ความเป็นไปได้ของการผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแอนแอโรป

ปริญญานิพนธ์

ของ

มนฑกาน อรรถสงเคราะห์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์

พฤษภาคม 2549

ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ความเป็นไปได้ของการผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแอนแอโรป

บทคัดย่อ

ของ

มนฑกาน อรรถสงเคราะห์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์
พฤษภาคม 2549

มนฑกาน อรรถสงเคราะห์. (2549). *ความเป็นไปได้ของการผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแอนแอโรป*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม.(ฟิสิกส์). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : รองศาสตราจารย์อรุณีย์ อินทศร , อาจารย์ศิริลักษณ์ เรืองรุ่งโรจน์.

ปัจจุบันซองแก๊สแพ็คที่ใช้สร้างบรรยากาศในภาชนะสำหรับบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดแอนแอโรปในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยามีวางจำหน่ายในท้องตลาดหลายแบบ โดยงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำและศึกษาความสามารถในการนำไปใช้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดแอนแอโรปภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยเปรียบเทียบกับระบบบ่มเพาะเลี้ยงเชื้ออ้างอิงที่ผลิตจากซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศเยอรมันนี ได้ทำการวัดความสามารถในการลดปริมาณแก๊สออกซิเจนและผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ของซองแก๊สแพ็คทั้งสองแบบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าเมื่อทำการวัด ณ นาทีที่ 60 หลังจากใส่ซองแก๊สแพ็คพบว่าปริมาณแก๊สออกซิเจนในระบบที่ใช้ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ และซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น มีค่าร้อยละ 5.73 โดยปริมาตร และร้อยละ 5.30 โดยปริมาตร และ 200 นาทีต่อมา ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าคงที่ประมาณร้อยละ 8.92 โดยปริมาตร และร้อยละ 12.29 โดยปริมาตร ตามลำดับ และได้ใช้สเปคโทรโฟโตมิเตอร์เป็นเครื่องมือช่วยในการศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยระบบทั้งสอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระบบที่ใช้ซองแก๊สแพ็คทั้งสองชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นมีข้อดีคือราคาถูกโดยต้นทุนในการผลิตมีราคาเพียงซองละ 17.50 บาท เท่านั้น

THE FEASIBILITY OF LOW COST GASPAK ENVELOPE PRODUCTION FOR ANAEROBIC BACTERIA CULTIVATION

AN ABSTRACT

BY

MONTAKARN ATTHASONGKROWH

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Education degree in Physics

at Srinakharinwirot University

May 2006

Montakarn Attasongkrowh.(2006).*The Feasibility of Low Cost GasPak Envelope Production for Anaerobic Bacteria Cultivation.* Master thesis,M.Ed.(Physics). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc.Prof.Arunee Intasorn, Siriluk Ruangrungrote.

Nowadays, plenty of well known brands of GasPak envelopes are available in the market for microbiological laboratories to generate an anaerobic atmosphere in an anaerobic jar. This work aims to produce low cost GasPak envelopes and monitor their abilities of anaerobic bacteria cultivation under the atmosphere less than 5 vol% of O_2 and 10 vol% of CO_2 approximately. The Anaerocult A system (Merck, Darmstadt, Germany) was utilized as a reference chemical system. Consequently, the abilities to decrease oxygen concentration and to liberate carbon dioxide in a jar of both GasPak anaerobic systems, i.e., the Merck Anaerocult A and our new product were measured simultaneously with Gas Chromatography (GC). We found that the atmospheric systems generated by the Merck Anaerocult A and our new product respectively turned to be O_2 5.73 vol%. and 5.30 vol%, at 60 min after placing the envelopes, and in 200 min later CO_2 concentration became stable around 8.92 vol%, and 12.29 vol%. Finally, the amounts of cultivated anaerobic bacteria in both systems were measured using spectrophotometer as a tool. It reveals that there is no significantly difference in the anaerobic bacteria culture with both kinds of gas generator envelopes. Of great practical importance, our GasPak envelopes are valuable with the benefit of low cost production at 17.50 Thai Baht per pack only.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

ความเป็นไปได้ของการผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแอนแอโรป

ของ

มนฑกาน อรรถสงเคราะห์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)
วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2549

..... ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ อรุณีย์ อินทศร)

..... กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์
(อาจารย์ ศิริลักษณ์ เรืองรุ่งโรจน์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บัญชา ศิลป์สกุลสุข)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ จริยา สินเดิมสุข)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ และด้วยความอนุเคราะห์อย่างดีจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์อรุณีย์ อินทศร ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ศิริลักษณ์ เรืองรุ่งโรจน์ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ บัญชา ศิลป์สกุลสุข และ รองศาสตราจารย์จริยา สินเดิมสุข ในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและแก้ไขปริญญานิพนธ์ ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์จริยา สินเดิมสุข ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้คำแนะนำ แนวคิด และหลักการต่างๆ เกี่ยวกับการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ความอนุเคราะห์เชื้อตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาฟิสิกส์ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ นิสิตปริญญาโท วิชาเอกฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอน้อมรำลึกพระคุณของบิดา มารดา และทุกๆคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้า จนสามารถทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

มนฑกาน อรรถสงเคราะห์

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

2 ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ทฤษฎี.....4

เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง 23

3 วัสดุอุปกรณ์และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....25

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 25

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 26

4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล 31

5 สรุปอภิปรายและข้อเสนอแนะ 58

สรุปผลการทดลอง 58

อภิปรายผลการทดลอง 59

ข้อเสนอแนะ.....60

บรรณานุกรม 62

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 อัตราส่วนของสารละลายแบเรียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร.....23

2 เวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 40 มิลลิแอมแปร์ 32

3 เวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 80 มิลลิแอมแปร์.....33

4 เวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 120 มิลลิแอมแปร์.....33

5 ผลการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สในอากาศปกติโดยใช้โปรแกรมในการวัดและวิเคราะห์แก๊สด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสมโดยทำการทดลองจำนวน 50 ครั้ง ในวันและเวลาที่แตกต่างกัน.....33

6 ปริมาณแก๊สชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในภาชนะปิดที่บรรจุแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์คแอนแอโรเคาล์ท เอ.....37

7 ปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุสารหรือวัสดุที่มีราคาถูก ณ เวลาที่กำหนด 40

8 ปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟในปริมาณต่างๆ ณ เวลาที่กำหนด.....41

9 ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะที่บรรจุกรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนตอัตราส่วนต่างๆ ณ เวลาที่กำหนด.....41

10 ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คที่ประกอบขึ้นด้วยวิธีต่างๆ ณ เวลาที่กำหนด.....42

11 ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คที่มีอัตราส่วนของส่วนผสมของสารในซองแก๊สแพ็คที่แตกต่างกัน ณ เวลาที่กำหนด.....44

12 ปริมาณแก๊สชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น ณ เวลาที่กำหนด.....45

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง **หน้า**

13 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น ในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็ค ยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาที่กำหนด.....48
14 ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายแบเรียมซัลเฟตที่ทำการวัดด้วยเครื่อง สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ตามหลักการ ของแมคฟาร์แลนด์.....51
15 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยง ครั้งที่ 1 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อ เมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วย ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศ ปกติ (ชุดควบคุม).....53
16 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยง ครั้งที่ 2 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อ เมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วย ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศ ปกติ (ชุดควบคุม).....54
17 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยง ครั้งที่ 3 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อ เมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วย ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศ ปกติ (ชุดควบคุม).....54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี....6
2 ลักษณะแพ๊คคอลัมน์และคาพิลลารีคอลัมน์ขอเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี....7
3 หัววัดแบบการนำความร้อน....8
4 โครมาโทแกรมแก๊สตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของแก๊ส 4 ชนิด....8
5 เวลารีเทนชันคือ เวลาตั้งแต่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปจนถึงเวลาที่เป็นจุดสูงสุด ของพีคดังปรากฏบนโครมาโทแกรม....9
6 การวิเคราะห์เพื่อตรวจพิสูจน์สารต่างๆในตัวอย่างโดยการปรับเทียบ กับแก๊สมาตรฐาน....10
7 อุปกรณ์ของเทคนิคแแอนแอโรบิค โกลฟ์ บอกซ์....12
8 เครื่องสูบสุญญากาศและวิธีการแทนที่แก๊สในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป....13
9 อุปกรณ์เทคนิคแอนแอโรบิคจาร์โดยใช้ซองแก๊สแพ็ค....14
10 กระบวนการวัดการดูดกลืนแสงของสเปคโทรโฟโตมิเตอร์....16
11 การเลือกความยาวคลื่นแสงของโมโนโครเมเตอร์....17
12 การเลี้ยวเบนของแสงจากเกรตติงแบบสะท้อนแสง....18
13 ลักษณะช่องแสงออก....19
14 ลักษณะของเซลล์ที่ใช้บรรจุสารตัวอย่างและสารปรับเทียบ....20
15 ลักษณะของโฟโตโวลตาอิกเซลล์....20
16 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์....21
17 ลักษณะเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับ จำนวนแบคทีเรีย....22
18 ลักษณะการวางซองกระดาษกรองในภาชนะ....27
19 โครมาโทแกรมในการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานโดยตั้งปริมาณกระแสไฟฟ้า แก่หัววัด 40 มิลลิแอมแปร์....34
20 โครมาโทรแกรมในการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานโดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้น ของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัดในการวิเคราะห์ แก๊สตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้า....35
21 ปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในบรรยากาศภายในภาชนะปิดที่บรรจุ แก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ 38

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

22 การเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ 39
23 การเก็บสารตัวอย่างในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คเพื่อทำการวัดและวิเคราะห์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี 43
24 ปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในบรรยากาศภายในภาชนะปิดที่บรรจุ แก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเอง ณ เวลาต่างๆ.....46
25 การเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะ ที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ.....47
26 การเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ.....49
27 การเปรียบเทียบปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็ค ที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอณ เวลาต่างๆ.....50
28 เส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟต กับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สอดคล้องกันตามหลักการ ของแมคฟาร์แลนด์.....52
29 การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างในภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์คภายในตู้บ่ม.....53
30 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวน เชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่าง ชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 1..... 55
31 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวน เชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่าง ชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 2..... 56
32 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวน เชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่าง ชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 3..... 57

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีด้านการแพทย์และด้านอุตสาหกรรมเกี่ยวกับจุลชีววิทยาของไทยมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ด้วยการศึกษาแบคทีเรียชนิดต่างๆ หลายประเภท แบคทีเรียบางประเภทก่อให้เกิดโรคต่อสิ่งมีชีวิต บางประเภทไม่ทำให้เกิดโรคแต่ยังมีบทบาทในการช่วยรักษาสุขภาพโดยทำหน้าที่ช่วยป้องกันเชื้อก่อโรคต่างๆ ในการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิด นักจุลชีววิทยาจำเป็นต้องบ่มเพาะเลี้ยงเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเพียงพอจนกระทั่งสามารถทำการศึกษาได้ การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีเทคนิคต่างๆ มากมายขึ้นอยู่กับประเภทของแบคทีเรียว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะใด

เชื้อแบคทีเรียประเภทแอนแอโรป (anaerobes) เป็นแบคทีเรียประเภทหนึ่งที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบรรยากาศปกติแต่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะบรรยากาศที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือมีน้อยมาก (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) และมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าปกติ (ร้อยละ 10 โดยปริมาตร) การสร้างสภาวะบรรยากาศให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปมีหลายวิธีด้วยกัน การใช้ซองแก๊สแพ็ค (GasPak envelope) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสร้างสภาวะบรรยากาศให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปซึ่งมีราคาถูกกว่าวิธีการอื่นๆ และนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ

อเล็กซานเดอร์ อิมฮอฟ[1] (Alexander Imhof) และ ไอโว ไฮนเซอร์ (Ivo Heinzer) ได้ทำการวัดและเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจน ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียประเภทแอนแอโรปที่ใช้วิธีการต่างๆ ในการสร้างสภาวะบรรยากาศให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปโดยวัดปริมาณแก๊สออกซิเจนด้วยเครื่องวิเคราะห์แก๊สออกซิเจน (oxygen analyzer series 3600 instrument)

ปัจจุบันประเทศไทยยังมีการสั่งซื้อซองแก๊สแพ็คในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อจากต่างประเทศในราคาสูงอยู่ งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะสร้างสภาวะบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวโดยอาศัยวัสดุที่มีราคาถูก และนำเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) มาใช้วัดชนิดและปริมาณของแก๊สภายในภาชนะซึ่งมีซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและแก๊สภายในภาชนะที่มีซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ (Merck Anaerocult A) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศเยอรมันนี ที่ประกอบด้วยผงเหล็กในการลดปริมาณแก๊สออกซิเจน

---

[1]Alexander Imhof & Ivo Heinzer. (1996). Continuous Monitoring of Oxygen Concentrations in Several Systems for Cultivation of Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* pp. 1646-1648

และใช้กรดซิตริก (citric acid) กับโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ในการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในการศึกษาผลสัมฤทธิ์ของซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นจะทำการเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโต ของเชื้อที่บ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศของระบบที่มีซองแก๊สแพ็คประกอบขึ้นเองกับบรรยากาศของระบบที่มีซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ โดยใช้เครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแอนแอโรปเจริญอยู่ นำไปหาจำนวนเซลล์ของเชื้อแอนแอโรปต่อมิลลิลิตรตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ (McFarland)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. ผลิตซองแก๊สแพ็คสำหรับสร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป เพื่อใช้ทดแทนซองแก๊สแพ็คที่สั่งซื้อมาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง

2. เปรียบเทียบสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะซึ่งมีซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ จากประเทศเยอรมันนี โดยการวัดปริมาณและชนิดของแก๊สที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

3. ศึกษาผลสัมฤทธิ์ของการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นกับซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ โดยตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแอนแอโรป ตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ออกแบบซองแก๊สแพ็คที่สามารถทำให้บรรยากาศภายในภาชนะเหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป แทนการซื้อจากต่างประเทศที่มีราคาสูง

2. ศึกษาการวัดปริมาณและชนิดของแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะซึ่งมีซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ จากประเทศเยอรมันนี ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

3. ศึกษาการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ที่สั่งซื้อมาจากประเทศเยอรมันนี เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่บ่มเพาะเลี้ยงในทั้ง 2 ระบบ เทียบกับการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ได้ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นด้วยต้นทุนต่ำกว่าการใช้ซองแก๊สแพ็คที่สั่งซื้อมาจากต่างประเทศเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดแอนแอโรป

2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณและชนิดของแก๊สที่เกิดขึ้นภายในภาชนะที่ได้จากซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. เชื้อแอนแอโรป (anaerobe) คือเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะบรรยากาศที่มีแก๊สออกซิเจนในระดับต่ำๆ (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) หรือไม่มีแก๊สออกซิเจนอยู่เลย และมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร

2. ซองแก๊สแพ็ค (GasPak envelope) คือซองที่บรรจุสารที่สามารถนำไปสร้างสภาวะบรรยากาศแวดล้อมในภาชนะให้เหมาะสมกับการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกรณีศึกษานี้คือเชื้อแอนแอโรป

บทที่ 2
ทฤษฎีและเอกสารงานที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎี

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ประกอบด้วย

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี
2. การจัดจำแนกและเทคนิคการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
3. สารที่ใช้ในการดูดแก๊สออกซิเจนในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง
4. สารผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง
5. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์
6. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography)

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีหรือที่นิยมเรียกชื่อย่อว่า GC เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารผสมโดยอาศัยหลักการกระจายตัว (distribution) ของสารแต่ละชนิดในสารผสมเมื่อเข้าสู่เครื่องมือ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ (relative solubility) ความสามารถในการแพร่และมวลโมเลกุลของสารแต่ละชนิด

ลักษณะของ GC นี้ภายในเครื่องสามารถแยกออกเป็น 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และวัฏภาคคงที่ (stationary phase) โดยวัฏภาคเคลื่อนที่คือแก๊สที่เรียกว่าแก๊สพาหะ (carrier gas) โดยทั่วไปนิยมใช้แก๊สฮีเลียมหรือแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ ซึ่งจะไหลผ่านคอลัมน์ภายในเครื่องมือตลอดเวลาขณะทำการวิเคราะห์ และวัฏภาคคงที่คือของแข็งบรรจุในคอลัมน์หรือของเหลวเคลือบอยู่ที่ผนังด้านในของคอลัมน์ วัฏภาคเคลื่อนที่ทำหน้าที่พาสารผสมเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ซึ่งทำหน้าที่ในการละลายหรือดูดซับสารผสมที่ผ่านเข้ามา สารใดที่มีมวลโมเลกุลน้อยหรือมีความสามารถในการแพร่ดีหรือความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ได้น้อย จะเคลื่อนที่ได้เร็วจึงถูกแยกออกมาก่อน แต่สารใดมีมวลโมเลกุลมาก หรือมีความสามารถในการแพร่น้อย หรือความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ได้มากจะเคลื่อนที่ช้ากว่าจึงถูกแยกออกมาทีหลัง ดังนั้นสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารผสมจะเคลื่อนที่เข้าสู่หัววัดด้วยเวลาที่แตกต่างกัน สารตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ต้องเป็นสารที่สามารถเปลี่ยนสถานะไปเป็นแก๊สได้ แก๊สโครมาโทกราฟีสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ ตามชนิดของ วัฏภาคคงที่ คือ

- แก๊ส - โซลิดโครมาโทกราฟี (gas solid chromatography; GSC) วิธีนี้ใช้วัฏภาคคงที่เป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (absorption) แก๊สซึ่งต้องการแยกได้และไม่มีสารอื่นใดเคลือบอยู่ ใช้แยกเฉพาะแก๊สหรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็กๆ เท่านั้น ดังนั้นคอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วยของแข็งที่ไวต่อการดูดซับเช่น ตัวกรองระดับโมเลกุล (molecular sieves) หรือ โพลิเมอร์ที่มีรูพรุน (porous polymers) ซิลิกาเจล และอะลูมินา เป็นต้น

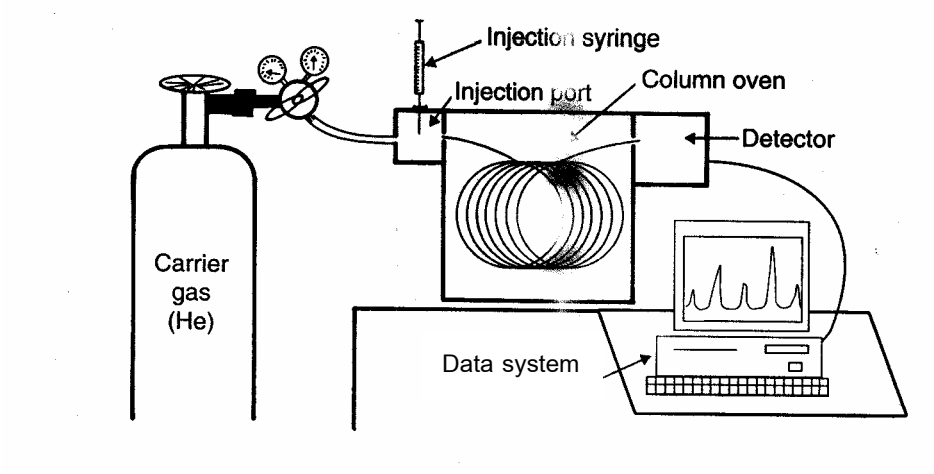
- แก๊ส - ลิควิดโครมาโทกราฟี (gas liquid chromatography; GLC) วิธีนี้ใช้วัฏภาคคงที่เป็นของเหลวซึ่งเคลือบหรือยึดอยู่บนของแข็ง หรือของเหลวเคลือบบนผนังของคอลัมน์ การแยกสารผสมใช้หลักการกระจายตัวของสารผสมในวัฏภาคของเหลว (liquid phase) ที่แตกต่างกัน วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นไอหรือวัฏภาคแก๊สที่อุณหภูมิกำหนดได้ (Willett. 1991: 1-3)

1.1 หลักการทำงานของเครื่อง

การฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องใช้เข็มฉีดระดับไมโครลิตรฉีดสารเข้าเครื่องตรงบริเวณช่องฉีดสาร (injection port) ดังภาพประกอบ 1 โดยมีเครื่องทำความร้อน (heater) หรือเครื่องระเหยสาร (vaporizer) ทำให้สารกลายเป็นไอ ไอของสารจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยแก๊สพาหะซึ่งไหลผ่านคอลัมน์อยู่ตลอดเวลา องค์ประกอบในสารตัวอย่างจะแพร่กระจายในวัฏภาคคงที่ตามคุณลักษณะเฉพาะตัวของสาร ดังนั้นแก๊สต่างชนิดกันจึงเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันทำให้แก๊สผสมแยกออกจากกันแล้วเคลื่อนที่เข้าสู่หัววัด (detecter) ด้วยเวลาที่แตกต่างกันตามลำดับ โดยแสดงผลเป็นกราฟระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับเวลาเรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งขนาดของสัญญาณจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของแก๊สชนิดนั้นๆ ตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการแยกสารสำหรับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการไหลของแก๊สพาหะ และชนิดของคอลัมน์โดยส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีมีดังนี้

1.1.1 ถังแก๊สที่ใช้บรรจุแก๊สพาหะ ได้แก่ แก๊สไนโตรเจน ฮีเลียม และอาร์กอน เป็นต้น โดยแก๊สพาหะจะพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังคอลัมน์

1.1.2 ตัวควบคุมการไหลของแก๊ส (flow controller) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ปรับและวัดความดันของแก๊สพาหะเพื่อควบคุมอัตราไหลของแก๊ส อัตราการไหลของแก๊สพาหะส่วนสำคัญต่อการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องควบคุมอัตราการไหลของแก๊สพาหะให้คงที่ แก๊สพาหะควรมีคุณสมบัติดังนี้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง ตัวทำละลายและสารที่เคลือบภายในคอลัมน์ มีอัตราการแพร่น้อย มีมวลโมเลกุลต่ำ หาง่าย ราคาไม่แพง มีความบริสุทธิ์สูง และเหมาะสมกับหัววัดที่ใช้



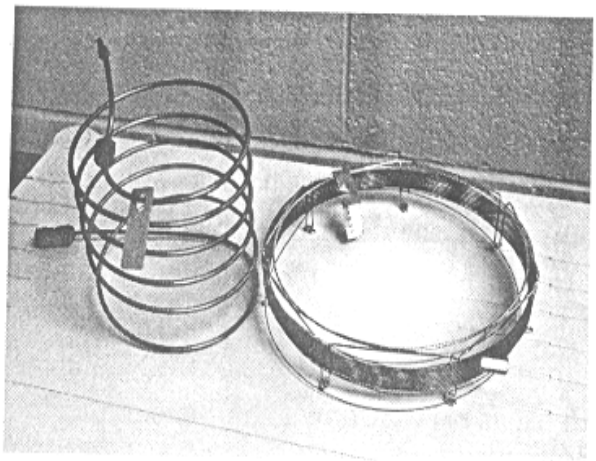
ภาพประกอบ 1 แสดงส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians.* p. 340.

