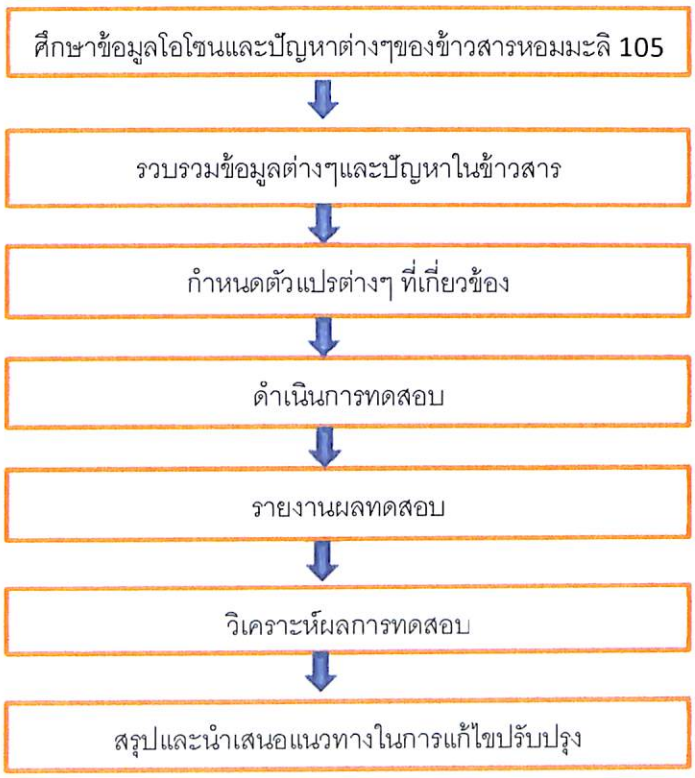
บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาปริมาณแก๊สโอโซนที่เหมาะสม ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิด E.coli และศึกษาลักษณะทางกายภาพของข้าวสารที่ผ่านการใช้โอโซน ดังนั้นเพื่อให้การวิจัยครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ผู้วิจัยจึงได้กำหนดวิธีดำเนินการวิจัย ซึ่งมีรายละเอียดและขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยตามรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 3.1 ดังนี้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

3.1. สถานที่ทดลอง

3.1.1 ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ห้อง ปฏิบัติการเคมี 5-603 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สำนักวิชาศึกษาทั่วไป มหาวิทยาลัยศรีปทุม วิทยาเขตบางเขน เป็นสถานที่ทดสอบ

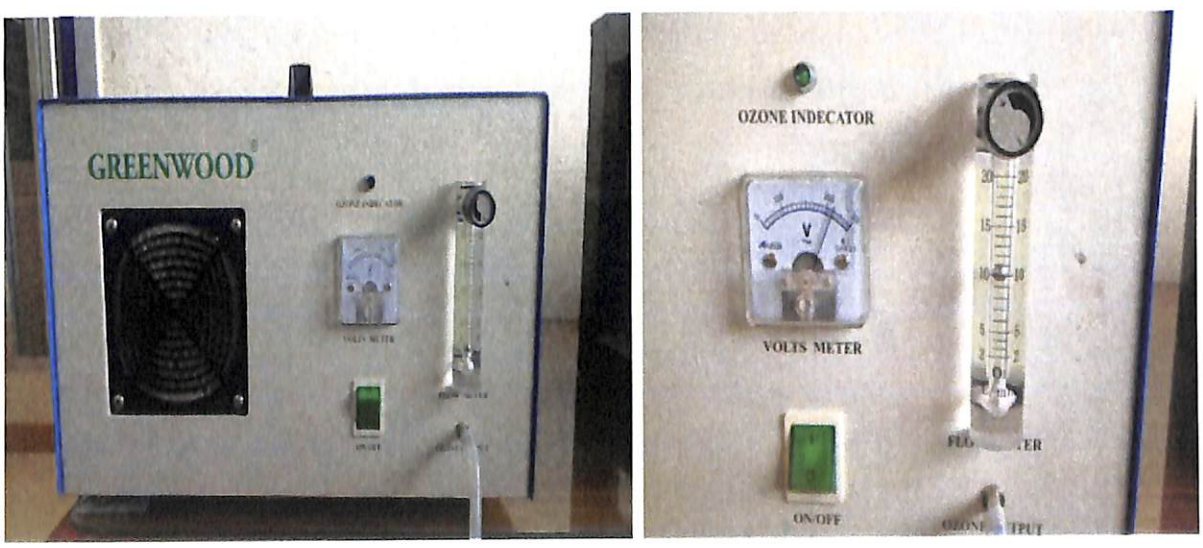
3.1.2 วิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันอาหาร (National Food Institute) แขวงบางยี่ขัน เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

