ายซ้อนในบริเวณที่ 1 ทั้งด้านหน้าและด้านหลัง นำไม้พันสำลีไปแกว่งในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้จุลินทรีย์หลุดออกมากที่สุด จากนั้นนำตัวอย่างซ้อนที่ป้ายแล้วจุ่มลงในน้ำร้อนที่เตรียมไว้ (อุณหภูมิ 70 °C) เป็นเวลา 3 วินาที นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายบัฟเฟอร์พอหมาด นำมาป้ายซ้อนในบริเวณที่ 2 ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านหน้าและด้านหลัง นำไม้พันสำลีไปแกว่งในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้จุลินทรีย์หลุดออกมากที่สุด โดยการป้ายจะใช้ตัวอย่างช้อน 4 คัน ต่อหนึ่งช่วงระยะเวลา โดยระยะเวลาที่ทดสอบคือ 3, 5 และ 10 วินาที ตามลำดับ

**3.5.2.3 การทดสอบปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำที่ใช้ลวกช้อน**

เก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการทดสอบ โดยเก็บตัวอย่างน้ำก่อนการต้ม, ตัวอย่างน้ำก่อนการจุ่มลวกช้อน และตัวอย่างน้ำหลังการจุ่มลวกช้อน เพื่อนำไป spread plate และวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อไป

**3.5.2.4 การเจือจางตัวอย่าง**

นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.2.2 ข้อ 4) ทั้งหมดจากช้อนตัวอย่าง 15 คัน ทั้งก่อนและหลังการจุ่มลวก รวมถึงตัวอย่างน้ำจากขั้นตอนที่ 3.5.2.3 ได้แก่ ตัวอย่างน้ำก่อนการต้ม, ตัวอย่างน้ำก่อนการจุ่มลวกช้อน และตัวอย่างน้ำหลังการจุ่มลวกช้อน นำตัวอย่างทั้งหมดมาเจือจางเป็นระดับ (serial dilution) ให้มีระดับการเจือจางตั้งแต่ $10^{-1}$ – $10^{-5}$ ด้วยสารละลาย 0.1% (w/v) peptone

**3.5.2.5 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ด้วยเทคนิค spread plate**

1) ปิเปตตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 3.5.2.4 ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ($10^{-1}$–$10^{-5}$) ลงบนจานอาหาร TSA ความเจือจางละ 3 เพลท ปริมาตรจานละ 0.1 มิลลิลิตร

2) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร TSA ด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนผ่านเปลวไฟ ทิ้งไว้สัก 2-3 วินาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3) นับโคโลนีบนจานที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

4) คำนวณในรูป CFU/ml

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวน colony บนจาน} \times \text{ระดับเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ}}$$

5) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**3.5.3 การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์**

1) จัดทำวีดีโอแนะนำการเก็บรักษาน้ำแข็งที่ถูกสุขลักษณะเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภค และจัดทำโปสเตอร์เผยแพร่เพื่อให้ความรู้ในเรื่องการจุ่มลวกช้อนในน้ำร้อนเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) จัดทำแบบฟอร์มประเมินความคิดเห็นของสื่อวีดีโอแนะนำการเก็บรักษาน้ำแข็งที่ถูกสุขลักษณะเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคและโปสเตอร์ความรู้ในเรื่องการจุ่มลวกช้อนในน้ำร้อนเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

3) ทำแบบประเมินโดยสุ่มนักศึกษาจำนวน 30 คน

4) วิเคราะห์ผลการประเมินของสื่อวีดีโอและโปสเตอร์ความรู้

5) ปรับปรุงสื่อวีดีโอแนะนำการเก็บรักษาน้ำแข็งที่ถูกสุขลักษณะเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคและโปสเตอร์ความรู้ในเรื่องการจุ่มลวกช้อนในน้ำร้อนเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

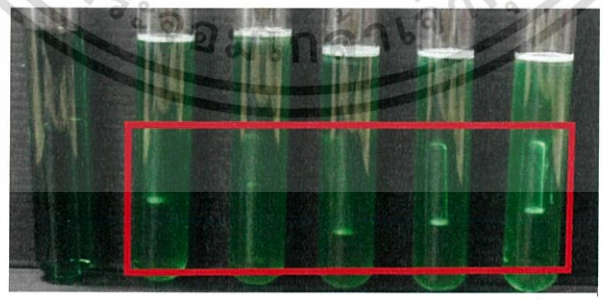
# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

## 4.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งสำหรับบริโภคในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม จำนวน 2 ร้านที่รับน้ำแข็งมาจากแหล่งผลิตเดียวกัน โดยร้าน A จำหน่ายเครื่องดื่มและขนมขบเคี้ยว ร้าน B จำหน่ายเครื่องดื่มประเภทปั่น ชูชิ ไอศกรีม เบเกอรี่และขนมคบเคี้ยว โดยลักษณะในการเก็บน้ำแข็งของร้าน A จะวางถังสูงจากพื้น 50 เซนติเมตร ไม่นำผลิตภัณฑ์อื่นแช่รวมกับน้ำแข็ง ร้าน B วางถังน้ำแข็งสูงจากพื้น 12 เซนติเมตร ฝาถังปิดไม่สนิท น้ำแข็งสัมผัสกับฝาถัง มีการนำผลิตภัณฑ์อื่นแช่รวมอยู่กับน้ำแข็ง ได้แก่ สากไม้ วิปครีม นมสด ซึ่งการวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์ในน้ำแข็งนั้นจะสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำแข็งร้านละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่างต่อ 1 ร้าน ได้ผลการศึกษาวิจัยดังต่อไปนี้

### 4.1.1 ปริมาณจำนวน Total coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ Total coliform bacteria โดยนับหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร BGLB (รูปที่ 4.1) และนำมาอ่านค่าในตาราง MPN พบว่า ตัวอย่าง 3 ตัวอย่างจากร้าน A มีปริมาณเชื้อ Total coliform bacteria เท่ากับ 300, 300, 900 MPN ต่อปริมาตรตัวอย่าง 100 ml. ตามลำดับ และตัวอย่าง 3 ตัวอย่างจากร้าน B มีปริมาณเชื้อ Total coliform bacteria เท่ากับ 500, 500, ≥1600 MPN ต่อปริมาตรตัวอย่าง 100 ml (ตารางที่4.1) เมื่อนำค่า MPN ของร้าน A และร้าน B มาหาเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ $5.0 \times 10^2$ และ $8.6 \times 10^2$ ตามลำดับ สรุปได้ว่าน้ำแข็งจากร้าน B มีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ Total coliform bacteria มากกว่าน้ำแข็งจากร้าน A




**รูปที่ 4.1** ตัวอย่างผลการตรวจยืนยันหาเชื้อ coliform bacteria ของตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภคในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB หลอดที่เกิดแก๊สที่แสดงในกรอบสีแดงให้ผลเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเชื้อ coliform bacteria

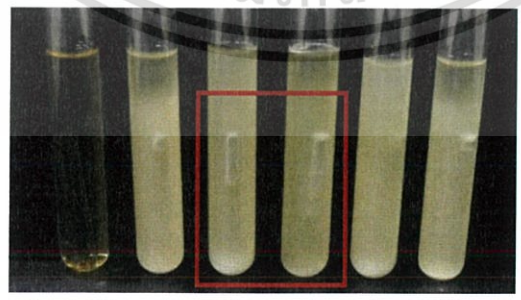
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่4.1** ผลการศึกษา Total coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

| Refreshment store | Sample | No. of tubes giving positive reaction out of | | | Combination of Positive | MPN index per 100 ml | 95% confidence limits | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 of 10 ml each | 5 of 1 ml each | 5 of 0.1 ml each | | | Lower | Upper |
| A | 1 | 5 | 5 | 1 | 5-5-1 | 300 | 100 | 1300 |
| | 2 | 5 | 5 | 1 | 5-5-1 | 300 | 100 | 1300 |
| | 3 | 5 | 5 | 3 | 5-5-3 | 900 | 300 | 2900 |
| B | 1 | 5 | 5 | 2 | 5-5-2 | 500 | 200 | 2000 |
| | 2 | 5 | 5 | 2 | 5-5-2 | 500 | 200 | 2000 |
| | 3 | 5 | 5 | 5 | 5-5-5 | ≥1600 | - | - |

### 4.1.2 ปริมาณจำนวน Total fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ Total fecal coliform bacteria โดยนับหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร EC medium (รูปที่ 4.2) และนำมาอ่านค่าในตาราง MPN พบว่า ตัวอย่าง 3 ตัวอย่างจากร้าน A มีปริมาณเชื้อ Total fecal coliform bacteria เท่ากับ 4, 2, 4 MPN ต่อปริมาตรตัวอย่าง 100 ml. ตามลำดับ และตัวอย่าง 3 ตัวอย่างร้าน B มีปริมาณเชื้อ Total fecal coliform bacteria เท่ากับ 2, 7, 14 MPN ต่อปริมาตรตัวอย่าง 100 ml (ตารางที่4.2) เมื่อนำค่า MPN ของร้าน A และร้าน B มาหาเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 3.3 และ 7.7 ตามลำดับ สรุปได้ว่าน้ำแข็งจากร้าน B มีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ Total fecal coliform bacteria มากกว่าน้ำแข็งจากร้าน A




**รูปที่4.2** แสดงตัวอย่างผลตรวจยืนยันหาเชื้อ fecal coliform bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Medium หลอดที่แสดงในกรอบสีแดงเกิดแก๊ส 1 ใน 10 ของหลอดดักแก๊สให้ผลเป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของ fecal coliform bacteria

