บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาเรื่องการตรวจหายีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ (Survey research) เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในร้านแผงลอย บนถนนสุเทพ บริเวณประตูด้านหลังมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อรา ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของยีสต์และเชื้อราในเครื่องดื่มหาบเร่แผงลอย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข วิธีดำเนินการศึกษามีดังนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในร้านแผงลอย บนถนนสุเทพ (ระหว่างประตูคณะเกษตรศาสตร์ถึงประตูคณะวิศวกรรมศาสตร์) บริเวณด้านหลังมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากร้านแผงลอยจำนวน 2 ร้าน ดังนี้

ร้านแผงลอยที่ 1 มีน้ำผักและน้ำผลไม้จำนวน 6 ชนิด ประกอบด้วย น้ำกระเจี๊ยบ น้ำตะไคร้ น้ำลำไย น้ำใบบัวบก น้ำมะพร้าว และน้ำมะตูม

ร้านแผงลอยที่ 2 มีน้ำผักและน้ำผลไม้จำนวน 10 ชนิด ประกอบด้วย น้ำผึ้งมะนาว น้ำส้ม น้ำสำรอง น้ำมะขาม น้ำบีทรูท น้ำมะพร้าว-แคนตาลูป น้ำมะเขือเทศ น้ำเสาวรส น้ำสตรอเบอร์รี่และน้ำผักรวม

โดยเก็บข้อมูลน้ำผักและน้ำผลไม้จำนวน 2 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บห่างกัน 2 เดือน เก็บข้อมูลครั้งที่ 1 ในช่วงวันที่ 5 ธันวาคม ถึง 17 ธันวาคม 2550 จำนวน 16 ชนิด เก็บข้อมูลครั้งที่ 2 ในช่วงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ ถึง 10 กุมภาพันธ์ 2551 จำนวน 16 ชนิด รวมจำนวนทั้งหมด 32 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราและแบบสังเกตอย่างมีโครงสร้างเพื่อสังเกตเกี่ยวกับการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้ผลิตและจำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้ แบบไม่มีส่วนร่วม โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และเชื้อรา

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มโดยวิธี Pour Plate Technique ตามหลักของ Bacteriological Analytical Manual of Food and Drug Administration ปี 2001 ซึ่งได้รับการรับรองจาก AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, 1998) (Center for Food Safety and Applied Nutrition – U.S. Food and Drug Administration, 2008) โดยห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่ม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เขต 10 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีหลักการตรวจวิเคราะห์ดังนี้ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง น้ำผักและน้ำผลไม้ที่เจือจางเป็นอัตราส่วนต่างๆ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมมานับและคำนวณปริมาณของยีสต์และเชื้อรา

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย

1. ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar Flow)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator Oven)
3. เตาอบร้อน (Hot – Air Sterilizing Oven)
4. เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (Autoclave)
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Analytical Balance)
6. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
7. เครื่องนับโคโลนี (Colony Counter)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย

1. ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ
2. หลอดดูดแก้วปราศจากเชื้อ ขนาด 2.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
3. จานแก้วเพาะเชื้อปราศจากเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิลิตร
4. ขวดแก้วปราศจากเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ขวดพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 125 มิลลิลิตร
6. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
7. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย

1. Plate Count Agar (PCA)
2. Chloramphenicol
3. Peptone water
4. Tartaric acid, AR
5. น้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85%
6. น้ำกลั่น

3.2. แบบสังเกตอย่างมีโครงสร้าง เพื่อสังเกตเกี่ยวกับการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้ผลิตและจำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่ม แบบไม่มีส่วนร่วม ซึ่งดัดแปลงมาจากคู่มือมาตรฐานและกลวิธีในการดำเนินงานสุขาภิบาลอาหารของสถานที่ปรุง ประกอบและจำหน่ายอาหารที่จัดทำโดยกองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2545 โดยเกณฑ์ในการประเมินผล อ้างอิงจากคู่มือมาตรฐานและกลวิธีในการดำเนินงานสุขาภิบาลอาหารและสถานที่ปรุง ประกอบและจำหน่ายอาหาร ที่จัดทำโดยกองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2545

การตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือ

การศึกษาครั้งนี้ ผู้ศึกษาได้ส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราที่ห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่ม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เขต 10 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO 15189 : 2003 และข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุขของสำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการในด้านชันสูตรสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขและทำการตรวจวิเคราะห์ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของยีสต์และเชื้อราในเครื่องดื่มหาบเร่แผงลอย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การตรวจสอบคุณภาพของวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำผักและน้ำผลไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อรา คือ วิธี Pour Plate Technique ตามหลักของ Bacteriological Analytical Manual of Food and Drug Administration ปี 2001 ซึ่งได้รับการรับรองจาก AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, 1998) (Center for Food Safety and Applied Nutrition – U.S. Food and Drug Administration, 2008) โดยห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่ม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เขต 10 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO 15189 : 2003 และข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุขของสำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ในด้านชันสูตรสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. การตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำผักและน้ำผลไม้มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเครื่องมือที่ได้คุณภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง (นงคราญ เรืองประพันธ์, 2549)

2.1. ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar Flow) เป็นเครื่องมือเพื่อใช้ในการป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ฟุ้งกระจายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำให้ผู้ปฏิบัติงานได้รับอันตรายจากการหายใจเอาเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกายได้ ตู้ปราศจากเชื้อแบ่งได้ 3 แบบ แต่สำหรับการตรวจทางด้านจุลชีววิทยาในอาหารจะใช้ แบบ Class 2 Cabinet ซึ่งเป็นตู้ชนิดที่เปิดด้านหน้าได้บางส่วน ตู้ชนิดนี้จะป้องกันทั้งผู้ปฏิบัติงาน ตัวอย่างทดสอบและสิ่งแวดล้อมภายนอกมิให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยตู้ปราศจากเชื้อจะดูดอากาศจากภายนอกเข้าสู่ตู้ผ่าน Air Filter แล้วจึงดูดอากาศภายในตู้ออกอีกด้านหนึ่งผ่านAir Filter อีกชุดหนึ่งก่อนปล่อยออกสู่ภายนอก โดยอากาศที่เข้าออกต้องปรับให้สมดุลกัน และค่าของความเร็วอากาศต้องไม่น้อยกว่า 0.4 เมตรต่อวินาที ตู้ชนิดนี้ใช้กับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการก่อโรคต่อสิ่งมีชีวิตต่ำถึงปานกลาง โดยก่อนและหลังการใช้งานทุกครั้งต้องเปิดหลอดอุลตร้าไวโอเลตซึ่งอยู่ภายในตู้เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เป็นเวลา 30 นาที

การควบคุมคุณภาพ โดยการตรวจสอบความปราศจากเชื้อของตู้ปราศจากเชื้อซึ่งทดสอบโดยการเปิดฝาจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Plate Count Agar ในตู้ปราศจากเชื้อขณะใช้งานประมาณ 15 นาที แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35–37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่งโมง

การประเมิน จานเพาะเชื้อต้องไม่มีโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator Oven) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการให้อุณหภูมิที่เหมาะสมและคงที่แก่ยีสต์และเชื้อราที่ต้องการเพาะเลี้ยง โดยปกติจะใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและใช้อากาศแบบธรรมดา (Aerobic Incubator)

การควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบความแม่นยำของเทอร์โมมิเตอร์ซึ่งจะทำการตรวจสอบทุก 3 เดือน อุณหภูมิที่วัดได้จากเทอร์โมมิเตอร์ประจำเครื่องกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานควรแตกต่างกันไม่เกิน ± 2 องศาเซลเซียส และมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