1.1.3 ส่วนสำหรับให้ฉีดสารตัวอย่างเข้า (injection port) โดยทั่วไปส่วนนี้จะมีเครื่องทำความร้อน (heater) หรือเครื่องระเหยสาร (vaporizer) ประกอบอยู่ด้วยเพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้มีความสัมพันธ์กับขนาดของคอลัมน์ วิธีการนำสารตัวอย่างเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์นั้นขึ้นอยู่กับสถานะของสารตัวอย่าง เช่น เป็นแก๊ส ของเหลว หรือของแข็ง สำหรับสารตัวอย่างที่อยู่ในสถานะแก๊ส การฉีดสารตัวอย่างเข้าไปต้องฉีดด้วยเข็มฉีดแก๊สที่ปิดสนิท (gas tight syringe) หรือวิธีฉีดสารตัวอย่างด้วยวาล์วแก๊ส (gas sampling valve) ซึ่งวิธีฉีดสารตัวอย่างด้วยวาล์วแก๊สจะให้ความแม่นยำดีกว่าการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปด้วยเข็มฉีด สำหรับสารตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของเหลวนิยมใช้เข็มฉีดยาเล็กๆ (microsyringe) หรืออาจใช้วิธีฉีดเข้าไปที่เครื่องฉีดให้เป็นไออย่างฉับพลัน (flash vaporizer) และสำหรับสารตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งจำเป็นต้องทำให้ละลายก่อนด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม หรือใช้อุปกรณ์ที่สามารถเปลี่ยนให้กลายเป็นแก๊สโดยการเผาที่อุณหภูมิสูงถึง 100 ^{0}C เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ฉีดสารเข้าไปนอกจากขึ้นอยู่กับสถานะของสารตัวอย่างแล้วยังขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์อีกด้วย

1.1.4 ตู้อบและคอลัมน์ (column) ในส่วนนี้จะประกอบด้วยคอลัมน์ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดในการแยกสาร และมีตัวควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้กับคอลัมน์ หัววัด และส่วนฉีดสารตัวอย่าง ตู้อบเป็นส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้ถูกต้องและคงที่ มีระบบการเพิ่ม-ลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว ภายในตู้อบจะบรรจุคอลัมน์ซึ่งปลายข้างหนึ่งต่อกับระบบฉีดสารและปลายอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับหัววัด วัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์มีหลายชนิด เช่น เหล็กไร้สนิม แก้ว โดยคอลัมน์ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีมี 2 ประเภท คือ แพ็คคอลัมน์ (packed columns) และคาพิลลารีคอลัมน์

(capillary columns) ดังภาพประกอบ 2 โดยแพ็คคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ขนาดประมาณ 0.125 - 0.250 นิ้ว และยาวประมาณ 4 - 6 ฟุต มี 2 ชนิด คือ คอลัมน์แยก และ คอลัมน์ดูดซับ สำหรับคอลัมน์แยกเป็นคอลัมน์เปล่าที่บรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งมีสมบัติเฉื่อย (inert solid particles) แล้วฉาบผิว (coated) ด้วยสารอินทรีย์บางชนิด และคอลัมน์ดูดซับเป็นคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคของสารดูดซับ (absorptive particles) เช่น อะลูมินา ซิลิกาเจล หรือตัวกรองระดับโมเลกุล เป็นต้น สำหรับคาพิลลารีคอลัมน์มีลักษณะเป็นหลอดรูเล็กๆ กลวง ทำด้วยเหล็กกล้าหรือเหล็กไร้สนิมหรือแก้ว มีรัศมีภายใน 0.3 - 0.6 มิลลิเมตร ภายในฉาบผิวด้วยของเหลวเป็นฟิล์มบางตลอดความยาวของคอลัมน์ซึ่งยาวประมาณ 25 - 100 เมตร คอลัมน์ชนิดนี้มีความยาวคอลัมน์ยิ่งมากจะมีประสิทธิภาพในการแยกสูง



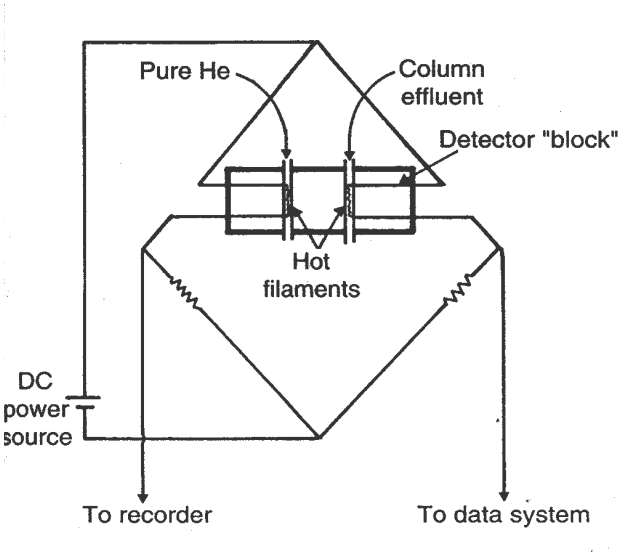
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะแพ็คคอลัมน์และคาพิลลารีคอลัมน์ขอเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians.* p. 343.

1.1.5 หัววัด (detector) เป็นเครื่องมือวัดชนิดและปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยแสดงผลเป็นสัญญาณไฟฟ้ามีหลายชนิดที่ใช้กันมากได้แก่ หัววัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector; FID) หัววัดแบบการจับอิเล็กตรอน (electron capture detector; ECD) และ หัววัดแบบการนำความร้อน (thermal conductivity detector; TCD)

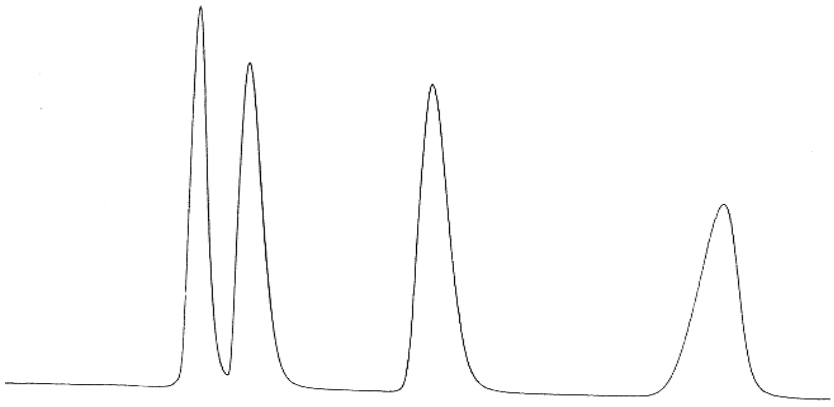
หัววัดแบบการนำความร้อน ใช้หลักการในการวัดหรือหาองค์ประกอบของแก๊สที่ไหลผ่านคอลัมน์ที่มีค่าการนำความร้อนของแก๊สแตกต่างจากแก๊สพาหะ โดยลักษณะของหัววัดจะประกอบด้วยไส้หลอด (filament) ดังภาพประกอบ 3 ไส้หลอดถูกทำให้ร้อนด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไป เมื่อแก๊สพาหะในที่นี้คือแก๊สฮีเลียมบริสุทธิ์ไหลผ่านไส้หลอดจะทำให้ไส้หลอดเย็นลงจนถึงอุณหภูมิสมดุล แต่การเย็นลงของไส้หลอดมีความแตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบของแก๊สแต่ละชนิดที่ไหลผ่านตามค่าการนำความร้อนของแก๊ส การเย็นลงของไส้หลอดมีผลต่อความ

ต้านทานกระแสไฟฟ้าของไส้หลอดเปลี่ยนไป เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านและความต่างศักย์ตกคร่อมไส้หลอดเปลี่ยนไปตามองค์ประกอบของแก๊สนั้น พีคของการเปลี่ยนแปลงจะถูกบันทึกลงบนโครมาโทแกรมดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 3 แสดงหัววัดแบบการนำความร้อน

ที่มา : Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians.* p. 349.

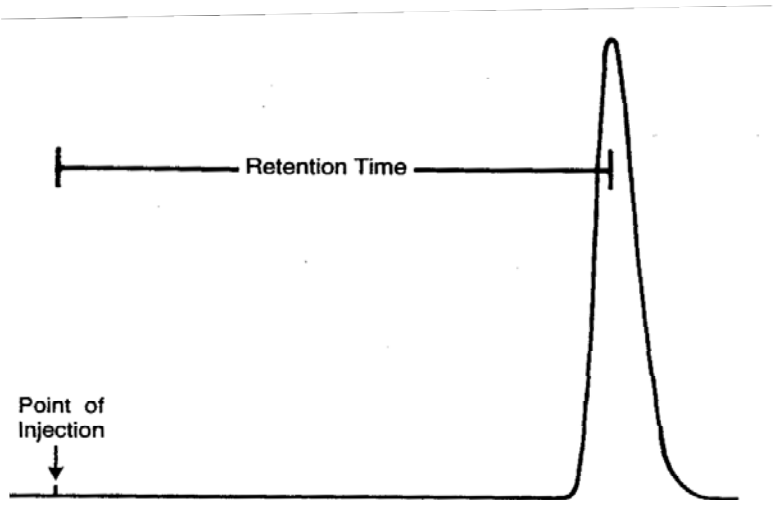


ภาพประกอบ 4 แสดงโครมาโทแกรมแก๊สตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของแก๊ส 4 ชนิด

ที่มา : Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians.* p. 340.

ข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ชนิดหรือปริมาณของสารได้แก่ เวลารีเทนชัน (retention time) ซึ่งเป็นเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของพีคบนโครมาโทแกรม ดังภาพประกอบ 5 ทำให้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ชนิดของสารได้ ซึ่งนับว่าเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ สำหรับขนาดของพีคซึ่งอาจเป็นพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak height) ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสาร

1.1.6 ระบบข้อมูล (data system) ประกอบด้วยเครื่องบันทึกโครมาโทแกรม หรือคอมพิวเตอร์ที่ใช้ประมวลผลข้อมูลต่างๆ โดยเครื่องที่ทำหน้าที่บันทึกและแสดงผลมีหลายแบบ เช่นเครื่องบันทึกผล (recorder) ทำหน้าที่บันทึกโครมาโทแกรมเพียงอย่างเดียว เครื่องบันทึกและประมวลผลทำหน้าที่บันทึกโครมาโทแกรม คำนวณผลและให้ข้อมูลต่างๆ เช่น พื้นที่ใต้พีค ความสูงของพีคใช้บอกถึงปริมาณสารแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ และเวลารีเทนชันใช้บอกชนิดของสารที่วิเคราะห์ และสามารถเก็บข้อมูลได้ ปัจจุบันนิยมใช้คอมพิวเตอร์ในการควบคุมการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีรวมทั้งบันทึกและประมวลผล



ภาพประกอบ 5 แสดงเวลารีเทนชันคือเวลาตั้งแต่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปจนถึงเวลาที่เป็นจุดสูงสุดของพีคดังปรากฏบนโครมาโทแกรม

ที่มา : Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry forTechnicians.* p. 321.

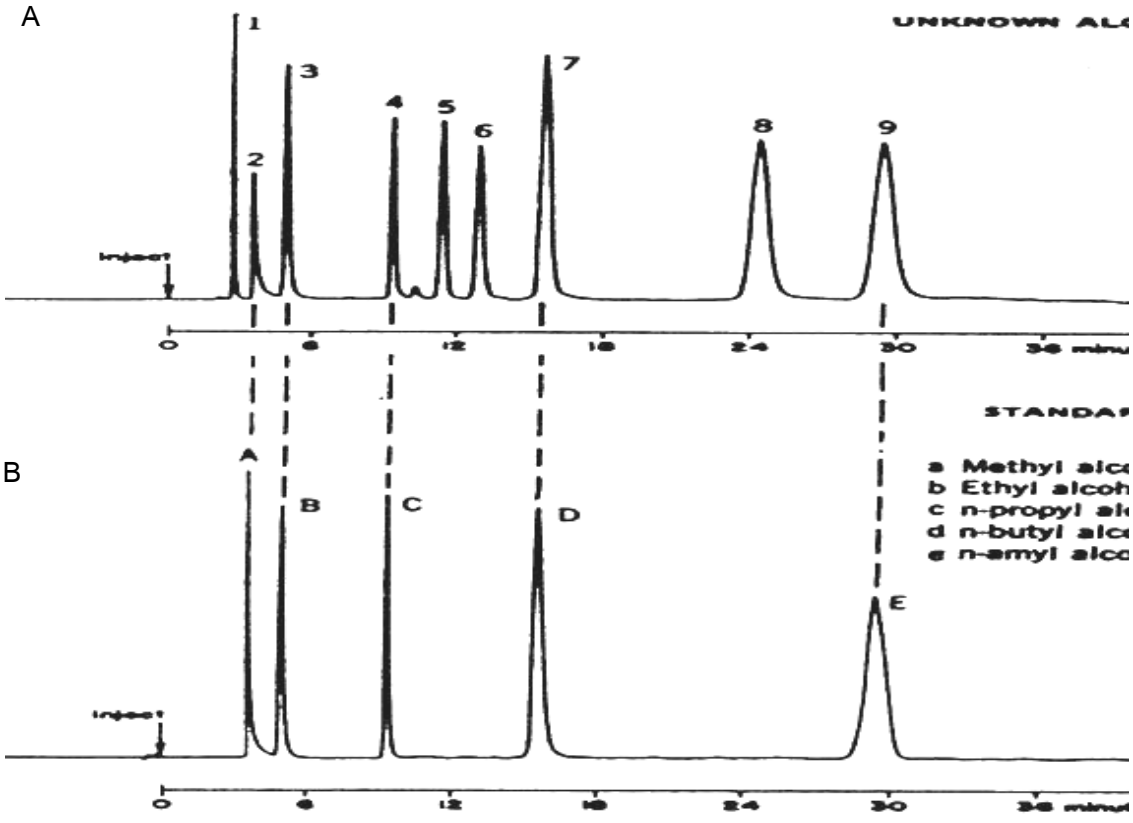
1.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟี (qualitative and quantitative analysis by GC)

วิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟีโดยใช้ข้อมูลเวลารีเทนชันเป็นการทดลองวัดและวิเคราะห์สารตัวอย่างและแก๊สมาตรฐานที่เงื่อนไขต่างๆ อย่างเดียวกันด้วย

การปรับเทียบเวลารีเทนชันดังภาพประกอบ 6 โดยสามารถบอกได้ว่าแต่ละพีคในโครมาโทแกรมนั้นเป็นพีคของสารใด

วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ด้วยแก๊สโครมาโทรกราฟีต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของแก๊สชนิดต่างๆ ในแก๊สมาตรฐาน ทำการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานที่เงื่อนไขต่างๆ อย่างเดียวกันกับที่วัดและวิเคราะห์สารตัวอย่าง นำค่าพื้นที่ใต้พีคของแก๊สชนิดเดียวกันมาคำนวณหาค่าร้อยละของสารตัวอย่างที่ต้องการดังสมการ

$$\text{ค่าร้อยละของสารตัวอย่าง} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่าง x ค่าร้อยละของแก๊สมาตรฐาน}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของแก๊สมาตรฐาน}}$$



ภาพประกอบ 6 แสดงการวิเคราะห์เพื่อตรวจพิสูจน์สารต่างๆในตัวอย่างโดยการปรับเทียบกับแก๊สมาตรฐาน (A = โครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง B = โครมาโทแกรมของแก๊สมาตรฐาน)

ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2539). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์ เชิงเครื่องมือ.* หน้า 862.

2. การจัดจำแนกและเทคนิคการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

[2]2.1. การจัดจำแนก (classification) แบคทีเรีย

ในการจำแนกแบคทีเรียเพื่อหาความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นสามารถใช้เกณฑ์ในการแบ่งได้หลายเกณฑ์ด้วยกัน เช่น ความต้องการอาหาร (nutritional requirement) ความต้องการทางด้านกายภาพ (physical requirement) คุณลักษณะการเจริญบนอาหารที่บ่มเพาะเลี้ยง (cultural characteristic) คุณลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) คุณลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristic) หรือคุณลักษณะทางด้านพันธุกรรม (genetic characteristic) เป็นต้น

ในการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้เกณฑ์ความต้องการทางด้านกายภาพในการแบ่ง ได้แก่ สภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ อากาศ แสง ความเป็นกรดด่าง ความต้องการแก๊สบางชนิด เป็นต้น การแบ่งกลุ่มตามความต้องการปริมาณแก๊สออกซิเจนที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ดังนี้

2.1.1 กลุ่มที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศธรรมดา ซึ่งมีแก๊สออกซิเจนร้อยละ 16 - 20 โดยปริมาตร และในสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนต่ำๆ เรียกว่า แอโรป (aerobes) ได้แก่ สแตฟไฟโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เป็นต้น

2.1.2 กลุ่มที่เจริญได้ดีบนอาหารในสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนร้อยละ 5 โดยปริมาตร เรียกว่าไมโครแอโรฟิล (microaerophiles) โดยไม่เจริญในสภาวะไร้แก๊สออกซิเจนหรือในบรรยากาศธรรมดา ได้แก่ แคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน (*Campylobacter jejuni*) เป็นต้น

2.1.3 กลุ่มที่เจริญได้บนอาหารในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนระดับต่ำๆ (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) เรียกว่าแอนแอโรป (anaerobes) ซึ่งในกลุ่มนี้ก็ยังแบ่งออกเป็น

2.1.3.1 แอนแอโรปกลุ่มที่เจริญได้บนอาหารในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ได้แก่เชื้อ คลอสตริเดียม ฮีโมไลติคัม (*Clostridium haemolyticum*) คลอสตริเดียม นอฟวิไอ บี *(C.novyi B*) คลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์ (*C.difficile*) เซเลโนโมนาส รูมิแนนเทียม (*Selenomonas ruminantium*) และ เทรพโพนีมา เดนทิโคลา (*Treponem denticola*) เชื้อกลุ่มนี้ตายได้ง่ายเพียงสัมผัสแก๊สออกซิเจน 2 - 3 นาทีเท่านั้น

2.1.3.2 แอนแอโรปกลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนไม่เกินร้อยละ 2 - 8 โดยปริมาตร (เฉลี่ยร้อยละ 3 โดยปริมาตร) เป็นกลุ่มที่อยู่ในตัวอย่างที่ส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วยเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ แบคทีรอยส์ ฟราจิลิส (*Bacteroides fragilis*) พรีโวเทลลา เมลานิโนเจนิคา (*Prevotella melaninogenica*) ฟิสโซแบคทีเรียม นิวคลีเอทัม (*Fusobacterium nucleatum*) และ คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*C. perfringens*)

---

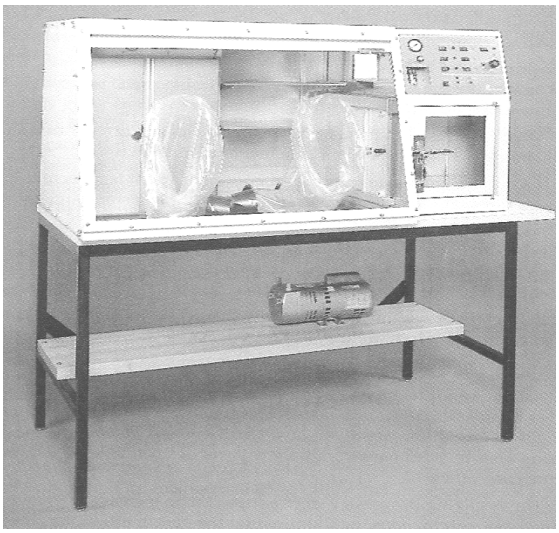
[2]ดวงพร คันธโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. หน้า 1-5.

แอนแอโรปบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในบรรยากาศปกติ แต่เจริญเติบโตได้ไม่ดี จะเรียกเชื้อกลุ่มนี้ว่าแอโรทอโลราน แอนแอโรป (aerotolerance anaerobes) ได้แก่ คลอสตริเดียม ฮีสโทไลติคัม (*C. histolyticum*) คลอสตริเดียม เทอร์เชียม (*C. tertium*) และคลอสตริเดียม คาร์นิส (*C. carnis*)

2.2. เทคนิคการบ่มเพาะเลี้ยง

ในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป มีเทคนิคดังต่อไปนี้

2.2.1 เทคนิคการบ่มเพาะเลี้ยงที่ใช้แแอนแอโรบิค โกลฟ์ บอกซ์ (Anaerobic Glove Box) ซึ่งเป็นตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อากาศในบรรยากาศเข้าไปไม่ได้ โดยมีถังแก๊สที่บรรจุแก๊สไนโตรเจน และแก๊สผสมของไนโตรเจน ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปเป็นส่วนที่ให้แก๊สเข้าไปในตู้ ดังภาพประกอบ 7



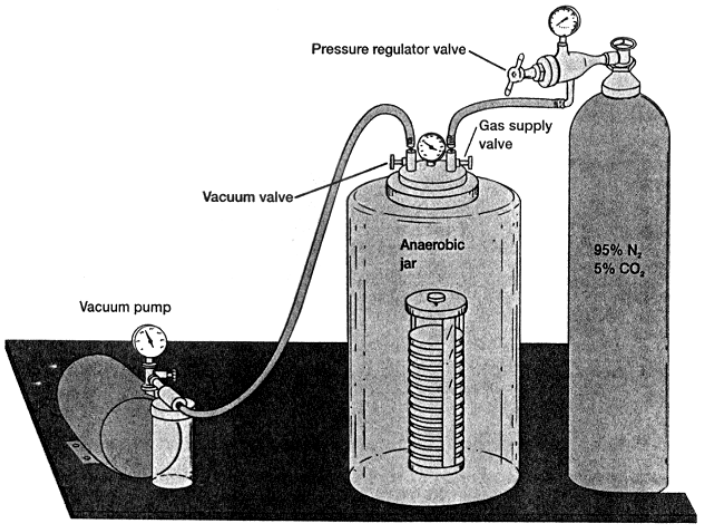
ภาพประกอบ 7 แสดงอุปกรณ์ของเทคนิคแแอนแอโรบิค โกลฟ์ บอกซ์

ที่มา : Ingraham, J. L; et al. (1994). *Introduction to Microbiology*. p. 73.

