

ภาคผนวก จ

คู่มือ

กิจกรรมบทเรียนวิทยาศาสตร์ท้องถิ่น
การพัฒนาคุณภาพดินสอพอง

เรื่อง

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพอง
ระดับอุดมศึกษา

อาจารย์เจนจิรา เดชรักษา

ใบกิจกรรมที่ 1

แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ในดินสอพอง

จุดประสงค์

1. เพื่อให้ นักศึกษามีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับวัตถุดิบ และกระบวนการผลิตดินสอพอง
2. เพื่อให้ นักศึกษาได้ใช้ทักษะการสังเกต การรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ในดินสอพองได้

หลักการ

บ้านหินสองก้อน ตำบลทะเลชุบศร อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี เป็นชุมชนที่ผลิตดินสอพองเป็นอาชีพ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของจังหวัด มีการถ่ายทอดภูมิปัญญาการผลิตจากอดีตถึงปัจจุบันเป็นเวลาเป็นร้อยปี ขั้นตอนการผลิตดินสอพองเริ่มจากนำดินมาร์ลมาละลายในบ่ออากาศและกรองด้วยตะแกรงลงในบ่อกรองหรือบ่อเนื้อ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วตักดินโคลนดินสอพองหยอดในแม่พิมพ์ พอหมาดนำไปวางบนตะแกรงไม้ไผ่ฟุ้งแดดให้แห้ง องค์ประกอบของดินสอพองประกอบด้วยธาตุแคลเซียมเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 79-86% มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 9.5

เนื่องจากในกระบวนการผลิตดินสอพองมีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ ดิน น้ำ และอากาศ รวมทั้งดินมาร์ลซึ่งแหล่งวัตถุดิบของดินสอพองนั้นเป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์จำนวนมาก ดังนั้นดินสอพองจึงมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อยู่เสมอ ในปี พ.ศ. 2544 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินสอพองจากแหล่งผลิต พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมดปนเปื้อนปริมาณ 39,000-1,200,000 โคโลนีต่อกรัม หากจุลินทรีย์สามารถเข้าสู่ร่างกายทางตา บาดแผลและผิวหนัง อาจทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรง จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดบาดแผลเนื้อเน่าตาย และหากปนเปื้อนในอาหารอาจทำให้เกิดท้องร่วง ท้องเสียได้ การผลิตดินสอพองในระดับครัวเรือนอาจมีการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้โดยการใช้ความร้อน

วิธีการทดลอง

1. สํารวจวัตถุดิบ วิธีการผลิต และสิ่งแวดล้อมรอบบริเวณแหล่งผลิตดินสอพอง โดยการสังเกต และสอบถามจากผู้ผลิต บันทึกลงในใบงานที่ 1 ตอนที่ 1

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
|--|--|--|--|

ตอนที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดินสอพองที่เก็บจากแหล่งผลิต

ชื่อแหล่งผลิตดินสอพอง.....

วัน เดือน ปี ที่สำรวจ

ผู้สำรวจ.....

| ลำดับ ตัวอย่างดินสอพอง | ลักษณะทางกายภาพ ของดินสอพอง |
|---------------------------|--------------------------------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดหลังการทดลอง

1. จากการสำรวจแหล่งผลิตดินสอพอง นักศึกษาคิดว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในดินน่าจะมาจากแหล่งหรือขั้นตอนการผลิตใดบ้าง

.....

.....

.....

2. ลักษณะทางกายภาพของดินสอพองทั่วไปมีลักษณะอย่างไร

.....

.....

.....