2. การตรวจสอบการกระจายความร้อน โดยการวัดอุณหภูมิตามตำแหน่งต่างๆ ภายในตู้ ซึ่งค่าที่วัดได้ไม่ควรแตกต่างกันเกิน ± 2 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่ตั้งไว้

2.3 เตาอบร้อน (Hot – Air Sterilizing Oven) เป็นเครื่องมือที่ให้ความร้อนแก่วัตถุที่ต้องการอบเพื่อให้วัตถุที่ต้องการอบแห้ง ซึ่งจะใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับวัตถุที่จะนำมาอบ

การควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบความแม่นยำของเทอร์โมมิเตอร์โดยจะตรวจสอบทุก 3 เดือน อุณหภูมิที่วัดได้จากเทอร์โมมิเตอร์ประจำเครื่องกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานควรแตกต่างกันไม่เกิน ± 2 องศาเซลเซียส และมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่95%

2. การตรวจสอบการกระจายความร้อน โดยการวัดอุณหภูมิตามตำแหน่งต่างๆ ภายในตู้ ซึ่งค่าที่วัดได้ไม่ควรแตกต่างกันเกิน ± 2 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่ตั้งไว้

2.4 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (Autoclave) เป็นเครื่องมือที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้แรงดันไอน้ำ ซึ่งภายในเครื่องนึ่งทำลายเชื้อจะต้องมีแรงดันไอน้ำที่มีอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะเข้าไปแทนที่อากาศทั้งหมดในเครื่องนึ่งทำลายเชื้อและไอน้ำจะแทรกเข้าไปในทุกส่วนของวัตถุที่ต้องการทำลายเชื้อจุลชีพ โดยทั่วไปจะใช้แรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้แรงดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบการกระจายความร้อนภายในเครื่อง โดยการใช้แถบเทปเคมี (Autoclave Indicator Tape) ซึ่งจะไวต่อแรงดันไอน้ำ ซึ่งเมื่อสัมผัสกับแรงดันไอน้ำ ณ เวลา อุณหภูมิและแรงดันที่กำหนดแถบเทปเคมีจะเปลี่ยนสีทันที ซึ่งจะทำทุกครั้งที่มีการใช้งานเครื่องนึ่งทำลายเชื้อและมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

การประเมิน แถบเทปเคมีเปลี่ยนสีและความเข้มของสีสม่ำเสมอ ตามที่บริษัทกำหนด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การตรวจสอบการปราศจากเชื้อ โดยการใช้เชื้อ *Bacillus sterthermophilus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส และเมื่อเจริญแล้วจะสร้างกรดซึ่งจะเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ภายในหลอดทดสอบ คือ Bromcresal Puple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง โดยเชื้อนี้สามารถทนอุณหภูมิสูง 121 องศาเซลเซียส ได้นาน 5 นาที แต่เชื้อนี้จะตายถ้าสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การประเมิน หลอดทดสอบไม่มีการเปลี่ยนสี หลังจากบ่มเพาะเชื้อ ตามที่บริษัทกำหนด

2.5 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Analytical Balance) ซึ่งมีความละเอียด 0.0001กรัม เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการชั่งน้ำหนักของวัตถุที่ต้องการ (ฐิติรัตน์ จารุวาระกูล, 2548)

การควบคุมคุณภาพ ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบลักษณะทั่วไป โดยตำแหน่งของลูกน้ำต้องอยู่ตรงกลาง ถ้ามีการปรับตำแหน่งของลูกน้ำใหม่ ต้องทำการปรับตั้งเครื่องชั่งทุกครั้ง เมื่อกดปุ่ม Tare เครื่องชั่งต้องอ่านได้ศูนย์

2. การตรวจสอบความเที่ยงของเครื่องชั่ง โดยเครื่องชั่งต้องสามารถชั่งวัตถุชิ้นเดียวกันได้เท่ากันทุกครั้ง ภายใต้เงื่อนไขและสภาวะต่างๆที่เหมือนกัน สามารถตรวจสอบได้โดยการชั่งตุ้มน้ำหนักมาตรฐานซ้ำกัน 10 ครั้ง ภายใต้เงื่อนไขและสภาวะเดียวกัน เครื่องชั่งต้องมีความเที่ยงไม่น้อยกว่า 90%