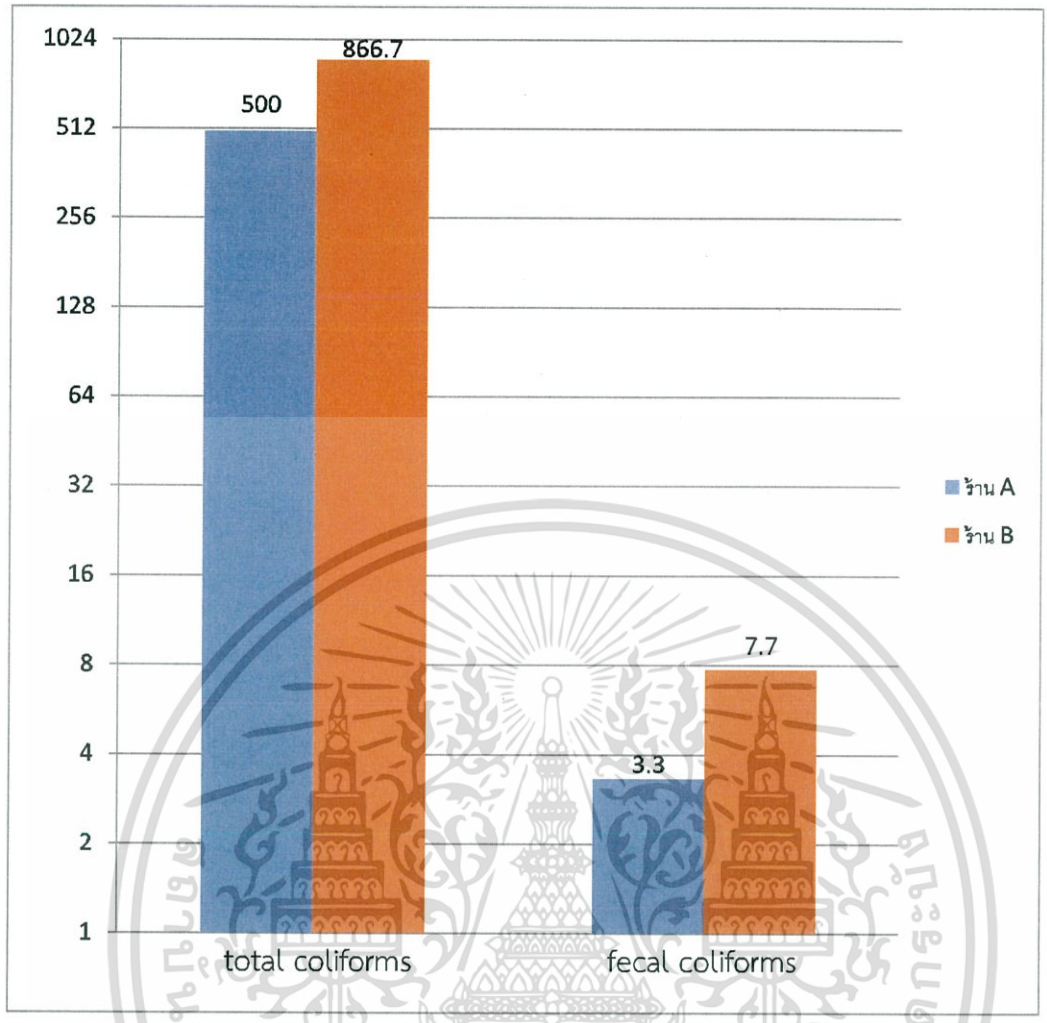
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่4.2** ผลการศึกษา Total fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

| Refreshment store | Sample | No. of tubes giving positive reaction out of | | | Combination of Positive | MPN index per 100 ml | 95% confidence limits | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 of 10 ml each | 5 of 1 ml each | 5 of 0.1 ml each | | | Lower | Upper |
| A | 1 | 2 | 0 | 0 | 2-0-0 | 4 | 1.0 | 17 |
| | 2 | 1 | 0 | 0 | 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 |
| | 3 | 1 | 0 | 1 | 1-0-1 | 4 | 1.0 | 15 |
| B | 1 | 1 | 0 | 0 | 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 |
| | 2 | 2 | 1 | 0 | 2-1-0 | 7 | 2.0 | 21 |
| | 3 | 3 | 1 | 1 | 3-1-1 | 14 | 6.0 | 35 |

จากการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม โดยวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม coliform bacteria ผลการวิจัยพบว่าปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ Total coliform bacteria ของร้าน A มีค่า MPN เฉลี่ยเท่ากับ $5.0 \times 10^2$ MPN/100 ml และร้าน B มีค่า MPN เฉลี่ยเท่ากับ $8.6 \times 10^2$ MPN/100 ml และปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ Total fecal coliform bacteria ของร้าน A มีค่า MPN เฉลี่ยเท่ากับ 3.3 MPN/100 ml และร้าน B มีค่า MPN เฉลี่ยเท่ากับ 7.7 MPN/100 ml พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อนทั้งเชื้อ Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria ของร้าน A และร้าน B มีค่าเกินมาตรฐานทั้งหมด โดยเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำแข็งตามประกาศกระทรวงของสาธารณะสุข ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) ที่กำหนดให้ปริมาณเชื้อชนิดโคลิฟอร์มต้องมีค่าน้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่าร้าน B มีการปนเปื้อนทั้งเชื้อ Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria สูงกว่าร้าน A (รูปที่4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่4.3** แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภคจากร้าน A และร้าน B

น้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์ทั้งร้าน A และร้าน B มาจากแหล่งผลิตเดียวกันและเก็บตัวอย่างช่วงเวลาเดียวกัน โดยร้าน A และร้าน B มีสุขลักษณะในการจัดเก็บที่แตกต่างกันของทั้ง 2 ร้านคือ ร้าน A มีการวางถังน้ำแข็งสูงจากพื้น 50 เซนติเมตร ไม่มีการนำสิ่งอื่นแซ่รวมกับน้ำแข็ง ส่วนการเก็บน้ำแข็งของร้าน B มีการวางถังน้ำสูงจากพื้นเพียง 12 เซนติเมตร ฝาถังปิดไม่สนิทเนื่องจากใส่น้ำแข็งมากกว่าไป มีการนำสิ่งของอื่นแซ่รวมกับน้ำแข็งได้แก่ สากไม้ วิปครีม นมสด จึงกล่าวได้ว่าสุขลักษณะในการจัดเก็บน้ำแข็งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อกลุ่ม coliform bacteria ซึ่งคลอดคล้องกับวิธีการเก็บน้ำแข็งตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ที่ระบุไว้ว่าการเก็บน้ำแข็งที่ป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นั้นสถานที่เก็บน้ำแข็งต้องสะอาดและวางสูงกว่าระดับทางเดิน ภาชนะบรรจุสามารถทำความสะอาดได้ง่าย ภาชนะต้องปิดสนิท ไม่แซ่ผลิตภัณฑ์อื่นรวมกับน้ำแข็ง (กระทรวงสาธารณะสุข, 2527) แต่ด้วยเหตุที่มีการปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม coliform bacteria และ fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์มีค่าเกินมาตรฐานนั้น มาจากหลายปัจจัยได้แก่น้ำที่ใช้ในการผลิต

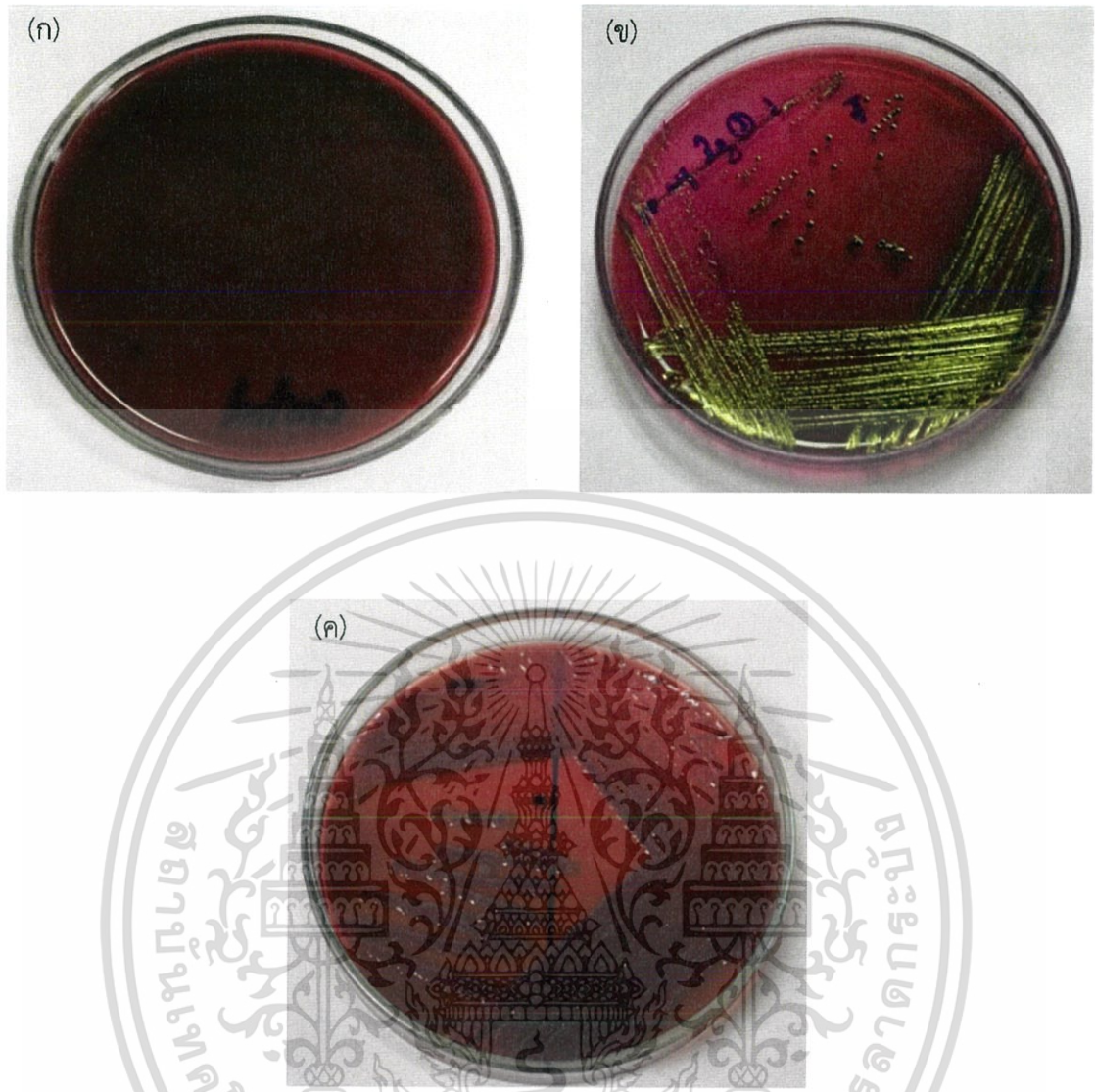
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานที่ อุปกรณ์ในการผลิต การบรรจุและการขนส่ง (สำนักอาหารและยา, 2545) และเนื่องจากเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียเป็นเชื้อที่พบทั่วไปในธรรมชาติและปนเปื้อนมาจากสิ่งขับถ่ายของคนและสัตว์ (มาริสา, 2553) คาดว่าอาจเกิดจากการปนเปื้อนมาจากพนักงานหรือเจ้าของร้านเครื่องดื่มมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่เหมาะสม ไม่ล้างมือให้สะอาดหลังจากเข้าห้องน้ำหรือก่อนที่จะสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง (สำนักงานอาหารและยา, 2545) การจากศึกษาของกรรณิการ์ (2558) พบการปนเปื้อนเชื้อ Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria ในน้ำแข็งจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มรอบมหาวิทยาลัยนเรศวรมีค่าเกินมาตรฐานทั้งสิ้น การปนเปื้อนเกิดจากการจัดการด้านสุขลักษณะไม่เหมาะสมโดยผู้จำหน่ายใช้มือสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรงรวมทั้งปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการผลิตและน้ำที่ใช้ในการผลิตน้ำแข็ง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Falcão *et al.* (2002) ที่ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับผู้บริโภคและแช่อาหารมีการตรวจพบเชื้อกลุ่ม coliform bacteria ในปริมาณสูง เนื่องมาจากน้ำที่นำมาใช้ในการผลิต จัดการด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการปนเปื้อนที่มาจากพนักงานและการทำความสะอาดเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกวิธี และงานวิจัยของ Gerokemou *et al.* (2011) ตรวจพบเชื้อกลุ่ม coliform bacteria คิดเป็น 31% ของตัวอย่าง ปริมาณเชื้อที่พบมีค่าเกินมาตรฐานทั้งสิ้น สาเหตุการปนเปื้อนคาดว่าเกิดจากน้ำที่ใช้ในการผลิต อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การเก็บรักษา การบรรจุรวมไปถึงการสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง งานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นมีความสอดคล้องกับกับการศึกษาวิจัยครั้งนี้กล่าวคือสุขอนามัยนั้นมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อในน้ำแข็งเพราะฉะนั้นการผลิตน้ำแข็งหรือแม้กระทั่งการจัดเก็บควรมีการควบคุมการผลิตให้ถูกหลัก GMP ที่ประกอบด้วยเรื่องของสุขลักษณะของสถานที่ตั้งและอาคารผลิต การทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักรและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การควบคุมการผลิตให้ถูกต้อง การจัดการด้านสุขาภิบาลที่เหมาะสม การรักษาความสะอาดและการให้ความรู้แก่พนักงาน รวมทั้งมาตรฐานต่างๆที่กระทรวงสาธารณะสุขได้กำหนด (สำนักงานอาหาและยา, 2545) เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรค

### 4.1.3 ผลการทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Complete test) สำหรับการตรวจหา *E. coli*

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB พบโคโลนีที่ต้องสงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli* โดยพบว่ามีตัวอย่างจากร้าน A จำนวน 5 ตัวอย่าง และร้าน B จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก มีสีเข้มตรงกลางเกือบดำและที่ผิวมีสีเขียวเหลือบเป็นเงาโลหะ (metallic sheen) (รูปที่ 4.4 ข) ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อ *E.coli* (นงลักษณ์, 2547) ส่วนอีก 2 ตัวอย่างจากร้าน B ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารมีลักษณะกลมขนาดใหญ่พื้นผิวเยิ้ม มีสีม่วง (รูปที่ 4.4 ค) ในการวิเคราะห์จะบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB ที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพื่อใช้เป็นตัวยืนยันว่าอาหารที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (รูปที่ 4.4 ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



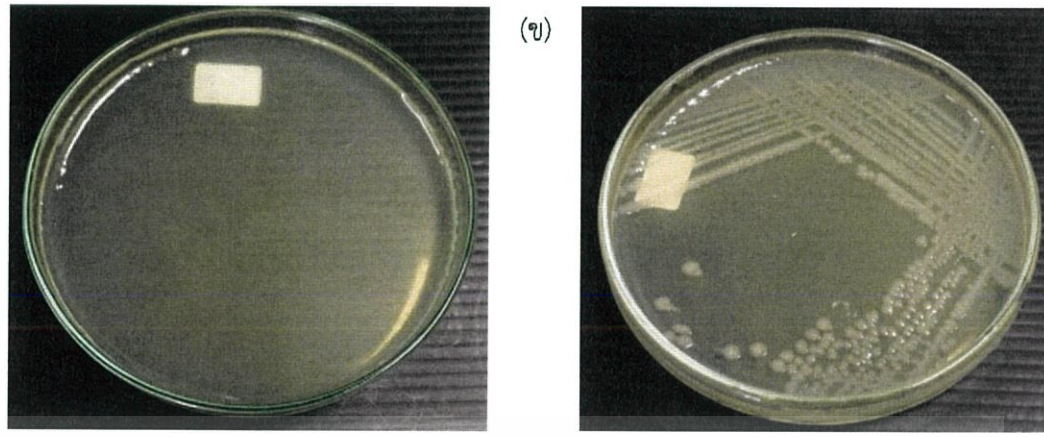

**รูปที่ 4.4** (ก) จานควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป
(ข) ตัวอย่างโคโลนีที่ต้องสงสัยว่าเป็นโคโลนีของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB
(ค) ตัวอย่างโคโลนี fecal coliform bacteria ทั่วไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB

### 4.1.4 ผลการทดสอบการย้อมแกรม

โคโลนีที่ต้องสงสัยว่าเป็นโคโลนีของ *E. coli* ถูกนำมาลากลงบนอาหาร PCA (รูปที่ 4.5 ข) และนำไปย้อมแกรม ในการวิเคราะห์จะบ่มจานอาหาร PCA ที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพื่อใช้เป็นตัวยืนยันว่าอาหารที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (รูปที่ 4.5 ก) พบว่าตัวอย่างจากร้าน A จำนวน 4 ตัวอย่าง และร้าน B จำนวน 7 ตัวอย่าง เป็นแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดเล็ก (short rod) เรียงตัวแบบกระจาย ได้แก่ A1, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4, B5, B6 และ B7 (รูปที่ 4.6 ก) ส่วนอีก 1 ตัวอย่าง คือ A2 เป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.6 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) (ข)



**รูปที่ 4.5** (ก) จานควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป
(ข) การเจริญของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

(ก) (ข)

**รูปที่ 4.6** (ก) ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลต A5 ที่ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดเล็ก
(ข) ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลต A2 ที่ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดใหญ่

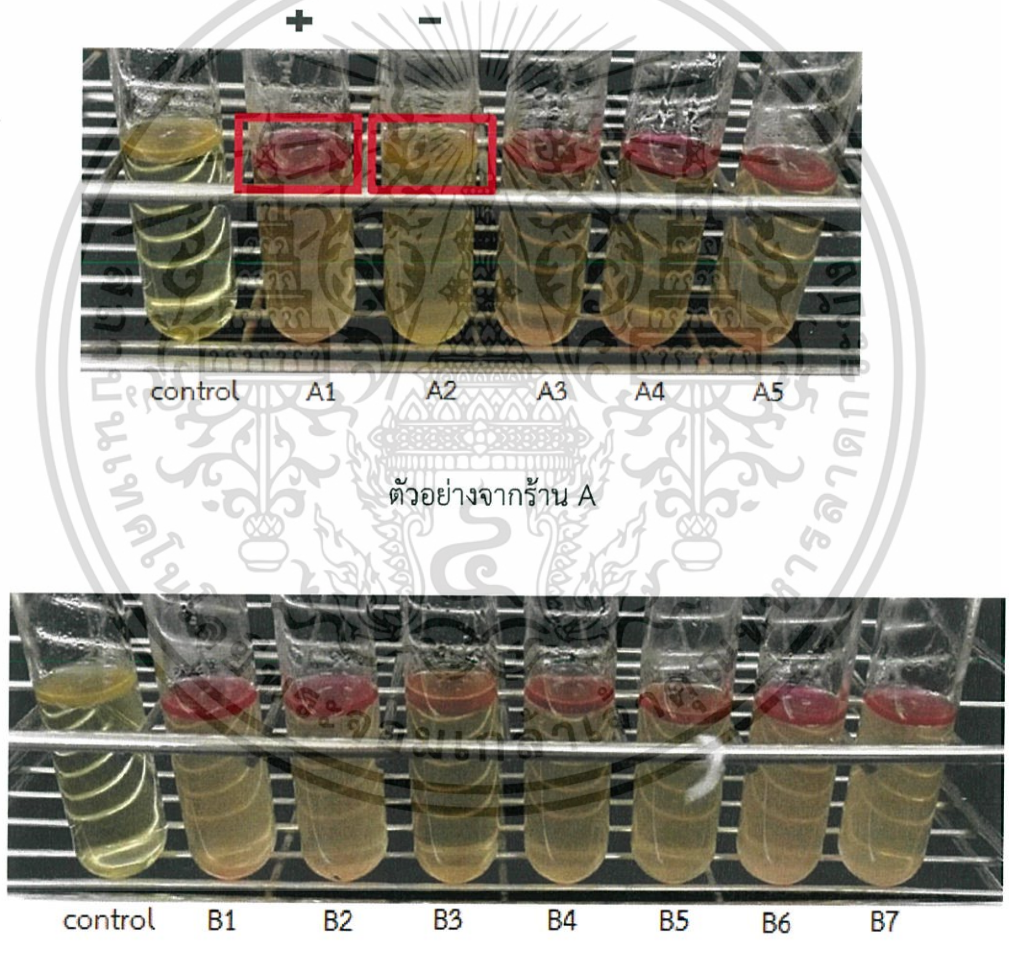
### 4.1.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (การทดสอบปฏิกิริยา IMViC)

IMViC Test เป็นการทดสอบ 4 ชนิดด้วยกันคือ 1. Indole Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต Indole จาก Tryptophan ได้หรือไม่ หากเชื้อสามารถสราง Indole ได้จะเกิดวงแหวนสีแดงอานผลเปนบวก ถ้าไม่เกิดวงแหวนสีแดงอ่านผลเป็นลบ 2. Methyl Red Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose ได้มากหรือน้อย โดยตรวจดู pH ของอาหารนั้น เชื้อที่สร้างกรดได้มากจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี Indicator ของ Methyl Red เป็นสีแดงอ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงอ่านผลเป็นลบ 3. Voges-Proskauer Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง Acethylmethylcarbinol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(acetoin) จาก Glucose ได้หรือไม่ ตรวจผลโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงอ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบ และ 4. Citrate Test เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ Citrate เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Source) ได้หรือไม่ ตรวจผลโดยอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นอ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่นอ่านผลเป็นลบ โดยการทดสอบปฏิริยา IMViC นี้ ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็น *E. coli* จะให้ผลดังนี้ การทดสอบการสร้างอินโดล, เมทิลเรด, Voges-Proskauer และการใช้ซิเตรต จะให้ผลเป็น บวก, บวก, ลบ และลบ ตามลำดับ (สุรีย์, 2557)