ใบกิจกรรมที่ 2

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพอง

- จุดประสงค์**
1. สามารถอธิบายหลักการและขั้นตอนของการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพองโดยวิธีนับจากจานเพาะเลี้ยง
 2. สามารถวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินสอพองได้

หลักการ

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินสอพอง ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ เป็นวิธีการหนึ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของดินสอพอง โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในดินสอพอง และนับจุลินทรีย์จากจานเพาะเลี้ยง (Standard plate count method) โดยวิธี Pour plate method

การนับจุลินทรีย์จากจานเพาะเลี้ยงโดยใช้ Pour plate method เป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยใช้เทคนิคการทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างเจือจางลงด้วยน้ำกลั่น หรือน้ำเกลือ 0.85% ใส่ตัวอย่างดินสอพองเจือจางในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมละลายแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงนำเข้าบ่มเพาะเชื้อตามอุณหภูมิที่กำหนด เมื่อครบเวลานำจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีไปนับจำนวน คำนวณค่าเป็น CFU/g หรือ ml

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างดินสอพอง
2. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
3. ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อ
4. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar (PCA)

วิธีการทดลอง

1. การทำการเจือจางตัวอย่างหรือเชื้อที่จะตรวจนับ

1.1 ชั่งตัวอย่างดินสอพอง 10 กรัม ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นมาเชื้อ 90 มล. จะได้ความเจือจางเท่ากับ 1 : 10 หรือ 10^{-1} เขย่าให้เข้ากันดี

1.2 ปิ่ปเตสารละลายดินสอพองจากข้อ 1.1 มา 1 มล. ใส่ในน้ำกลั่น 9 มล. เขย่าให้ตัวอย่างกระจายอย่างสม่ำเสมอ จะได้ความเจือจาง 1 : 100 หรือ 10^{-2} และเจือจางต่อจนได้ความเจือจาง 1 : 1,000 1 : 10,000 และ 1 : 100,000

2. การเทอาหารและผสมเชื้อในงานเพาะเชื้อ

2.1 หลอมอาหาร Plate Count Agar (PCA) และวางให้เย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส

2.2 ปิ่ปเตสารละลายตัวอย่างดินสอพองที่ความเจือจางต่างๆ ความเจือจางละ 1 มล. ใส่ลงงานเพาะเชื้อ 2 งาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.1 ลงในงานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยการหมุนงานเพาะเชื้อ โดยหมุนงานขึ้น-ลง 5 ครั้ง วนขวา-ซ้าย 5 ครั้ง วนตามเข็มนาฬิกา-ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง กว่างานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.3 ทำการบันทึกผลหลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง เลือกนับโคโลนีจากงานอาหารที่มีโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี นำจำนวนโคโลนีมาคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด} = \text{จำนวนโคโลนี} \times \text{dilution factor}$$

$$\text{dilution factor} = \text{ส่วนกลับการเจือจางของงานเพาะเชื้อที่สามารถนับโคโลนี}$$

ผลการทดลอง

| ตัวอย่างดินสอพอง | ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g) |
|------------------|---------------------------------|
| | |
| | |
| | |
| | |

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....
.....
คำถามท้ายการทดลอง

1. โคลโลยี คือ.....

2. เพราะเหตุใดจึงต้องเจือจางตัวอย่างดินสอพองก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

.....
.....
3. จงบอกข้อควรระวังในการทำปฏิบัติการครั้งนี้

ใบกิจกรรมที่ 3

คุณภาพทางจุลชีววิทยาของดินสอพอง

จุดประสงค์

สามารถระบุคุณภาพทางจุลชีววิทยาของดินสอพอง โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของดินสอพอง

หลักการ

ดินสอพองเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น การทำแป้งน้ำ ยาสีฟัน สีทาบ้าน ใช้สำหรับตกแต่งเครื่องเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ และยังมีควมหมายอย่างมากในแง่การอนุรักษ์วัฒนธรรมไทย ซึ่งใช้ในเทศกาลสงกรานต์ นอกจากนี้ในปัจจุบันนิยมนำดินสอพองมาเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเป็นเครื่องสำอาง หากกระบวนการผลิตดินสอพองซึ่งเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนไม่ถูกสุขลักษณะเพียงพอ อาจมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ในปี 2544 กองเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิเคราะห์ตัวอย่างด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ดินสอพองจากจังหวัดลพบุรี พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดินสอพองตั้งแต่ 39,000-1,200,000 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 12 (พ.ศ. 2536) และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนดินสอพองกำหนดให้จุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัม ต้องไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*, *Salmonella*, และ *Clostridium* sp. หากจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าสู่ร่างกายทางตา ผิว บาดแผล อื่นๆ และกระแสดโลหิต อาจมีผลให้เกิดการอักเสบรุนแรง และหากจุลินทรีย์เข้าร่างกายอาจทำให้อาหารเป็นพิษ

การปฏิบัติกิจกรรม

1. ให้นักศึกษาค้นคว้าด้วยตัวเองเกี่ยวกับมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของดินสอพองและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และวิธีการลดปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพอง
2. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในดินสอพองจากแหล่งผลิตกับมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาต่างๆ
3. นักศึกษานำเสนอผลงานร่วมกัน

เอกสารอ้างอิง

ดินสอพอง. 2549. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก

http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_cosmetic/a_ch_3_0011c.asp?info_id=123)

ธาดา วิมลวัตรเวที. 2534. **คู่มือการสอนภาคปฏิบัติการ วิชา สข 214 วิชาจุลชีววิทยาในทางสาธารณสุข.**

ภาควิชาสุขศึกษา คณะพลศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 141 หน้า

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2549. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.fda.moph.go.th/fda-net/>

[html/product/cosmetic/cosmetic/dat/law/MOPH_Notification_12.pdf](http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/cosmetic/cosmetic/dat/law/MOPH_Notification_12.pdf)

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2536. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ : นวกนก. 327 หน้า

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ดินสอพองแปรรูป. 2549 [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก:

http://www.tisi.go.th/otop/pdf_file/tcps453_47.pdf

สวยด้วยดินสอพอง. 2549. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก

<http://www.geocities.com/dhealth061/beauty2.htm>

แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ก่อนและหลังเรียน
บทเรียนวิทยาศาสตร์ท้องถิ่น เรื่องการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพอง

คำสั่ง จงเลือกคำตอบที่ถูกต้องเพียงคำตอบเดียว

1. จุลินทรีย์ที่พบในดินสอพองมีการปนเปื้อนมาจากที่ใด
ก. ดิน
ข. น้ำ
ค. อากาศ
ง. ถูกทุกข้อ
2. แหล่งผลิตดินสอพองที่สำคัญในจังหวัดลพบุรีอยู่ที่ตำบลใด
ก. บ้านท่าแค
ข. บ้านถนนใหญ่
ค. บ้านท่ากระยาง
ง. บ้านหินสองก้อน
3. วัตถุประสงค์ที่นำมาผลิตดินสอพอง คือ
ก. ดินมาร์ล
ข. หินปูน
ค. ดินนวล
ง. ปูนขาว
4. ผู้ผลิตดินสอพองทำการลดปริมาณจุลินทรีย์ในดินสอพองได้โดยวิธีใด
ก. เติมน้ำปูนไฟ
ข. กรองด้วยผ้าขาวบางหลายๆชั้น
ค. ตากแดดให้ดินแห้งที่สุด
ง. การให้ความร้อนโดยการระเหย
5. นักศึกษาคิดว่าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ดินสอพองที่วางขายในท้องตลาด มาจากสาเหตุใด
ก. แหล่งน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตดินสอพองปนเปื้อนน้ำทิ้งจากชุมชน
ข. ผลิตภัณฑ์ดินสอพองไม่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์โดยการให้ความร้อน
ค. แหล่งดินที่ใช้ในการผลิตมีการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากมนุษย์ สัตว์ และขยะ
ง. ถูกทุกข้อ
6. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน “ดินสอพอง” กำหนดว่า จุลินทรีย์ที่พบในดินสอพองต้องมีปริมาณเท่าใด
ก. 10 CFU/g
ข. 100 CFU/g
ค. 1,000 CFU/g
ง. 10,000 CFU/g
7. ข้อใดเป็นประโยชน์ในด้านต่างๆของดินสอพอง
ก. เครื่องสำอาง
ข. ก่อสร้าง
ค. อาหาร
ง. ถูกทุกข้อ

8. มนุษย์สามารถรับจุลินทรีย์ก่อโรคในดินสอพองโดยวิธีใดมากที่สุด
- ก. การหลุ่รูดเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยตรงผ่านบาดแผล
 - ข. การรับประทานโดยตรง
 - ค. การหายใจเอาดินสอพองเข้าไป
 - ง. ผิวหนังสัมผัสกับดินสอพองโดยตรง
9. จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในดินสอพองสามารถก่อให้เกิดโรคใด
- ก. ปวดบวม
 - ข. เนื้อเน่าตาย
 - ค. แอนแทรกซ์
 - ง. บาดทะยัก
10. โดยทั่วไปค่าความเป็นกรด-ด่างของดินสอพองเป็นแบบใด
- ก. กรด
 - ข. กลาง
 - ค. ด่าง
 - ง. ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต
11. จุลินทรีย์ชนิดใดที่พบมากที่สุดที่สุดในดินสอพอง
- ก. ไวรัส
 - ข. แบคทีเรีย
 - ค. ยีสต์
 - ง. โปรโตซัว
12. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินสอพอง คือ
- ก. MacConkey
 - ข. Nutrient broth
 - ค. Potato Dextrose Agar
 - ง. Plate Count Agar
13. วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จากดินสอพองโดยการเกลี่ยตัวอย่างดินสอพองลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เรียกว่า
- ก. Spread plate
 - ข. Pour plate
 - ค. Inoculated plate
 - ง. Streak plate
14. Aseptic technique คือ
- ก. เทคนิคการทำให้ไร้จุลินทรีย์
 - ข. เทคนิคการนับจำนวนจุลินทรีย์
 - ค. เทคนิคการใช้เครื่องมือทางจุลชีววิทยา
 - ง. เทคนิคการแยกจุลินทรีย์ออกจากสิ่งแวดล้อม
15. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อใดที่บ่งบอกว่าสามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จากดินสอพองได้
- ก. อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น
 - ข. มีจุดหรือกลุ่มเซลล์เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - ค. เกิดบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - ง. ถูกทุกข้อ

16. ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ งานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปิเปต ควรทำการให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีใด
- ก. อบด้วยความร้อนจากตู้อบลมร้อน
 - ข. ึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน
 - ค. ล้างให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง
 - ง. แช่น้ำยาฆ่าเชื้อก่อนนำมาล้างให้สะอาด
17. “โคโลนี” คือ
- ก. กลุ่มเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทำให้อาหารขุ่น
 - ข. กลุ่มเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง มีลักษณะเป็นจุดขนาดต่างๆ
 - ค. จำนวนจุลินทรีย์ 1 เซลล์
 - ง. จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลาที่กำหนด
18. จำนวนโคโลนีที่สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดนั้น ต้องเลือกจากงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีจำนวนเท่าใด
- ก. 0-30 โคโลนี
 - ข. 3-30 โคโลนี
 - ค. 30-300 โคโลนี
 - ง. 300-3,000 โคโลนี
19. จุลินทรีย์ที่พบในดินสอพองมีหลายชนิด นักศึกษาคิดว่าจุลินทรีย์เหล่านั้นมีอันตรายต่อมนุษย์ทุกชนิดหรือไม่
- ก. ใช่ เพราะจุลินทรีย์ทุกชนิดสามารถก่อโรคในร่างกายมนุษย์ได้
 - ข. ไม่ใช่ เพราะจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ไม่สามารถเจริญในดินสอพองได้
 - ค. ใช่ เพราะจุลินทรีย์ในดินสอพองสามารถฉวยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ได้
 - ง. ไม่ใช่ เพราะจุลินทรีย์ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในดินและบางชนิดเท่านั้นที่สามารถก่อโรคได้
20. การทำดินสอพองปราศจากจุลินทรีย์ ควรใช้วิธีการใดจึงจะเหมาะสมที่สุด
- ก. การนึ่งภายใต้ความดัน
 - ข. การตากแดดเป็นเวลานาน
 - ค. การอบแห้งที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส
 - ง. การกรองดินสอพองผ่านผ้าขาวบางหลายๆครั้ง