3. การตรวจสอบความถูกต้องของค่าที่อ่านได้ โดยเครื่องชั่งต้องสามารถแสดงค่าน้ำหนักที่อ่านได้เท่ากับน้ำหนักจริงที่วางอยู่บนเครื่องชั่ง สามารถตรวจสอบได้โดยการหาค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่อ่านได้จากเครื่องชั่งกับค่าจริงของตุ้มน้ำหนักมาตรฐานที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว โดยจะตรวจสอบความถูกต้องเป็นช่วงๆ ซึ่งไม่น้อยกว่า 10 ช่วงเท่าๆกัน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าแก้ของเครื่องชั่ง เพื่อให้การชั่งได้มาตรฐาน

3. การตรวจสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำผักและน้ำผลไม้ (สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2550) ประกอบด้วย

3.1. การตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อทางกายภาพ ประกอบด้วย การตรวจดูลักษณะทั่วๆไปของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นมาใหม่ ถ้าพบว่าสีผิดไปจากเดิมจะดำเนินการตรวจสอบ pH ของอาหาร ซึ่งค่าที่วัดได้ไม่ควรเกิน ± 0.2 ของค่า pH ที่กำหนดไว้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2. การตรวจสอบความปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วร้อยละ 5 ของจำนวนที่เตรียมทั้งหมด นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูเชื้อจุลินทรีย์ ถ้าพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่นำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาใช้

3.3. การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยก่อนที่จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ ต้องตรวจสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อว่าช่วยในการเจริญเติบโตของยีสต์และเชื้อราต่างๆได้หรือไม่ โดยการนำเชื้อ *Cadida albicans* มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่นำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาใช้

4. การตรวจสอบคุณภาพของแบบสังเกตอย่างมีโครงสร้าง

การหาความเที่ยงตรงด้านเนื้อหา (Validity) ของแบบสังเกต ผู้ศึกษานำแบบสังเกตให้ผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน ตรวจสอบความครอบคลุมของเนื้อหา รวมทั้งแก้ไขสำนวนภาษาจากนั้นจึงนำแบบสังเกตมาปรับปรุงแก้ไขให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้ศึกษาเก็บรวบรวมข้อมูลน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มด้วยตนเองและตรวจวิเคราะห์ ณ. ห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่ม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เขต 10 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ทำการสำรวจจำนวนร้านแผงลอยที่จำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มและจำนวนน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่ม

2. ใช้แบบสังเกตแบบมีโครงสร้าง เพื่อสังเกตเกี่ยวกับการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้ผลิตและจำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้ ซึ่งครอบคลุมสาระต่างๆ เช่น การสุขาภิบาลทางด้านอาหาร ด้านภาชนะและอุปกรณ์ ด้านผู้สัมผัสอาหาร ด้านแมลงและสัตว์นำโรคและด้านสิ่งแวดล้อม

3. การเก็บตัวอย่างน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่วางจำหน่ายที่ในร้านแผงลอยบริเวณถนนสุเทพ (ระหว่างประตูคณะเกษตรศาสตร์ถึงประตูคณะวิศวกรรมศาสตร์) บริเวณด้านหลังมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บห่างกัน 2 เดือน โดยมีวิธีการเก็บและรักษาน้ำผักและน้ำผลไม้เพื่อการวิเคราะห์ ดังนี้
(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1. เก็บน้ำผักและน้ำผลไม้ที่ต่ำกว่าผิวหน้าประมาณ 1 นิ้วและมีปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร โดยเก็บแยกถุงแต่ละชนิดของน้ำผักและน้ำผลไม้จากร้านแผงลอยแต่ละร้านและเก็บน้ำผักและน้ำผลไม้ไว้ในถุงพลาสติกที่ร้านแผงลอยนั้นๆใส่ให้