ผลการทดสอบการสร้างอินโดล พบว่าตัวอย่างจากร้าน A ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวก 4 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นลบ 1 ตัวอย่าง คือ A2 ส่วนตัวอย่างจากร้าน B ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.3)




**รูปที่ 4.7** การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเปลี่ยน Tryptophan เป็น Indole

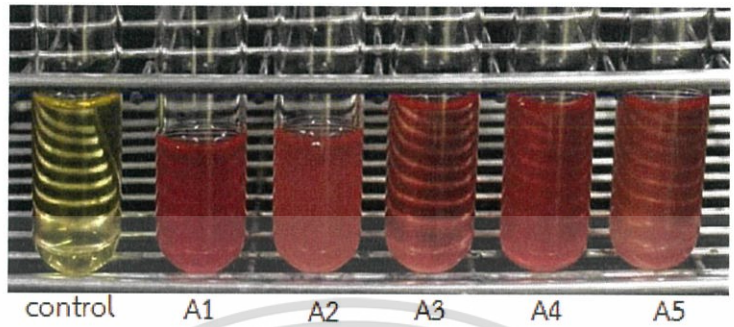
โดย control คือ หลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป

ผล (+) เกิดชั้นสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร

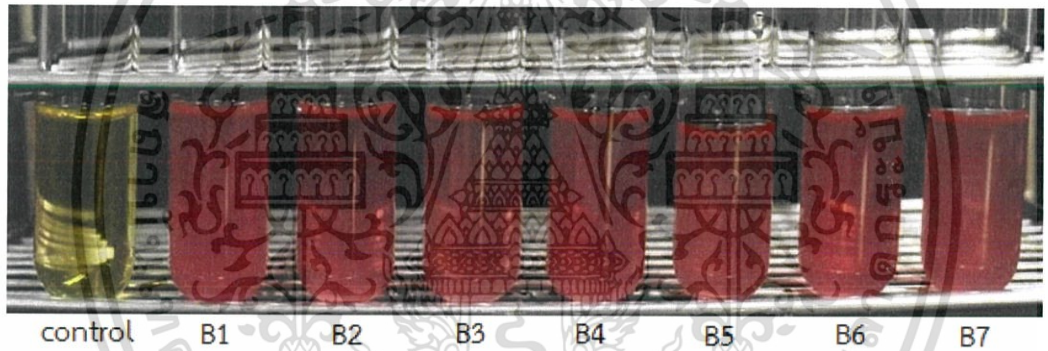
(–) เกิดชั้นสีเหลืองที่ผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบเมทิลเรด พบว่าตัวอย่างจากร้าน A ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากร้าน B ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.3)




ตัวอย่างจากร้าน A

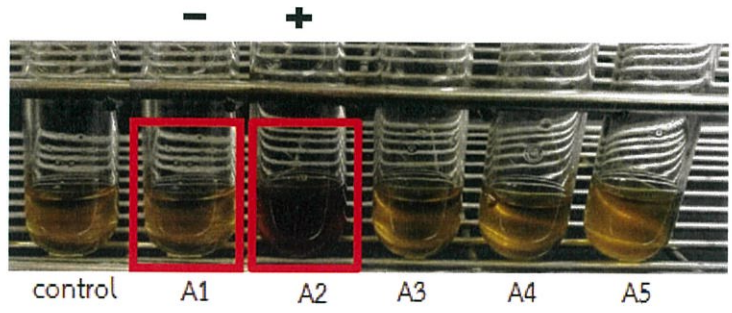



ตัวอย่างจากร้าน B

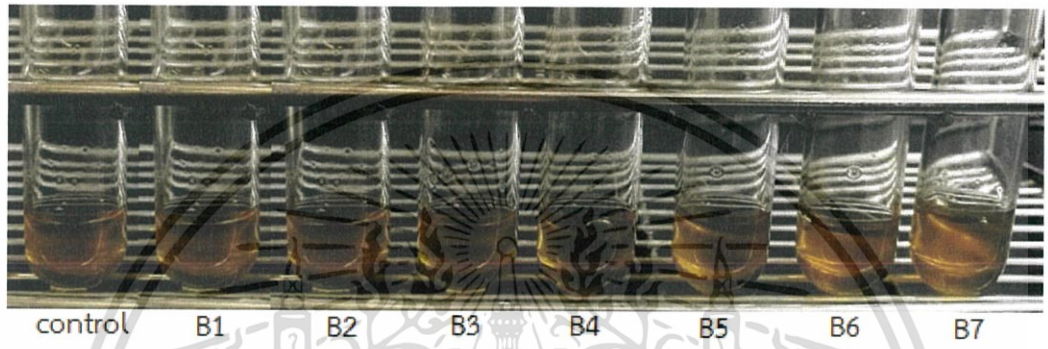
**รูปที่ 4.8** การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose
โดย control คือ หลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป
ผล (+) อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง
(–) อาหารเป็นสีเหลือง

ผลการทดสอบ Voges-Proskauer พบว่าตัวอย่างจากร้าน A ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวก 1 ตัวอย่าง คือ A2 และให้ผลเป็นลบ 4 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างจากร้าน B ให้ผลเป็นลบทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



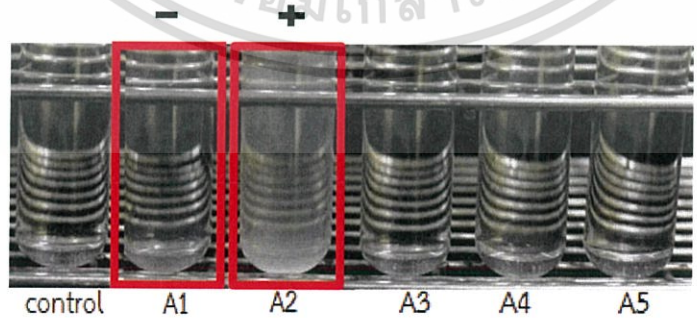

ตัวอย่างจากร้าน A




ตัวอย่างจากร้าน B

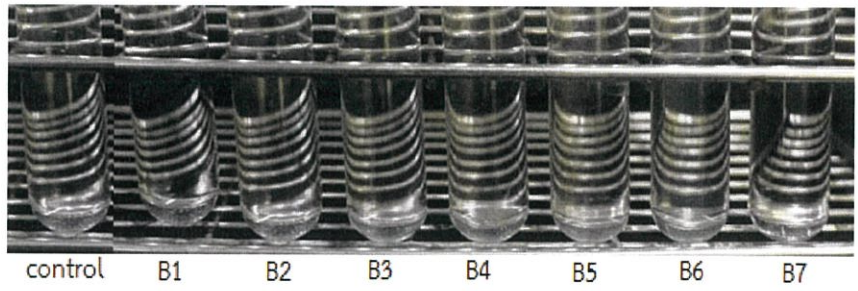
**รูปที่ 4.9** การทดสอบความสามารถในการสร้าง Acethyl Methyl Carbinol จาก Glucose
โดย control คือ หลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป
ผล (+) อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง
(–) อาหารเป็นสีเหลือง

ผลการทดสอบการใช้ซิเตรต พบว่าตัวอย่างจากร้าน A ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวก 1 ตัวอย่าง คือ A2 และให้ผลเป็นลบ 4 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างจากร้าน B ให้ผลเป็นลบทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.3)




ตัวอย่างจากร้าน A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ตัวอย่างจากร้าน B

**รูปที่ 4.10** การทดสอบความสามารถใช้ citrate เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน
โดย control คือ หลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงไป
ผล (+) อาหารขุ่น
(–) อาหารไม่ขุ่น

**ตารางที่4.3** แสดงผลการศึกษาทางชีวเคมีของเชื้อ *E.coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งสำหรับบริโภค

| ตัวอย่าง | การทดสอบทางชีวเคมี | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Indole | Methyl red | Voges-proskaver | Citrate |
| A1 | + | + | - | - |
| A2 | - | + | + | + |
| A3 | + | + | - | - |
| A4 | + | + | - | - |
| A5 | + | + | - | - |
| B1 | + | + | - | - |
| B2 | + | + | - | - |
| B3 | + | + | - | - |
| B4 | + | + | - | - |
| B5 | + | + | - | - |
| B6 | + | + | - | - |
| B7 | + | + | - | - |

หมายเหตุ (+) ให้ผลบวกในการทดสอบ, (–) ให้ผลลบในการทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-EMB พบโคโลนีที่ต้องสงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของ *E. coli* จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยพบว่าเป็นตัวอย่างจากร้าน A จำนวน 5 ตัวอย่าง และร้าน B จำนวน 7 ตัวอย่าง เนื่องจากโคโลนีมีลักษณะสีมันวาวคล้ายโลหะที่เป็นลักษณะโคโลนีของ *E. coli* บนอาหาร L-EMB (นงลักษณ์, 2547) จากนั้นนำมาย้อมแกรมและทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางชีวเคมีพบว่า เป็นเชื้อ *E. coli* จำนวน 11 ตัวอย่างจากทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างจากร้าน A ทั้งหมด 5 ตัวอย่างพบตัวอย่างที่เป็น *E. coli* 4 ตัวอย่าง ได้แก่ A1, A3, A4 และ A5 ส่วนตัวอย่างจากร้าน B พบว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง เนื่องจากลักษณะการติดสีแกรมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ตัวเซลล์มีลักษณะรูปท่อนสั้น มีความสอดคล้องตามลักษณะ *E. coli* (Eley, 1996) และผลการทดสอบปฏิกิริยา IMViC เป็นดังนี้ Indole test และ Methyl red test ให้ผลเป็นบวก ส่วน Voges-Proskauer และ Citrate utilization ให้ผลเป็นลบ มีความสอดคล้องตามสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* (กัญจนา และคณะ, 2547) ส่วนตัวอย่าง A2 ไม่ใช่ *E. coli* เนื่องจากผลการทดสอบการย้อมแกรม และการทดสอบทางชีวเคมีไม่สอดคล้องกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น

### 4.1.6 ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็งโดยนับจากตัวอย่างที่มีผลการทดสอบปฏิกิริยา IMViC แล้วนำมาหาค่าโดยใช้ตาราง MPN ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำแข็งทั้งร้าน A และร้าน B แสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่4.4** ผลการตรวจวิเคราะห์ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

| Refreshment store | Sample | No. of tubes giving positive reaction out of | | | Combination of Positive | MPN index per 100 ml | 95% confidence limits | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 of 10 ml each | 5 of 1 ml each | 5 of 0.1 ml each | | | Lower | Upper |
| A | 1 | 1 | 0 | 0 | 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 |
| | 2 | 1 | 0 | 0 | 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 |
| | 3 | 1 | 0 | 1 | 1-0-1 | 4 | 1.0 | 15 |
| B | 1 | 1 | 0 | 0 | 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 |
| | 2 | 2 | 1 | 0 | 2-1-0 | 7 | 2.0 | 21 |
| | 3 | 2 | 0 | 1 | 2-0-1 | 7 | 2.0 | 20 |

จากผลการวิเคราะห์ *E. coli* ในน้ำแข็งสำหรับบริโภคทั้งสองร้าน พบว่า ตัวอย่างน้ำแข็งมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ทั้งสองร้าน ดังตารางที่4.4 โดยร้าน A มีค่าเฉลี่ยการปนเปื้อน *E. coli* เท่ากับ 2.7 และร้าน B มีค่าเฉลี่ยการปนเปื้อน *E. coli* เท่ากับ 5.3 แสดงให้เห็นว่าน้ำแข็งจากทั้งสองร้านไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำแข็งตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2557) ที่ระบุไว้ว่าต้องไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli* ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เกิดจากการจัดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม คาดว่าเกิดจากการสัมผัสกับน้ำแข็งไม่ว่าจะเป็นมือของผู้จำหน่าย หรือแม้กระทั่งอุปกรณ์ตักน้ำแข็งที่อาจไม่สะอาดพอ หรือมีการจัดเก็บที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น มีสิ่งอื่นแซ่ปนกับน้ำแข็ง โดยการปนเปื้อนจากร้าน A อาจเกิดจากการปนเปื้อนจากการสัมผัสของพนักงาน รวมถึงอุปกรณ์ตักน้ำแข็งที่อาจไม่สะอาดพอไปสู่น้ำแข็งที่จำหน่าย ส่วนร้าน B มีการเก็บรักษาที่ไม่ถูกสุขลักษณะโดยมีการนำสิ่งอื่นแซ่ปะปนกับน้ำแข็ง เช่น ขวดวิปครีม กล่องนมสด เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ได้ สอดคล้องตามงานวิจัยของ Falcão *et al.* (2002) ตรวจพบเชื้อ *E. coli* มากถึง 50 สายพันธุ์ ปนเปื้อนในน้ำแข็งสำหรับบริโภคและแซ่อาหาร ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงถึงการจัดการด้านสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากมีการปนเปื้อนที่มาจากพนักงานและการทำความสะอาดเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกวิธี และงานวิจัยของ Gerokomou *et al.* (2011) ตรวจพบเชื้อ *E. coli* คิดเป็น 22% ของตัวอย่างน้ำแข็งที่ใช้สำหรับเครื่องดื่มและแซ่อาหาร ซึ่งการปนเปื้อนอาจเกิดจากถังเก็บน้ำแข็ง, อุปกรณ์, บรรจุภัณฑ์, การเก็บรักษาและการสัมผัสกับน้ำแข็ง รวมไปถึงบุคลากรที่เกี่ยวข้องในการผลิตและการจัดการน้ำแข็ง ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์นี้ อาจส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ควรมีการกำกับดูแลการผลิตน้ำแข็ง มีการฝึกอบรมด้านสุขอนามัย และมีการตรวจสอบอยู่เสมอ

**4.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร**

งานวิจัยครั้งนี้ได้จำลองอุณหภูมิน้ำจากสภาวะจริงโดยวัดค่าจากจุดบริการลวกช้อน ณ โรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส โดยน้ำที่ใช้ในการจุ่มลวกคือน้ำประปาซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นเท่ากับ 76 CFU/ml เมื่อต้มน้ำทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเพียง 1 โคโลนีเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าถ้ามีอุณหภูมิน้ำที่ 70 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดเชื้อ *E. coli* ได้ โดยเชื้อ *E. coli* ถูกจัดอยู่ในจำพวก mesophillic bacteria เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 7-50 องศาเซลเซียส (Eley, 1996) และระยะเวลาใช้ในการจุ่มลวกสังเกตจากพฤติกรรมของผู้มาใช้บริการลวกช้อนอยู่ในช่วง 3-10 วินาที ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาปริมาณเชื้อ *E. coli* บนช้อนทั้งก่อนและหลังการจุ่มลวก เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ เช่น โรคท้องร่วงถ่ายเป็นน้ำและเลือด เลือดออกในทางเดินอาหาร (Griffin and Tauxe, 1991) และเชื้อ *E. coli* แสดงถึงการปนเปื้อนอุจจาระในภาชนะสัมผัสอาหารที่มาจากการจัดการด้านสุขอนามัยไม่เหมาะสม (Maori and De, 2009)

การศึกษาปริมาณเชื้อ *E. coli* โดยป้ายสารละลายเชื้อในรูปสารแขวนลอยที่มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 (Acharya, 2016) ลงบนช้อนจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเชื้อก่อนจุ่มลวกและหลังจุ่มลวกในน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3, 5 และ 10 วินาที ช่วงเวลาละ 4 ตัวอย่าง โดยนับโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA (รูปที่ 4.11) ในช่วง 25 - 250 โคโลนี (สุรีย์, 2557) แสดงผลในหน่วย CFU ต่อชิ้นภาชนะ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อจุ่มลวก 3, 5 และ 10 วินาที เชื้อก่อนการจุ่มลวกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$1.5\times10^4$, $5.3\times10^4$ และ $6.7\times10^4$ CFU ต่อชิ้นภาชนะ ตามลำดับ และเชื้อหลังการจุ่มลวกที่เวลา 3 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.6\times10^3$ CFU ต่อชิ้นภาชนะ ส่วนหลังการจุ่มที่เวลา 5 และ 10 วินาที ปริมาณเชื้อที่เจริญบนอาหารมีค่าน้อยว่า 25 โคโลนี ข้อมูลแสดงในตารางที่ 4.5

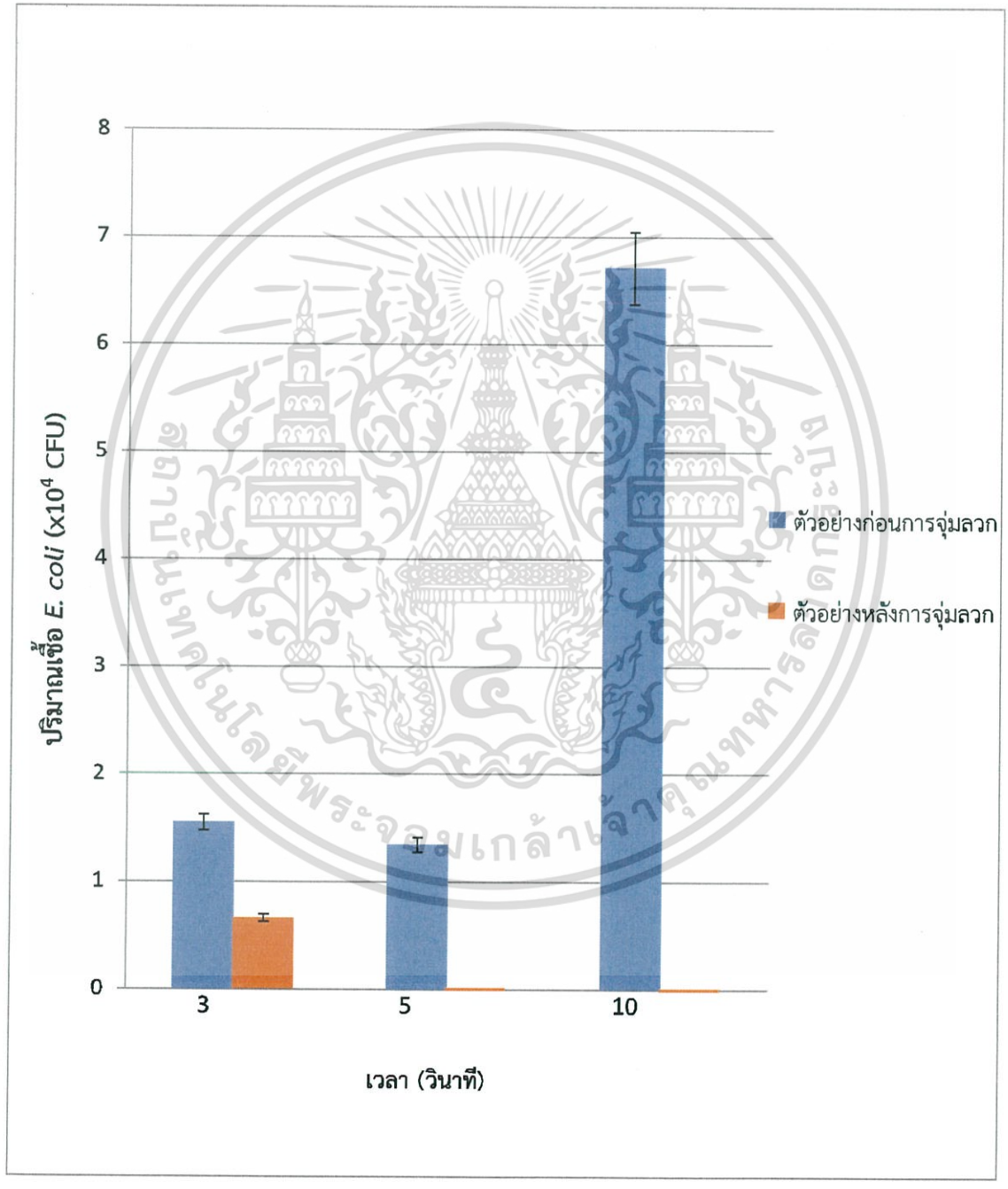
**รูปที่4.11** ตัวอย่างการเจริญของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

**ตารางที่4.5** จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังการจุ่มลวกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 5 และ 10 วินาที

| เวลา (วินาที) | ก่อนการจุ่มลวก (CFU/ชิ้นภาชนะ) | ค่าเฉลี่ย ± S.D ก่อนการจุ่มลวก | หลังการจุ่มลวก (CFU/ชิ้นภาชนะ) | ค่าเฉลี่ย ± S.D หลังการจุ่มลวก |
|---|---|---|---|---|
| 3 | $1.5\times10^4$ | $\pm 9.6\times10^3$ | $6.6\times10^3$ | $\pm 3.8\times10^3$ |
| 5 | $5.3\times10^4$ | $\pm 4.1\times10^3$ | <25 | - |
| 10 | $6.7\times10^4$ | $\pm 1.0\times10^4$ | <25 | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อของตัวอย่างทั้งก่อนและหลังการจุ่มลวกของแต่ละเวลาพบว่า หลังจากจุ่มลวกมีปริมาณเชื้อลดลง แต่หลังการจุ่มเป็นระยะเวลา 3 วินาทีนั้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.6\times10^3$ CFU ต่อชิ้นภาชนะ ซึ่งยังมีค่าเกินมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่กำหนดว่าจำนวนจุลินทรีย์ต้องน้อยกว่า 1000 CFU ต่อชิ้นภาชนะ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) ส่วนจำนวนโคโลนีหลังจากจุ่มลวกเป็นระยะเวลา 5 และ 10 วินาทีนั้นอยู่ในค่ามาตรฐานที่กำหนด โดยการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อก่อนและหลังการจุ่มลวกได้แสดงในรูปที่ 4.12




**รูปที่4.12** เปรียบเทียบจำนวนโคโลนี (CFU/ชิ้นภาชนะ) ของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังการจุ่มลวกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3, 5 และ 10 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่ได้แสดงไว้ข้างต้นจึงสรุปได้ว่า การลวกซ้อนยิ่งใช้เวลามากขึ้นก็สามารถลดการปนเปื้อนบนซ้อนลงได้ โดยอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ต้องมีค่า 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป แต่การจุ่มลวกเพียง 3 วินาทีนั้นไม่เพียงพอที่ทำให้ปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ จากงานวิจัยของวรีวรรณ และภารดี (2556) ที่ศึกษาจำนวนแบคทีเรียบนซ้อนส้อมหลังการลวกในน้ำร้อนที่ต้มด้วยหม้อหุงข้าว ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ คืออุณหภูมิของน้ำที่สามารถลดปริมาณเชื้อบนซ้อนส้อมได้ต้องสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยชิ้นนี้ และยังพบว่ายิ่งจุ่มซ้อนส้อมนานขึ้นจำนวนแบคทีเรียบนซ้อนส้อมยิ่งลดลง แต่ข้อแตกต่างของงานวิจัยดังกล่าวคือผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างซ้อนก่อนและหลังจุ่มลวกคนละตัวอย่างกัน ทำให้ไม่ทราบจำนวนโคโลนีเริ่มต้นของแต่ละตัวอย่างที่แน่นอน ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้ใช้ตัวอย่างซ้อนก่อนและหลังจุ่มลวกเป็นตัวอย่างเดียวกันทำให้ทราบค่าจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นได้แน่นอนกว่า และงานวิจัยของ Poonnoy *et al.* (2014) ศึกษาเวลาและอุณหภูมิเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* บนซ้อนโดยการจุ่มลวกด้วยน้ำร้อน ผลการวิจัยมีความสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ คือการใช้อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส และเวลาจุ่มลวกอยู่ในช่วง 3 – 7 วินาทีสามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ลงได้ แต่ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อ *E. coli* บนซ้อนได้ทั้งหมด การจุ่มลวกซ้อนในน้ำร้อนเป็นเพียงวิธีหนึ่งที่ช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารลงได้ เนื่องจากการปนเปื้อนในอาหารเกิดจากสาเหตุหลายปัจจัยได้แก่ บุคคล อาหาร ภาชนะอุปกรณ์ สถานที่ประกอบอาหาร รวมทั้งสัตว์หรือแมลงนำโรค (สำนักงานสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย, 2557) ผู้วิจัยนำข้อมูลที่ได้จัดทำเป็นสื่อประชาสัมพันธ์ในรูปแบบของโปสเตอร์จำนวน 3 รูปแบบ และจัดทำแบบประเมินสื่อประชาสัมพันธ์โดยนักศึกษาในคณะวิทยาศาสตร์จำนวน 30 คนพบว่า รูปแบบที่ 1 ได้คะแนนเฉลี่ย 71.22 คะแนน (รูปที่4.13 ก) รูปแบบที่ 2 ได้คะแนนเฉลี่ย 67.14 คะแนน (รูปที่ 4.13 ข) และรูปแบบที่ 3 ได้คะแนนเฉลี่ย 93.03 คะแนน (รูปที่4.13 ค) จากคะแนนการประเมินผู้วิจัยจึงเลือกรูปแบบที่ 3 นำมาปรับปรุงแก้ไขตามคำเสนอแนะผู้ประเมินเรื่องตัวหนังสือหัวเรื่องไม่ชัดเจน (รูปที่4.14) เพื่อให้สื่อประชาสัมพันธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และเผยแพร่เพื่อเป็นแนวทางในการจุ่มลวกซ้อนกับนักศึกษาและบุคลากรเพื่อลดการปนเปื้อนลงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

(ข)

(ค)

**รูปที่4.13** (ก) สื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 1
(ข) สื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 2
(ค) สื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่4.14** สื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนที่ปรับปรุงแก้ไข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

### 5.1.1 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำแข็งสำหรับบริโภคในคณะวิทยาศาสตร์จำนวน 2 ร้านที่รับมาจากแหล่งผลิตเดียวกันโดยร้าน A ที่มีการจัดเก็บน้ำแข็งโดยวางถังน้ำแข็งสูงจากพื้น 50 เซนติเมตร ไม่มีการนำสิ่งอื่นแช่รวมกับน้ำแข็ง ร้าน B มีการจัดเก็บน้ำแข็งโดยวางถังน้ำแข็งสูงจากพื้นเพียง 12 เซนติเมตร ฝาถังปิดไม่สนิทและมีการนำสิ่งของอื่นแช่รวมกับน้ำแข็ง ผลการวิเคราะห์ว่าพบตัวอย่างน้ำแข็งจากร้าน B มีปริมาณการปนเปื้อนทั้งเชื้อกลุ่ม Total coliform bacteria และ Total fecal coliform bacteria สูงกว่าร้าน A แสดงในเห็นว่าสุขลักษณะในการจัดเก็บน้ำแข็งมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ จึงนำผลงานวิจัยที่ได้มาจัดทำเป็นสื่อวีดีโอเพื่อเผยแพร่ให้กับประชาชนทั่วไปได้นำไปปรับใช้ในชีวิตประจำวัน และนอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์ทั้งร้าน A และ B ซึ่งเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีแหล่งกำเนิดมาจากอุจจาระ และตัวอย่างน้ำแข็งที่นำมาวิเคราะห์ทั้งจากร้าน A และร้าน B มีปริมาณการปนเปื้อนทั้งเชื้อ Total coliform bacteria, Total fecal coliform bacteria และ *E. coli* มีค่าเกินมาตรฐานที่กระทรวงสาธารณะสุขที่กำหนดให้ปริมาณเชื้อชนิดโคลิฟอร์มต้องมีค่าน้อยกว่า 2.2 MPN ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร และระบุไว้ว่าต้องไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli* นอกเหนือไปจากสาเหตุที่สังเกตเห็นแล้วคาดว่าการปนเปื้อนยังอาจเกิดขึ้นได้จากการมีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่เหมาะสม เช่น ไม่ล้างมือหลังจากเข้าห้องน้ำ ใช้มือสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง รวมทั้งการปนเปื้อนในน้ำที่ทำมาใช้ในการผลิต กระบวนการผลิต กระบวนการบรรจุและขนส่ง เพราะฉะนั้นการผลิตน้ำแข็งควรมีการจัดการด้าน GMP เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

### 5.1.2 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหาร

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *E. coli* บนช้อนหลังจากการจุ่มลวกในน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาจุ่มนาน 3, 5 และ 10 วินาที พบว่าช่วงอุณหภูมิและเวลาดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้แต่ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ทั้งหมด การจุ่มลวกนาน 3 วินาที ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยังมีเกินมาตรฐานที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนด และการจุ่มลวกนาน 5 และ 10 วินาที ปริมาณเชื้อ *E. coli* มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนด โดยการจุ่มนาน 10 วินาทีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อมากที่สุด จึงสรุปได้ว่าการจุ่มช้อนที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ดีอุณหภูมิของน้ำต้อง 70 องศาเซลเซียสขึ้นไปโดยใช้เวลาจุ่มลวกอย่างน้อย 10 วินาที นำข้อมูลที่ได้จัดทำเป็นสื่อประชาสัมพันธ์เผยแพร่ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปปรับใช้ในชีวิตประจำวัน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ผู้ประกอบการร้านขายเครื่องดื่มควรมีการแก้ไขปรับปรุงด้านสุขาภิบาลอาหารที่ดีเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสน้ำแข็งควรมีสุขอนามัยที่ดี มีการทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ตักหรือเก็บรักษาน้ำแข็ง ไม่นำสิ่งอื่นแช่ปะปนกับน้ำแข็งสำหรับบริโภค และไม่วางถังน้ำแข็งติดกับพื้น เป็นต้น

5.2.2 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆว่าสามารถถูกกำจัดได้ที่น้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้หรือไม่ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยจากภาชนะสัมผัสอาหารให้แก่ผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. **เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2.** เข้าถึงได้จาก : http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguideline.pdf.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2560. **เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3.** เข้าถึงได้จาก : http://www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/news_detail.php.

กรรณิการ์ เครื่องชนะ. 2558. "การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มรอบมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก." วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ภาควิชา ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร.

กระทรวงสาธารณสุข. 2527. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 เรื่อง น้ำแข็ง.** เข้าถึงได้จาก : http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2.

กัญจนา ธีระกุล, เกสร ทวีเศษ, ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์, ชัยวัฒน์ กิตติกูล, ชุลี ชัยศรีสุข, ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, ธงชัย คัมภีร์, นภา โล่ห์ทอง, นภาวรรณ นพรัตนราภรณ์, บุษบา ยงสมิทธ์, ปทุมพร ฉิมเอนก, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, พัชรี สุนทรนันท, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, ลาวัณย์ ไกรเดช, เลอลักษณ์ จิตรดอน, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, วิเชียร ยงมานิตชัย, วิวัฒน์ แดงสุภาพ, สนทนา แสงจันทร์, สาวิตรี ลิ่มทอง, สุรางค์ สุธิราวุธ, สุราษฎร์ กุฏอินทร์, อมรา จันทนโอ และหลังกอบเกียรติ. 2547. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิช. 2550. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2553. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม.** ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วน จำกัดสุเนตรฟิล์ม.

วรีวรรณ ศรีทอง และภารดี ช่วยบำรุง. 2557. "จำนวนแบคทีเรียรมบนช้อนส้อมที่จุ่มลวกในน้ำร้อนและการปนเปื้อนแบคทีเรียจากน้ำร้อนสู่ช้อนส้อม." *ธรรมศาสตร์เวชสาร.* 16(1) : 48-59

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2545. **ปัญหาและแนวทางแก้ปัญหาการผลิตน้ำแข็ง.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สำนักงานสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย. 2557. **คู่มือหลักสูตรการสุขาภิบาลอาหารสำหรับผู้สัมผัสอาหารและผู้ประกอบการ.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://foodsan.anamai.moph.go.th.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2557. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Acharya, T. 2016 **Preparation of McFarland Turbidity Standards.** [Online]. Available : https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standard.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1999. **Standard Method for the Examination of Water and Wastewater.** [Online]. Available https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf.

Eley, A.R. 1996. **Microbiol Food Poisoning.** 2nd ed. London : Chapman & Hall.

Falcão, J.P. Dias, A.G.M. Correa, E.F. and Falcão, D.P. 2002. "Microbiology quality of ice used to refrigerate foods." *Elesvier.* 19 : 269-276.

Gerokomou, V. Voidarou, C. Vatopoulos, A. Velonakis, E. Rozos, G. Alexopoulos, A. Plessas, S. Stavropoulou, E. Bezirtzoglou, E. Demertzis, P.G. and Akrida-Demertzi K. 2011. "Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications." *Elsevier.* 17 : 351-353.

Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. 1991 "The Epidemiology of infection Caused by Escherichia coli O157:H7 Other Enterohemorrhagic E. coli and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome." *Epidemiologic Reiew.* 13 : 60-98.

Maori, L. and De, N. 2010. "Bacterial contamination of crockery and cultlery within the kiosks' restaurants of the Federral University." *Academic Journals.* 4(3) : 147-153.

Poonney, P. Klayroung, S. and Tanongkankit, Y. 2014 "Time and temperature on *E. coli* survival during hot water treatment of spoons." *Food and Applied Bioscience Journal.* 2(2) : 135-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. Lauryl Tryptose Broth

| | | |
|---|---|---|
| Tryptose | 20.00 | g |
| Lactose | 5.00 | g |
| Sodium chloride | 5.00 | g |
| Dipotassium phosphate | 2.75 | g |
| Monopotassium phosphate | 2.75 | g |
| Sodium lauryl sulphate | 0.10 | g |
| น้ำกลั่น | 1,000 | ml |
| pH | 6.8±0.2 | |

### 2. Brilliant Green Lactose Bile Broth 2%

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10.00 | g |
| Lactose | 10.00 | g |
| Bile | 20.00 | g |
| Brilliant green | 0.0133 | g |
| น้ำกลั่น | 1,000 | ml |
| pH | 7.2±0.2 | |

### 3. EC medium

| | | |
|---|---|---|
| Casein enzymic hydrolysate | 20.00 | g |
| Lactose | 5.00 | g |
| Bile salts mixture | 1.50 | g |
| Dipotassium phosphate | 4.00 | g |
| Monopotassium phosphate | 1.50 | g |
| Sodium chloride | 5.00 | g |
| น้ำกลั่น | 1,000 | ml |
| pH | 6.0±0.2 | |

### 4. EMB Agar, Levine

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10.00 | g |
| Dipotassium phosphate | 2.00 | g |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| Lactose | 10.00 g |
| Eosin –Y | 0.40 g |
| Methylene | 0.065 g |
| Agar | 15.00 g |
| น้ำกลั่น | 1,000 ml |
| pH | 7.1±0.2 |

## 5. Plate count Agar

| | |
|---|---|
| Tryptone | 5.00 g |
| Yeast extract | 2.50 g |
| Glucose | 1.00 g |
| Agar | 15.00 g |
| น้ำกลั่น | 1,000 ml |
| pH | 7.1±0.2 |

## 6. Koser citrate Medium

| | |
|---|---|
| Sodium ammonium phosphate | 1.50 g |
| Monopotassium phosphate | 1.00 g |
| Magnesium sulphate | 0.20 g |
| Sodium citrate | 3.00 g |
| น้ำกลั่น | 1,000 ml |
| pH | 6.7±0.2 |

## 7. MR-VP Medium

| | |
|---|---|
| Buffered peptone | 7.00 g |
| Dextrose | 5.00 g |
| Dipotassium phosphate | 5.00 g |
| น้ำกลั่น | 1,000 ml |
| pH | 6.9±0.2 |

## 8. Tryptone Soya Agar

| | |
|---|---|
| Tryptone | 17.00 g |
| Sodium chloride | 5.00 g |
| Soyatone | 3.00 g |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| Dipotassium phosphate | 2.00 g |
| Dextrose | 2.00 g |
| Agar | 15.00 g |
| น้ำกลั่น | 1,000 ml |
| pH | 7.3±0.2 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

## สารเคมี

### 1. สารละลายบัฟเฟอร์ (0.1% peptone)

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 0.1 | g |
| น้ำกลั่น | 100 | ml |

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1% peptone) ทำได้โดยชั่ง peptone 0.1 g นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

### 2. 0.5 McFarland Standard

| | | |
|---|---|---|
| 1% sulfuric acid | 99.5 | ml |
| 1% barium chloride | 0.5 | ml |

การเตรียม McFarland Standard เบอร์ 0.5 ทำได้โดยนำ 1% sulfuric acid 99.5 ml ผสมกับ 1% barium chloride 0.5 ml จากนั้นใส่หลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

## ผลการทดลอง

**ตารางที่ ค.1** ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ LTB

| ร้านค้า | ตัวอย่าง | ปริมาตร (ml) | หลอดที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| A | 1 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | - | + | + | + |
| | 2 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | - | + | - | - |
| | 3 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | - | - | + |
| B | 1 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | - | + | + | + | - |
| | 2 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | - | - | - |
| | 3 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | + | + | + |

หมายเหตุ : + เกิดแก๊สและความขุ่น

- ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.2** ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB

| ร้านค้า | ตัวอย่าง | ปริมาตร (ml) | หลอดที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| A | 1 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | - | - | - | - |
| | 2 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | - | - | - | - |
| | 3 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | - | - | + |
| B | 1 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | - | - | + | + | - |
| | 2 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | - | - | - |
| | 3 | 10 | + | + | + | + | + |
| | | 1 | + | + | + | + | + |
| | | 0.1 | + | + | + | + | + |

หมายเหตุ : + เกิดแก๊สและความขุ่น

- ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.3** ผลการทดลองการเกิดแก๊สและความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium

| ร้านค้า | ตัวอย่าง | ปริมาตร (ml) | หลอดที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| A | 1 | 10 | - | + | + | - | - |
| | | 1 | - | - | - | - | - |
| | | 0.1 | - | - | - | - | - |
| | 2 | 10 | - | + | - | - | - |
| | | 1 | - | - | - | - | - |
| | | 0.1 | - | - | - | - | - |
| | 3 | 10 | - | - | - | + | - |
| | | 1 | - | - | - | - | - |
| | | 0.1 | - | - | - | - | + |
| B | 1 | 10 | + | - | - | - | - |
| | | 1 | - | - | - | - | - |
| | | 0.1 | - | - | - | - | - |
| | 2 | 10 | - | + | + | - | - |
| | | 1 | - | + | - | - | - |
| | | 0.1 | - | - | - | - | - |
| | 3 | 10 | + | + | - | + | - |
| | | 1 | - | - | + | - | - |
| | | 0.1 | - | - | + | - | - |

หมายเหตุ : + เกิดแก๊สและความขุ่น

- ไม่เกิดแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.4** แสดงผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อ *E.coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง

| ตัวอย่าง | การย้อมแกรม | การทดสอบทางชีวเคมี | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Indole | Methyl red | Voges-proskaver | Citrate |
| A1 | + | + | + | - | - |
| A2 | - | - | + | + | + |
| A3 | + | + | + | - | - |
| A4 | + | + | + | - | - |
| A5 | + | + | + | - | - |
| B1 | + | + | + | - | - |
| B2 | + | + | + | - | - |
| B3 | + | + | + | - | - |
| B4 | + | + | + | - | - |
| B5 | + | + | + | - | - |
| B6 | + | + | + | - | - |
| B7 | + | + | + | - | - |

หมายเหตุ + ให้ผลเป็นผลบวกในการทดสอบ

\- ให้ผลเป็นผลลบในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ค.5** จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA ก่อนการจุ่มลวกซ้อน

| เวลา (วินาที) | ตัวอย่าง | ระดับความเจือจาง | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 | | $10^{-1}$ | | $10^{-2}$ | | $10^{-3}$ | | $10^{-4}$ | | $10^{-5}$ | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 3 | A31 | >300 | >300 | 286 | 296 | 63 | 62 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | A32 | >300 | >300 | 96 | 77 | 23 | 8 | 2 | 1 | 11 | 5 | 0 | 0 |
| | A33 | >300 | >300 | 175 | 138 | 20 | 23 | 2 | 4 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| | A34 | >300 | >300 | 65 | 106 | 12 | 9 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| 5 | A51 | >300 | >300 | 157 | 118 | 30 | 23 | 2 | 4 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | A52 | >300 | >300 | 97 | 56 | 25 | 37 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | A53 | >300 | >300 | 152 | 157 | 19 | 19 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | A54 | >300 | >300 | 141 | 196 | 16 | 16 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | A101 | >300 | >300 | >300 | >300 | 63 | 90 | 21 | 23 | 0 | 8 | 2 | 12 |
| | A102 | >300 | >300 | >300 | >300 | 72 | 73 | 2 | 8 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | A103 | >300 | >300 | >300 | >300 | 58 | 75 | 7 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | A104 | >300 | >300 | 150 | 110 | 48 | 58 | 30 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**ตารางที่ ค.6** จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA หลังการจุ่มลวกซ้อน

| เวลา (วินาที) | ตัวอย่าง | ระดับความเจือจาง | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 | | $10^{-1}$ | | $10^{-2}$ | | $10^{-3}$ | | $10^{-4}$ | | $10^{-5}$ | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 3 | B31 | 121 | 125 | 15 | 26 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| | B32 | 39 | 42 | 10 | 11 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B33 | 41 | 52 | 4 | 8 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | B34 | 56 | 54 | 8 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | B51 | 7 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B52 | 12 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B53 | 23 | 21 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| | B54 | 10 | 13 | 8 | 8 | 12 | 1 | 1 | 2 | 11 | 7 | 0 | 1 |
| 10 | B101 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | B102 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | B103 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | B104 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ค.7** จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร TSA ในตัวอย่างน้ำก่อนต้ม, น้ำก่อนจุ่มลวก และน้ำหลังจุ่มลวก

| ตัวอย่าง | ระดับความเจืองจาง | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | | | $10^{-1}$ | | | $10^{-2}$ | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| น้ำก่อนต้ม | 86 | 68 | 74 | 1 | 1 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| น้ำก่อนจุ่มลวก | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| น้ำหลังจุ่มลวก | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

# ภาคผนวก ง

## แบบฟอร์มแบบสอบถาม

### แบบสอบถามความคิดเห็น

### เรื่อง วีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็ง

เพศ : ☐ ชาย ☐ หญิง

คณะ : .....