2.2.2 เทคนิคการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยระบบโรลสตรีค (Roll - Streak System) เป็นเทคนิคที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่ปิดด้วยจุกยางให้แน่น นำไปวางในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) หลังจากนั้นนำมาทำให้เย็นลงขณะหมุนหลอดด้วยเครื่องหมุน ทำให้ผิวภายในหลอดเคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิเหมาะสม

2.2.3 เทคนิคแอนแอโรบิคจาร์ (Anaerobic Jar Technique) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ภาชนะทรงกระบอก อาจจะทำด้วยโลหะ พลาสติก หรือแก้วมีฝาปิดสนิท สำหรับการเตรียมสภาพของภาชนะให้อยู่ในสภาพที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน มี 2 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

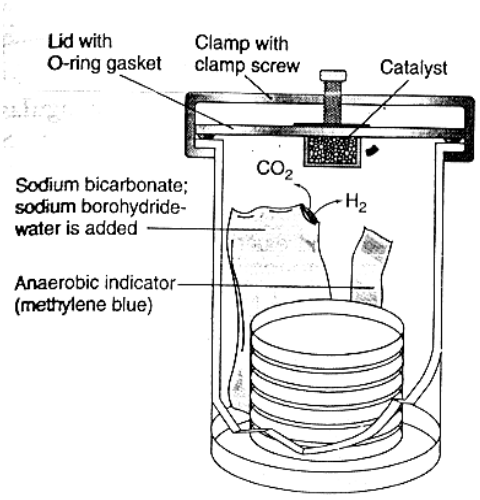
- การกำจัดแก๊สออกซิเจนออกจากภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องสูบสุญญากาศและบรรจุแก๊สไนโตรเจนเข้าไปแทนและเพิ่มแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อยตามเหมาะสม การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 เครื่องสูบสุญญากาศและวิธีการแทนที่แก๊สในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป

ที่มา : Prescot, L.M t; et al. (1993). *Microbiology*. p. 128.

- การใช้ซองแก๊สแพ็ค เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ค่าใช้จ่ายน้อยและสะดวก โดยใส่อาหารที่บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในภาชนะพร้อมซองแก๊สแพ็คที่สร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมแล้วปิดฝาภาชนะให้สนิท ดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 แสดงอุปกรณ์เทคนิคแอนแอโรบิคจาร์โดยใช้ซองแก๊สแพ็ค

ที่มา : Lisa A. S; et al. (1999). *Essentials of Diagnostic Microbiology*. p. 97.

3. สารดูดแก๊สออกซิเจนในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง

สารดูดแก๊สออกซิเจนในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงมีหลายประเภทด้วยกันในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้สารดูดแก๊สออกซิเจนในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง ดังนี้

3.1 สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ (Wonderkeep) เป็นสารที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชั้นนำจากญี่ปุ่นมีคุณลักษณะในการดูดซับแก๊สออกซิเจนที่นำมาใช้ในการรักษาคุณภาพของอาหาร โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นผงเหล็ก

3.2 สารเหล็ก โดยทั่วไปเหล็กและออกซิเจนในอากาศจะทำปฏิกิริยากันเรียกว่าออกซิเดชัน (oxidation) เป็นการรวมตัวของไอออนเหล็กกับแก๊สออกซิเจนกลายเป็นเฟอร์รัสไฮดรอกไซด์ (ferrous hydroxide) ซึ่งต่อมาจะเปลี่ยนรูปเป็นไฮเดรทออกไซด์ (hydrate oxide) หรือสนิม

4. สารผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง

สารผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงมีหลายประเภทด้วยกัน สารที่มีราคาถูกและสามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยง มีดังนี้

4.1 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) และ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

กรดซิตริก 2 โมเลกุล รวมกับโซเดียมคาร์บอเนต 3 โมเลกุล จะให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3 โมเลกุล และ น้ำ 3 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาเคมีต่อไปนี้

$$2(C_6H_8O_7) + 3(Na_2CO_3) \longrightarrow 2(C_6H_5O_7Na_3) + 3CO_2 + 3H_2O$$

4.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) และ โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

กรดซิตริก 1 โมเลกุล รวมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต 3 โมเลกุล จะให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3 โมเลกุล และ น้ำ 3 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาเคมีต่อไปนี้

$$(C_6H_8O_7) + 3(NaHCO_3) \longrightarrow 2(C_6H_5O_7Na_3) + 3CO_2 + 3H_2O$$

4.3 กรดออกซาริก ($(CO_2H)_2$) และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

กรดออกซาริก 1 โมเลกุล รวมกับโซเดียมคาร์บอเนต 1 โมเลกุล จะให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล และ น้ำ 1 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาเคมีต่อไปนี้

$$(CO_2H)_2 + (Na_2CO_3) \longrightarrow 2(CO_2Na) + CO_2 + H_2O$$

4.4 กรดออคซาริก ($(CO_2H)_2$) และ โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

กรดออกซาริก 1 โมเลกุล รวมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 โมเลกุล จะให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และ น้ำ 2 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาเคมีต่อไปนี้

$$(CO_2H)_2 + 2(NaHCO_3) \longrightarrow 2(CO_2Na) + 2CO_2 + 2H_2O$$

5. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือที่วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นต่างๆกัน เมื่อให้แสงความยาวคลื่นเดียวผ่านสารละลาย สารละลายจะดูดกลืนแสงไว้ทำให้แสงที่ผ่านออกจากสารละลายมีความเข้มน้อยลง ดังภาพประกอบ 10 นำไปเปรียบเทียบกับความเข้มแสงที่ผ่านสารละลายปรับเทียบ สามารถหาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายได้ตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ดังนี้

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = KCL$$

เมื่อ A ค่าการดูดกลืนแสง

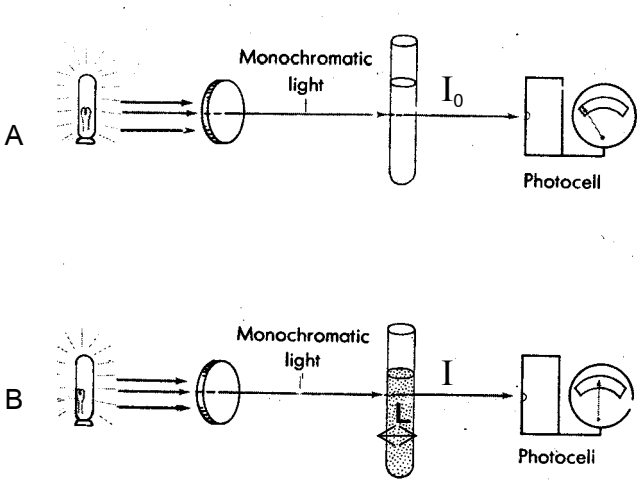
I ความเข้มแสงเมื่อผ่านสารละลายตัวอย่าง มีหน่วยเป็นวัตต์ต่อตารางเมตร

I_0 ความเข้มแสงเมื่อผ่านน้ำกลั่นหรือสารละลายปรับเทียบมีหน่วยเป็นวัตต์ต่อตารางเมตร

K ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงมีหน่วยเป็น ลิตรต่อกรัมต่อเซนติเมตร หรือ ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

C ความเข้มข้นของสารละลายมีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร หรือ โมลต่อลิตร

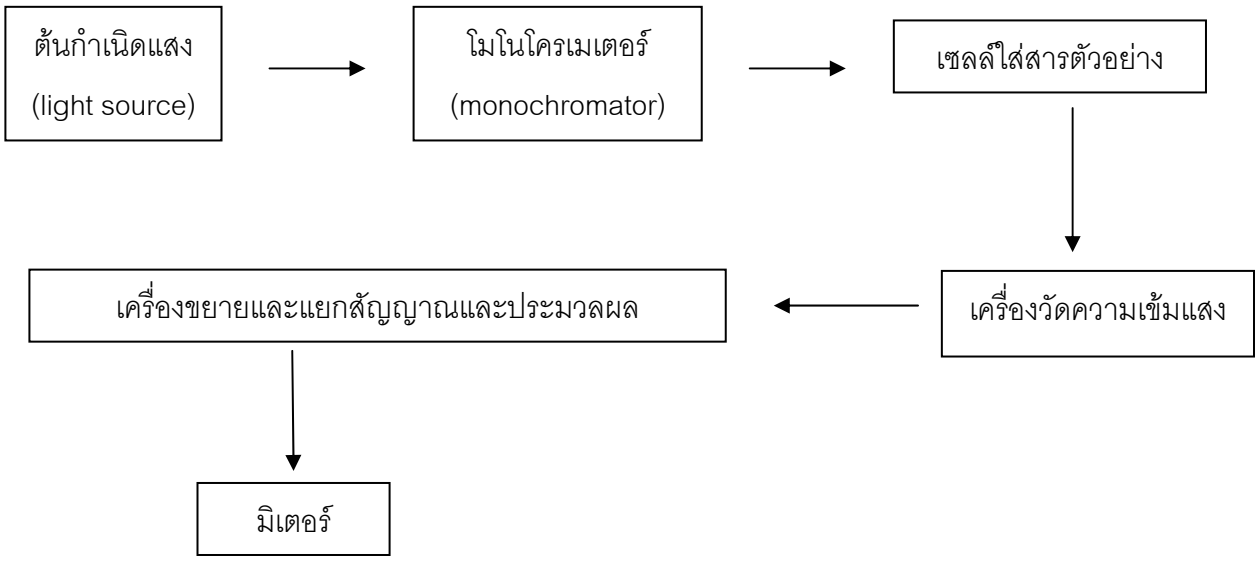
L ระยะทางที่แสงผ่านสารละลายหรือความกว้างของเซลล์ใส่สารมีหน่วยเป็นเซนติเมตร



ภาพประกอบ 10 แสดงกระบวนการวัดการดูดกลืนแสงของสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (A คือภาพแสดงการวัดความเข้มของแสงเมื่อผ่านน้ำกลั่นหรือสารละลายปรับเทียบ B คือภาพแสดงการวัดความเข้มของแสงเมื่อผ่านสารละลายตัวอย่าง)

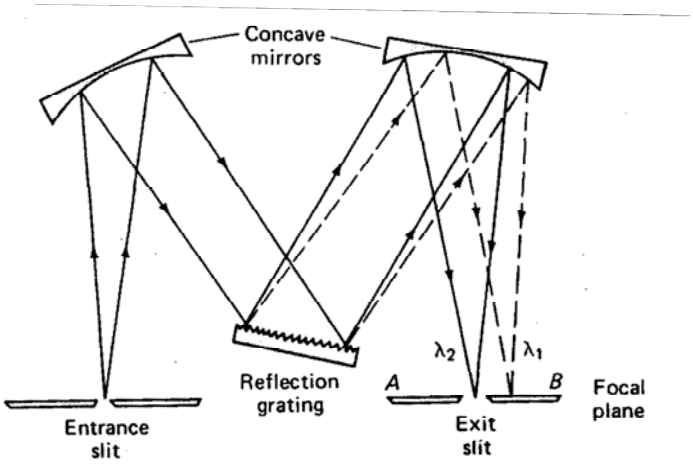
ที่มา : Brock, T. D. (1985). *Biology of Microorganisms* . p. 128.

สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้



5.1 ต้นกำเนิดแสง เป็นหลอดไส้ทังสเตน (tungsten filament lamp) ซึ่งมีลักษณะคล้ายหลอดไฟธรรมดาที่มีไส้หลอดเป็นโลหะทังสเตน เมื่อให้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไป ลวดทังสเตนจะถูกเผาให้ร้อนและเปล่งแสงออกมาอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 320 - 2500 นาโนเมตร

5.2 โมโนโครเมเตอร์ เป็นเครื่องที่ใช้เลือกแสงที่มาจากแหล่งกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่นต่างๆ ให้ออกมาเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นค่าเดียว ดังภาพประกอบ 11 ซึ่งประกอบด้วย



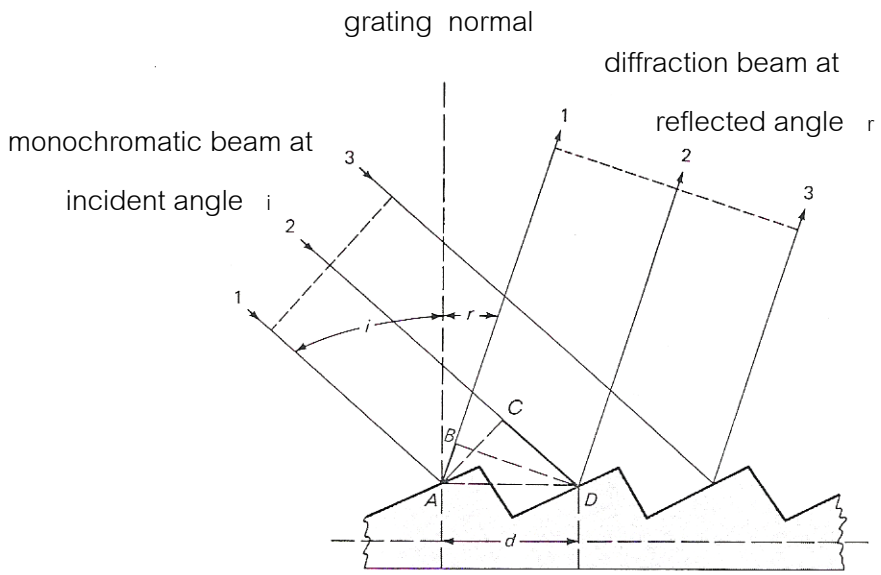
ภาพประกอบ 11 แสดงการเลือกความยาวคลื่นแสงของโมโนโครเมเตอร์

ที่มา : Skoog, A. D. (1992). *Principles of Instrument Analysis*. p. 90.

5.2.1 ช่องที่ให้แสงเข้า (entrance slit) เพื่อให้แสงที่เข้ามาเป็นลำเล็กๆออกไปยังสารตัวอย่าง

5.2.2 กระจกเว้า (concave mirror) เพื่อทำให้แสงกลายเป็นลำแสงขนานที่มีลักษณะเป็นลำขนานเล็กๆ

5.2.3 เกรตติงแบบสะท้อนแสง (reflection grating) เป็นส่วนที่ทำให้แสงกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ เพื่อสามารถเลือกเฉพาะความยาวคลื่นของแสงที่ต้องการนำไปใช้ต่อไป เกรตติงชนิดนี้จะมีการขีดเป็นร่องบนพื้นผิวโลหะ มีจำนวนร่อง 300 - 2000 ร่องต่อมิลลิเมตร โดยร่องมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย ดังภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 แสดงการเลี้ยวเบนของแสงจากเกรตติงแบบสะท้อนแสง

ที่มา : Skoog, A. D. (1992). *Principles of Instrument Analysis*. p. 92.

เมื่อคลื่นแสงที่ประกอบด้วยความยาวคลื่นต่างๆ ตกกระทบบนแต่ละร่องจะเกิดการกระจายแสงไปด้วยมุมต่างๆ โดยแสงที่เลี้ยวเบนออกมาจากพื้นผิวของร่องแต่ละร่องจะเกิดการแทรกสอดแบบเสริมกันได้ก็ต่อเมื่อระยะทางที่แสงเคลื่อนที่จากแต่ละร่องมีความแตกต่างกันเท่ากับจำนวนเต็มของความยาวคลื่นของแสง ดังสมการ

$$n\lambda = (\overline{CD} - \overline{AB}) \qquad (1)$$

จากภาพประกอบ 12 จะเห็นได้ว่า

$$\overline{CD} = d\sin i$$

และ

$$\overline{AB} = -d\sin r$$

มุมสะท้อน r จะมีเครื่องหมายลบเมื่ออยู่คนละด้านกับมุมตกกระทบ i เมื่อเทียบจากเส้นตั้งฉากของระนาบเกรตติง

แทนค่า $\overline{CD}$ และ $\overline{AB}$ ในสมการ (1) จะได้

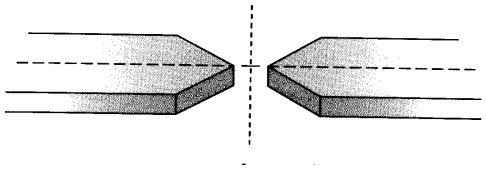
$$n\lambda = d\sin i - (-d\sin r)$$

หรือ

$$n\lambda = d(\sin i + \sin r)$$

เมื่อ n คือตัวเลขที่แสดงอันดับการเลี้ยวเบนของแสง
λ คือความยาวคลื่นของคลื่นแสง
i คือมุมระหว่างรังสีตกกระทบกับเส้นปกติของผิวเกรตติง
θ คือมุมระหว่างรังสีเลี้ยวเบนกับเส้นปกติของผิวเกรตติง
d คือระยะระหว่างร่อง

5.2.4 ช่องแสงออก (exit slit) เป็นส่วนที่ปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นค่าเดียวให้ผ่านออกไปสู่สารตัวอย่างแล้วผ่านไปยังเครื่องวัดความเข้มแสง ประกอบด้วยโลหะ 2 ชิ้น มีขอบคมคล้ายลิ่มดังภาพประกอบ 13 ถ้าต้องการแสงความยาวคลื่นใดให้ผ่านออกจากช่องแสงผ่านออกก็ทำโดยการหมุนเกรตติง จะได้แสงความยาวคลื่นนั้นผ่านออกจากช่องแสงผ่านออกดังที่แสดงไว้ในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 13 แสดงลักษณะช่องแสงออก

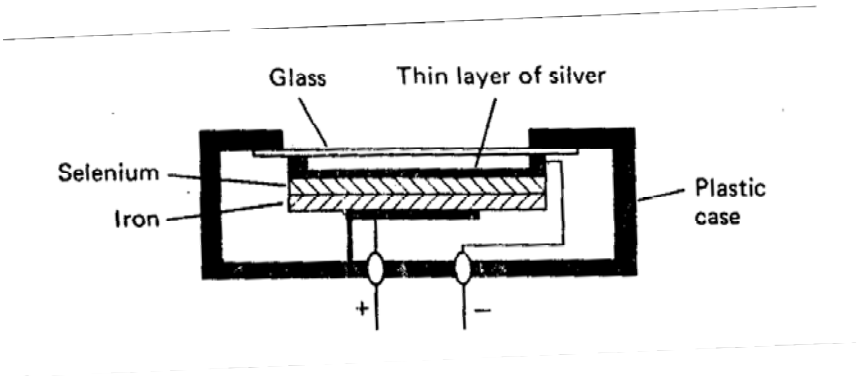
ที่มา : Skoog, A. D. (1992). *Principles of Instrument Analysis*. p. 95.

5.3 เซลล์ที่ใช้บรรจุสารตัวอย่างและสารปรับเทียบ บางครั้งเรียกว่า คิวเวทท์ (cuvettes) เซลล์ทำด้วยแก้วธรรมดา มีลักษณะดังภาพประกอบ 14

ภาพประกอบ14 แสดงลักษณะของเซลล์ที่ใช้บรรจุสารตัวอย่างและสารปรับเทียบ

ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2539). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.* หน้า 88.

5.4 เครื่องวัดความเข้มแสง ประกอบด้วยโฟโตโวลตาอิกเซลล์ (photovoltaic cell) เป็นเซลล์ใช้ตรวจและวัดความเข้มแสง ประกอบด้วยแผ่นกึ่งตัวนำซิลิเนียม (Se) เคลือบอยู่บนฐานโลหะทองแดงหรือเหล็ก ทำหน้าที่เป็นขั้วบวก ด้านบนผิวตัวนำเคลือบด้วยแผ่นฟิล์มเงินหรือทองคำบางๆ ทำหน้าที่เป็นขั้วลบ ดังภาพประกอบ 15 เมื่อแสงตกกระทบบนผิวหน้าของแผ่นกึ่งตัวนำ มันจะดูดกลืนพลังงาน ทำให้เกิดอิเล็กตรอนและโฮลในแผ่นกึ่งตัวนำ โดยอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น ถ้าขั้วไฟฟ้าทั้งสองเชื่อมต่อกับวงจรภายนอกที่มีความต้านทานต่ำ กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับพลังงานของแสงตกกระทบ โดยปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่ามากพอ (10 - 100 ไมโครแอมแปร์) ที่สามารถวัดได้ด้วยไมโครแอมมิเตอร์ธรรมดา โฟโตโวลตาอิกเซลล์มีความไวต่อการตอบสนองมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 15 แสดงลักษณะของโฟโตโวลตาอิกเซลล์

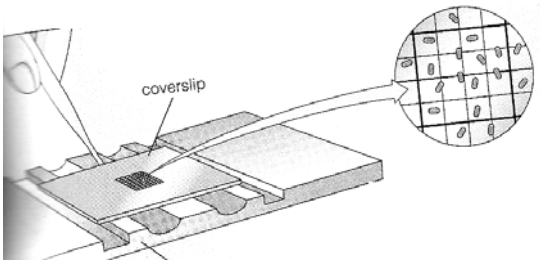
ที่มา : Skoog, A. D. (1992). *Principles of Instrument Analysis*. p. 100.