3.2. ติดฉลากที่ถุงพลาสติกทุกถุง (โดยฉลากระบุเกี่ยวกับร้านแผงลอยที่จำหน่ายและชนิดของน้ำผักและน้ำผลไม้ ครั้งที่เก็บน้ำผักและน้ำผลไม้ โดยกำหนดเป็นรหัส)

3.3. นำถุงพลาสติกที่บรรจุน้ำผักและน้ำผลไม้ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดอีกชั้นหนึ่งรัดปากถุงให้แน่น

3.4. หลังจากนั้นเก็บน้ำผักและน้ำผลไม้ไว้ในที่แห้งและมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 0–4 องศาเซลเซียส

3.5. หลังจากนั้นทำการส่งน้ำผักและน้ำผลไม้ไปห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่มภายใน 12 ชั่วโมงหรืออย่างช้าไม่เกิน 48 ชั่วโมงและรักษาอุณหภูมิระหว่างการนำส่งให้อยู่ในช่วง 0–4 องศาเซลเซียส โดยการใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งแห้ง

4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้ ณ. ห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องดื่ม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เขต 10 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมน้ำผักและน้ำผลไม้ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อรา การนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และเชื้อรา การคำนวณปริมาณของยีสต์และเชื้อราและการรายงานจำนวนยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.1. การเตรียมน้ำผักและน้ำผลไม้ (Center for Food Safety and Applied Nutrition – U.S. Food and Drug Administration, 2008)

4.1.1. การเตรียมน้ำผักและน้ำผลไม้เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทำโดยการใช้เทคนิคปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน

4.1.2. นำถุงน้ำผักและน้ำผลไม้มาเขย่าแรงๆ อย่างน้อย 25 ครั้ง

4.1.3. ดูดน้ำผักและน้ำผลไม้ที่ยังไม่ได้เจือจาง จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกที่มีสารละลาย 0.1% peptone water จำนวน 90 มิลลิลิตร (น้ำผักและน้ำผลไม้จะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 10)

4.1.4. ดูดน้ำผักและน้ำผลไม้จากข้อ 4.1.3 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกที่มีสารละลาย 0.1% peptone water จำนวน 90 มิลลิลิตร (น้ำผักและน้ำผลไม้จะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 100)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.5. เจือจางน้ำผักและน้ำผลไม้ลงไปครั้งละ 10 เท่าในลักษณะเดียวกันนี้จนได้อัตราส่วนตามที่ต้องการ

4.2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้ (Center for Food Safety and Applied Nutrition – U.S. Food and Drug Administration, 2008)

4.2.1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้ใช้เทคนิคปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำยาสำหรับเจือจางตัวอย่าง อุปกรณ์ทุกชนิดที่ต้องสัมผัสกับตัวอย่างต้องผ่านการอบหรือนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

4.2.2. ดูดน้ำผักและน้ำผลไม้ที่ถูกเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ โดยในแต่ละอัตราส่วนของตัวอย่างที่ถูกเจือจางให้ทำอย่างน้อย 2 จานและให้ดูดน้ำผักและน้ำผลไม้ที่ไม่ได้เจือจางใส่ลงในจานด้วย

4.2.3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่ผสม Chloramphenicol ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 40 – 50 องศาเซลเซียส ใส่ลงในจานเพาะเชื้อในข้อที่ 4.2.2. จานละประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

4.2.4. นำจานเพาะเชื้อ (ห้ามกลับด้าน) ไปบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