ชั้นปี : ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

เกณฑ์การให้คะแนน : 5 = ดีมาก 4 = ดี 3 = ปานกลาง 2 = พอใช้ 1 = ปรับปรุง

| รายการ | ระดับความพึงพอใจ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| **1. ด้านเนื้อหา** | | | | | |
| 1.1 เนื้อหามีความถูกต้อง ครบถ้วน | | | | | |
| 1.2 เนื้อหามีความชัดเจน เหมาะสม | | | | | |
| 1.3 สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | | | | | |
| 1.4 สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันได้ | | | | | |
| **2. ด้านรูปแบบ** | | | | | |
| 2.1 รูปแบบมีความน่าสนใจ | | | | | |
| 2.2 ภาพมีความสวยงามและเหมาะสม | | | | | |
| 2.3 ความเหมาะสมของเวลา | | | | | |
| 2.4 ความพึงพอใจโดยรวม | | | | | |

**รูปที่ ง.1** แบบฟอร์มแบบสอบถามเรื่องวีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบสอบถามความคิดเห็น

เรื่อง โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนเพื่อลดการปนเปื้อน

เพศ : ☐ ชาย ☐ หญิง

คณะ : .....

ชั้นปี : ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

เกณฑ์การให้คะแนน : 5 = ดีมาก 4 = ดี 3 = ปานกลาง 2 = พอใช้ 1 = ปรับปรุง

| รายการ | ระดับความพึงพอใจ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| **1. เนื้อหา** | | | | | |
| 1.1 ความครบถ้วนของเนื้อหา | | | | | |
| 1.2 ความน่าสนใจของเนื้อหา | | | | | |
| 1.3 สามารถสื่อได้เข้าใจง่าย | | | | | |
| **2. ด้านรูปแบบ** | | | | | |
| 2.1 ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | | | | | |
| 2.2 ขนาดของโปสเตอร์มีความเหมาะสม | | | | | |
| 2.3 ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | | | | | |
| 2.4 ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | | | | | |

**รูปที่ ง.2** แบบฟอร์มแบบสอบถามเรื่องโปสเตอร์การจุ่มลวกช้อนเพื่อลดการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ง.1** คะแนนประเมินวีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็งจากผู้ประเมินจำนวน 30 คน

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1. เนื้อหามีความถูกต้อง ครบถ้วน | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| 2. เนื้อหามีความชัดเจน เหมาะสม | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| 4. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันได้ | 4 | 5 | 4 | 5 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 4 |
| 5. รูปแบบมีความน่าสนใจ | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 6. ภาพมีความสวยงามและเหมาะสม | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 |
| 7. ความเหมาะสมของเวลา | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 8. ความพึงพอใจโดยรวม | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 3 |
| **รวม** | **36** | **37** | **36** | **40** | **35** | **38** | **36** | **32** | **31** | **35** | **40** | **31** | **40** | **34** | **36** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี
3 = ปานกลาง 2 = พอใช้
1 = ปรับปรุง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ตารางที่ ง.1** คะแนนประเมินวีดีโอให้ความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยของน้ำแข็งจากผู้ประเมินจำนวน 30 คน (ต่อ)

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 1. เนื้อหามีความถูกต้อง ครบถ้วน | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 2. เนื้อหามีความชัดเจน เหมาะสม | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันได้ | 3 | 3 | 5 | 4 | 5 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 5 | 4 |
| 5. รูปแบบมีความน่าสนใจ | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6. ภาพมีความสวยงามและเหมาะสม | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 7. ความเหมาะสมของเวลา | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| 8. ความพึงพอใจโดยรวม | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| **รวม** | **34** | **32** | **40** | **39** | **40** | **35** | **35** | **33** | **35** | **38** | **38** | **37** | **36** | **40** | **37** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี
3 = ปานกลาง 2 = พอใช้
1 = ปรับปรุง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ตารางที่ ง.2** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 1 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 4 | 3 | 1 | 4 | 5 | 4 | 3 | 3 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 5 | 3 | 2 | 1 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 2 | 4 | 3 | 4 | 5 | 5 | 3 | 5 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 | 5 | 3 | 4 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 | 5 | 2 | 3 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 5 | 2 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| **รวม** | **22** | **24** | **21** | **18** | **23** | **26** | **34** | **19** | **24** | **21** | **27** | **32** | **32** | **26** | **28** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

**ตารางที่ ง.2** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกข้อนรูปแบบที่ 1 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน (ต่อ)

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 4 | 4 | 5 | 3 | 5 | 5 | 3 | 4 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 |
| **รวม** | **22** | **26** | **24** | **26** | **24** | **25** | **21** | **24** | **23** | **31** | **24** | **25** | **25** | **24** | **27** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

**ตารางที่ ง.3** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 2 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 3 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 5 | 3 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 5 | 4 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| **รวม** | **23** | **15** | **24** | **23** | **23** | **23** | **33** | **21** | **23** | **16** | **26** | **20** | **25** | **24** | **24** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ตารางที่ ง.3** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 2 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน (ต่อ)

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 4 | 4 | 3 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 5 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | 4 | 3 | 4 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 2 | 4 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 4 | 5 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 3 | 1 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 4 | 3 |
| **รวม** | **23** | **23** | **26** | **24** | **25** | **25** | **21** | **21** | **23** | **25** | **25** | **23** | **26** | **27** | **25** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

**ตารางที่ ง.4** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 3 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 4 | 4 | 5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 3 | 5 | 5 | 2 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 3 | 4 | 5 | 3 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 4 | 5 | 5 | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| **รวม** | **27** | **33** | **35** | **24** | **33** | **32** | **31** | **33** | **33** | **33** | **35** | **35** | **35** | **35** | **34** |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

**ตารางที่ ง.4** คะแนนประเมินของสื่อประชาสัมพันธ์โปสเตอร์ความรู้เรื่องการจุ่มลวกช้อนรูปแบบที่ 3 จากผู้ประเมินจำนวน 30 คน (ต่อ)

| คำถาม | ผู้ประเมิน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 1. ความครบถ้วนของเนื้อหา | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2. ความน่าเชื่อถือของเนื้อหา | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3. สามารถสื่อให้เข้าใจได้ง่าย | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| 4. ความเหมาะสมของรูปภาพที่ใช้ | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5. ขนาดของโปสเตอร์ | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6. ตัวหนังสือเห็นได้ชัดเจน อ่านง่าย | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| 7. ความน่าสนใจของโปสเตอร์ | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 |
| **รวม** | 33 | 33 | 31 | 34 | 33 | 35 | 30 | 33 | 34 | 34 | 33 | 32 | 34 | 31 | 29 |

*หมายเหตุ 5 = ดีมาก 4 = ดี

3 = ปานกลาง 2 = พอใช้

1 = ปรับปรุง

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

# ภาคผนวก จ

**ตารางที่ จ.1** แสดงค่าดัชนี MPN และขีดจำกัดความเชื่อมั่น 95% ของหลอดที่ให้ผลบวกเมื่อใช้ระบบ 5 หลอดของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (10 ml, 1.0 ml, 0.1ml)

| Combination of Positive | MPN Index per 100 mL | 95% confidence limits | | Combination of Positive | MPN Index per 100 mL | 95% confidence limits | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Lower | Upper | | | Lower | Upper |
| 0-0-0 | <2 | - | - | 4-3-0 | 27 | 12 | 67 |
| 0-0-1 | 2 | 1.0 | 1.0 | 4-3-1 | 33 | 15 | 77 |
| 0-1-0 | 2 | 1.0 | 10 | 4-4-0 | 34 | 16 | 80 |
| 0-2-0 | 4 | 1.0 | 13 | 5-0-0 | 23 | 9.0 | 86 |
| 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 | 5-0-1 | 30 | 10 | 110 |
| 1-0-1 | 4 | 1.0 | 15 | 5-0-2 | 40 | 20 | 140 |
| 1-1-0 | 4 | 1.0 | 15 | 5-1-0 | 30 | 10 | 120 |
| 1-1-1 | 6 | 2.0 | 18 | 5-1-1 | 50 | 20 | 150 |
| 1-2-0 | 6 | 2.0 | 18 | 5-1-2 | 60 | 30 | 180 |
| 2-0-0 | 4 | 1.0 | 17 | 5-2-0 | 50 | 20 | 170 |
| 2-0-1 | 7 | 2.0 | 20 | 5-2-1 | 70 | 30 | 210 |
| 2-1-0 | 7 | 2.0 | 21 | 5-2-2 | 90 | 40 | 250 |
| 2-1-1 | 9 | 3.0 | 24 | 5-3-0 | 80 | 30 | 250 |
| 2-2-0 | 9 | 3.0 | 25 | 5-3-1 | 110 | 40 | 300 |
| 2-3-0 | 12 | 5.0 | 29 | 5-3-2 | 140 | 60 | 360 |
| 3-0-0 | 8 | 3.0 | 24 | 5-3-3 | 170 | 80 | 410 |
| 3-0-1 | 11 | 4.0 | 29 | 5-4-0 | 130 | 50 | 390 |
| 3-1-0 | 11 | 4.0 | 29 | 5-4-1 | 170 | 70 | 480 |
| 3-1-1 | 14 | 6.0 | 35 | 5-4-2 | 220 | 100 | 580 |
| 3-2-0 | 14 | 6.0 | 35 | 5-4-3 | 280 | 120 | 690 |
| 3-2-1 | 17 | 7.0 | 40 | 5-4-4 | 350 | 160 | 820 |
| 4-0-0 | 13 | 5.0 | 38 | 5-5-0 | 240 | 100 | 940 |
| 4-0-0 | 17 | 7.0 | 45 | 5-5-1 | 300 | 100 | 1300 |
| 4-0-1 | 17 | 7.0 | 46 | 5-5-2 | 500 | 200 | 2000 |
| 4-1-1 | 21 | 9.0 | 55 | 5-5-3 | 900 | 300 | 2900 |
| 4-1-2 | 26 | 12 | 63 | 5-5-4 | 1600 | 600 | 5300 |
| 4-2-0 | 22 | 9.0 | 56 | 5-5-5 | ≥1600 | - | - |
| 4-2-1 | 26 | 12 | 65 | | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้