5.5 เครื่องขยาย - แยกสัญญาณและประมวลผล สัญญาณจากเครื่องวัดจะเข้ากระบวนการระบบอิเล็กทรอนิกส์ และแสดงผลออกมาโดยต่อเข้ากับมิเตอร์

6. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

วิธีการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย มีหลายวิธีด้วยกัน ดังนี้

6.1 วิธีการนับจำนวนเซลล์ในช่อง (counting chamber method) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งต้องหยดสารแขวนลอยที่มีแบคทีเรียอยู่ลงบนแผ่นฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) ที่ทำเป็นช่อง โดยทราบขนาดความกว้างและความลึก แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนแบคทีเรียที่พบนำมาคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร ดังภาพประกอบ 16



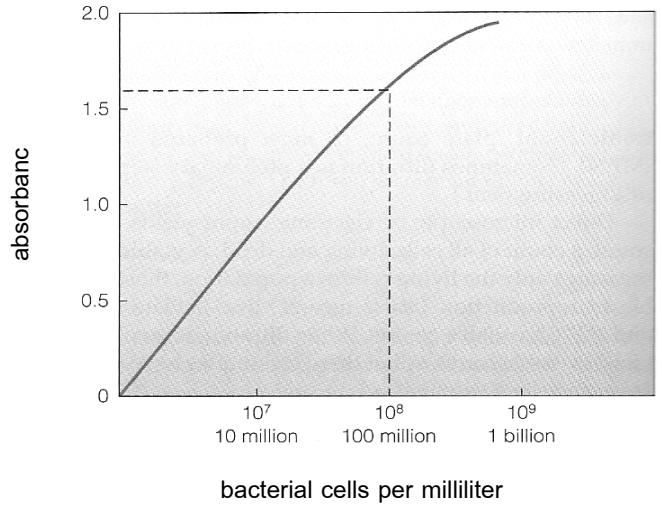
ภาพประกอบ 16 แสดงการนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา : Ingraham, J. L; et al. (1994). *Introduction to Microbiology*. p. 207.

6.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate count) โดยการหยดสารแขวนลอยที่มีแบคทีเรียอยู่ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ แบคทีเรียแต่ละเซลล์จะเจริญแบ่งเซลล์จนมีจำนวนมากเกิดเป็นโคโลนี (colony) ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า แบคทีเรียหนึ่งเซลล์จะเจริญเป็นหนึ่งโคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเชื้อก็จะทราบจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในสารแขวนลอยนั้น

6.3 วิธีการนับจำนวนแบคทีเรียจากความขุ่น โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (nephelometer) วัดความขุ่นหรือวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ของอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้นี้ไปหาจำนวนแบคทีเรียจากเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างขึ้นตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์

แมคฟาร์แลนด์นำเสนอความสอดคล้องของความขุ่นของสารละลายแบเรียมซัลเฟตที่เกิดจากการผสมแบเรียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในอัตราส่วนต่างๆ โดยให้สารละลายแบเรียมซัลเฟตมีความขุ่นจากน้อยไปหามากเป็นจำนวนทั้งสิ้น 10 หลอด ดังตาราง 1 โดยนำความขุ่นของสารละลายแบเรียมซัลเฟตทั้ง 10 หลอดมาเทียบเคียงกับอาหารเหลวที่มีแบคทีเรียแขวนลอยอยู่จริง 10 หลอด แล้วนำอาหารเหลวดังกล่าวทั้ง 10 หลอดมานับจำนวนแบคทีเรียในหลอด นำสารละลายแบเรียมซัลเฟตดังกล่าวข้างต้นทั้ง 10 หลอดมาวัดค่าความขุ่นหรือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตแต่ละหลอด นำค่าที่ได้ มาสร้างเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นหรือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตกับจำนวนแบคทีเรีย ดังภาพประกอบ 17 และสามารถนำเส้นกราฟดังกล่าวมาเป็นเส้นโค้งมาตรฐานในการใช้หาจำนวนแบคทีเรีย



ภาพประกอบ 17 แสดงลักษณะเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับจำนวนแบคทีเรีย

ที่มา : Ingraham, J. L; et al. (1994). *Introduction to microbiology*. p. 206.

ตาราง 1 แสดงอัตราส่วนของสารละลายแบเรียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ได้ความขุ่นที่สอดคล้องกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวของแมคฟาร์แลนด์

หลอดที่	ปริมาณสาร (มิลลิลิตร)		จำนวนแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวต่อมิลลิลิตรที่สอดคล้องกับความขุ่นของสารละลาย ($x10^8$)
	$BaCl_2$ (1%)	H_2SO_4(1%)	
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

ที่มา : Lennette E. H; et al. (1985). *Manual of Clinical Microbiology.* p. 1905.

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พ.ศ. 2513 ฮาวาร์ด (Howard) และซิดนีย์ (Sydney) ได้ทำการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีรอยส์ เมลานิโนเจนิคา (*Bacteroides melaninogenica*) ฟิสโซแบคทีเรี่ยม ฟิสซิฟอร์ม (*Fusobacterium fusiforme*) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียประเภทแอนแอโรป โดยบ่มเพาะเลี้ยงใส่หลอดทดลองในภาชนะบ่ม และใช้ฝอยเหล็กชุบสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในการลดปริมาณแก๊สออกซิเจนและใช้อัลกาเซลล์เซอร์ (alka-seltzer) เป็นแหล่งให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

พ.ศ. 2539 อเล็กซานเดอร์ อิมฮอฟ และ ไอโว ไฮนเซอร์ ได้เปรียบเทียบผลการสร้างสภาวะบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียประเภทแอนแอโรป ที่ต้องการลดแก๊สออกซิเจนให้เหลือประมาณร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ ระบบดูดแก๊สออกซิเจนออกและใส่แก๊สที่ต้องการเข้าไปแทน(evacuation replacement method) ใช้เพียงเวลาประมาณ 8 - 15 นาทีก็สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนได้ตามที่ต้องการ และการใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ยี่ห้อออกซอยด์แอนแอโรเจน (Oxoid AnaeroGen) ในการดักจับ

แก๊สออกซิเจนวิธีนี้สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนได้ตามที่ต้องการในเวลาประมาณ 26 - 41 นาที วิธีที่ใช้ผงเหล็กยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ในการดักจับแก๊สออกซิเจนวิธีนี้สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนได้ตามที่ต้องการในเวลาประมาณ 60 - 93 นาทีและวิธีที่ใช้โซเดียมโบโรไฮไดร์ (sodium borohydride) ยี่ห้อบีบีเอล แก๊สเพค (BBL GasPak) และยี่ห้อบีบีเอล แก๊สเพคพลัส (BBL GasPakPlus) ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งให้แก๊สไฮโดรเจนรวมตัวกับแก๊สออกซิเจนกลายเป็นน้ำวิธีนี้สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนได้ตามที่ต้องการในเวลาประมาณ 22 - 419 นาที โดยการทดลองใช้เครื่องวิเคราะห์แก๊สออกซิเจนวัดความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจน

พ.ศ. 2544 ระติพร หาเรือนกิจ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการบรรจุภัณฑ์ที่ดัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere packing, MAP) กับการยืดอายุผักสดแปรรูป โดยการเสื่อมคุณภาพของผักมีปัจจัยมาจากกระบวนการหายใจของพืช ในกระบวนการหายใจต้องใช้แก๊สออกซิเจนและปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดก็จะปล่อยแก๊สเอธีลีนซึ่งมีผลให้ผักเสื่อมคุณภาพ ซึ่งได้ใช้สารต่างๆ ในการลดหรือเพิ่มแก๊สต่างๆ ตามความต้องการและใช้สารดูดซับออกซิเจน ยี่ห้อเอจเลส (Ageless) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของประเทศญี่ปุ่นที่มีส่วนผสมของเหล็กออกไซด์ ในสภาพผงเพื่อจับแก๊สออกซิเจน โดยเอจเลส 1 กรัมจะทำปฏิกิริยากับแก๊สออกซิเจนได้ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร และใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตกับกรดซิตริกเพื่อปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ภาชนะแก้วมีฝาปิดตรงกลางเป็นยางปริมาตร 3 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลางของก้นภาชนะ 10 เซนติเมตร)

2. ภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์คปริมาตร 2.5 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลางของก้นภาชนะ 12 เซนติเมตร)

3. กระดาษกรอง

4. ซองแผ่นโลหะบาง

5. ผงเหล็ก

6. ฝอยเหล็ก

7. สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ

8. ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ

9. กรดแอสคอร์บิกยี่ห้อไอซี ชนิดเม็ด

10. โซเดียมไบคาร์บอเนต

11. กรดออคซาริก

12. อาหารเหลว (Brain heart infusion broth)

13. หลอดทดลองพร้อมฝา

14. ตะเกียงแอลกอฮอล์

15. ตู้บ่ม

16. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง

17. เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่งยี่ห้อ Denver Instrument Company รุ่น TC205

18. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น GC-17A Ver 3 เป็นเครื่องที่มีวัฏภาคคงที่เป็นของเหลว มีแก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพาหะที่มีอัตราการไหล 35 มิลลิลิตรต่อนาที สารตัวอย่างอยู่ในสถานะแก๊ส โดยฉีดสารตัวอย่างเข้าไปด้วยเข็มฉีด ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร ใช้คอลัมน์ชนิดแพ็คคอลัมน์ และหัววัดแบบการนำความร้อน

19. เครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ Jenway รุ่น 6400 มีต้นกำเนิดแสงเป็นหลอดไส้ทังสเตน โมโนโครเมเตอร์ให้แสงความยาวคลื่นค่าเดียว ตั้งแต่ 320 ถึง 950 นาโนเมตร ในกรณีนี้เลือกใช้ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ก่อนและหลังทำการวัดสารตัวอย่างทำการปรับเทียบค่าความดูดกลืนแสงของเครื่องมือด้วยสารละลายปรับเทียบทุกครั้ง ทำให้สามารถแสดงผลเป็นค่าความดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างออกมาได้

20. แก๊สมาตรฐาน (standard gas) เป็นแก๊สที่ทราบชนิดและปริมาณแน่นอนในกรณีนี้ แก๊สมาตรฐานประกอบด้วย แก๊สไฮโดรเจนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร แก๊สออกซิเจนร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สไนโตรเจนร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร แก๊สมีเทนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร และแก๊สฮีเลียมร้อยละ 71.64 โดยปริมาตร

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ภาควิชาฟิสิกส์และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ทำการศึกษาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีหัววัดแบบการนำความร้อน โดยใช้แก๊สมาตรฐานเป็นแก๊สตัวอย่างในการวัดและวิเคราะห์แก๊สให้ได้ค่าที่น่าเชื่อถือซึ่งต้องศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อเงื่อนไขในการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ได้แก่

- อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ในการวิเคราะห์แก๊สตัวอย่างที่เหมาะสม
- ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ให้แก่หัววัดที่เหมาะสมในการแยกแก๊สตัวอย่าง

ปรับพารามิเตอร์ให้เหมาะสมต่อการวัดและวิเคราะห์สารด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีและใช้เป็นเงื่อนไขของการวัด และวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อไป

2. ศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ทำการศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ทำการทดลองโดยเติมน้ำปริมาตร 35 มิลลิลิตร ในซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ นำซองแก๊สแพ็คดังกล่าวมาวางในภาชนะปิดและทำการทดลองวัดเป็นช่วงๆ ดังนี้ เริ่มวัดที่นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 และทุกๆ 50 นาทีถัดไปจนครบ 2910 นาที (วัดนาทีที่ 60 110 160 210 260 ... 2910) เนื่องจากการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปในภาชนะใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน หรือ 48 ชั่วโมงขึ้นไป ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standand deviation) เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง

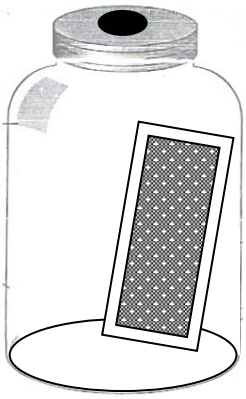
3. ศึกษาผลสัมฤทธิ์ของซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเอง

ทำการศึกษาผลสัมฤทธิ์ของซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเองโดยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

3.1 ศึกษาสารหรือวัสดุที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนที่เหมาะสมที่สุดในภาชนะ ทำการทดลองโดยใช้สารหรือวัสดุซึ่งสามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะได้และมีราคาถูกดังนี้

- ผงเหล็ก 10 กรัม ชุบสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตร
- ฝอยเหล็ก 10 กรัม ชุบสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 มิลลิลิตร
- กรดแอสคอร์บิก 1.5 กรัม ชุบสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 5 มิลลิลิตร
- สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ 10 กรัม

ในการทดลองแต่ละครั้งนำสารชนิดหนึ่งๆ บรรจุในซองที่ทำด้วยกระดาษกรองขนาด 7 x 20 ตารางเซนติเมตร ปิดผนึกซองเพื่อทำเป็นซองแก๊สแพ็ค แล้วนำซองไปชุบสารละลายดังกล่าวมาวางในภาชนะปิดดังภาพภาพประกอบ 18 วัดปริมาณออกซิเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สังเกตการลดของปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะดังกล่าว โดยวัดเป็นช่วงๆ ดังนี้ เริ่มวัดที่นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 นาทีที่ 60 และ นาทีที่ 110 เพื่อศึกษาความสามารถในการลดปริมาณแก๊สออกซิเจนของสารแต่ละชนิด ณ เวลาที่กำหนด เนื่องจากแบคทีเรียแอนแอโรปจะทนต่อบรรยากาศที่มีปริมาณแก๊สออกซิเจนปกติไม่เกิน 60 นาที



ภาพประกอบ 18 แสดงลักษณะการวางซองกระดาษกรองในภาชนะ

3.2 ศึกษาปริมาณของสารที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนที่เหมาะสมที่สุด ทำการทดลองโดยใช้สารที่เหมาะสมจากหัวข้อ 3.1 ในปริมาณ 15 30 60 และ 70 กรัม ตามลำดับ บรรจุในซองแบบเดียวกันและทำการทดลองในแนวทางเดียวกันกับหัวข้อ 3.1 วัดปริมาณออกซิเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สังเกตการลดของปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะดังกล่าว โดยวัดเป็นช่วงๆดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 นาทีที่ 60 และนาทีที่ 110 เพื่อหาปริมาณสารที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนภายในภาชนะให้เหลือไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาที และลดลงในเวลาต่อไป เนื่องจากแบคทีเรียแอนแอโรปจะทนต่อบรรยากาศที่มีปริมาณ

แก๊สออกซิเจนปกติไม่เกิน 60 นาที และเจริญได้ดีในบรรยากาศที่มีแก๊สออกซิเจนปริมาณน้อยมาก (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร)

3.3 ศึกษาปริมาณกรดออคซาริก และ โซเดียมไบคาร์บอเนตที่น้อยที่สุดที่สามารถให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาทีและคงที่ในเวลาต่อไป เนื่องจากแบคทีเรียแอนแอโรปเจริญได้ดีในบรรยากาศที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากหัวข้อ 4 ในบทที่ 2 สารที่ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อได้ในปริมาณมาก และราคาถูกคือ กรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้กรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต มาเป็นสารผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และจากการคำนวณน้ำหนักของสารแต่ละชนิดจากสมการในหัวข้อดังกล่าวจึงกำหนดปริมาณกรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต ดังนี้

- กรดออคซาริก 1.5 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัม น้ำ 10 มิลลิลิตร
- กรดออคซาริก 3 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 4 กรัม น้ำ 10 มิลลิลิตร
- กรดออคซาริก 9 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 12 กรัม น้ำ 10 มิลลิลิตร

นำสารปริมาณต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นใส่ซองที่ทำด้วยแผ่นโลหะบางเพื่อทำเป็นซองแก๊สแพ็ค ปิดผนึกซอง ใช้เข็มฉีดยาฉีดน้ำ 10 มิลลิลิตรเข้าไปในซองบรรจุสาร ตัดมุมซองให้มีช่องกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านออกได้ นำไปวางในภาชนะวัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สังเกตปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในภาชนะดังกล่าว โดยวัดเป็นช่วงๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 นาทีที่ 60 และนาทีที่ 110 เพื่อหาปริมาณของกรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะ ณ เวลาที่กำหนด

3.4 ศึกษาวิธีประกอบซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นให้สะดวกต่อการนำไปสร้างสภาวะบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป

ทำการทดลองโดยแบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

3.4.1 บรรจุสารที่ใช้ลดปริมาณออกซิเจนและผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แยกจากกันเป็นแต่ละซอง โดยใช้ปริมาณสารที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.2 บรรจุในซองกระดาษกรองขนาด 7 x 20 ตารางเซนติเมตร ปิดผนึกซอง และใช้ปริมาณสารที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.3 บรรจุในซองที่ทำด้วยแผ่นโลหะบางปิดผนึกซอง ใช้เข็มฉีดยาฉีดน้ำ 10 มิลลิลิตรในซองบรรจุสาร ตัดมุมซองให้มีช่องกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร และใส่ในภาชนะปิดเดียวกัน

3.4.2 บรรจุสารที่ใช้ลดปริมาณออกซิเจนและผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในซองเดียวกัน โดยใช้ปริมาณสารที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.2 และปริมาณสารที่เหมาะสม ในหัวข้อ 3.3 ผสมให้เข้ากันภายในถุงพลาสติกที่อากาศผ่านไม่ได้ เพื่อไม่ให้ความสามารถในการลดปริมาณแก๊สออกซิเจนของสารลดลงนำไปบรรจุในซองกระดาษกรองขนาด 7 x 20 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ซอง ปิดผนึกซอง วางซองทั้งสองลงในภาชนะ แล้วเติมน้ำ 20 มิลลิลิตรในภาชนะ

วัดชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะทั้งสองแบบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยวัดเป็นช่วงๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 นาทีที่ 60 และนาทีที่ 110 ในกรณีนี้ทำการวัดชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่นาทีที่ 2910 ด้วย เพื่อศึกษาว่าแบบใดเป็นแบบที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปในภาชนะเนื่องจากเชื้อแอนแอโรปจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือน้อยมาก (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) แต่ต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ตลอดการบ่มเพาะเลี้ยงหรืออย่างน้อย 48 ชั่วโมง (2880 นาที)

3.5 ศึกษาปริมาณส่วนผสมของสารในซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.4 เลือกแบบการทดลองที่เหมาะสม นำมาปรับหาสัดส่วนปริมาณของสารที่เหมาะสมต่อการทำให้บรรยากาศภายในภาชนะสามารถบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปได้ โดยวัดชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีสังเกตชนิดและปริมาณแก๊สในภาชนะดังกล่าว โดยวัดเป็นช่วงๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 นาทีที่ 60 และนาทีที่ 110

นำซองแก๊สแพ็คที่มีปริมาณส่วนผสมของสารในซองเป็นปริมาณเหมาะสมจากการศึกษาดังกล่าวมาทำการทดลองอีกครั้งโดยวัดชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นช่วงๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 และทุกๆ 50 นาทีถัดไปจนครบ 2910 นาที (วัดนาทีที่ 60 110 160 210 260 ... 2910) เพื่อนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบผลกับผลการทดลองในหัวข้อที่ 2 การทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง

3.6 ศึกษาการเจริญเติบโตเชื้อแอนแอโรปที่บ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแอนแอโรปในกรณีนี้เลือกใช้วิธีการนับเชื้อจากความขุ่นตามหัวข้อ 6.3 บทที่ 2 โดยมีการทดลอง 3 ขั้นตอนดังนี้

3.6.1 การสร้างเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตกับจำนวนแบคทีเรียตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ นำสารละลายแบเรียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรในอัตราส่วนต่างๆ ตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ โดยทำทั้งหมด 10 หลอด ดังตาราง 1 ในหัวข้อ 6.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตทั้ง 10 หลอด เครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหารเหลวเป็นสารละลายปรับเทียบ สร้างเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตทั้ง 10 หลอด กับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวที่สอดคล้องกันตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ ซึ่งมีค่า (3 - 30) x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำเส้นโค้งมาตรฐานที่ได้นำไปใช้ ในการปรับเทียบหาจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวต่อไป

3.6.2 การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ สำหรับเชื้อตัวอย่างประเภทแอนแอโรป 4 ชนิด

คือ คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*C. perfringens*) คลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์ (*C.difficile*) คลอสตริเดียม ไบเฟอร์แมนแทนส์ (*C. bifermantans*) และ แบคทีรอยส์ ฟราจิลิส (*Bacteroides fragilis*) ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีความสำคัญทางด้านการแพทย์เพราะก่อโรคในคน โดยนำเชื้อตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดมา ทำการทดลองโดยแบ่งออกเป็น 3 ชุด แต่ละชุดใส่เชื้อตัวอย่างแต่ละชนิดลงไปในอาหารเหลวที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 หลอดรวมทั้งหมด 12 หลอด หลอดทดลองในชุดที่ 1 และชุดที่2 บรรจุในภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์ค แต่หลอดทดลองในชุดที่ 3 วางในที่วางหลอดทดลอง โดยทั้ง 3 ชุดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C จนครบ 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อตัวอย่างแต่ละชุดบ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะบรรยากาศที่ต่างกันดังนี้

- ชุดที่ 1 บ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะบรรยากาศที่ใส่ซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ที่เติมน้ำ 35 มิลลิลิตร

- ชุดที่ 2 บ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะบรรยากาศที่ใช้ซองซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น พร้อมเติมน้ำ 25 มิลลิลิตรในภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์ค (ในหัวข้อ 3.5 เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร เนื่องจากขนาดของภาชนะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของก้นภาชนะ 10 เซนติเมตร ภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์คมีเส้นผ่านศูนย์กลางของก้นภาชนะ 12 เซนติเมตร จึงต้องเติมน้ำ 25 มิลลิลิตร เพื่อให้ระดับความสูงของน้ำในแต่ละภาชนะที่สัมผัสซองแก๊สแพ็ค มีระดับความสูงเดียวกัน คือสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร)

- ชุดที่ 3 บ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ เรียกว่าชุดควบคุม ถ้าพบว่าเชื้อตัวอย่างเจริญเติบโตได้แสดงว่าในขณะทดลองมีเชื้อจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาปนเปื้อน เนื่องจากเชื้อตัวอย่างที่ทำการทดลองไม่เจริญเติบโตในที่มีแก๊สออกซิเจน จึงไม่สามารถนำมาพิจารณา แต่ถ้าเชื้อตัวอย่างไม่มีการเจริญเติบโตก็สามารถนำเชื้อตัวอย่างในชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 ไปใช้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตได้

3.6.3 การวัดการเจริญเติบโตเชื้อแอนแอโรปที่บ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ โดยนำอาหารเหลวในชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 จากข้อ 3.6.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และใช้อาหารเหลวเป็นสารละลายปรับเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองแต่ละหลอด หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลองแต่ละชุดที่เหมือนกัน จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปหาจำนวนแบคทีเรียจากเส้นโค้งมาตรฐานในหัวข้อ 3.6.1 และทำการทดลองในหัวข้อ 3.6.2 และ หัวข้อ 3.6.3 ซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ สำหรับตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการศึกษาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ในการศึกษาหาเงื่อนไขอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่เหมาะสมต่อการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีหัววัดแบบการนำความร้อนได้ตั้งโปรมแกรม การวิเคราะห์ที่มีอุณหภูมิของคอลัมน์คงที่นานเป็นเวลา 7 นาที แล้วเพิ่มขึ้นนาทีละ 10 ^{0}C จนคอลัมน์มีอุณหภูมิเท่ากับ 150 ^{0}C

- ผลการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย แก๊สไฮโดรเจนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร แก๊สออกซิเจนร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สไนโตรเจน ร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร แก๊สมีเทนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร และแก๊สฮีเลียมร้อยละ 71.64 โดยปริมาตร โดยตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 40 มิลลิแอมแปร์ให้แก่หัววัดและปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ให้เริ่มต้นที่ 30 ^{0}C 31 ^{0}C และ 40 ^{0}C ตามลำดับ ปรากฏผลการทดลองได้โครมาโทแกรมดังภาพประกอบ 19 จะเห็น ได้ว่าโครมาโทแกรมที่มีอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 31 ^{0}C เริ่มปรากฏพีคของแก๊สชนิดต่างๆ ได้ชัดเจนและมีการแยกของพีคที่ดี

- จากผลดังกล่าวข้างต้นได้ทำการปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัดเป็น 40 80 และ 120 มิลลิแอมแปร์ ตามลำดับโดยมีอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น 31 ^{0}C ได้ผลแสดงดังภาพประกอบ 20 และตาราง 2 แสดงค่าเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สชนิดต่างๆ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่างแก๊สมาตรฐานนี้ 25 นาที ทำให้สามารถจัดระบบในการทดลองวัดและวิเคราะห์ครั้งต่อไปต้องใช้เวลา 50 นาที ในการให้เครื่องมือเข้าสู่สภาพปกติก่อนที่จะใช้ทำการทดลองครั้งต่อไปได้ รวมเวลาทั้งสิ้น 75 นาที ต่อการวัดและวิเคราะห์ 1 ตัวอย่างด้วยเงื่อนไขที่อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัดเป็น 40 มิลลิแอมแปร์ ตาราง 3 แสดงค่าเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สชนิดต่างๆ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่างแก๊สมาตรฐาน 20 นาที ในการทดลองวัดและวิเคราะห์ครั้งต่อไปต้องใช้เวลา 25 นาที ในการให้เครื่องมือเข้าสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้ทำการทดลองครั้งต่อไป รวมเวลาทั้งสิ้น 45 นาที ต่อการวัดและวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ตาราง 4 แสดงค่าเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สชนิดต่างๆ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่างแก๊สมาตรฐาน 18 นาที พบว่าในการทดลองวัดและวิเคราะห์ครั้งต่อไปต้องใช้เวลา 20 นาที ในการให้เครื่องมือเข้าสู่สภาพปกติพร้อมที่จะใช้ทำการทดลองครั้งต่อไป รวมเวลาทั้งสิ้น 38 นาที ต่อการวัดและวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง และพบว่าหัววัดของเครื่องมีความไว

มากต่อการตรวจจับปริมาณและชนิดของแก๊สที่ผ่านมาทำให้ลักษณะพีคของแก๊สมีเทน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ไม่ดี

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 80 มิลลิแอมแปร์ โครมาโทแกรมที่ได้อยู่ระดับพอดีกับเบสไลน์ (Base Line) ทำให้คำนวณค่าพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดได้แม่นยำขึ้น และระยะเวลา 45 นาที สำหรับการวัดและวิเคราะห์ในแต่ละครั้งและความพร้อมสำหรับทำการวัดและวิเคราะห์ ในครั้งต่อไปนับว่าเหมาะสมกว่าการทดลองที่ให้กระแสไฟฟ้าในปริมาณอื่นๆ แก่หัววัด

จากผลการศึกษาเงื่อนไขดังกล่าวข้างต้นนำมาตั้งโปรแกรมในการวัดและและวิเคราะห์แก๊สในการวิจัยนี้ ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 31 ^{0}C และให้คอลัมน์มีอุณหภูมิดังกล่าวคงที่เป็นเวลา 7 นาที แล้วเพิ่มขึ้นนาทีละ 10 ^{0}C จนคอลัมน์มีอุณหภูมิเท่ากับ 150 ^{0}C กระแสไฟฟ้าที่ให้แก่หัววัดคือ 80 มิลลิแอมแปร์ ซึ่งเป็นเงื่อนไขในการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่ทำให้โครมาโทแกรมเกิดการแยกที่ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานเกินไป คือ 45 นาที ได้ทำการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สในอากาศปกติก่อนการทดลองวัดและวิเคราะห์แก๊สตัวอย่างทุกครั้ง

เพื่อศึกษาความน่าเชื่อถือในการวัดและวิเคราะห์แก๊สด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี นำค่าพื้นที่ใต้พีคของแก๊สตัวอย่างแต่ละชนิดที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละโดยปริมาตรโดยใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ในหัวข้อ 1.2 บทที่ 2 โดยได้ผลการทดลองดังตาราง 5

ตาราง 2 แสดงเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 40 มิลลิแอมแปร์

ชนิดของแก๊ส	เวลารีเทนชั่น(นาที)	พื้นที่ใต้พีค
ไฮโดรเจน	1.776	3153
ออกซิเจน	6.067	224576
ไนโตรเจน	6.581	222484
คาร์บอนมอนอกไซด์	9.019	143266
มีเทน	17.223	143482
คาร์บอนไดออกไซด์	21.880	207535

ตาราง 3 แสดงเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 80 มิลลิแอมแปร์

ชนิดของแก๊ส	เวลารีเทนชั่น(นาที)	พื้นที่ใต้พีค
ไฮโดรเจน	0.907	1829
ออกซิเจน	3.134	95759
ไนโตรเจน	3.411	105512
คาร์บอนมอนอกไซด์	4.747	99149
มีเทน	11.504	192163
คาร์บอนไดออกไซด์	17.736	159158

ตาราง 4 แสดงเวลารีเทนชันและพื้นที่ใต้พีคของแก๊สแต่ละชนิดในแก๊สมาตรฐาน เมื่อตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 120 มิลลิแอมแปร์

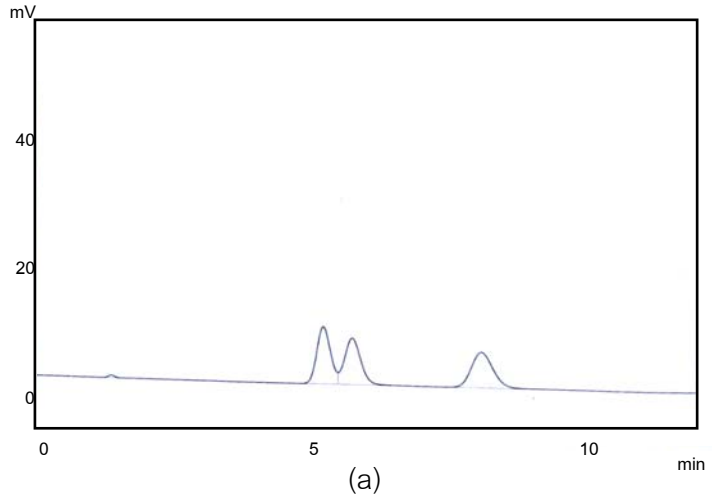
ชนิดของแก๊ส	เวลารีเทนชั่น(นาที)	พื้นที่ใต้พีค
ไฮโดรเจน	0.804	2919
ออกซิเจน	2.817	158679
ไนโตรเจน	3.099	209021
คาร์บอนมอนอกไซด์	4.340	161264
มีเทน	10.713	598554
คาร์บอนไดออกไซด์	16.900	805945

ตาราง 5 แสดงผลการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สในอากาศปกติด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยทำการทดลองจำนวน 50 ครั้ง ในวันและเวลาที่แตกต่างกันตลอดการวิจัยนี้

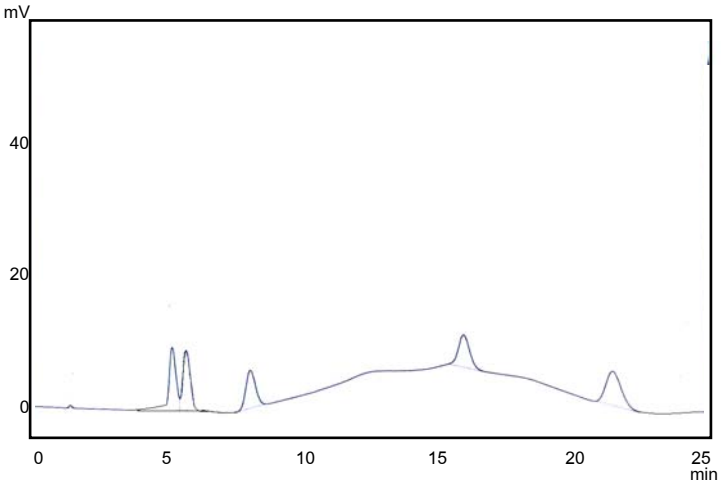
	เวลารีเทนชั่น (นาที) ค่าเฉลี่ย[RSD(%)]	พื้นที่ใต้พีค	ปริมาณแก๊ส (%) ค่าเฉลี่ย[RSD(%)]
ออกซิเจน	3.09 [4.51]	396432	20.99 [1.40]
ไนโตรเจน	3.24 [2.20]	1620647	77.87 [1.10]

RSD คือ Relative Standard Deviation

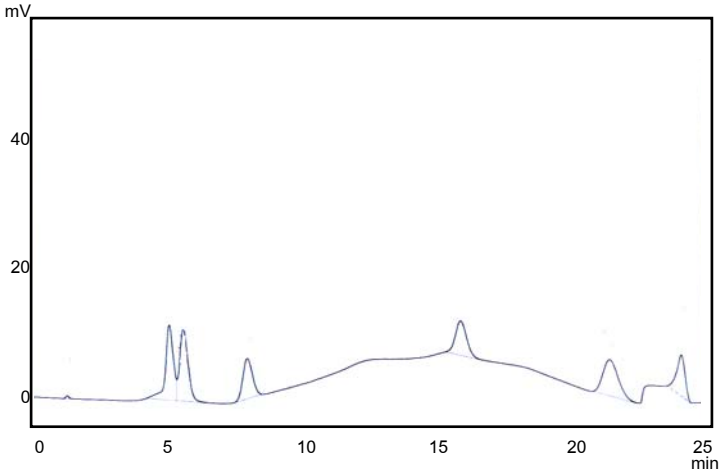
34



(a)

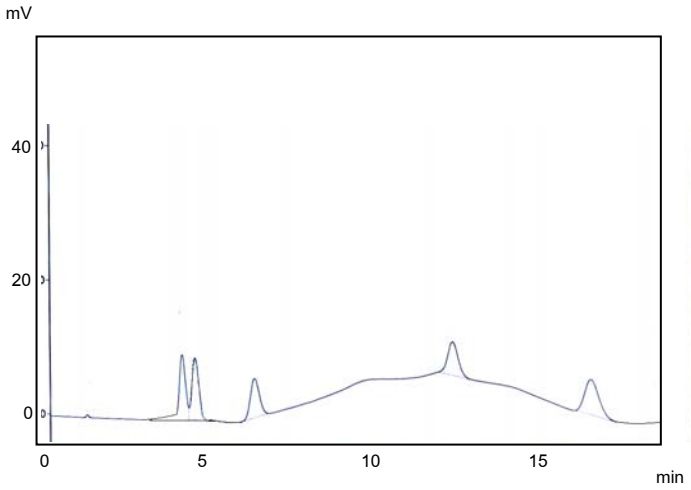


(b)

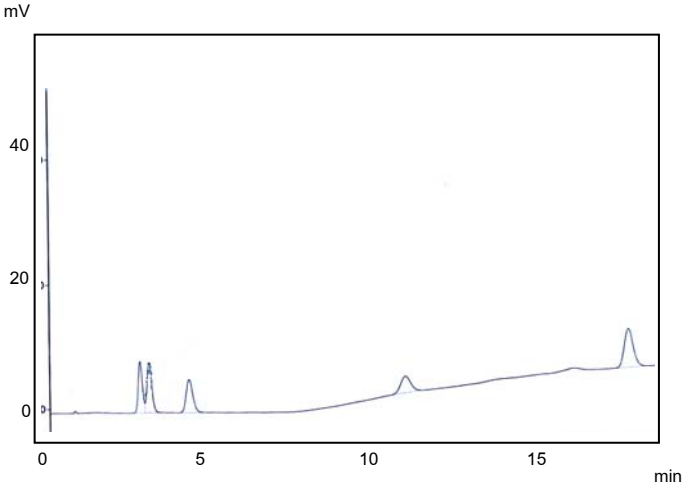


(c)

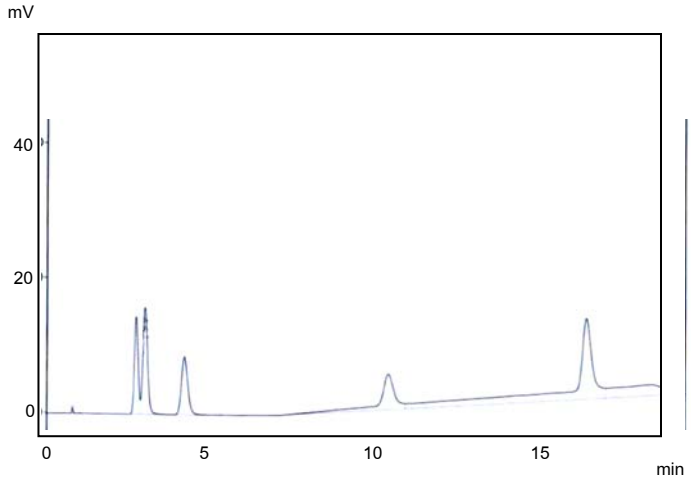
ภาพประกอบ 19 แสดงโครมาโทแกรมในการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานโดยตั้งปริมาณกระแสไฟฟ้าแก่หัววัด 40 มิลลิแอมแปร์ และอุณหภูมิ (a) 30 ^{0}C (b) 31 ^{0}C และ (c) 40 ^{0}C



(a)



(b)



(c)

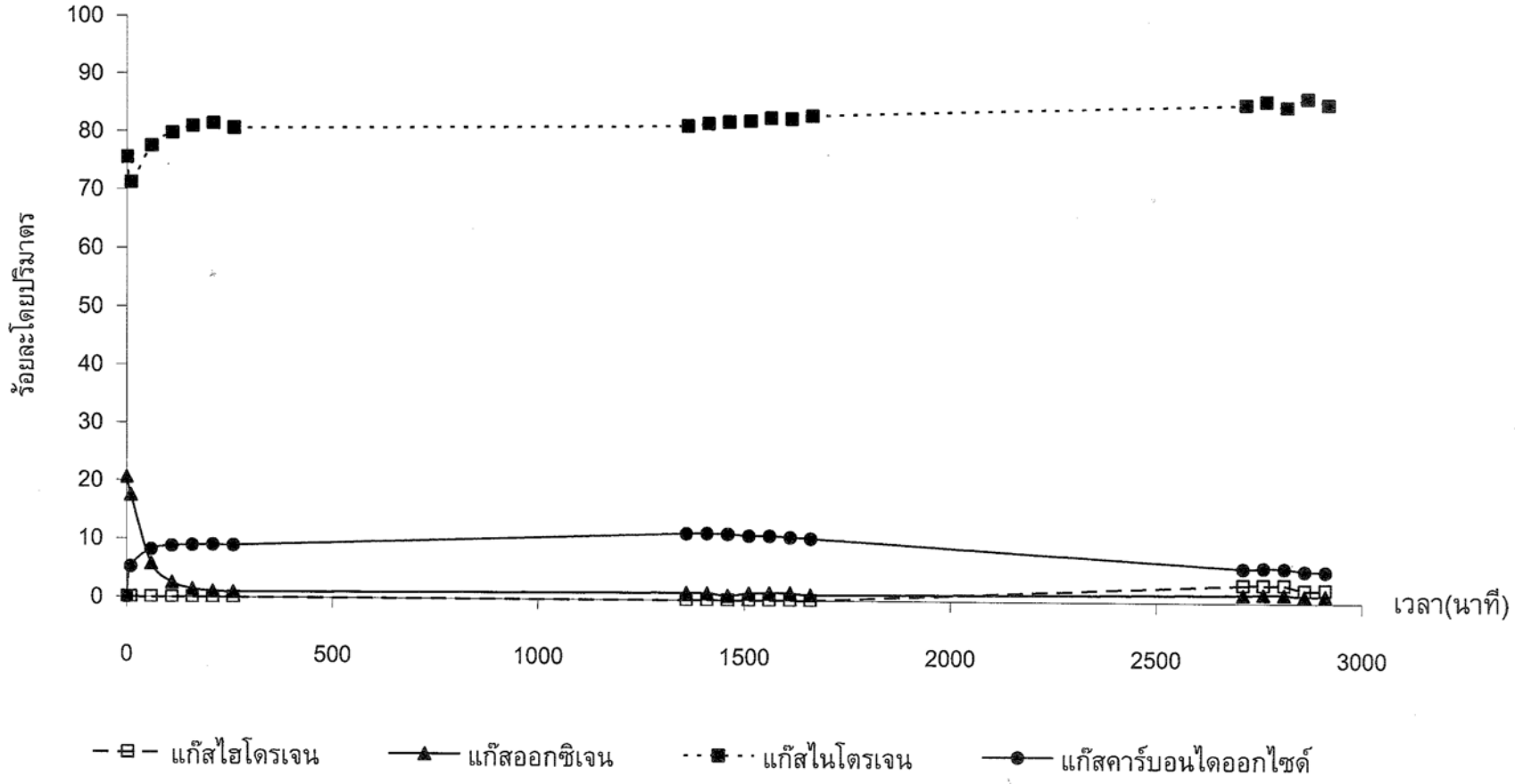
ภาพประกอบ 20 แสดงโครมาโทรแกรมในการวัดและวิเคราะห์แก๊สมาตรฐานโดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์มีค่า 31 ^{0}C และปรับกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัดในการวิเคราะห์แก๊สตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้า (a) 40 (b) 80 และ (c) 120 มิลลิแอมแปร์

2. ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาที่กำหนด

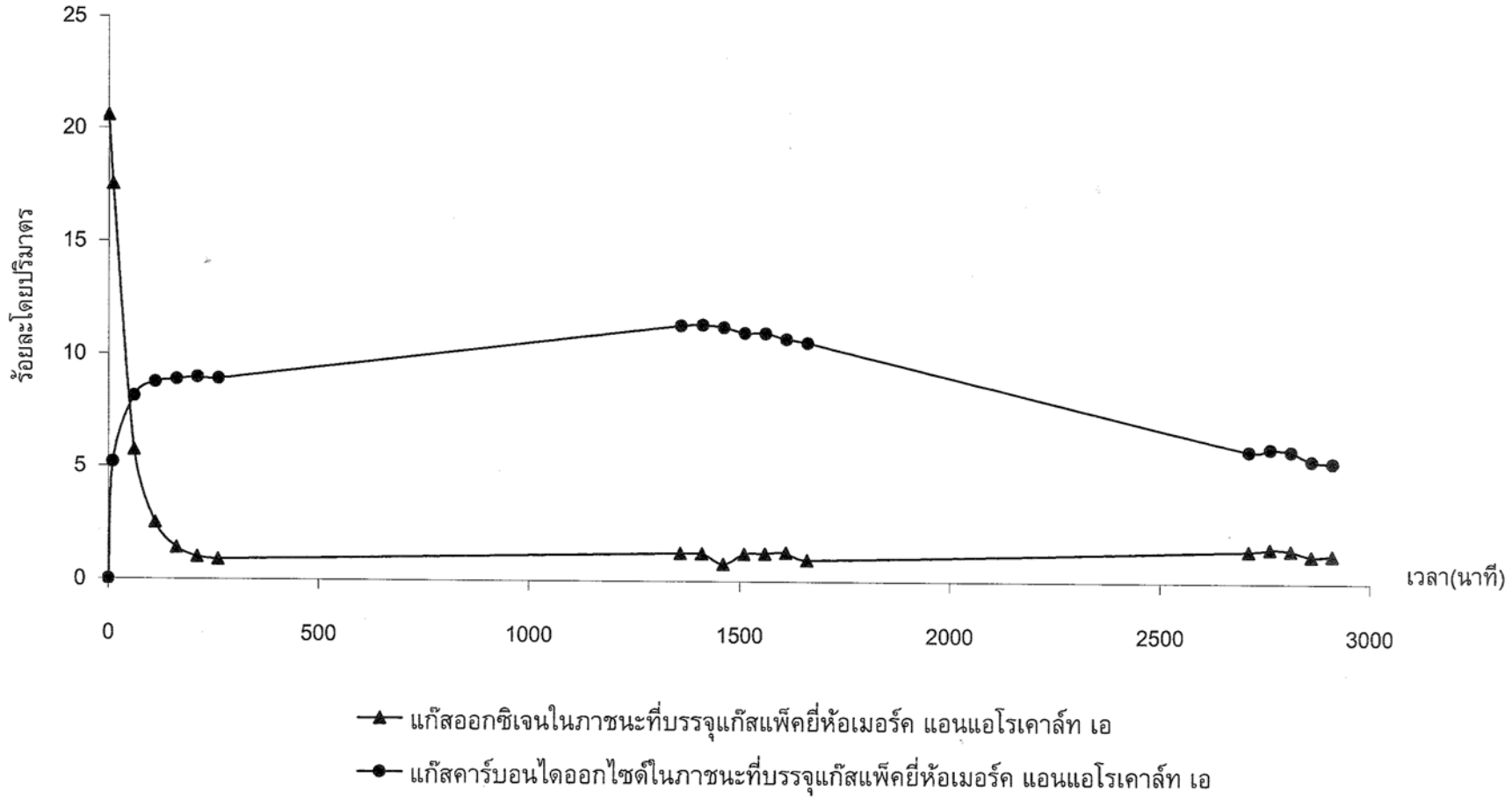
ผลการศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยทำการทดลองตามหัวข้อ 2 บทที่ 3 ด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น ได้ผลการทดลองดังตาราง 6 และภาพประกอบ 21 ที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณแก๊สชนิดต่างๆภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ และภาพประกอบ 22 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ ผลจากตารางแสดงให้เห็นว่าปริมาณแก๊สชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นภายในภาชนะเป็นสภาวะบรรยากาศที่เชื้อแอนแอโรปสามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจาก เชื้อแอนแอโรปสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือน้อยมาก (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) แต่ต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรตลอดการบ่มเพาะเลี้ยงหรืออย่างน้อย 48 ชั่วโมง (2880 นาที) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าผลการทดลองในตาราง 6 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูง เนื่องจากการกระจายของน้ำที่เติมในซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ แต่ละครั้งสัมผัสสารภายในซองไม่เท่ากันจึงมีผลทำให้ปริมาณแก๊สภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ แตกต่างกันมาก โดยเฉพาะพีคของแก๊สไนโตรเจนที่อยู่ติดกับพีคของแก๊สออกซิเจนโดยมีการซ้อนทับกันเล็กน้อย เมื่อแก๊สออกซิเจนลดลงไปเรื่อยๆ การหาพื้นที่ใต้พีคของแก๊สทั้งสองชนิดที่อยู่ติดกันก็มีโอกาสถูกต้องน้อยลง ขณะที่แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เป็นพีคเดี่ยวๆ จึงทำให้การหาพื้นที่ใต้พีคของแก๊สทั้ง 2 ชนิดทำได้ดีกว่า แต่สำหรับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่สูงกว่าแก๊สไฮโดรเจนเนื่องจากพีคของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อยู่เป็นเบสไลน์ที่สูง จึงทำให้การหาค่าพื้นที่ใต้พีคได้ถูกต้องแม่นยำน้อยกว่าของแก๊สไฮโดรเจน และเป็นข้อมูลที่ได้ทำการทดลองซ้ำเพียง 3 ครั้งเท่านั้น

ตาราง 6 แสดงปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในภาชนะปิดที่บรรจุแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

เวลา (นาที)	ปริมาณแก๊ส(ร้อยละโดยปริมาตร)			
	ไฮโดรเจน(H_2)	ออกซิเจน (O_2)	ไนโตรเจน(N_2)	คาร์บอนไดออกไซด์(CO_2)
	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]
0	-	20.58 [2.69]	75.56 [6.50]	-
10	-	17.52 [4.16]	71.26 [9.79]	5.20 [35.90]
60	-	5.73 [52.43]	77.54 [8.91]	8.13 [25.36]
110	-	2.51 [95.88]	79.75 [8.96]	8.75 [28.05]
160	-	1.40 [99.97]	80.96 [10.10]	8.89 [30.75]
210	-	1.00 [100.01]	81.40 [10.90]	8.99 [33.84]
260	-	0.89 [100.02]	80.66 [11.44]	8.92 [34.39]
1360	-	1.24 [20.38]	81.46 [1.40]	11.36 [31.31]
1410	-	1.23 [99.94]	81.89 [2.03]	11.40 [31.14]
1460	-	0.77 [28.66]	82.20 [3.86]	11.29 [29.31]
1510	-	1.21 [24.82]	82.37 [1.44]	11.04 [30.76]
1560	-	1.24 [31.01]	82.91 [2.10]	11.04 [30.57]
1610	-	1.29 [99.99]	82.79 [2.60]	10.77 [31.19]
1660	-	0.96 [12.60]	83.31 [2.72]	10.60 [32.73]
2710	3.05 [5.15]	1.42 [31.42]	85.59 [0.97]	5.84 [10.59]
2760	3.05 [1.90]	1.52 [31.48]	86.25 [1.36]	5.96 [5.31]
2810	3.06 [1.99]	1.45 [99.97]	85.25 [0.81]	5.85 [5.95]
2860	2.18 [99.99]	1.21 [21.62]	86.78 [1.55]	5.42 [18.72]
2910	2.20 [99.99]	1.23 [18.27]	85.72 [2.19]	5.34 [21.53]



ภาพประกอบ 21 แสดงปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในบรรยากาศภายในภาชนะปิดที่บรรจุแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ



ภาพประกอบ 22 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ

3. ผลสัมฤทธิ์ของซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเอง

3.1 ผลการศึกษาสารหรือวัสดุราคาถูกที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะ ณ เวลาที่กำหนด แสดงดังตาราง 7 จะเห็นได้ว่าสารหรือวัสดุราคาถูกที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะได้ดีที่สุดคือ สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ

ตาราง 7 แสดงปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุสารหรือวัสดุที่มีราคาถูก ณ เวลาที่กำหนด ที่วัดด้วยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

สารหรือวัสดุ	ปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะ (ร้อยละโดยปริมาตร)			
	0 นาที	10 นาที	60 นาที	110 นาที
ผงเหล็ก	20.69	20.68	20.50	20.23
ฝอยเหล็ก	20.90	19.91	18.16	17.29
กรดแอสคอร์บิก	21.40	20.53	19.22	17.59
สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ	21.05	19.73	16.89	14.87

3.2 การศึกษาปริมาณของสารที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป

จากผลการทดลองหัวข้อ 3.1 ข้างต้น สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟเป็นสารที่สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้นำสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟปริมาณต่างๆ มาทำการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณแก๊สออกซิเจนภายในภาชนะให้เหลือไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาที และลดลงในเวลาต่อไป ผลการทดลองแสดงดังตาราง 8 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ 60 และ 70 กรัม สามารถลดปริมาณแก๊สออกซิเจนภายในภาชนะให้เหลือไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาที และลดลงในเวลาต่อไป

ตาราง 8 แสดงปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ ในปริมาณต่างๆ ณ เวลาที่กำหนด ที่วัดด้วยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ปริมาณสาร (กรัม)	ปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะ (ร้อยละโดยปริมาตร)			
	0 นาที	10 นาที	60 นาที	110 นาที
15	21.01	19.78	16.49	13.96
30	20.65	19.88	13.87	12.86
60	21.29	17.67	2.77	1.62
70	21.07	14.81	1.62	1.02

3.3 การศึกษาปริมาณกรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาทีและคงที่ในเวลาต่อไป ปรากฏได้ผลดังตาราง 9

ตาราง 9 แสดงปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะที่บรรจุกรดออคซาริกและโซเดียมไบคาร์บอเนตอัตราส่วนต่างๆ ณ เวลาที่กำหนดที่วัดด้วยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

อัตราส่วน กรดออคซาริก(กรัม) : โซเดียมไบคาร์บอเนต(กรัม)	ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในภาชนะ (ร้อยละโดยปริมาตร)			
	0 นาที	10 นาที	60 นาที	110 นาที
1.5 : 2.0	-	12.33	13.32	14.36
3.0 : 4.0	-	15.38	21.11	21.31
9.0 : 12.0	-	39.23	67.71	68.19

3.4 การศึกษาวิธีประกอบซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นให้สะดวกต่อการนำไปสร้างสภาวะบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3 ข้างต้นและเนื่องจากภาชนะเป็นระบบปิดดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณร้อยละของแก๊สชนิดใดชนิดหนึ่งจะเกิดผลกระทบกับปริมาณร้อยละของแก๊สชนิดอื่นภายในภาชนะด้วย จึงเลือกใช้สารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ 30 กรัม กรดออคซาริก 3 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต 4 กรัม ผสมรวมกันและทำการทดลอง 2 แบบ ได้ผลดังตาราง 10 จากการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการบรรจุสารในซองเดียวกันสามารถเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่เหมาะต่อการสร้างสภาวะบรรยากาศใน

การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปมากกว่าและมีค่าคงที่ประมาณไม่เกินร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ 60 นาที ขึ้นไปขณะที่แก๊สออกซิเจนมีค่าลดลงเรื่อยๆ

ตาราง 10 แสดงชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คที่ประกอบขึ้นด้วยวิธีต่างๆ ณ เวลาที่กำหนด ที่วัดด้วยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใส่น้ำ 20 มิลลิลิตรในภาชนะปิดขนาด 3 ลิตร

วิธีประกอบ	เวลา (นาที)	ปริมาณแก๊ส (ร้อยละโดยปริมาตร) ไฮโดรเจน (H_2)	ออกซิเจน (O_2)	ไนโตรเจน (N_2)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
บรรจุสารแยกจากกันเป็นแต่ละซอง	0	-	21.56	75.11	-
	10	-	16.10	60.31	20.44
	60	-	15.00	60.74	21.16
	110	-	9.44	67.04	21.46
	2910	-	0.26	82.87	0.32
บรรจุสารผสมในซองเดียวกัน	0	-	21.56	75.11	-
	10	-	19.12	60.84	10.75
	60	-	15.41	59.44	15.20
	110	-	10.19	67.47	17.34
	2910	-	2.77	76.15	19.43

3.5 การศึกษาปริมาณส่วนผสมของสารในซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.4 ได้เลือกวิธีประกอบซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นที่สามารถสร้างสภาวะบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป เป็นแบบบรรจุสารผสมในซองเดียวกันและนำวิธีการดังกล่าวมาปรับหาสัดส่วนปริมาณของสารที่เหมาะสมต่อการทำให้บรรยากาศภายในภาชนะสามารถบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปอีกครั้งหนึ่ง ปรากฏได้ผลดังตาราง 11 โดยจะเห็นว่าสัดส่วนของสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ 70 กรัม กรดออคซาริก 6 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต 8 กรัม สามารถสร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป เนื่องจากเชื้อแอนแอโรปสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือน้อยมาก (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) แต่ต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ตลอดการบ่มเพาะเลี้ยงหรืออย่างน้อย 48 ชั่วโมง (2880 นาที)

43

ทำการทดลองการวัดชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คที่มีปริมาณสัดส่วนดังกล่าวอีกครั้งด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นช่วงๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 นาทีที่ 10 และทุกๆ 50 นาทีถัดไปจนครบ 2910 นาที ดังภาพประกอบ 23 ได้ผลดังตาราง 12 และภาพประกอบ 24 ที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ และภาพประกอบ 25 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ ผลการทดลองในตาราง 12 เป็นการทดลองซ้ำที่สามารถยืนยันให้เห็นว่าปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในภาชนะน่าจะเป็นสภาวะบรรยากาศที่เชื้อแอนแอโรปสามารถเจริญเติบโตได้

ภาพประกอบ 23 แสดงการเก็บสารตัวอย่างภายในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเพื่อทำการวัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

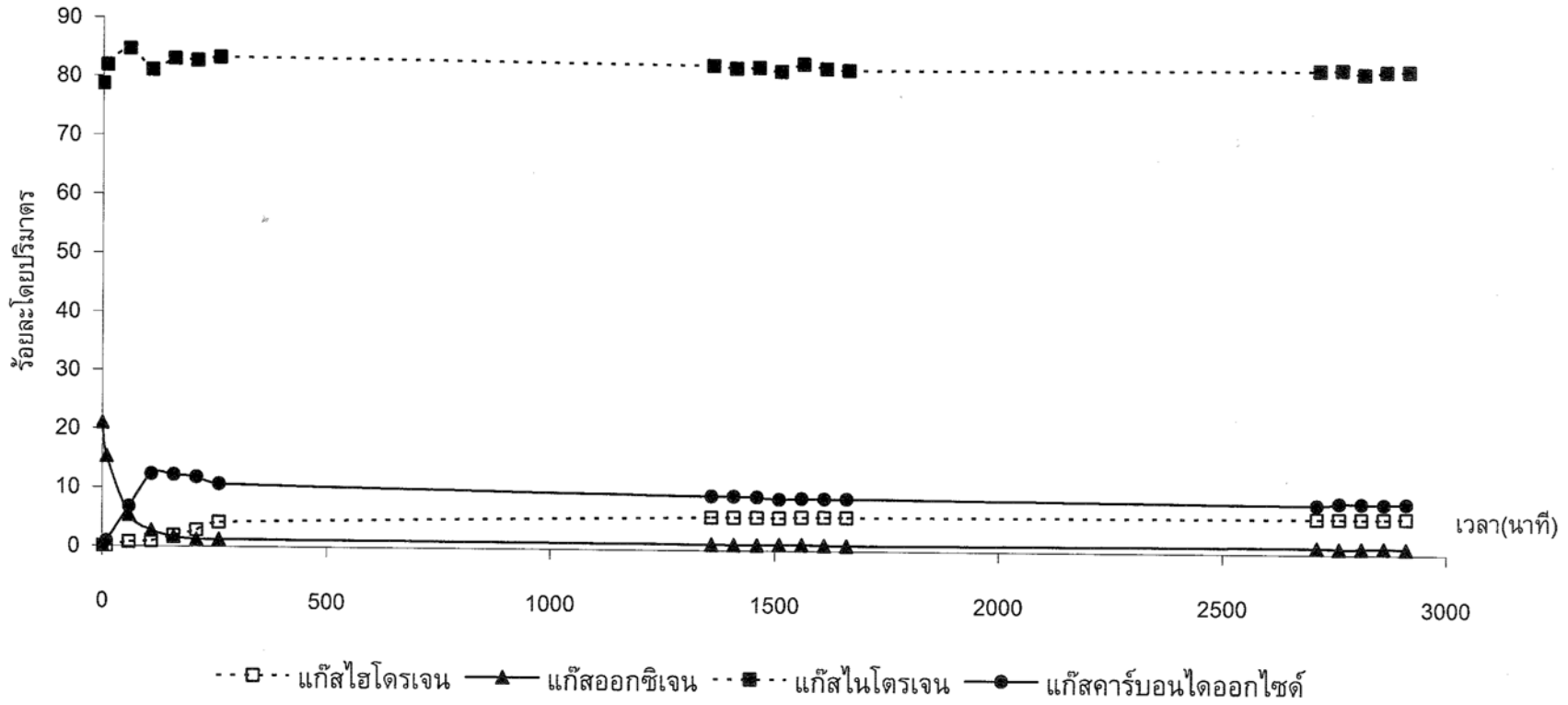
ในการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้แก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเองและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ได้แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ ในภาพประกอบ 26 และ 27 ตามลำดับ และ ตาราง 13 โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ มีปริมาณใกล้เคียงกัน

ตาราง 11 แสดงชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คที่มีอัตราส่วนของส่วนผสมของสารในซองแก๊สแพ็คที่แตกต่างกัน ณ เวลาที่กำหนด

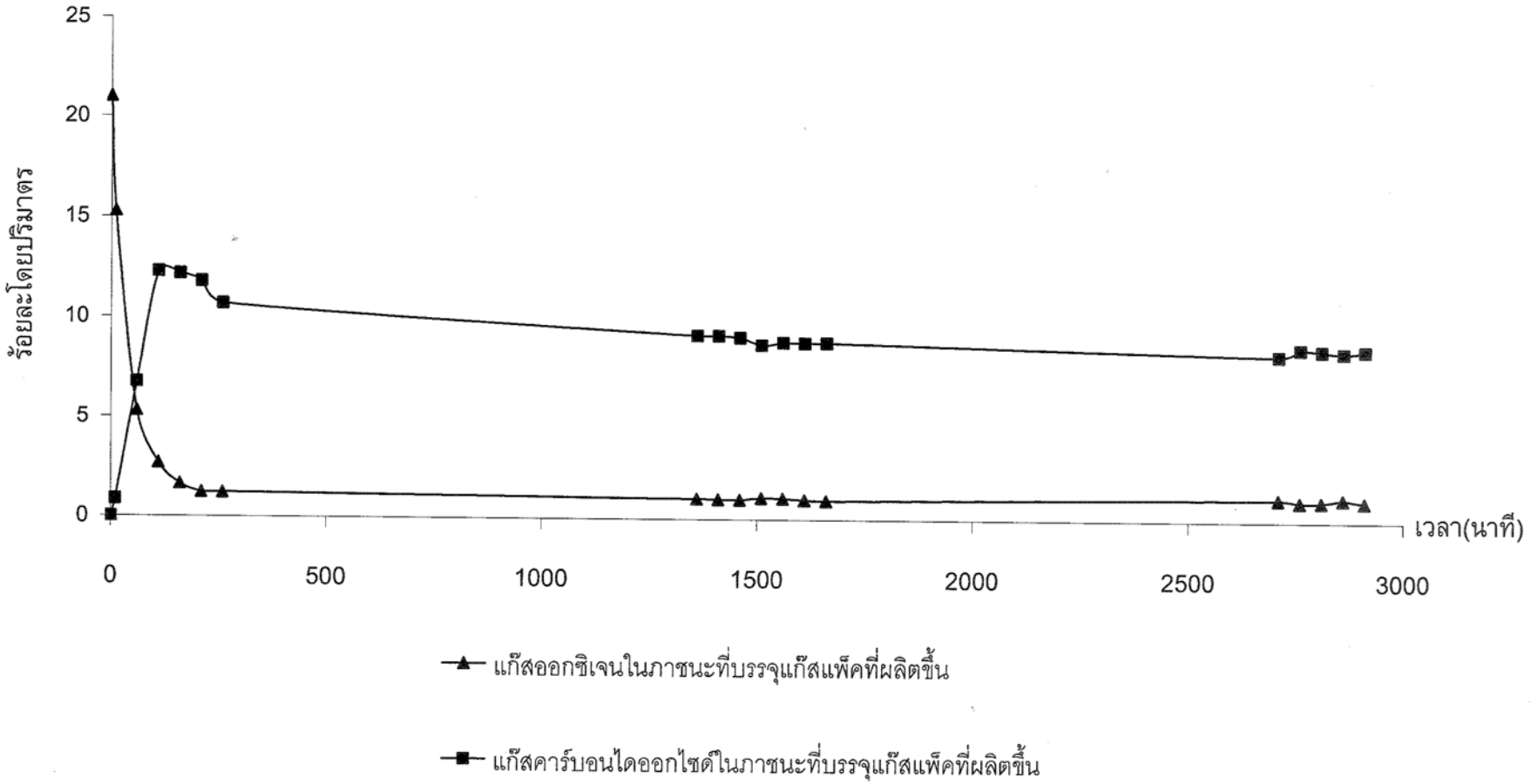
สารดูดซับแก๊สออกซิเจน ยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ(กรัม) : กรดออคซาริก(กรัม) : โซเดียมไบคาร์บอเนต (กรัม)	เวลา (นาที)	ปริมาณแก๊ส (ร้อยละโดยปริมาตร)			
		ไฮโดรเจน (H_2)	ออกซิเจน (O_2)	ไนโตรเจน (N_2)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
30 : 3 : 4	0	-	21.56	76.11	-
	10	-	19.12	69.84	10.75
	60	-	16.41	59.44	15.20
	110	-	13.19	67.47	17.34
60 : 3 : 4	0	-	20.14	72.53	-
	10	-	18.17	73.78	8.18
	60	-	9.07	79.07	13.73
	110	-	5.15	79.20	14.11
70 : 6 : 8	0	-	21.02	77.73	-
	10	-	15.50	82.90	0.08
	60	-	5.12	88.53	1.72
	110	-	2.93	80.46	14.71
70 : 9 : 12	0	-	21.57	77.50	-
	10	-	19.10	76.98	2.61
	60	-	13.06	68.74	18.44
	110	2.40	9.28	60.07	30.96

ตาราง 12 แสดงปริมาณแก๊สชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น ณ เวลาที่กำหนดโดยใส่น้ำ 20 มิลลิลิตรและทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

เวลา (นาที)	ปริมาณแก๊ส (ร้อยละโดยปริมาตร)			
	ไฮโดรเจน(H_2)	ออกซิเจน (O_2)	ไนโตรเจน(N_2)	คาร์บอนไดออกไซด์(CO_2)
	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]
0	-	21.00 [0.77]	78.67 [0.45]	-
10	-	15.30 [8.61]	81.89 [2.19]	-
60	-	5.30 [15.78]	84.65 [5.78]	6.75 [65.08]
110	-	2.68 [16.82]	81.11 [1.53]	12.29 [11.59]
160	-	1.65 [31.32]	83.02 [1.93]	12.29 [12.52]
210	2.83 [17.87]	1.24 [16.93]	82.73 [2.64]	11.81 [15.96]
260	4.13 [49.02]	1.22 [10.55]	83.28 [1.77]	10.70 [24.79]
1360	5.62 [19.28]	1.04 [7.32]	82.47 [1.38]	9.21 [6.93]
1410	5.63 [17.56]	1.01 [10.20]	82.03 [2.06]	9.21 [7.35]
1460	5.62 [17.93]	1.00 [4.45]	82.19 [1.05]	9.11 [10.45]
1510	5.55 [18.24]	1.09 [7.53]	81.54 [1.58]	8.76 [8.71]
1560	5.68 [17.21]	1.06 [10.59]	82.82 [1.02]	8.88 [10.51]
1610	5.72 [17.09]	0.99 [4.60]	82.05 [1.55]	8.86 [11.15]
1660	5.70 [17.11]	0.95 [3.58]	81.81 [1.64]	8.88 [11.48]
2710	6.01 [16.13]	0.21 [11.75]	82.21 [1.78]	8.32 [6.82]
2760	5.99 [16.43]	0.13 [4.50]	82.37 [1.25]	8.66 [6.07]
2810	5.99 [16.54]	1.01 [0.68]	81.68 [0.64]	8.59 [8.82]
2860	6.05 [15.58]	1.15 [21.62]	82.15 [1.58]	8.49 [13.20]
2910	6.10 [16.73]	1.00 [2.66]	82.18 [1.57]	8.60 [11.25]