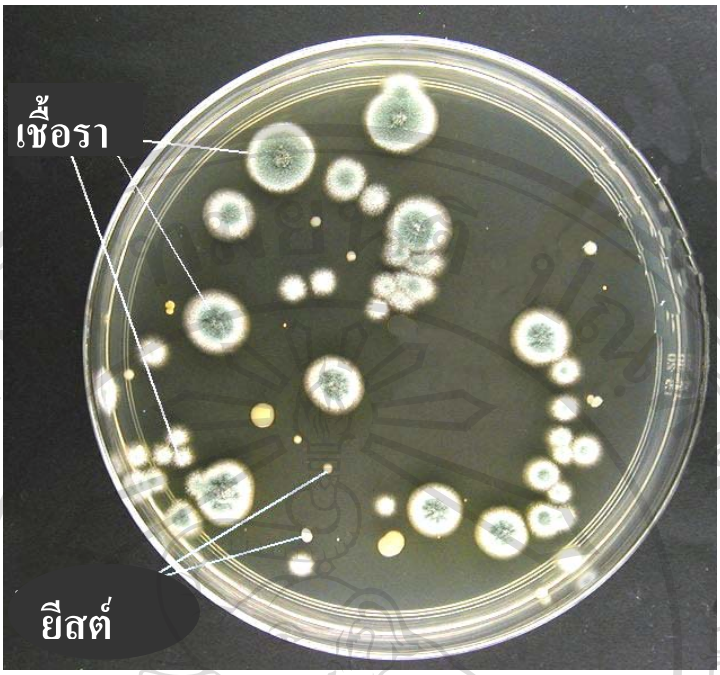
4.2.5. เมื่อครบเวลา ให้นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ โดยเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี ประมาณ 30 - 300 โคโลนี ส่วนโคโลนีที่ไม่แน่ใจว่าเป็นยีสต์หรือเชื้อราให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่สงสัยผสมกับน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85% แล้วนำไปหยดลงบนสไลด์ หลังจากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นยีสต์จะมีลักษณะเป็นเซลล์กลมๆ บางเซลล์มีลักษณะการแตกหน่อแต่ถ้าเป็นเซลล์ของเชื้อราจะเห็นเป็นสาย Hyphae

โคโลนีของยีสต์และเชื้อรา มีลักษณะดังนี้

1. ยีสต์ โคโลนีมีลักษณะเป็นจุดสีเขียวขนาดเล็กสีน้ำตาลหรือสีฟ้า–เขียว หรือไม่มีสี แต่ต้องไม่มีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี ลักษณะนูน มีขอบเขตชัดเจน

2. เชื้อรา โคโลนีของเชื้อราส่วนใหญ่มีสีน้ำเงินหรือสีที่เชื้อราสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น สีดำ สีเหลือง สีเขียว สีขาว เป็นต้น และมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (ใหญ่กว่ายีสต์) ขอบเขตของโคโลนีไม่ชัดเจนเนื่องจากการแผ่กระจายของเส้นใย บ่อยครั้งจะพบว่ามีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1. ลักษณะโคโลนีของยีสต์และเชื้อรา

4.3. การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณปริมาณของยีสต์และเชื้อรา (Center for Food Safety and Applied Nutrition –U.S. Food and Drug Administration, 2008) การนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานเพาะเชื้อที่มีการเจือจางน้อยก่อนไปสู่การเจือจางมาก

4.3.1. ถ้าจานเพาะเชื้อทั้ง 2 จาน จากการเจือจางตัวอย่างที่เท่ากันมีจำนวนโคโลนี อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจาน ให้นับจำนวนโคโลนีของทั้ง 2 จาน นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วย dilution factor

4.3.2. ถ้าจานเพาะเชื้อจานใดจานหนึ่ง จากการเจือจางตัวอย่างที่เท่ากันมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 หรือมากกว่า 300 โคโลนีต่อจาน ให้นับจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จาน นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วย dilution factor

4.3.3. ถ้าจานเพาะเชื้อมี 2 การเจือจางตัวอย่างที่ต่างกันมีจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจาน ให้นับจำนวนโคโลนีทั้ง 2 การเจือจางตัวอย่างแล้วนำมาคำนวณเหมือนข้อที่ 4.3.1 แล้วนำค่าที่ได้จากทั้ง 2 การเจือจางตัวอย่างที่ต่างกันนั้นมาหาค่าเฉลี่ย