3.2.วัตถุดิบและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ผู้วิจัยได้นำเครื่องกำเนิดโอโซนชนิดโคโรนาดิสชาร์จกำลังผลิต 2,000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง มาใช้ในการทดสอบในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิด (E.coli)

3.2.1 เครื่องผลิตแก๊สโอโซน(ozone generator)

3.2.2 มีหัวปล่อยแก๊ส 1 หัวใช้พลังงานกระแสไฟฟ้าสลับ 220 โวลต์ ความถี่ 50 Hz พลังงานไฟฟ้า 60 วัตต์สามารถผลิตโอโซนได้ 2,000 mg/hr



รูปที่ 3.2 แสดงเครื่องผลิตแก๊สโอโซน 2,000 มิลลิกรัมโอโซน/ชั่วโมง

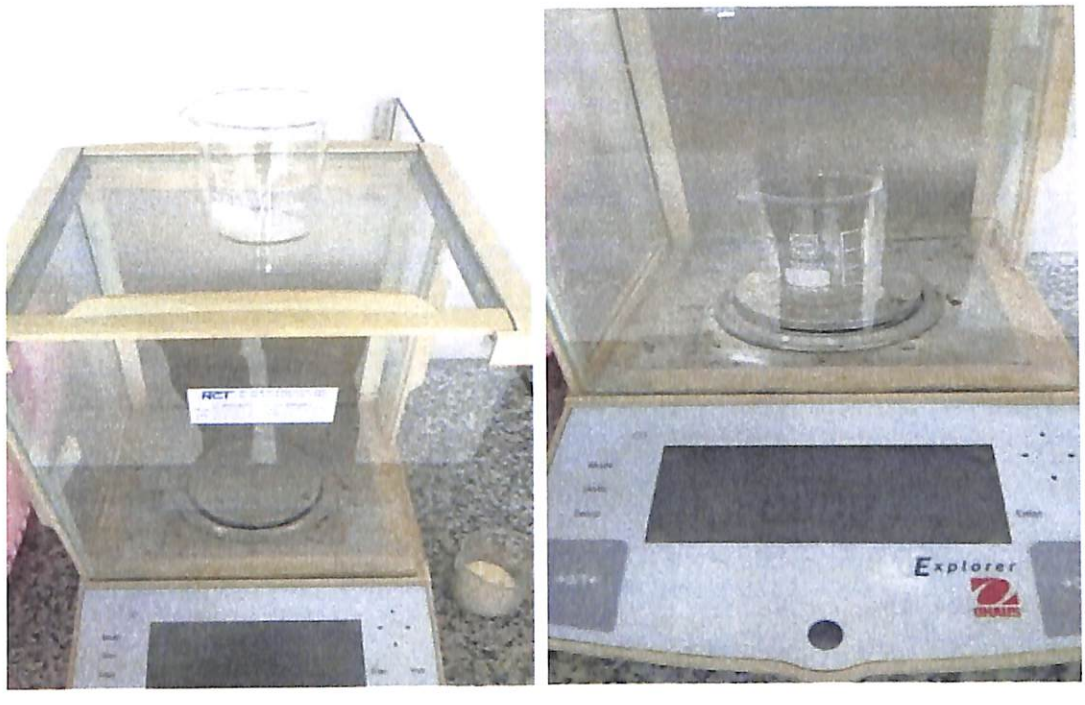
3.2.2 เชื้อจุลินทรีย์ Escherichia coli (E.coli)

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงในขวดแก้วแบบมีฝาปิด โดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในลักษณะที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) และต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อหรือฆ่าเชื้อต่างๆ ซึ่งขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้นำเชื้อมาจากสถาบันอาหารโดยแบ่งใส่ขวดและปิดฝาเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมภายในกล่องเก็บเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 3.4

รูปที่ 3.3 เชื้อจุลินทรีย์บรรจุขวดเลี้ยงเชื้อชนิด Escherichia coli (E.coli)

3.2.3 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบความเที่ยงตรงสูง (Precision Balances)

ผู้วิจัยได้ใช้เครื่องชั่งน้ำหนักแบบความเที่ยงตรงสูงมีฝาปิด 4 ด้าน ยี่ห้อ OHALIS รุ่น EXPLORER ความละเอียดสูงภายในห้องปฏิบัติการเคมี มหาวิทยาลัยศรีปทุม เพื่อชั่งน้ำหนักเมล็ดข้าวในกระบอกตวงให้ได้น้ำหนักกระบอกละ 30 กรัม เท่ากันทุกกระบอกเพื่อนำไปผ่านโอโซน ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบความเที่ยงตรงสูง Precision Balances ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.4 ข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105

ข้าวสารที่ใช้ในการทดสอบเป็นข้าวหอมมะลิสายพันธุ์ 105 ที่ได้มาจากท้องตลาดทั่วไป โดยนำมาใส่บิ๊กเกอร์และชั่งน้ำหนักให้ได้เท่ากันทุกบิ๊กเกอร์ และแยกเป็นชนิดที่จำทำการทดสอบว่าแต่ละบิ๊กเกอร์ ใช้เวลาในการทดสอบกี่นาที เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบ ดังแสดงในรูปที่ 3.5

รูปที่ 3.5 ข้าวสารหอมมะลิที่ใช้ทดสอบสายพันธุ์ 105

3.3 วิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยได้กำหนดให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิด E.Coli อยู่ในภาชนะแบบปิดโดยกำหนดจำนวนของเชื้อในขวดให้เท่ากันทุกขวดและเก็บรักษาไว้ที่ห้องแลปของสถาบันอาหาร

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ E.Coli ในภาชนะแบบปิด (packed in 1 glass bottle)

ผู้วิจัยได้นำเชื้อ E.Coli จากสถาบันอาหาร โดยมีการเลี้ยงเชื้อแบบ Aerobic Plate Count ที่ได้มาตรฐานและถูกเก็บไว้ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ นำมาแบ่งจำนวนเพื่อเข้าเครื่องทดสอบตามลำดับที่กำหนดไว้ โดยผู้วิจัยได้แบ่งจำนวนเชื้อ E.Coli ในภาชนะแบบปิดแบ่งออกเป็นจำนวน 5 ขวด ใช้สัญลักษณ์แทนแต่ละขวดว่า A-1, A-2, A-3, A-4, A-5 โดยที่ A-1 เป็นตัวควบคุม (control) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบดูการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์หลังผ่านแก๊สโอโซนที่ระยะเวลาต่างๆดังแสดงในรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.6 แสดงการเลี้ยงเชื้อ E.Coli ในขวดเลี้ยงเชื้อ

3.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแก๊สโอโซนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิด E.Coli

ผู้วิจัยได้แบ่งระยะเวลาในการใช้แก๊สโอโซนเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวน 4 ขวด เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสม โดยให้ระยะเวลาในการใช้แก๊สพ่นใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในขวดแก้วทีละ 1 ขวด กำหนดให้ขวดที่ 1 ใช้ระยะเวลาพ่นแก๊สโอโซน 5 นาที ขวดที่ 2 ใช้เวลาพ่นแก๊สโอโซน 10 นาที ขวดที่ 3 ใช้เวลาในการพ่นแก๊สโอโซน 15 นาที และขวดที่ 4 ใช้ระยะเวลาในการพ่น

แก๊สโอโซน 20 นาที ทั้งนี้ผู้วิจัยได้กำหนดความเข้มข้นของแก๊สโอโซนที่ใช้ในการทดสอบอยู่ที่ 10 ลิตรต่อนาที ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3.1

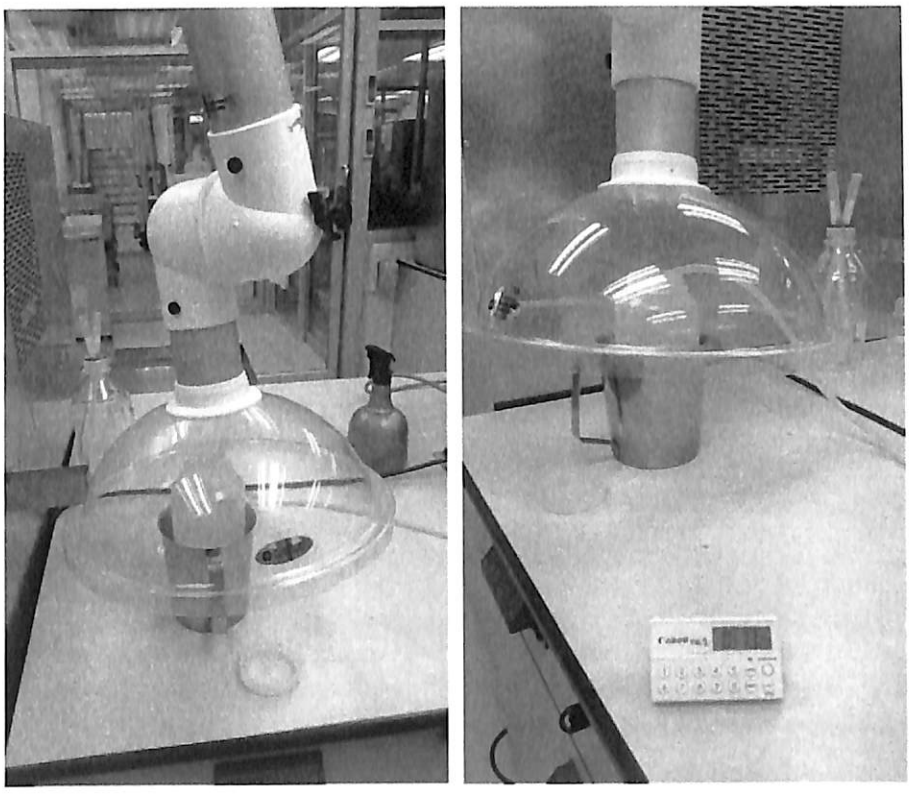
ตารางที่ 3.1 แสดงระยะเวลาและอัตราการไหลที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ E.Coli	ระยะเวลาที่ใช้	อัตราการไหลของแก๊สโอโซน (O_3)	ความเข้มข้นของโอโซน
A- 2	5 นาที	10 ลิตรต่อนาที	2.000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง
A- 3	10 นาที	10 ลิตรต่อนาที	2.000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง
A- 4	15 นาที	10 ลิตรต่อนาที	2.000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง
A- 5	20 นาที	10 ลิตรต่อนาที	2.000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง

การทดลองพ่นแก๊สโอโซนในครั้งนี้ได้ใช้ห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อโรค ของทางสถาบันอาหาร (NFI) ที่ได้มาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในการดำเนินงานเนื่องจากมีอุปกรณ์ป้องกันและเครื่องมือที่ได้มาตรฐาน โดยได้นำเครื่องกำเนิดโอโซน 2,000 มิลิกรัมโอโซนต่อชั่วโมง ทำการต่อเข้ากับขวดพลาสติกที่ภายในบรรจุเชื้อจุลินทรีย์ชนิด E.Coli เพื่อทำการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.7 หลังจากนำเชื้อจุลินทรีย์ E.coli ที่ผ่านการพ่นด้วยโอโซนตามระยะเวลาและความเข้มข้นดังกล่าว ผู้วิจัยได้นำเชื้อจุลินทรีย์มาเก็บไว้ในขวดแก้วเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับขวดแก้วเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการพ่นโอโซน (Control A-1) ดังแสดงในรูปที่ 3.8 เพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ลดลงหลังจากผ่านกระบานการกำจัดด้วยโอโซน และดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์

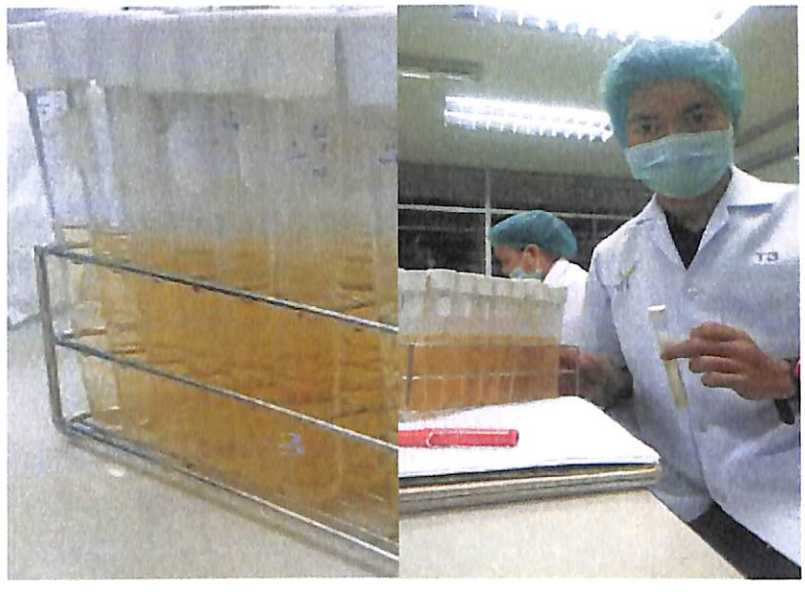
รูปที่ 3.7 แสดงการต่อเครื่องกำเนิดโอโซนเข้ากับอุปกรณ์การทดลอง

ดำเนินการทดสอบ ระหว่างกระบวนการนำเชื้อจุลินทรีย์มาผ่านโอโซน ผู้วิจัยได้ใช้นาฬิกาจับเวลาโดยแบ่งเป็นช่วงเวลาต่างๆ (5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, และ 20 นาที) เพื่อแยกประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านโอโซนตามขอบเขตที่กำหนด และได้ติดตั้งอุปกรณ์ดูดอากาศเพื่อระบายโอโซนออกสู่ภายนอกห้องทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 แสดงการทดสอบใช้โอโซนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ตามระยะเวลาที่กำหนด

หลังจากที่นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านโอโซนตามกระบวนการที่กำหนด ผู้วิจัยได้นำเชื้อมาเก็บไว้ในหลอดแก้ววิทยาศาสตร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างเชื้อที่ควบคุมกับเชื้อที่หลังจากผ่านโอโซนว่ามีการลดลงของจำนวนเชื้อมากน้อยเพียงใด โดยขั้นตอนนี้ได้ให้ทางสถาบันอาหารเป็นผู้วิเคราะห์ผลการทดสอบ เนื่องจากมีเครื่องมือและบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ดังแสดงในรูปที่ 3.9

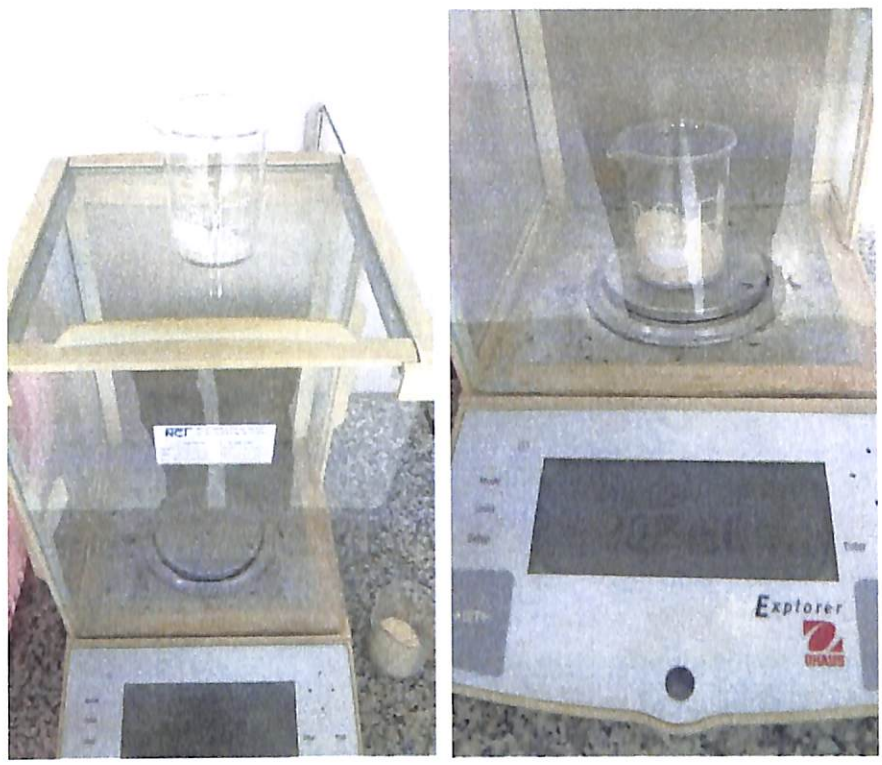


รูปที่ 3.9 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลองหลังการผ่านโอโซนเพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

3.4. การนำข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105 มาผ่านแก๊สโอโซนเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

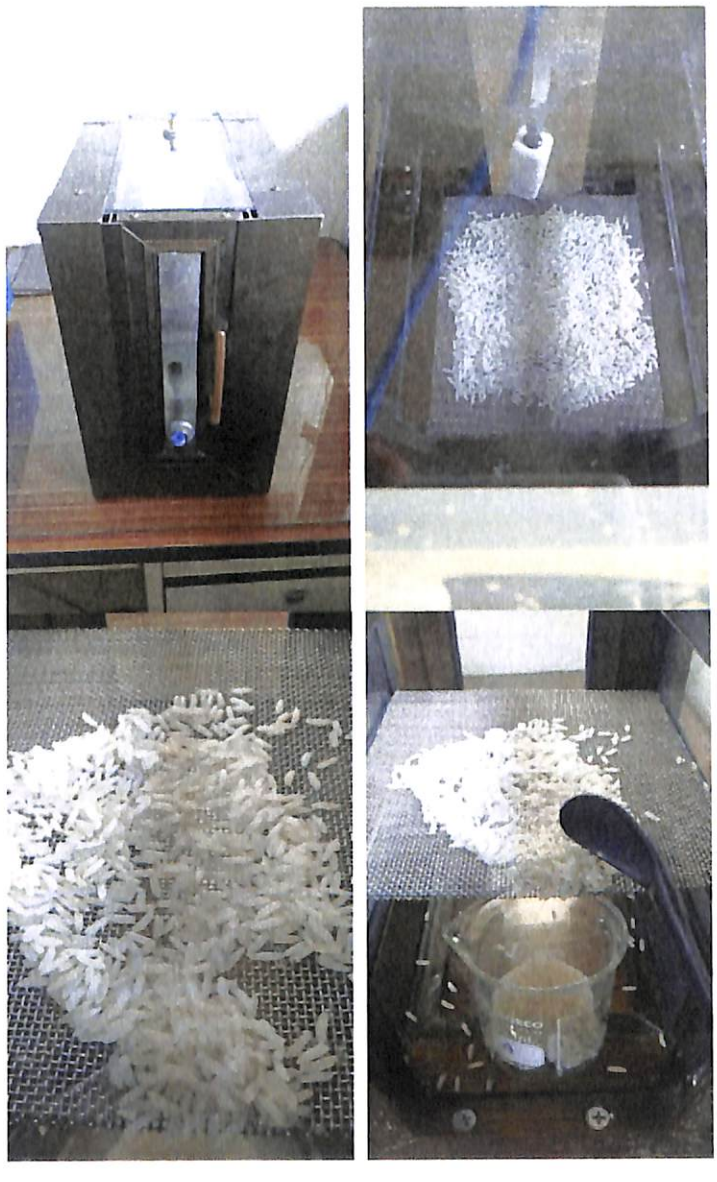
ผู้วิจัยได้นำข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105 มาชั่งน้ำหนักให้เท่ากันโดยกำหนดให้แต่ละขวดมีน้ำหนักขวดละ 30 กรัม โดยเครื่องชั่งน้ำหนักแบบความเที่ยงตรงสูง ดังแสดงในรูปที่ 3.10 จากนั้นจึงมาผ่านแก๊สโอโซนเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและแบ่งระยะเวลาในการพ่นแก๊สโอโซนเป็นจำนวน 4 ชุด เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้โดยให้สัมพันธ์กับระยะเวลาในการใช้แก๊สพ่นใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ภาชนะทำจากกระจกใสแล้วเชื่อมรอยต่อด้วยยางซิลิโคนมีขนาด กว้าง 14.8 เซนติเมตร ยาว 34.8 เซนติเมตร สูง 30.4 เซนติเมตร ซึ่งนำข้าวสารที่ใช้ในการทดลองมาวางไว้บริเวณกลางของภาชนะ กำหนดให้ชุดที่ 1 ใช้ระยะเวลาพ่นแก๊สโอโซน 5 นาที ชุดที่

2 ใช้เวลาพ่นแก๊สโอโซน 10 นาที ชุดที่ 3 ใช้เวลาในการพ่นแก๊สโอโซน 15 นาที ชุดที่ 4 ใช้ระยะเวลาในการพ่นแก๊สโอโซน 20 นาที กำหนดอัตราการไหลของแก๊สโอโซนที่ใช้ในการทดสอบอยู่ที่ 5 ลิตรต่อนาที และ 10 ลิตรต่อนาที ที่ความเข้มข้นของโอโซน ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3.2 และ 3.3



รูปที่ 3.10 ข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105 มาชั่งน้ำหนักแบบความเที่ยงตรงสูง Precision Balances

ข้าวสารที่ผ่านกระบวนการโอโซน ในภาชนะทำจากกระจกใสแล้วเชื่อมรอยต่อด้วยยางซิลิโคน มีขนาด กว้าง 14.8 เซนติเมตร ยาว 34.8 เซนติเมตร สูง 30.4 เซนติเมตร ที่ออกแบบมาสำหรับการนำเมล็ดข้าวสารมาวางให้แก๊สโอโซนไหลผ่าน โดยการออกแบบ ได้คำนึงถึงการใช้งานที่ใกล้เคียงกับกระบวนการบรรจุข้าวสารมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 ภาชนะรมแก๊สโอโซนภายในบรรจุด้วยข้าวสาร 30 กรัม

ตารางที่ 3.2 แสดงระยะเวลาและอัตราการไหลโอโซนผ่านข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105

ข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105	ระยะเวลาที่ใช้	อัตราการไหลของแก๊สโอโซน	ลักษณะการเปลี่ยนแปลง
A- 2	5 นาที	5 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
A- 3	10 นาที	5 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
A- 4	15 นาที	5 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
A- 5	20 นาที	5 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ

ตารางที่ 3.3 แสดงระยะเวลาและอัตราการไหลโอโซนผ่านข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105

ข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105	ระยะเวลาที่ใช้	อัตราการไหลของแก๊สโอโซน	ลักษณะการเปลี่ยนแปลง
B- 2	5 นาที	10 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
B- 3	10 นาที	10 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
B- 4	15 นาที	10 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ
B- 5	20 นาที	10 ลิตรต่อนาที	ดูลักษณะทางกายภาพ

3.5 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวสารหอมมะลิพันธุ์ 105 เมื่อผ่านกระบวนการพ่นด้วยแก๊สโอโซน

จุดประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดข้าว หลักจากผ่านแก๊สโอโซนในระดับความเข้มข้นที่สามารถควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ได้ จากระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้แก๊สโอโซนกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ โดยเปรียบเทียบคุณภาพข้าวที่ไม่ได้ผ่านโอโซน และศึกษาคุณสมบัติของข้าวที่อาจเปลี่ยนแปลงทางกายภาพได้แก่ การแตกหักของเมล็ดข้าว เป็นต้น