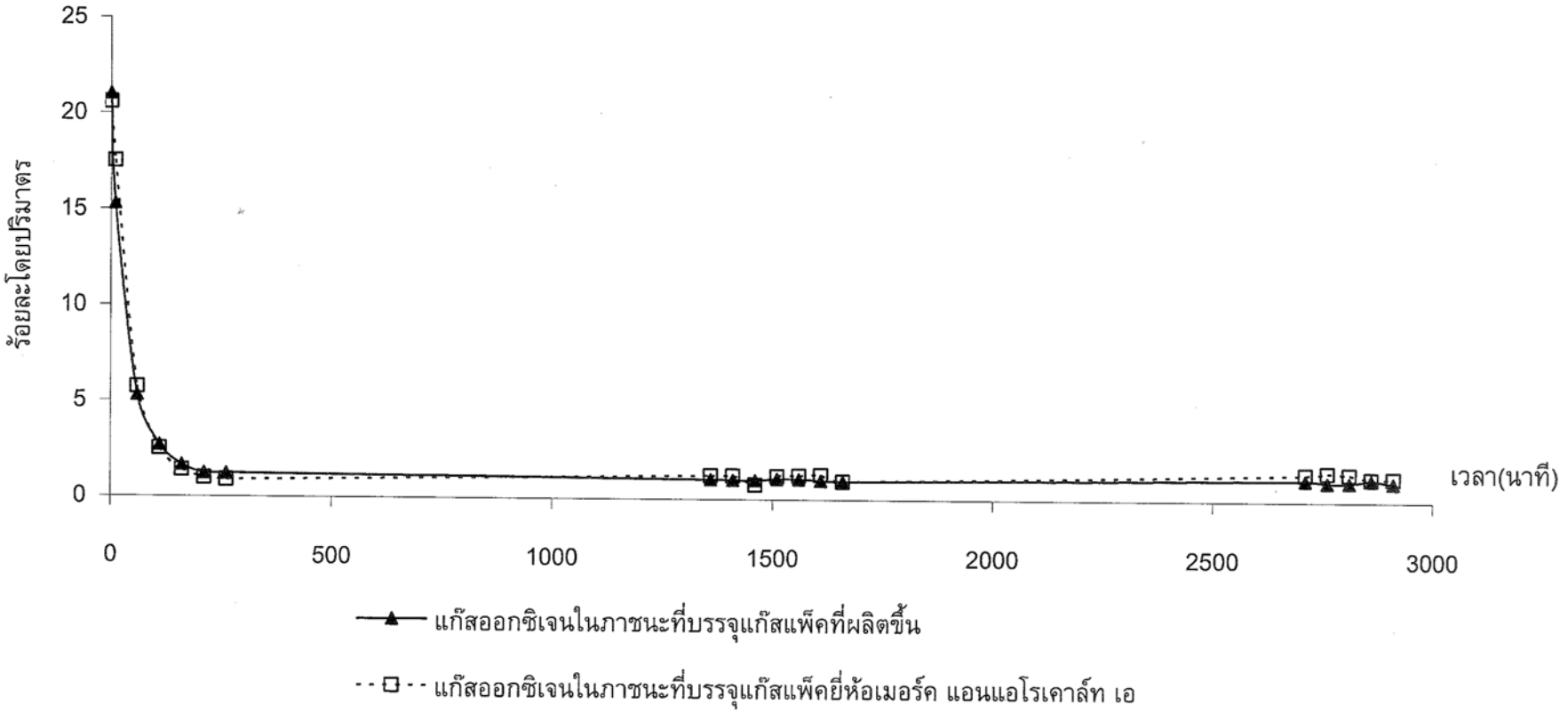
ภาพประกอบ 24 แสดงปริมาณแก๊สชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในบรรยากาศภายในภาชนะปิดที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น ณ เวลาต่างๆ



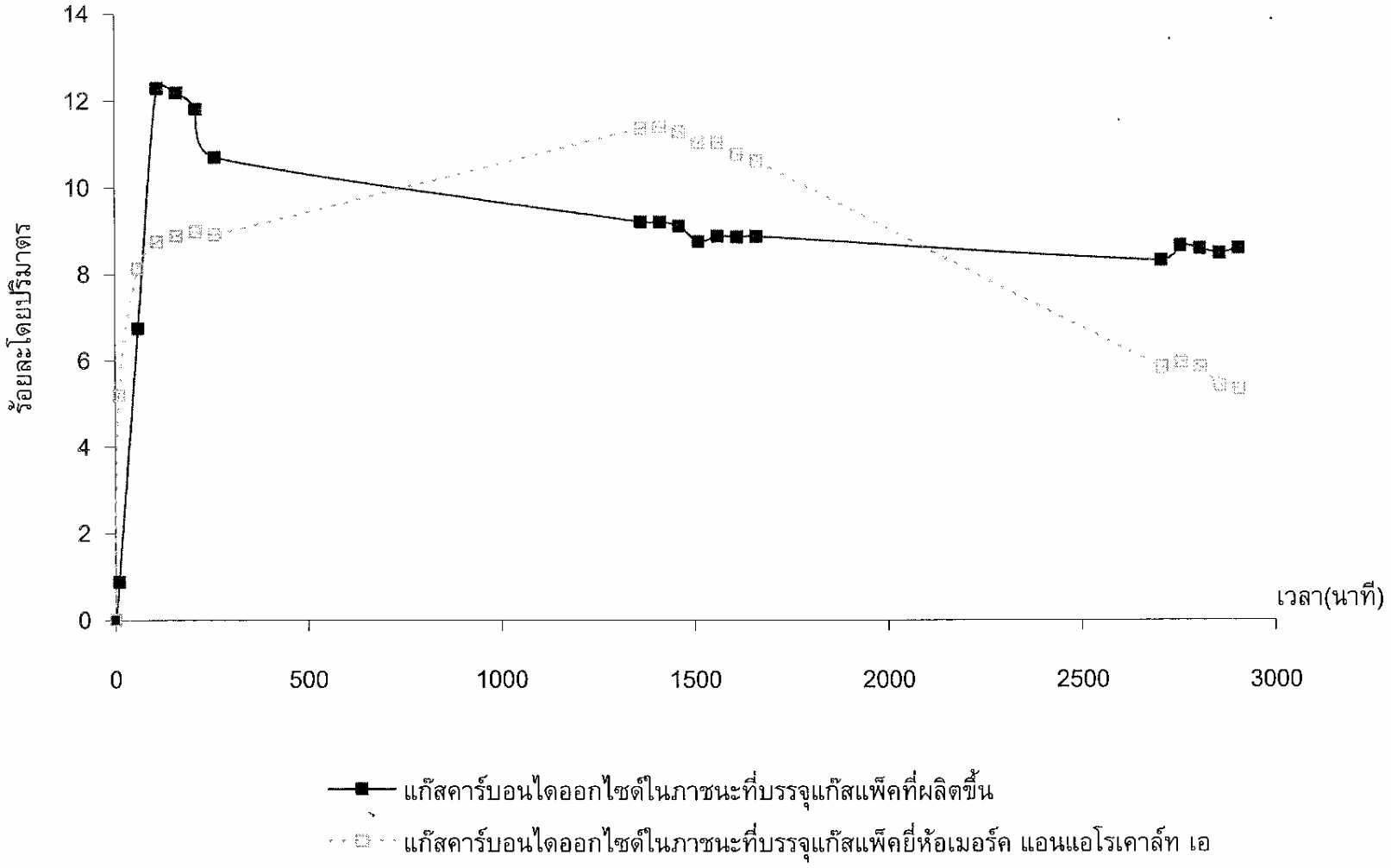
ภาพประกอบ 25 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น ณ เวลาต่างๆ

ตาราง 13 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาที่กำหนด

เวลา (นาที)	ปริมาณแก๊ส (ร้อยละโดยปริมาตร)			
	แก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น		แก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ	
	ออกซิเจน(O_2)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)	ออกซิเจน(O_2)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]	ค่าเฉลี่ย [RSD]
0	21.00 [0.77]	-	20.58 [2.69]	-
10	15.30 [8.61]	-	17.52 [4.16]	5.20 [35.90]
60	5.30 [15.78]	6.75 [65.08]	5.73 [52.43]	8.13 [25.36]
110	2.68 [16.82]	12.29 [11.59]	2.51 [95.88]	8.75 [28.05]
160	1.65 [31.32]	12.29 [12.52]	1.40 [99.97]	8.89 [30.75]
210	1.24 [16.93]	11.81 [15.96]	1.00 [100.01]	8.99 [33.84]
260	1.22 [10.55]	10.70 [24.79]	0.89 [100.02]	8.92 [34.39]
1360	1.04 [7.32]	9.21 [6.93]	1.24 [20.38]	11.36 [31.31]
1410	1.01 [10.20]	9.21 [7.35]	1.23 [99.94]	11.40 [31.14]
1460	1.00 [4.45]	9.11 [10.45]	0.77 [28.66]	11.29 [29.31]
1510	1.09 [7.53]	8.76 [8.71]	1.21 [24.82]	11.04 [30.76]
1560	1.06 [10.59]	8.88 [10.51]	1.24 [31.01]	11.04 [30.57]
1610	0.99 [4.60]	8.86 [11.15]	1.29 [99.99]	10.77 [31.19]
1660	0.95 [3.58]	8.88 [11.48]	0.96 [12.60]	10.60 [32.73]
2710	0.21 [11.75]	8.32 [6.82]	1.42 [31.42]	5.84 [10.59]
2760	0.13 [4.50]	8.66 [6.07]	1.52 [31.48]	5.96 [5.31]
2810	1.01 [0.68]	8.59 [8.82]	1.45 [99.97]	5.85 [5.95]
2860	1.15 [21.62]	8.49 [13.20]	1.21 [21.62]	5.42 [18.72]
2910	1.00 [2.66]	8.60 [11.25]	1.23 [18.27]	5.34 [21.53]



ภาพประกอบ 26 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็ค ที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ



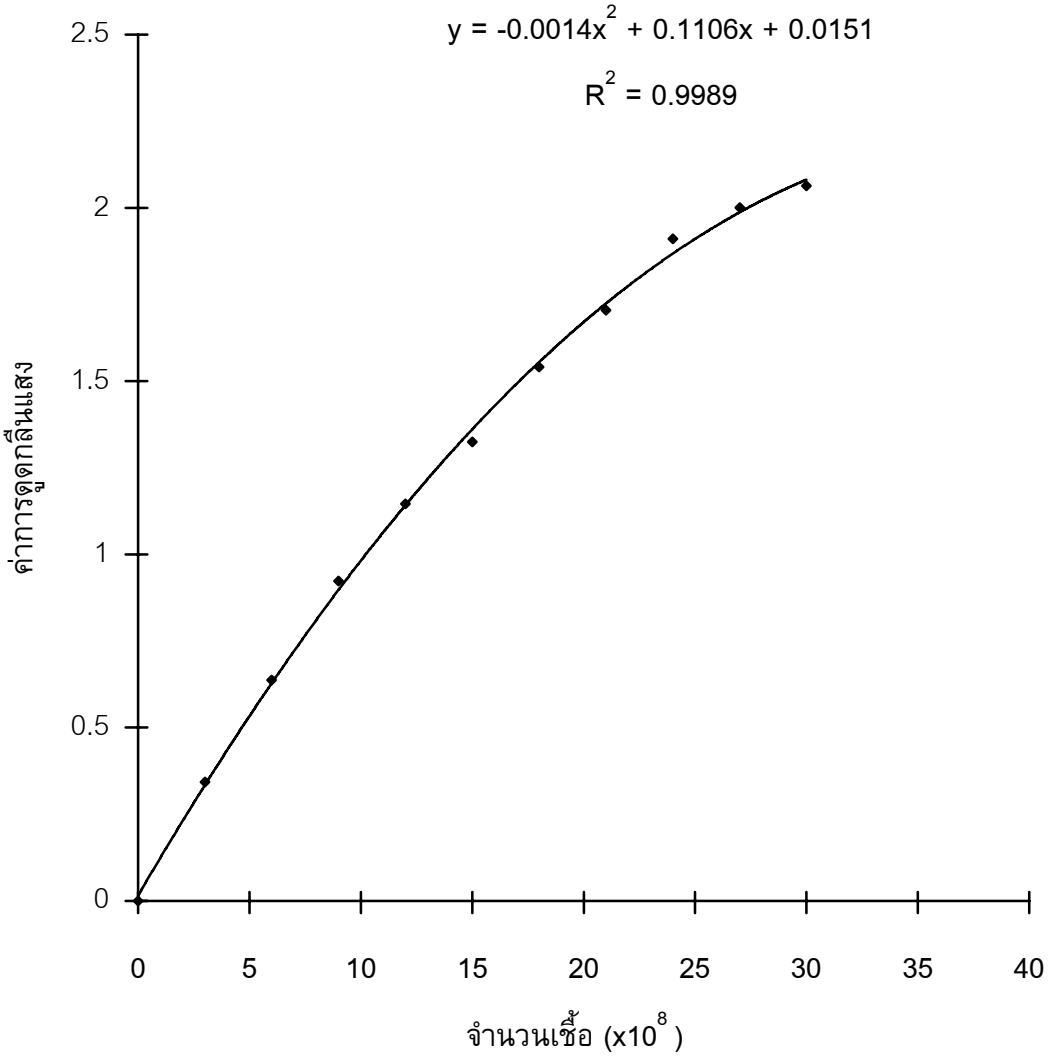
ภาพประกอบ 27 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะที่บรรจุแก๊สแพ็ค ที่ผลิตขึ้นและแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาต่างๆ

3.6 ผลศึกษาการเจริญเติบโตเชื้อแอนแอโรปที่บ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ โดยมีการทดลอง 3 ขั้นตอนดังนี้

3.6.1 การสร้างเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตกับจำนวนแบคทีเรียตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ซึ่งได้จากการนำผลค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟตทั้ง 10 หลอด ที่ทำการวัดด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และอาศัยหลักการของแมคฟาร์แลนด์ได้ผลดังตาราง 14 นำผลไปพล๊อตเส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนแบคทีเรียได้ผลดังภาพประกอบ 28

ตาราง 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรของสารละลายแบเรียมซัลเฟตที่ทำการวัดด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวปรับเทียบร่วมกับการใช้หลักการของแมคฟาร์แลนด์

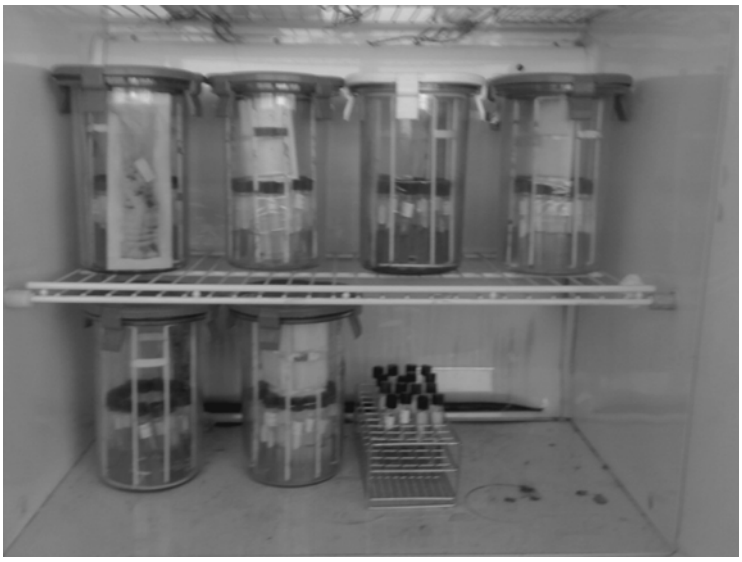
หลอดที่	ปริมาณสาร(มิลลิลิตร)		จำนวนแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อมิลลิลิตรที่สอดคล้องกับความขุ่นของสารละลาย ($x10^8$)	ค่าการดูดกลืนแสง
	$BaCl_2$ (ml)	H_2SO_4 (ml)		
1	0.1	9.9	3	0.343
2	0.2	9.8	6	0.637
3	0.3	9.7	9	0.923
4	0.4	9.6	12	1.146
5	0.5	9.5	15	1.324
6	0.6	9.4	18	1.541
7	0.7	9.3	21	1.705
8	0.8	9.2	24	1.911
9	0.9	9.1	27	2.001
10	1.0	9.0	30	2.063



ภาพประกอบ 28 เส้นโค้งมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบเรียมซัลเฟต กับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สอดคล้องกันตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์

3.6.2 การบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างแอนแอโรปด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ได้ทำการทดลองขึ้นดังภาพประกอบ 29 โดยใช้เชื้อ 4 ชนิดได้แก่ คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*C. perfringens*) คลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์ (*C.difficile*) คลอสตริเดียม ไบเฟอร์แมนแทนส์ (*C. bifermantans*) และ แบคทีรอยส์ ฟราจิลิส (*Bacteroides fragilis*) ได้รับการอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยเชื้อแต่ละชนิดได้เตรียมเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 หลอด โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น

และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ(ชุดควบคุม) ทำการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกันนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง ผลการบ่มเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 2 และ 3 แสดงดังตาราง 15 16 และ 17 ตามลำดับ และภาพประกอบ 30 31 และ 32 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 จะเห็นได้ว่า การเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 ในการทดลองทั้ง 3 ครั้งมีค่าใกล้เคียงกัน และชุดที่ 3 มีค่าน้อยมากหรือพบว่าไม่มีการเจริญเติบโต



ภาพประกอบ 29 แสดงการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างในภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์คภายในตู้บ่ม

ตาราง 15 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ (ชุดควบคุม)

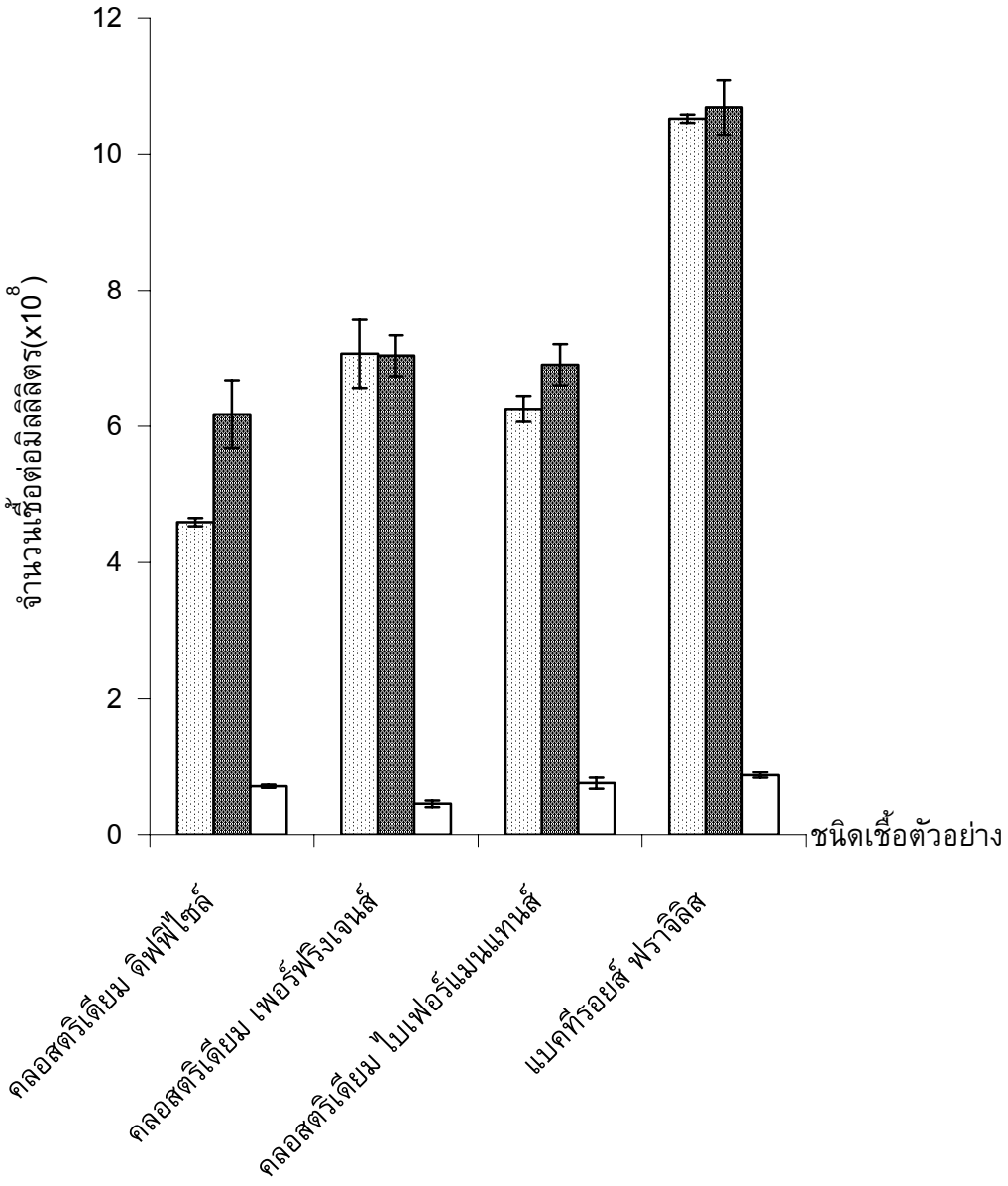
ชนิดเชื้อตัวอย่าง	จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร($\times 10^8$) [RSD(%)]		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
าลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์	4.6 [1.31]	6.2 [8.09]	0.7 [3.52]
าลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	7.1 [7.08]	7.0 [4.26]	0.5 [11.09]
าลอสตริเดียม ไบเฟอร์แมนแทนส์	6.3 [3.04]	6.9 [4.35]	0.8 [10.61]
เบคทีรอยส์ ฟราจิลิส	10.5 [0.57]	10.7 [3.74]	0.9 [4.57]

ตาราง 16 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ (ชุดควบคุม)

ชนิดเชื้อตัวอย่าง	จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร($\times 10^8$) [RSD(%)]		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
คลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์	3.9 [10.78]	5.7 [5.83]	0.7 [3.52]
คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	7.0 [0.29]	7.1 [3.52]	0.5 [11.09]
คลอสตริเดียม ไบเฟอร์แมนแทนส์	3.9 [1.28]	6.7 [6.01]	0.8 [10.61]
แบคทีรอยส์ ฟราจิลิส	10.2 [7.85]	10.7 [2.43]	0.9 [4.57]

ตาราง 17 แสดงจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยงครั้งที่ 3 โดยชุดที่ 1 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ชุดที่ 2 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น และชุดที่ 3 ทำการบ่มเพาะเลี้ยงในบรรยากาศปกติ (ชุดควบคุม)

ชนิดเชื้อตัวอย่าง	จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร($\times 10^8$) [RSD(%)]		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
คลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์	5.0 [20.38]	5.5 [5.50]	0.7 [3.52]
คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์	6.8 [4.43]	6.9 [1.45]	0.5 [11.09]
คลอสตริเดียม ไบเฟอร์แมนแทนส์	6.1 [8.14]	6.7 [1.49]	0.8 [10.61]
แบคทีรอยส์ ฟราจิลิส	10.4 [3.07]	10.5 [2.85]	0.9 [4.57]

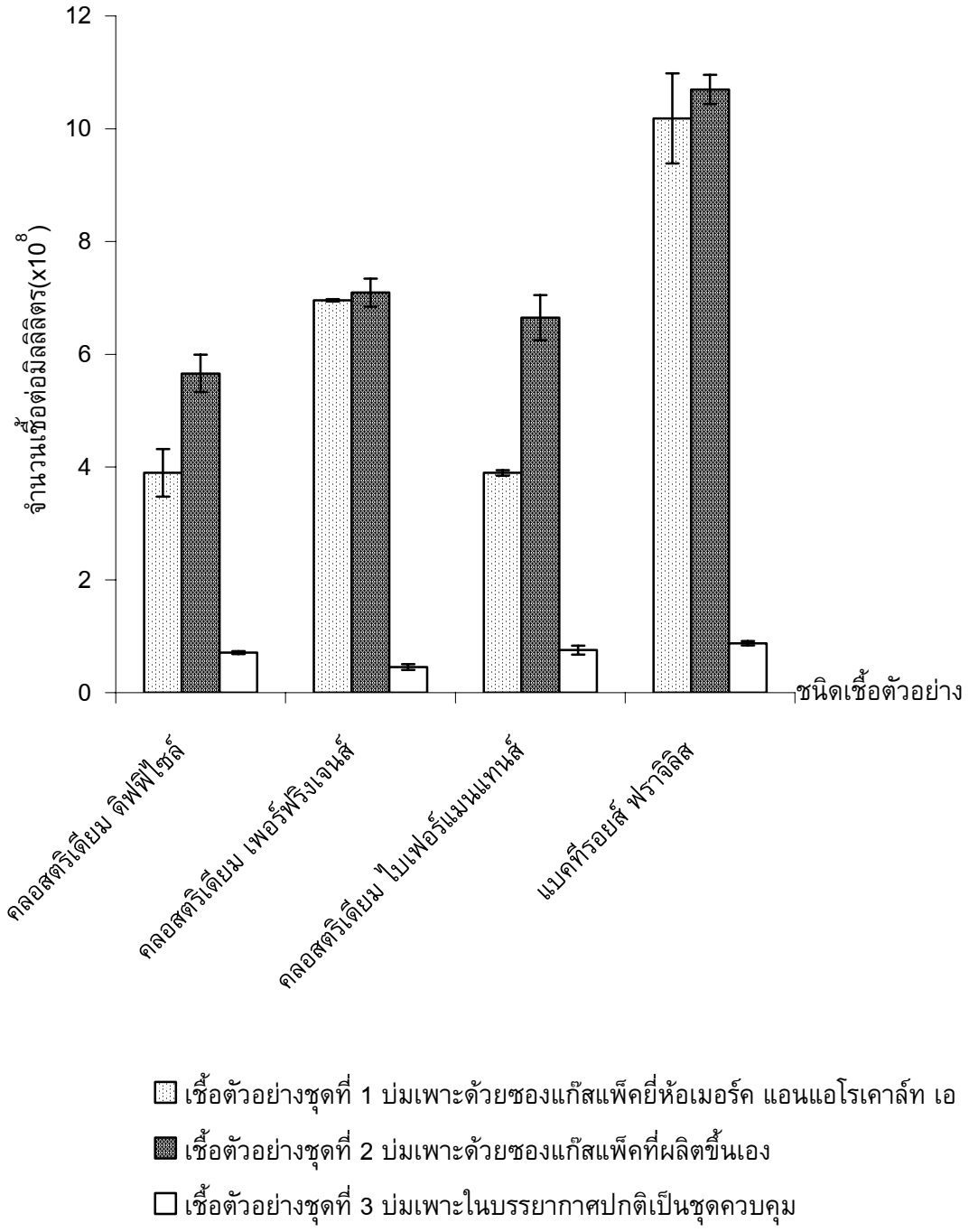


เชื้อตัวอย่างชุดที่ 1บ่มเพาะด้วยซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ

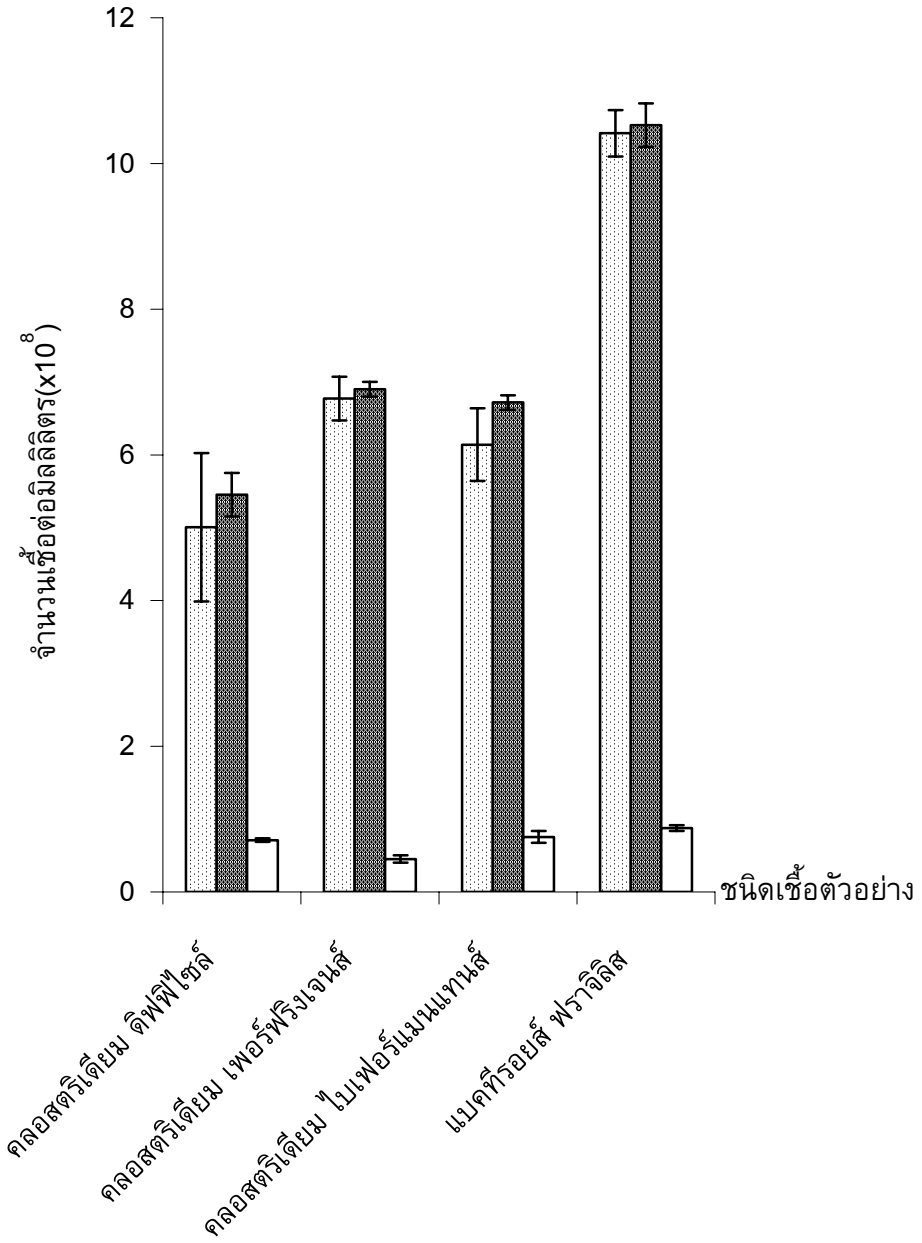
เชื้อตัวอย่างชุดที่ 2 บ่มเพาะด้วยซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเอง

เชื้อตัวอย่างชุดที่ 3 บ่มเพาะในบรรยากาศปกติเป็นชุดควบคุม

ภาพประกอบ 30 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 1



ภาพประกอบ 31 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 2



ภาพประกอบ 32 แสดงการเปรียบเทียบผลการบ่มเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อตัวอย่างที่เลี้ยงในบรรยากาศทั้ง 3 แบบ สำหรับจำนวนเชื้อตัวอย่างชุดที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการบ่มเพาะครั้งที่ 3

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตซองแก๊สแพ็คต้นทุนต่ำเพื่อการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแอนแอโรป สามารถสรุปได้ดังนี้

1. เงื่อนไขที่เหมาะสมของการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเพื่อการวัดและวิเคราะห์แก๊สต้องพิจารณาจากความสามารถในการแยกพีคของโครมาโทแกรมได้ดี มีเบสไลน์ที่ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะไม่นานเกินไป สำหรับในงานวิจัยพบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสมในการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีหัววัดแบบนำความร้อนคือ อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 31 ^{0}C เป็นเวลา 7 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิในอัตรานาทีละ 10 ^{0}C จนมีอุณหภูมิเท่ากับ 150 ^{0}C โดยให้กระแสไฟฟ้าแก่หัววัด 80 มิลลิแอมแปร์

2. จากการศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะที่ใส่ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ณ เวลาที่กำหนด ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ที่มีการนำไปใช้ในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปสามารถสร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะได้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแอนแอโรป คือ สามารถลดแก๊สออกซิเจนให้เหลือร้อยละ 5.73 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาที ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 8.99 โดยปริมาตร ในนาทีที่ 260 โดยสามารถรักษาสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะให้มีแก๊สออกซิเจนในปริมาณน้อย (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ตลอดการบ่มเพาะเลี้ยงหรืออย่างน้อย 48 ชั่วโมง (2880 นาที)

3. ผลสัมฤทธิ์ของซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเอง โดยการวัดวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าการผสมสารดูดซับแก๊สออกซิเจนยี่ห้อวอนเดอร์คีฟ 70 กรัม กรดออคซาริก 6 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต 8 กรัม เข้าด้วยกันแล้วแบ่งสารผสมบรรจุในซองที่ทำด้วยกระดาษกรองขนาด 7 x 20 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ซอง สามารถนำไปสร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแอนแอโรปได้ คือ สามารถลดแก๊สออกซิเจนให้เหลือร้อยละ 5.30 โดยปริมาตร ภายในเวลา 60 นาที ขณะที่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นจนมีค่าคงที่ประมาณร้อยละ 12.29 โดยปริมาตร ในนาทีที่ 160 โดยสามารถรักษาสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะให้มีแก๊สออกซิเจนในปริมาณน้อย (ไม่เกินร้อยละ 5 โดยปริมาตร) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ตลอดการบ่มเพาะเลี้ยงหรืออย่างน้อย 48 ชั่วโมง (2880 นาที) และเมื่อเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างแอนแอโรปในบรรยากาศที่ผลิตขึ้นเมื่อใช้ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นกับซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ด้วยวิธีการนับจำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตรตามหลักการของแมคฟาร์แลนด์ พบว่าเชื้อตัวอย่างมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบราคาของ

ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเองกับซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ พบว่าในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป 1 ครั้งในภาชนะปิดสนิทยี่ห้อเมอร์ค ปริมาตร 2.5 ลิตร ต้องใช้ซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ 1 ซอง ราคา 120.00 บาท แต่ถ้าใช้ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นเองต้องใช้ซองแก๊สแพ็คดังกล่าว 2 ซอง มีราคาประมาณ 35.00 บาท ต่อการบ่มเพาะเลี้ยงใน 1 ครั้ง หรือมีราคา 17.50 บาท ต่อซอง เท่านั้น

อภิปรายผลการทดลอง

1. จากการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีมาทำการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลโดยได้ศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สในอากาศซึ่งประกอบด้วย แก๊สออกซิเจน แก๊สไนโตรเจน แก๊สไฮโดรเจน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สอื่นๆ เป็นแก๊สตัวอย่างหลักที่ใช้ในการตรวจสอบผลการวัดและวิเคราะห์ทุกครั้ง หัววัดที่ใช้ในการทดลองนี้คือหัววัดแบบการนำความร้อนซึ่งหัววัดชนิดนี้สามารถนำมาวิเคราะห์สารตัวอย่างดังกล่าวโดยตั้งกระแสไฟฟ้าให้แก่หัววัด 80 มิลลิแอมแปร์ และใช้แพ็คคอลัมน์ โดยในการปรับเทียบตอนเริ่มต้นได้ใช้แก๊สมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย แก๊สไฮโดรเจนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร แก๊สออกซิเจนร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สไนโตรเจนร้อยละ 5.07 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร แก๊สมีเทนร้อยละ 4.05 โดยปริมาตร แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.06 โดยปริมาตร และแก๊สฮีเลียมร้อยละ 71.64 โดยปริมาตร เป็นแก๊สตัวอย่าง และตั้งค่าการวิเคราะห์ที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์คงที่ที่อุณหภูมิ 31 ^{0}C นาน 7 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิในอัตรานาทีละ 10 ^{0}C จนมีอุณหภูมิเท่ากับ 150 ^{0}C

สำหรับความน่าเชื่อถือของการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สในอากาศที่ทำการทดลองทุกครั้งก่อนทำการทดลองศึกษาบรรยากาศของการใช้ซองแก๊สแพ็คจะเห็นได้ว่าจากการทดลองทำซ้ำ 50 ครั้ง ในช่วงวันและเวลาที่แตกต่างกันได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณแก๊สแต่ละชนิดน้อยกว่าร้อยละ 1.5 โดยปริมาตร ซึ่งนับว่าข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือดีมาก แต่เมื่อนำไปวัดแก๊สในบรรยากาศภายในภาชนะที่บรรจุซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นและซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ปรากฏว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูงมากเนื่องจากได้ทำการทดลองซ้ำเพียง 3 ครั้งเท่านั้น และเนื่องจากการเติมน้ำของซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ต้องทำอย่างรวดเร็วจึงทำให้การกระจายของน้ำที่ใส่ในซองแก๊สแพ็คสัมผัสกับสารภายในซองไม่ทั่วถึงจึงมีผลทำให้ปริมาณแก๊สภายในภาชนะ ณ เวลาต่างๆ แตกต่างกันมาก โดยเฉพาะพีคของแก๊สไนโตรเจนที่อยู่ติดกับพีคของแก๊สออกซิเจนมีการซ้อนทับกันเล็กน้อย เมื่อแก๊สออกซิเจนลดลงไปเรื่อยๆ การหาพื้นที่ใต้พีคของแก๊สทั้งสองชนิดที่อยู่ติดกันก็มีโอกาสถูกต้องน้อยลง ขณะที่แก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เป็นพีคเดี่ยวๆ จึงทำให้การหาพื้นที่ใต้พีคของแก๊สทั้ง 2 ชนิดทำได้ดีกว่า แต่สำหรับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่สูงกว่าแก๊สไฮโดรเจนเนื่องจากพีคของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อยู่บนเบสไลน์ที่สูง จึงทำ

ให้การหาค่าพื้นที่ใต้พีคได้ถูกต้องแม่นยำน้อยกว่าของแก๊สไฮโดรเจน และเนื่องจากแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สออกซิเจนที่เกิดขึ้นในภาชนะมีปริมาณน้อยมากจึงทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแก๊สทั้งสองมีค่าสูงกว่าแก๊สไนโตรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดในปริมาณที่มากกว่า แต่เมื่อพิจารณาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแก๊สต่างๆ ที่วิเคราะห์สำหรับซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น ปรากฏว่ามีค่าต่ำกว่าของซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ แสดงว่าวิธีการให้น้ำทำปฏิกิริยากับสารเคมีในซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นนับว่ามีความแน่นอนกว่าการเติมน้ำของซองแก๊สแพ็คยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ

2. ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้น จากงานวิจัยนี้ราคาต้นทุนประมาณซองละ 17.50 บาท โดยแต่ละครั้งในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรปต้องใช้ 2 ซอง คิดเป็นต้นทุนราคาประมาณ 35 บาท ดังนั้นถ้านำไปพัฒนาผลิตเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการค้า ราคาต้นทุนในการผลิตต่อซองก็น่าจะมีราคาต่ำกว่านี้

3. งานวิจัยในครั้งนี้ผลของการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน นั่นแสดงว่าสามารถใช้ซองแก๊สแพ็คที่ผลิตขึ้นสามารถสร้างสภาวะบรรยากาศภายในภาชนะให้เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรป แทนซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ได้ ในงานวิจัยครั้งนี้แต่ละครั้งในการบ่มเพาะเลี้ยงได้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเชื้อละ 3 หลอด และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลองในแต่ละครั้ง และทำการบ่มเพาะ 3 ครั้ง เพื่อตรวจสอบคุณภาพของซองแก๊สแพ็คว่าสามารถใช้แทนซองแก๊สแพ็คของยี่ห้อเมอร์ค แอนแอโรเคาล์ท เอ ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวัดและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแก๊สด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีให้ถูกต้องน่าเชื่อถือนั้นต้องเลือกหัววัด และคอลัมน์ ที่เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ โดยต้องศึกษาเงื่อนไขต่างๆ ที่เหมาะสมในการปรับตั้งค่าให้แก่หัววัด คอลัมน์ และโปรแกรมในการวัดเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีและน่าเชื่อถือ จำเป็นที่ต้องระมัดระวังในการเก็บสารตัวอย่างและฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี การวัดและวิเคราะห์จะได้ผลที่มีความแม่นยำดีต้องควบคุมปริมาณของสารตัวอย่างให้คงที่เสมอ เพื่อป้องกันการรั่วออกของสารตัวอย่างทุกครั้งในการฉีดสารเข้าเครื่อง ต้องฉีดสารอย่างรวดเร็ว และเมื่อทำการฉีดสารเข้าเครื่องครบ 50 ครั้งต้องเปลี่ยนจุกยาง (septum) ที่บริเวณส่วนฉีดสารตัวอย่างของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

2. ในการศึกษาชนิดและปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในภาชนะทุกครั้งก่อนใส่ซองแก๊สแพ็คต้องตรวจวัดปริมาณแก๊สตั้งต้นแต่ละชนิดภายในภาชนะทุกครั้งเพื่อแสดงว่าอากาศในภาชนะเป็นอากาศปกติทั่วไป

3. การศึกษาผลสัมฤทธิ์ในการบ่มเพาะเชื้อด้วยวิธีการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีของแมคฟาร์แลนด์จำเป็นต้องใช้ความระมัดระวังสูงในการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นๆ เนื่องจากเป็นการวัดความขุ่นหรือค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น ถ้ามีการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นๆ ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีมากกว่าปกติ ทำให้ได้ผลการนับจำนวนเชื้อไม่ถูกต้อง

4. ในการนับจำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตรต้องทำให้เชื้อแอนแอโรปในหลอดทดลองกระจายตัวให้สม่ำเสมอก่อนทำการนับเพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการกระจายเชื้อภายในหลอดด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองก่อนนำไปทำการนับด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ดวงพร คันธโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้น-ติ้ง เฮ้าส์.

ปุลพร เหว่าสำเนียง. (2548). *วิธีที่รวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในตัวอย่างน้ำโดยเทคนิคมัลติคาพิลลารีคอลัมน์แก๊สโครมาโทกราฟี*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2539). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

ระติพร หาเรือนกิจ. (2001). MAT กับการยืดอายุผักสดแปรรูปเล็กน้อย. *โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง*. pp25-28.

ศิริพรรณ วงศ์วานิช. (2538). *การตรวจวินิจฉัยเชื้อบักเตรีไร้อากาศในห้องปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ : กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. pp1-14.

Alexander, I. & Ivo, H. (1996). Continuous Monitoring of Oxygen Concentrations in Several Systems for Cultivation of Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 7(34) : pp1646-1648.

Braun, R.D. (1987). *Introduction to Instrumental Analysis*. N.Y : McGraw-Hill Book Co.

Brock, T. D. (1988). *Biology of Microorganisms* . New Jersey : Prentice-Hall Englewood Cliffs.

Connie, R. M. & George, M. (2000). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2nd Edition, London : W.B Saunders Company.

Gas Chromatograph GC-17A Ver.3 User's Manual (1995). Shimadzu corporation. Kyoto.

Golay, M. J. E; et al. (1975). *Gas Chromatography*. New York : Academic Press.

Howard, R. A. & Sydney, M. F. (1970,March). A Miniature Anaerobic Jar for Tissue Transport or for Cultivation of Anaerobes. *Miniature Jar For Anaerobes*.(53) : pp.383-388.

Ingraham, J. L; et al. (1994). *Introduction to microbiology*. USA : W.A. Bsworth Publishing Company.

Kellner, R; et al. (1997). *Analytical chemistry.* VCH, Weinheim, Germany.

Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians.* New York : Lewis Puplishers ACR.C Press Company.

Koneman, E. W; et al. (1988). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. New York : McGraw-Hill Book Company.

Lennette, E. H; et al. (1985). *Manual of Clinical Microbiology.* 4th Edition. Washington DC : American society for Microbiology.

Lisa, A. S; et al. (1999). *Essentials of Diagnostic Microbiology*. USA : An international Thomson Publishing Company.

Prescott, L.M; et al. (1993). *Microbiology*. 2nd Edition. USA : Wm.c. Brown Commonications,Inc.

Robert, L. (1985). *Modern Practice of Gas Chromatography.* 2nd Edition. Singapore : John Wiley & Sonc. Inc.

Skoog, A. D. (1992). *Principles of Instrument Analysis.* 4th Edition. United State : Saunders College Publishing.

Willett, J. E. (1991). *Gas Chromatography*. Singapore : John Wiley & Sonc. Inc.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางมนฑกาน อรรถสงเคราะห์
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 25 พฤศจิกายน พุทธศักราช 2519
สถานที่เกิด	อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	181/437 ถนนเจริญประดิษฐ์ ต. รูสะมิแล อ. เมือง จ. ปัตตานี 94000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2536	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีพัทลุง จังหวัดพัทลุง
พ.ศ. 2540	วท.บ.(ศึกษาศาสตร์)วิชาเอกฟิสิกส์ จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
พ.ศ. 2549	กศ.ม.(สาขาวิชาฟิสิกส์) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