4.3.4. ถ้าจานเพาะเชื้อทั้ง 2 จาน จากการเจือจางตัวอย่างที่เท่ากันในอัตราส่วนที่ต่ำสุด นับจำนวนโคโลนีได้น้อยกว่า 300 โคโลนีต่อจาน ให้นับจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จาน นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วย dilution factor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.5. ถ้าจานเพาะเชื้อทุกจานจากการเจือจางตัวอย่างที่ต่างกันมีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนีต่อจาน ให้เลือกเอาจานที่มีการเจือจางมากที่สุด มาแบ่งเป็นส่วนๆ เช่น แบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 2, 4, 8 ส่วน หลังจากนั้นให้นับจำนวนโคโลนีในแต่ละจาน โดยให้นับอย่างน้อย 1 ส่วน แล้วคูณด้วยตัวคงที่ที่เหมาะสม (ถ้าแบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 8 ส่วน แล้วนับจำนวนโคโลนี 2 ส่วน ให้นำค่าที่ได้มาคูณด้วย 4 แต่ถ้านับจำนวนโคโลนี 4 ส่วนให้นำค่าที่ได้มาคูณด้วย 2 นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วคูณด้วย dilution factor)

4.3.6. ถ้าแบ่งจานเพาะเชื้อจากการเจือจางตัวอย่างมากสุดออกเป็น 8 ส่วน และในแต่ละส่วนมีโคโลนีมากกว่า 20 โคโลนี ให้รายงานว่ามากกว่า 1,600 (200 คูณด้วย 8) คูณด้วย dilution factor ถ้าในจานเพาะเชื้อมี spreader มากกว่า 25% ให้รายงานว่า spreader และถ้าจำเป็นต้องนับให้นับโคโลนีที่ spreader เป็น 1 โคโลนีและนับรวมกับโคโลนีปกติ แล้วนำไปคำนวณ

4.4. การรายงานจำนวนยีสต์และเชื้อรา

4.4.1. ให้รายงานเป็นจำนวนเลขนัยสำคัญเท่ากับ 2

4.4.2. ถ้าไม่มียีสต์และเชื้อราเจริญในจานเพาะเชื้อที่ไม่ได้มีการเจือจางตัวอย่างให้รายงานว่า ไม่พบยีสต์และเชื้อราต่อน้ำผักและน้ำผลไม้ 1 มิลลิลิตร

5. บันทึกผลการทดสอบและผลการสังเกตลงในแบบบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์และแบบบันทึกผลการสังเกต

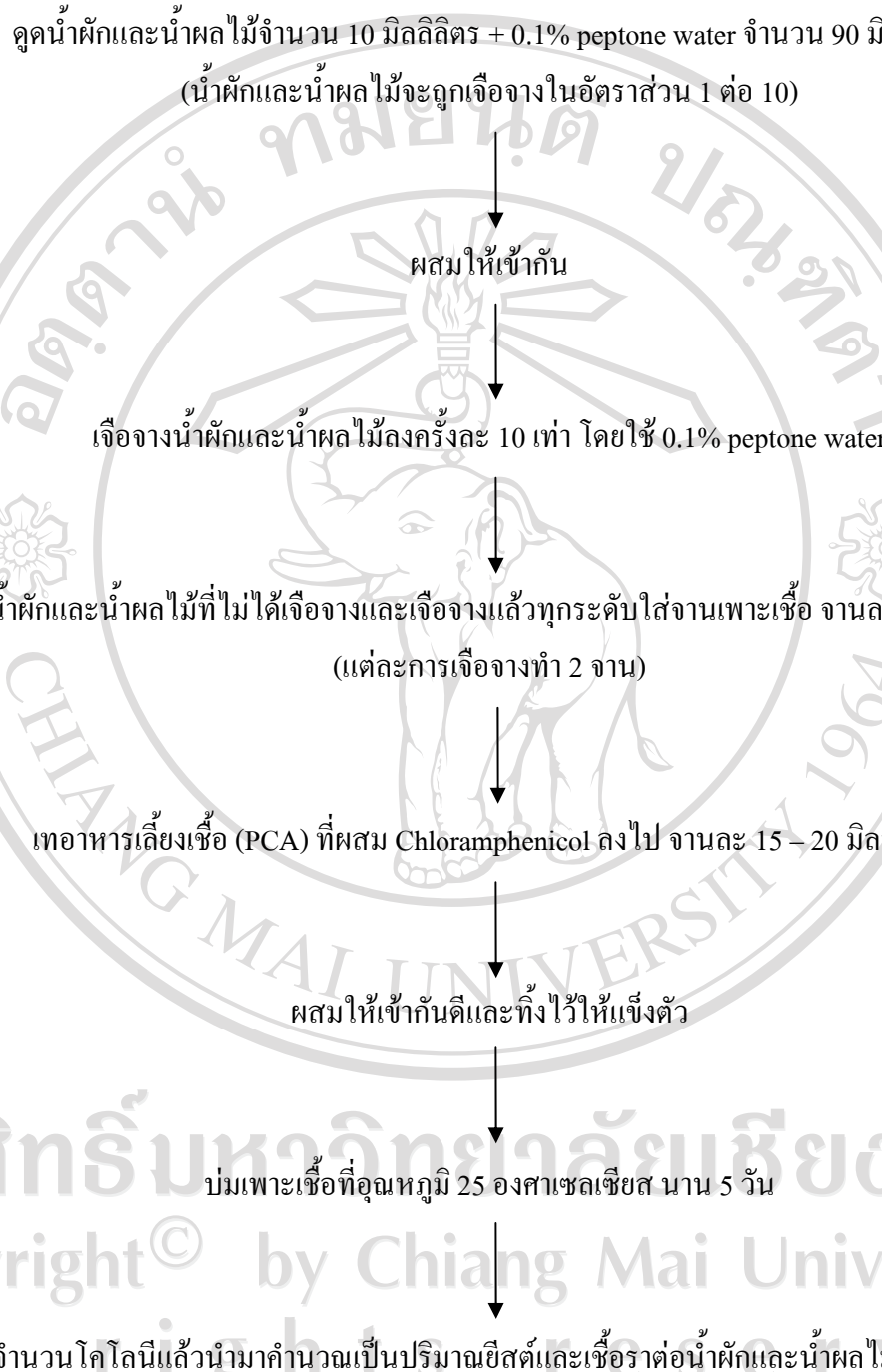
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

การวิเคราะห์ผลการตรวจปริมาณของยีสต์และเชื้อราในน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่ม โดยน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มต้องผ่านเกณฑ์ทางจุลชีวิทยาทั้งยีสต์และเชื้อราจึงจะผ่านเกณฑ์ทางจุลชีวิทยาของยีสต์และเชื้อราในเครื่องดื่มหาบเร่แผงลอย สถิติค่าร้อยละนำมาใช้เพื่อบอกจำนวนน้ำผักและน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ผลการสังเกตแบบมีโครงสร้าง เพื่อสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้ผลิตและจำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้โดยผู้ผลิตและจำหน่ายน้ำผักและน้ำผลไม้ต้องปฏิบัติตามเกณฑ์ครบทุกข้อ ทั้งทางด้านอาหาร ด้านภาชนะและอุปกรณ์ ด้านผู้สัมผัสอาหาร ด้านแมลงและสัตว์นำโรคและด้านสิ่งแวดล้อม จึงจะผ่านเกณฑ์การประเมิน หากขาดข้อใดข้อหนึ่งถือว่าไม่ผ่านการประเมิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภูมิ 3.1 การลำดับขั้นการวิเคราะห์ปริมาณของยีสต์และเชื้อราในตัวอย่างน้ำผักและน้ำผลไม้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved