รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาสูตรและรูปแบบชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ

โดย

แผนกอนามัยสิ่งแวดล้อม กองอนามัย
ฝ่ายแพทย์และอนามัย การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย

ธันวาคม 2555

บทคัดย่อ

ฝ่ายแพทย์และอนามัย การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) รับผิดชอบดูแลสุขภาพอนามัยของผู้ปฏิบัติงาน จึงมีการเฝ้าระวังตรวจสอบคุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรียตามวิธีการมาตรฐาน ซึ่งต้องมีการตรวจสอบควบคุมคุณภาพน้ำอย่างต่อเนื่องและเป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง เมื่อ พ.ศ. 2543 ฝ่ายแพทย์และอนามัยได้วิจัยและผลิตชุดตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำอย่างง่าย (Egat Aqua test) โดยสามารถใช้งานได้สะดวกขึ้น ให้ผลการทดสอบรวดเร็วกว่าเดิม มีความถูกต้อง เพื่อสนับสนุนให้หน่วยงานภูมิภาคของ กฟผ. สามารถดำเนินการตรวจสอบคุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรียได้เองในเบื้องต้นอย่างต่อเนื่อง และสามารถแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำได้ทันเหตุการณ์ โดยผลิตและจัดส่งชุดตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำให้หน่วยงานต่างๆ ของ กฟผ. ทั่วประเทศปีละ 21,000 ชุด แต่บางหน่วยงานน้ำมีสภาพเป็นกรดทำให้การอ่านผลชุดทดสอบผิดพลาด และชุดทดสอบเสียจากการขนส่งร้อยละ 5 ฝ่ายแพทย์และอนามัยจึงได้วิจัยเพื่อพัฒนาสูตรและรูปแบบชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำแบบใหม่ที่มีความถูกต้องในการทดสอบมากขึ้น ลดระยะเวลาในการทดสอบ และเปลี่ยนรูปแบบของชุดทดสอบใหม่เพื่อลดการเสียจากการขนส่ง

การวิจัยได้พัฒนาสูตรน้ำยาทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย 4 สูตร มีส่วนผสมที่แตกต่างกัน และได้เปลี่ยนรูปแบบของชุดทดสอบโดยใช้สำลีเป็นวัสดุดูดซับน้ำยาทดสอบ ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ โดยนำน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากหน่วยงานส่วนกลางและภูมิภาค ของ กฟผ. จำนวน 149 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาแบคทีเรียโคลิฟอร์มตามโดยวิธีมาตรฐาน เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำยาทดสอบสูตร 1 ถึง 4 ผลการวิจัยพบว่าน้ำยาทดสอบสูตรที่ 2 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป มีความถูกต้องสูงกว่าร้อยละ 97.3 และมีความไวของการทดสอบสูงกว่าชุดทดสอบเดิม โดยชุดทดสอบเดิมสามารถตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ตั้งแต่ 13 MPN/100 ml ขณะที่ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มได้ตั้งแต่ 6 MPN/100 ml ขึ้นไป

จากผลการวิจัยครั้งนี้ได้น้ำยาทดสอบที่มีความไวของการสูงเทียบได้กับวิธีมาตรฐาน วิธีการตรวจไม่ยุ่งยาก ได้ผลการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง ลดความผิดพลาดในการอ่านผล และลดการเสียของชุดทดสอบจากการขนส่ง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำชุดทดสอบที่พัฒนานี้ไปใช้ติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำด้านแบคทีเรียในหน่วยงานส่วนภูมิภาคของ กฟผ. อันส่งผลให้การแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำเป็นไปอย่างฉับไว ทันการณ์

ครอบคลุมพื้นที่ ซึ่งเป็นมาตรการหนึ่งในการเฝ้าระวังโรคต่าง ๆ เนื่องจากน้ำเป็นสื่อ และยังเป็นการส่งเสริมสุขภาพผู้ปฏิบัติของ กฟผ. ให้บริโภคอุปโภคน้ำที่สะอาดปลอดภัย

คำนำ

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ การอุปโภคบริโภคน้ำที่สะอาดในชีวิตประจำวันทำให้ปลอดภัยจากโรคติดต่อต่างๆที่มีน้ำเป็นสื่อ และยังเป็นการเสริมสร้างสุขภาพที่ดีอีกด้วย ตามกฎหมายแรงงานได้กำหนดให้หน่วยงานหรือสถานประกอบการต่าง ๆ ต้องจัดหาน้ำบริโภคที่สะอาดและมีปริมาณเพียงพอให้แก่ผู้ปฏิบัติงานภายในหน่วยงาน ประกอบกับ กฟผ. มีหน่วยงานภายในมากมายกระจายอยู่ตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ การดูแลสวัสดิการน้ำอุปโภคบริโภคที่สะอาดให้ทั่วถึงต่อเนื่องภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ จึงเป็นไปอย่างยากลำบาก การควบคุมคุณภาพน้ำอุปโภคบริโภคที่ กฟผ. จัดหาให้มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐาน การควบคุมคุณภาพน้ำมีความจำเป็นต้องทราบผลการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง ฝ่ายแพทย์และอนามัยซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบตรวจสอบคุณภาพน้ำด้านแบคทีเรีย จึงได้ทำการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรสำหรับตรวจสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่มีอยู่เดิม ให้ได้ผลการตรวจสอบที่มีความถูกต้องยิ่งขึ้น มีความถูกต้องสูงเทียบเคียงได้กับวิธีมาตรฐาน ให้หน่วยงานส่วนภูมิภาคสามารถตรวจสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียได้เองโดยบุคลากรภายในหน่วยงาน โดยผลิตในรูปแบบที่สามารถลดการเสียจากการขนส่งและลดความผิดพลาดในการอ่านผล แจกจ่ายให้หน่วยงานต่าง ๆ เพื่อให้สามารถแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำได้อย่างฉับไว ทันการณ์ ครอบคลุมพื้นที่

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	**2**
คำนำ	**3**
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	8
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน	9
1.3 สมมุติฐาน	9
1.4 ขอบเขตของโครงงานที่ทำการศึกษา	9
1.5 นิยามคำศัพท์	9
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงงาน	10
1.7 กรอบแนวคิด	10
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	
2.1 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria)	11
2.2 วิธีการตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ในน้ำ	12
2.3 การตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ในน้ำอย่างง่าย	16
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 รูปแบบงานวิจัย 20

3.2 สถานที่ทำการศึกษา 20

3.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์ 20

3.4 สารเคมี 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 วิธีการศึกษา 21

3.6 ระยะเวลาในการศึกษาวิจัย 24

3.7 สถิติที่ใช้ในการวิจัย 24

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานกับอาหาร 4 สูตร 25

4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีมาตรฐานกับอาหาร 4 สูตร 36

4.3 การวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบ 37

4.4 Detection Limit 39

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 41
5.2 ข้อเสนอแนะ 41

เอกสารอ้างอิง 42

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. 44
- วิธีการเก็บน้ำตัวอย่างและ การเก็บรักษาตัวอย่าง (Preservation and storage)

ภาคผนวก ข. 46
- ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติจากตารางความสัมพันธ์ 2 ทาง

ภาคผนวก ค. 50
- ภาพการทดลอง

ภาคผนวก ง. 52
- สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 แสดงปริมาตรตัวอย่างน้ำกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth ที่เหมาะสม 13
ตารางที่ 2-2 แสดงปริมาตรตัวอย่างน้ำกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่เหมาะสม 14
ตารางที่ 3-1 24
การคำนวณหาค่าของความความไวของการทดสอบและความจำเพาะของการทดสอบ
ตารางที่ 4-1 ผลการทดลอง 26
ตารางที่ 4-2 ความสัมพันธ์ค่าผลบวกและค่าผลลบ 36
ตารางที่ 4-3 ความไวและความจำเพาะของการทดสอบการตรวจสอบ 37
ตารางที่ 4-4 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ณเวลาต่าง ๆ 40
ตารางที่ ข-1 ตัวอย่างการนำผลมาหาความสัมพันธ์ 47
ตารางที่ ข-2 ตารางความสัมพันธ์ **2 ทาง** 47

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 รูปร่างของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม	11
ภาพที่ 2-2 การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม	**12**
ภาพที่ 2-3 วัฏจักรกำมะถัน	**17**
ภาพที่ 4-1 ความไวของการทดสอบ	**38**
ภาพที่ 4-2 ความจำเพาะของการทดสอบ	**38**
ภาพที่ ค-1-2 ภาพการทดลอง	**51**

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบดูแลสุขภาพอนามัยของพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) ซึ่งรวมถึงการตรวจสอบคุณภาพน้ำที่ใช้อุปโภคบริโภคในหน่วยงานทั้งในสำนักงานกลางและภูมิภาคทั่วประเทศ

สำหรับการตรวจสอบคุณภาพน้ำอุปโภคบริโภคทางแบคทีเรียได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยใช้วิธีการมาตรฐาน(Most Probable Number Technique, MPN, AWWA. , 2005) ในหน่วยงานของ กฟผ. ทั่วประเทศปีละ 2 ครั้ง แต่เนื่องจากหน่วยงานในส่วนภูมิภาคทุกแห่งมีระบบผลิตน้ำประปาใช้เองในหน่วยงาน มีความจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพน้ำอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่ระบบประปาขัดข้องหรือมีปัจจัยด้านอื่นๆ

ที่มีผลกระทบต่อการผลิตน้ำประปา รวมทั้งการตรวจสอบเครื่องกรองน้ำบริโภคและจุดจ่ายน้ำบริโภคภายในหน่วยงาน ซึ่งหน่วยงานบางแห่งมีความประสงค์ตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยบุคลากรของหน่วยงานเอง เนื่องจากช่วงเวลาที่ฝ่ายแพทย์และอนามัยดำเนินการตรวจวิเคราะห์ให้มีระยะเวลาห่างเกินไป

การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม นิยมใช้เป็นดัชนีบ่งถึงความสกปรกของน้ำและเป็นการชี้เตือนว่าน้ำนั้นอาจมีเชื้อโรคที่มีอันตรายปนเปื้อนมาด้วย เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นถึงร้อยละ 95 และพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ร่วมกับแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคอื่นๆ ฉะนั้นถ้าพบแบคทีเรียกลุ่มนี้แสดงว่าน้ำที่นำมาใช้เพื่อการบริโภคนั้นมีการปนเปื้อนอุจจาระของมนุษย์และสัตว์ ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มตามวิธีมาตรฐาน ใช้เวลานานถึง 96 ชั่วโมงและมีค่าใช้จ่ายสูงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมของวัสดุอุปกรณ์และมีบุคลากรที่มีความชำนาญเท่านั้น เพื่อตอบสนองความต้องการของหน่วยงาน กฟผ. กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัยจึงได้วิจัยหาวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มขั้นต้น (Screening test) ที่ใช้งานง่าย สะดวก ให้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ โดยตั้งชื่อว่า “Egat Aqua test” โดยชุดทดสอบนี้ใช้เวลาในการเพาะเชื้อ 48 ชั่วโมง และใช้อินดิเคเตอร์ประเภทฟีนอลเรด (phenol red) และอาศัยหลักการที่แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มสามารถหมัก (Ferment) คาร์โบไฮเดรต เช่น lactose, saccharose, dextrose ได้ผลิตผลสุดท้ายเป็นกรดหลายชนิด เช่น lactic acid เป็นต้น ซึ่งจะทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง อย่างไรก็ตามพบว่าชุดทดสอบ Egat Aqua test มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้ตรวจสอบน้ำอุปโภคบริโภคที่มีสภาพเป็นกรดหรือกรดอ่อนๆ ได้ เพราะอาจเกิดปัญหาการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ถึงแม้ว่าน้ำที่นำมาทดสอบไม่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Selective agents) ที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มต้องการ เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของชุดตรวจ Egat Aqua test ทำให้สามารถตรวจสอบน้ำอุปโภคบริโภคที่มีสภาพเป็นกรดหรือกรดอ่อนๆ ได้ ซึ่งจะลดความผิดพลาดในการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ และพัฒนารูปแบบชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำเพื่อลดปัญหาการชำรุดระหว่างการขนส่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม Egat Aqua test

2) เพื่อศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ Egat Aqua test

1.3 สมมุติฐาน

สูตรอาหารเลี้ยงเชื่อที่มีส่วนประกอบของ L-Cystine และ Iron (III) Ammonium Citrate Green ในปริมาณที่สูง จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วและสามารถลดระยะการอ่านผลได้เร็วกว่า 48 ชั่วโมง

1.4 ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง เพื่อศึกษาส่วนประกอบของสูตรชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ โดยใช้ตัวอย่างน้ำดิบและน้ำอุปโภคบริโภคภายในหน่วยงานของ กฟผ. จากสำนักงานกลางและหน่วยงานในส่วนภูมิภาค รวมทั้งสิ้นจำนวน 162 ตัวอย่าง ทดสอบเปรียบเทียบด้วยวิธีมาตรฐาน (MPN) และสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นทั้งหมด 4 สูตร โดยทดลองใช้สำลีก้อน สำลีแผ่น และกระดาษชำระเป็นวัสดุดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำผลที่ได้จากสูตรทั้ง 4 สูตรเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเพื่อเลือกสูตรที่มีความถูกต้องสูงกว่าร้อยละ 95 โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2555 ถึงมกราคม 2556

1.5 นิยามศัพท์

Egat Aqua test คือ ชุดตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ ที่ใช้ในหน่วยงาน กฟผ.

MPN (Most Probable Number Technique) คือ วิธีการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธีการมาตรฐาน

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม คือแบคทีเรียที่พบได้ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นและมักพบเชื้อชนิดนี้ร่วมกับแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค

อุณหภูมิห้อง คืออุณหภูมิห้องที่ทำการทดลอง ที่ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย กฟผ. อุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 – 33 องศาเซลเซียส

Aseptic Technique คือ เทคนิคปลอดเชื้อซึ่งเป็นเทคนิคที่ป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการปนเปื้อนลงไปในเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ นอกจากนั้นยังป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังทำการทดลองอยู่ออกมายังสิ่งแวดล้อม

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1 .
ได้ชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำที่สามารถตรวจสอบน้ำอุปโภคบริโภคที่มีสภาพเป็นกรดหรือกรดอ่อนๆ ได้

2 .
ได้รูปแบบชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำที่สะดวกในการขนส่งไปยังหน่วยงานส่วนภูมิภาค

1.7 กรอบแนวคิด

ตัวแปรต้น

- สูตรที่ 1 (ชนิดและอัตราส่วนตามภาคผนวก)
- สูตรที่ 2 (ชนิดและอัตราส่วนตามภาคผนวก)
- สูตรที่ 3 (ชนิดและอัตราส่วนตามภาคผนวก)
- สูตรที่ 4 (ชนิดและอัตราส่วนตามภาคผนวก)

→

ตัวแปรตาม

ความไวและความจำเพาะ
ของการทดสอบ

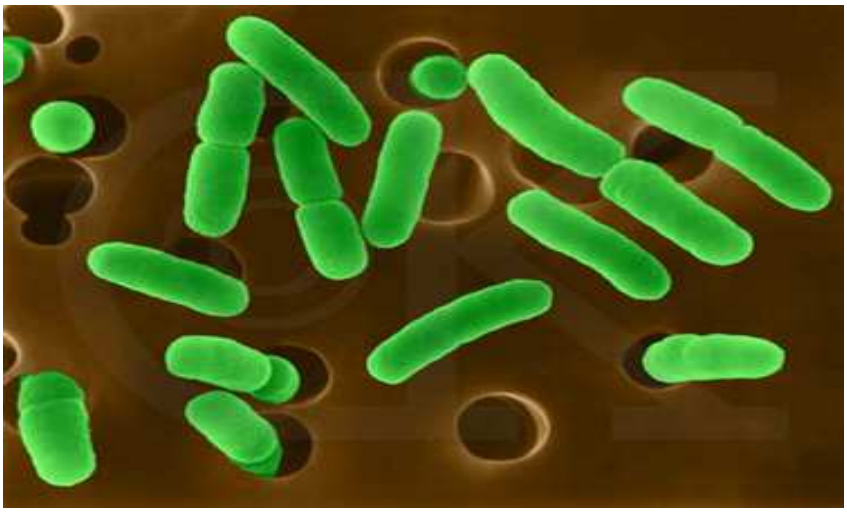
ตัวแปรควบคุม

ชนิดและปริมาณน้ำที่นำมาทดลอง

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria)

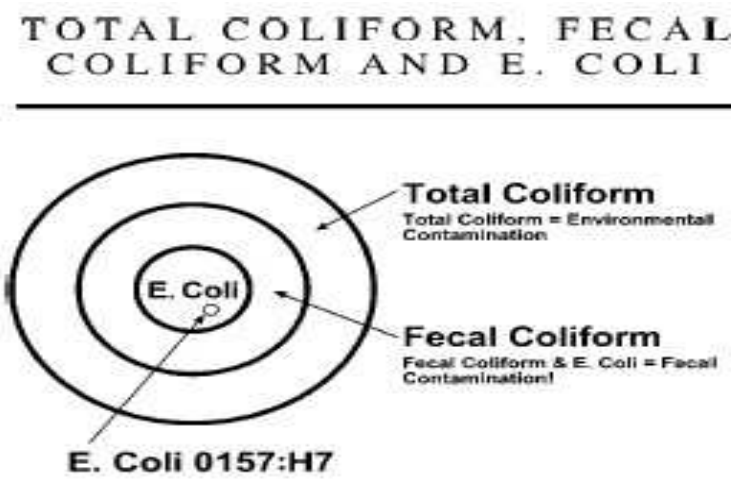
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์เอนเทอโรแบคเทอริเอซิอี (Enterobacteriaceae) ลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ติดสี เป็นแบคทีเรียแกรมลบ(Gram negative bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (Non spore forming) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและมีอากาศน้อย (Facultative anaerobe) มักพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น แบคทีเรียโคลิฟอร์มสามารถหมักน้ำตาลแลกโตส (Lactose) ให้เกิดกรดและแก๊ส ได้ที่อุณหภูมิ 35-37 อาศาเซลเซียส ภายใน 24- 48 ชั่วโมง ไม่ทนความร้อน สามารถทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization) ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase negative) สามารถทำให้เกิดก๊าซจากอาหารเหลวบริลเลียนกรีนแล็กโทส ไบล์บรอธ (Brilliant Green Lactose Bile broth) ที่อุณหภูมิ 35 อาศาเซลเซียส ภายในเวลา 48 ชั่วโมง หรือเร็วกว่านั้นและสามารถเจริญเติบโตในอาหารแข็ง อีเอ็มบี (EMB, Eosine Methylene Blue Agar) ที่ 35 อาศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง (Teresa Thiel , 1999 ; Peter Feng , 2002)



ภาพที่ 2.1 รูปร่างของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (Non-pathogen) แต่แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria count) ใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางสุขาภิบาลอาหารและน้ำ การตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในอาหารและน้ำสามารถบ่งชี้ถึงความไม่สะอาด ไม่ถูกสุขลักษณะ อาจมีการปนเปื้อนจากอุจจาระของคนหรือ สัตว์เลือดอุ่น แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น ดินและแหล่งน้ำได้ดี ซึ่งถ้าพบในน้ำหรืออาหารก็แสดงถึงโอกาสของการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของสิ่งมีชีวิต ดิน ฯลฯ ส่วนฟีคัลโคลิฟอร์ม มักถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้โอกาสของการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของมนุษย์

เนื่องจากพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป โดยแบคทีเรียที่สำคัญและถูกกำหนดให้เป็นตัวบ่งชี้อยู่เสมอ ๆ ได้แก่ *E. coli* ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มดังแสดงในภาพที่ 2.2 ดังนั้นถ้าพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในอาหารหรือน้ำก็แสดงให้เห็นถึงโอกาสการปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์ โดยอาจเกิดจากการขาดการควบคุมระบบสุขลักษณะที่ดี หรือกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้อง โดยการบ่งชี้ดังกล่าวนอกจากจะบอกถึงความสะอาดแล้ว ยังบอกถึงอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่พบในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย



ภาพที่ 2.2 การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

2.2 วิธีการตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ในน้ำโดยวิธี MPN

วิธีการตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี สำหรับประเทศไทยมาตรฐานคุณภาพน้ำอุปโภคบริโภคที่กำหนดโดยหน่วยงานต่าง ๆ เช่นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา , การประปานครหลวง , องค์การอนามัยโลก เป็นต้น กำหนดให้ตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN test (คำว่า MPN test มาจาก Most Probable Number Test หรือ multiple tube fermentation technique

วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มและแบคทีเรียฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ในน้ำอุปโภคบริโภคหรือน้ำเสียต่าง ๆ

2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มมีทั้งชนิดสำเร็จรูปที่เอามาละลายน้ำได้เลยและชนิดที่ต้องผสมเองจากการชั่งสารต่าง ๆ ตามที่กำหนด ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

ก. Lactose Broth

- Beef extract	3.0	กรัม
- Peptone	5.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- Distilled water	1	ลิตร

ภายหลังจาก Sterile แล้วควรมี pH ประมาณ 6.8 – 7.0 ก่อนเข้า Sterileให้ใส่น้ำยาที่เตรียมนี้ลงใน Fermentation tubes ในปริมาณที่ของเหลวในหลอดที่ได้หลังการ Sterile สูงเกินก้นของ Vial ที่คว่ำไว้ข้างใน

เนื่องจากในการวิเคราะห์อาจใช้ปริมาตรตัวอย่างแตกต่างกันไปเป็น 10 มิลลิลิตร หรือ 100 มิลลิลิตร Lactose broth ที่ใช้จึงควรมีความเข้มข้นที่เหมาะสม เมื่อเติมตัวอย่างในปริมาตรดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอยู่ใน Fermentation tube แล้วจะไม่ไปลดความเข้มข้นของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่ามาตรฐาน ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะของส่วนประกอบจะดูได้จากตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2-1 ปริมาตรตัวอย่างน้ำกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth ที่เหมาะสม

Inoculum (ml)	Amount of Medium in Tube (ml)	Volume of Medium + Inoculum (ml)	Dehydrated Lactose Broth Required (g/L)
1	10 or more	11 or more	13.0
10	10	20	26.0
10	20	30	19.5
100	50	150	39.0
100	35	135	50.1
100	20	120	78.0

ข. Lauryl Tryptose Broth

- Tryptose	20.0	กรัม
- Lactose	5.00	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4	2.75	กรัม
- Potassium dihydrogen Phosphate, KH_2PO_4	2.75	กรัม
- Sodium chloridce, NaCl	5.00	กรัม

- Sodium lauryl sulfate 1.00 กรัม
- Distilled water 1 ลิตร

ภายหลังจาก Sterile แล้วควรมี pHประมาณ 6.8 ก่อนเข้า Sterile ให้ใส่น้ำยาที่เตรียมนี้ลงใน Fermentation tubes ในปริมาณที่ของเหลวในหลอดที่ได้หลังการ Sterile สูงเกินของ vial ที่คว่ำไว้ข้างใน Lauryl tryptose broth ควรมีความเข้มข้นที่เหมาะสม เมื่อเติมตัวอย่าง 100 หรือ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะไม่ลดความเข้มข้นของส่วนประกอบต่าง ๆ ให้ต่ำกว่ามาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2-2 ปริมาตรตัวอย่างน้ำกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่เหมาะสม

Inoculum (ml)	Amount of Medium in Tube (ml)	Volume of Medium + Inoculum (ml)	Dehydrated Lauryl Tryptose Broth Required (g/L)
1	12 or more	13 or more	35.0
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

ค. Brilliant Green Lactose Bile Broth

- Peptone 10.0 กรัม
- Lactose 10.0 กรัม
- Oxgall 20.0 กรัม
- Brilliant green 0.0133 กรัม
- Distilled water 1 ลิตร

pH หลังจาก Sterile ควรเป็น 7.2 ก่อนเข้า sterile ให้ใส่น้ำยาที่เตรียมนี้ลงใน Fermentation tubes ในปริมาณที่ให้ของเหลวในหลอดที่ได้หลังการ Sterile สูงเกินระดับก้นของ Vial ที่คว่ำไว้ภายใน

2.2.2 การตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม มี 3 ขั้นตอน ได้แก่

ก. Presumptive phase

1) ให้ Inoculate ตัวอย่าง (Aseptic) ลงใน Fermentation tube ขนาดใหญ่ซึ่งบรรจุ Double-strength lactose broth 5 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร

2) ให้ Inoculate ตัวอย่างลงใน Fermentation tube ขนาดเล็กซึ่งบรรจุ Lactose broth

ความเข้มข้นปกติ 5 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

3) ทำเหมือนข้อ 2. แต่ใช้น้ำตัวอย่าง 0.1 , 0.01 , 0.001 มิลลิลิตร

4) นำ Fermentation tube ทั้งหมดซึ่งอยู่ใน Rack เข้าตู้อบที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส

5) เมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ให้ดูว่ามีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดข้างใน Fermentation tube แต่ละหลอดหรือไม่

6) ถ้าหลอดใดเกิดก๊าซก็ให้ทำ Confirmed test ต่อไปเลย แต่ถ้าหลอดใดไม่เกิดก๊าซก็ให้ Incubate ต่อไปอีก

7) เมื่อครบเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง ให้สังเกตใหม่ว่ามีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดที่เหลือหรือไม่

8) ให้ทำ Confirmed test กับหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นทุกหลอด

ข. Confirmed phase

1) เลือกหลอดที่เกิดก๊าซจาก Presumptive phase (ข้อ 5.-7.) แล้วใช้ Wire loop ถ่ายของเหลวจากหลอดหลอดที่เกิดก๊าซนี้ 1 loop ไปยัง Fermentation tube ที่บรรจุ Brilliant green lactose bile broth ให้ Sterile loop ด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์หรือตะเกียงก๊าซทุกครั้งที่จะใช้

2) นำไป Incubate ที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส 48 ± 3 ชั่วโมง

3) เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ตรวจดูว่ามีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดหรือไม่ถ้าหลอดใดมีก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผล + แต่ถ้าไม่มีก๊าซแสดงว่าให้ผล – จากจำนวนของหลอดที่ให้ผล + และ - ในแต่ละการเจือจาง สามารถที่จะนำไปคำนวณหาค่า MPN index ซึ่งค่านี้จะบอกถึงจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่มีโอกาสพบได้บ่อยกว่าค่าอื่นสำหรับตัวอย่างนั้น ๆ สำหรับผลที่ได้นั้น ถ้าเกิดก๊าซในหลอด Lactose broth และได้ Gram positive , Non spore forming , Rod-shaped bacteria ใน Agar culture ให้ถือว่า Positive completed phase แสดงว่ามี Coliform ในตัวอย่างที่หา (ถ้าได้เป็น Gram negative ก็ถือว่า Coliform organism เช่นกัน) (APHA , 2005)

ค. Completed phase

นำเชื้อจากหลอดที่เกิดฟองอากาศในขั้น Confirmed phase มา Streak ลงบนอาหารแข็ง EMB (Eosin Methylene Blue Plate) แล้วนำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มเท่านั้น ที่เจริญเติบโตได้เห็นเป็นโคโลนี ซึ่งโคโลนีจะมีลักษณะมีสีเข้มตรงกลาง และมีสีโลหะตัด (Metallic sheen) จากนั้นให้ใช้ไม้จิ้มฟันที่ Sterile แล้ว จิ้มเอาโคโลนีที่แยกเดี่ยวๆ เห็นชัดในแต่ละ Plate ประมาณ 2-3 โคโลนี ใส่ลงในหลอดที่มีอาหาร Lactose Broth แล้วนำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ถ้าเป็นเชื้อโคลิฟอร์มจะให้ก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักอากาศเดอร์แรม Nutrient Agar Slant

แล้วนำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จึงนำเชื้อไปทำ Gram-stained ซึ่งจะเป็น Gram negative แล้วส่องดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทัศน์ (APHA , 2005)

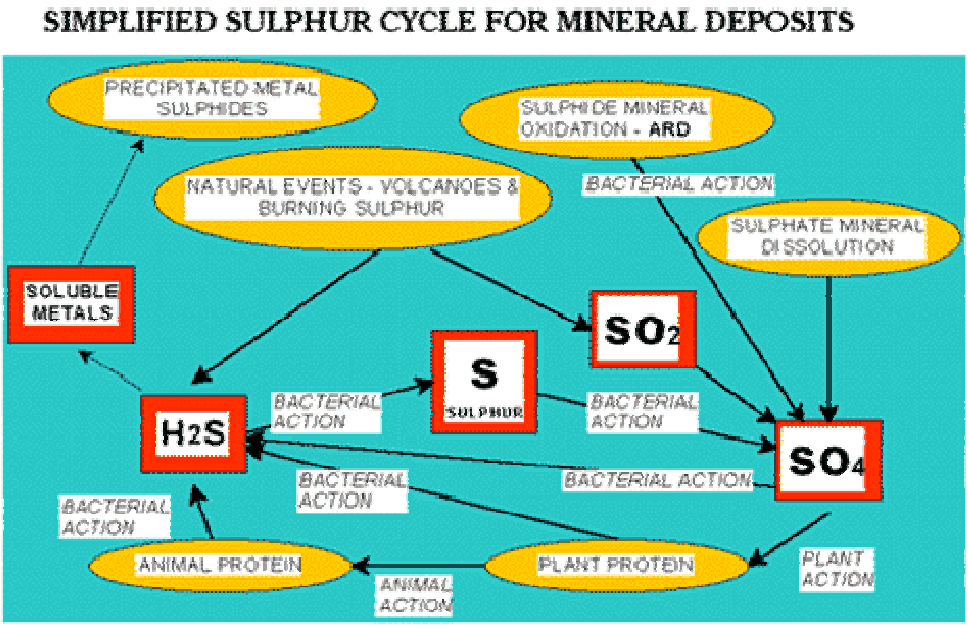
2.3 การตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ในน้ำอย่างง่าย

จากการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำอย่างง่าย พบว่ามีวิธีการต่างๆ มากมายโดยใช้หลักการต่างกัน บางวิธีตรวจได้รวดเร็วแต่ต้องใช้อุปกรณ์และเทคนิคค่อนข้างสูง บางวิธีสามารถตรวจได้ง่ายแต่ใช้ระยะเวลานาน ซึ่งไม่เหมาะสำหรับหน่วยงานในภูมิภาคต่าง ๆ ของ กฟผ. ซึ่งต้องติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำ (กองอนามัย , 2543) ดังนั้นในปี 2543 กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย กฟผ. ได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาวิธีการตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ง่าย ใช้เครื่องมืออุปกรณ์น้อย มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานต่ำ ที่เรียกว่าชุดตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ หรือ Egat Aqua Test ใช้เวลาในการเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งชุดตรวจสอบมีความไวและความถูกต้องสูงในระดับที่ยอมรับได้ สามารถให้ผลการทดสอบรวดเร็วขึ้น มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการน้อยกว่าวิธีมาตรฐาน และใช้เทคนิค วิธีการตรวจไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เครื่องมืออุปกรณ์ในการเตรียมการและการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องอาศัยความชำนาญและใช้เทคนิคขั้นสูง สามารถนำชุดตรวจสอบไปใช้ตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำอุปโภคบริโภคภายในหน่วยงานที่ตั้งอยู่ตามภูมิภาคต่างๆ ของ กฟผ. ได้ (กองอนามัย , 2543) ทั้งนี้น้ำยาทดสอบนี้จะเป็นนวัตกรรมหนึ่งที่แนะนำให้หน่วยงานซึ่งมีภารกิจและหน้าที่ในการควบคุม ติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรีย เพื่อเฝ้าระวัง ป้องกัน ควบคุมโรคติดต่อต่างๆ ที่มีน้ำเป็นสื่ออันอาจจะนำไปสู่การแพร่กระจายโรค หรือเกิดการระบาดของโรคเหล่านั้นอย่างทันท่วงที อีกทั้งอาจนำไปใช้ในงานสนับสนุน ส่งเสริมสุขภาพอนามัยที่ดีในกลุ่มผู้ปฏิบัติงาน ครอบครัว และชุมชน ให้มั่นใจได้ว่าจะได้รับการดูแล ตรวจสอบคุณภาพน้ำที่ใช้สำหรับอุปโภคบริโภคอย่างปลอดภัย และมีมาตรฐานเดียวกันกับมาตรฐานน้ำดื่มที่หน่วยงานราชการกำหนด สำหรับกรณีการตรวจด้วยวิธี Egat Aqua Test ซึ่งมีอยู่ส่วนหนึ่ง (ร้อยละ 0.8) ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกโดยที่ไม่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์มอยู่ในน้ำตัวอย่างนั้น ในทางปฏิบัติแล้วค่าผลบวกที่เป็นเท็จนี้สามารถยกให้เป็นค่าความปลอดภัย (Safety Factor) ที่กำหนดให้มีได้ในเชิงการควบคุม ป้องกันโรค เพราะผลที่ได้ถึงแม้จะไม่ถูกต้อง แต่ก็เป็นผลที่ทำให้หลักการปฏิบัติที่จะต้องตามมาเมื่อพบว่าผลการตรวจเป็นบวกนั้นมีการดำเนินมาตรการต่างๆในเชิงระบาดวิทยาตามมา

2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแบคทีเรีย

ในอุจจาระของมนุษย์มีแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟตจำนวนมาก ซึ่งผลพลอยได้จากการหายใจและการย่อยสลายของแบคทีเรียพวกนี้คือ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Levett.1993) แบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำดื่มสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่นเดียวกับแบคทีเรียในลำไส้กลุ่ม *Samonella, Proteus, Citrobacter* และกลุ่ม*Klebstella* บางสายพันธุ์ (WHO, 1982) การตรวจวัดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำดื่มได้ (Castillo et al.,1994)

แบคทีเรียโคลิฟอร์มจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย่อยสลายซัลเฟตเพื่อให้ได้ซัลเฟอร์มาสังเคราะห์เป็นสารประกอบที่จำเป็นในการดำรงชีวิต ปฏิกิริยานี้เกิดในสภาวะไร้อากาศ โดยเมื่อแบคทีเรียย่อยสลายซัลเฟตจะเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเหม็นที่เรียกว่าก๊าซไข่เน่า ในแหล่งน้ำที่เน่าเสียเมื่อแบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำโดยใช้ก๊าซออกซิเจน หลังจากที่ออกซิเจนในแหล่งน้ำหมดลง จะเกิดสภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งจะเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโลหะหนักที่ละลายอยู่ในน้ำเกิดเป็นโลหะซัลไฟด์อยู่ในรูปตะกอนสีดำ ทำให้แหล่งน้ำที่ขาดออกซิเจนมีสภาพเป็นสีดำดังแสดงในภาพที่ 2.3 (Castillo et al.,1994) จึงมีแนวคิดว่าหลักการดังกล่าวนี้สามารถนำมาตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำดื่มน้ำใช้ได้



ภาพที่ 2.3 วัฏจักรกำมะถัน

2.5 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย

การเจริญของแบคทีเรียนอกจากจะขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน อาหารเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องมีส่วนประกอบของธาตุอาหารเหล่านี้ ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อให้สารอาหารอยู่ในรูปที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้

แบคทีเรียมีหลายพวก แบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของคนสัตว์และในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เป็นแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ และยังเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารกระป๋อง การเลี้ยงแบคทีเรียในห้องทดลองต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้สารอาหารในรูปที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ และจำเป็นต้องสร้างสภาวะรีดิวซ์ให้กับแบคทีเรีย ซึ่งอาจทำได้โดยสร้าง Pre-reduced medium ใช้ reducing agent เช่น L-cysteine HCL และ NaS เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มขั้นต้น (Screening test)

จุไร (2532)
ได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบความสะอาดอย่างง่ายสำหรับภาชนะสัมผัสอาหารโดยศึกษาการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ที่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เพื่อใช้เป็นเครื่องตรวจสอบขั้นต้นโดยอ่านผลการเกิดตะกอนสีดำที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ Peptone , Dipotassium Hydrogen Phosphate , Ferric Ammonium Citrate , Bile Salt No. 3 และ Sodium Thiosulphate

กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย กฟภ. (2539) ได้วิจัยและผลิตชุดตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Egat Aqua Test) อาศัยการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง จากน้ำยาที่มีสภาพด่างเปลี่ยนเป็นกรด โดยใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม เช่น phenol red ถ้าในน้ำมีแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น lactose, saccharose, dextrose ได้ผลิตผลสุดท้ายเป็นกรดหลายชนิดเช่น lactic acid น้ำยาจะเปลี่ยนจากด่างเป็นกรด จึงสามารถตรวจสอบการเกิดกรดโดยสังเกตการณ์เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าน้ำยาเปลี่ยนสีแสดงว่าน้ำมีการปนเปื้อนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม วิธีการนี้ไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการและวัสดุอุปกรณ์จำนวนมาก แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือใช้ตรวจสอบน้ำที่มีค่า pH ต่ำกว่า 7 ไม่ได้ (กองอนามัย , 2543)

สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2545)
ได้คิดค้นและพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรีย อ 12 (ว 810) สำหรับตรวจสอบคุณภาพน้ำภาคสนาม โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของอาหารตรวจ อ 12 จากสีเหลืองเป็นสีดำ พบว่าการตรวจด้วย อ 12 สอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน MPN ไม่น้อยกว่าร้อยละ 85.2

WHO (1982)

ได้สำรวจระบบประปาภาคสนามพบว่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำดื่มสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่นเดียวกับแบคทีเรียในลำไส้กลุ่ม *Samonella ,Proteus , Citrobacter* และกลุ่ม*Klebstella* บางสายพันธุ์ จึงสามารถใช้หลักการนี้ตรวจสอบน้ำดื่มโดยใช้หลักการตรวจจับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเ พื่อใช้ในการควบคุมการระบาดของโรคที่เกิดจากน้ำเป็นสื่อ

Vicki A. Bamford (2002) ศึกษาพบว่าสารประกอบกำมะถัน ได้แก่ซัลไฟด์ และเป็นสารควบคุมกลไกการย่อยสลายซัลเฟตในเซลของแบคทีเรีย ต่อมาในปี 2001 Jan R. และคณะได้ทำการศึกษาพบว่า
กรดอะมิโนซิสเตอีนสามารถควบคุมกลไกการย่อยสลายซัลเฟตในเซลของแบคทีเรียในกลุ่ม E. Coli โดยพบว่าเมื่อเติมกรดอะมิโนซิสเตอีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ E. Coli สร้างเอนไซม์ ที่ใช้ในการย่อยสลายซัลเฟตได้ดี
เนื่องจากกรดอะมิโนซิสเตอีนจะเข้าไปควบคุมการทำงานของยีนที่มีหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย สลายซัลเฟต

บทที่ 3
ขั้นตอนการศึกษา

3.1 รูปแบบงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อและพัฒนารูปแบบชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำโดยอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อหลัก (Common media) และอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective agents) เพื่อให้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ ขณะเดียวกันก็ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มอื่นได้ โดยใช้หลักการดักจับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการย่อยสลายของแบคทีเรียโคลิฟอร์มด้วยสารประกอบของเหล็ก เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารที่เลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีดำ ซึ่งในการศึกษาผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างน้ำดิบและน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภคจากหน่วยงานต่าง ๆ ของ กฟผ. ทั้งสำนักงานกลาง และหน่วยงานส่วนภูมิภาคจำนวน 162 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน และตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม 4 สูตร โดยใช้วัสดุดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดได้แก่สำลีก้อน สำลีแผ่น และกระดาษชำระ เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นำผลที่ได้วิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเพื่อเลือกสูตรที่มีความถูกต้องสูงกว่าร้อยละ 95 นำมาผลิตเป็นชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มใช้ในหน่วยงานของ กฟผ. ต่อไป

3.2 สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย กฟผ. ตำบลบางกรวย อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 200 มิลลิลิตร มีฝาจุกแก้วปิดสนิทแบบกราวน์จอยท์ ฝาและคอขวดหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมบรรจุในกระป๋องเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งสามารถอบที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสได้

2) ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิในช่วง 35 ±0.5 องศาเซลเซียส ได้

3) ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) ซึ่งสามารถกำหนดอุณหภูมิที่ 170 องศาเซลเซียส ได้

4) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร

5) Autoclave ซึ่งสามารถกำหนดอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ได้

6) เครื่องชั่ง ซึ่งสามารถชั่งน้ำหนักได้ละเอียดถึงทศนิยม 3 ตำแหน่ง

7) หลอดแก้ว ขนาด 20 x 200 และ 16 x 200 มิลลิเมตร

8) Durham tubes ขนาด 6 x 20 มิลลิเมตร

9) Pipettes ขนาด 10 และ 5 มิลลิลิตร พร้อมด้วย Pipette Containers

10) ตะเกียงแอลกอฮอล์

11) Inoculating Equipment (Wire loop)

12) สำลี

13) กระดาษชำระ

3.4 สารเคมี

1) Bacto Peptone

2) Bacto Lactose

3) Bacto Beef Extract

4) Bacto Oxgall

5) Bacto Lauryl Triptose Broth

6) Bacto Brillant Green Bile 2 %

7) Bile Salt No.3

8) Beef Extract

9) Di K_2HPO_4

10) FerricAmmonium Citrate Green

11) $Na_2S_2O_3$

12) Twin

13) L-Cystine

14) น้ำกลั่น

15) แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 วิธีการศึกษา

1) เก็บตัวอย่างน้ำอุปโภคและบริโภคในหน่วยงานของ กฟผ. ทั้งสำนักงานและส่วนภูมิภาค จำนวน 162 ตัวอย่าง รายละเอียดดังนี้

สำนักงานกลาง กฟผ.	จำนวน	17	ตัวอย่าง
กองโรงงานหนองจอก	จำนวน	24	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้าบางปะกง	จำนวน	6	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้าราชบุรี	จำนวน	10	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้าลำตะคองชลภาวัฒนา	จำนวน	14	ตัวอย่าง
เขื่อนอุบลรัตน์	จำนวน	19	ตัวอย่าง
เขื่อนจุฬาภรณ์	จำนวน	16	ตัวอย่าง
เขื่อนสิรินธร	จำนวน	11	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้ากระบี่	จำนวน	30	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้าสุราษฎร์ธานี	จำนวน	3	ตัวอย่าง
โรงไฟฟ้าวังน้อย	จำนวน	12	ตัวอย่าง

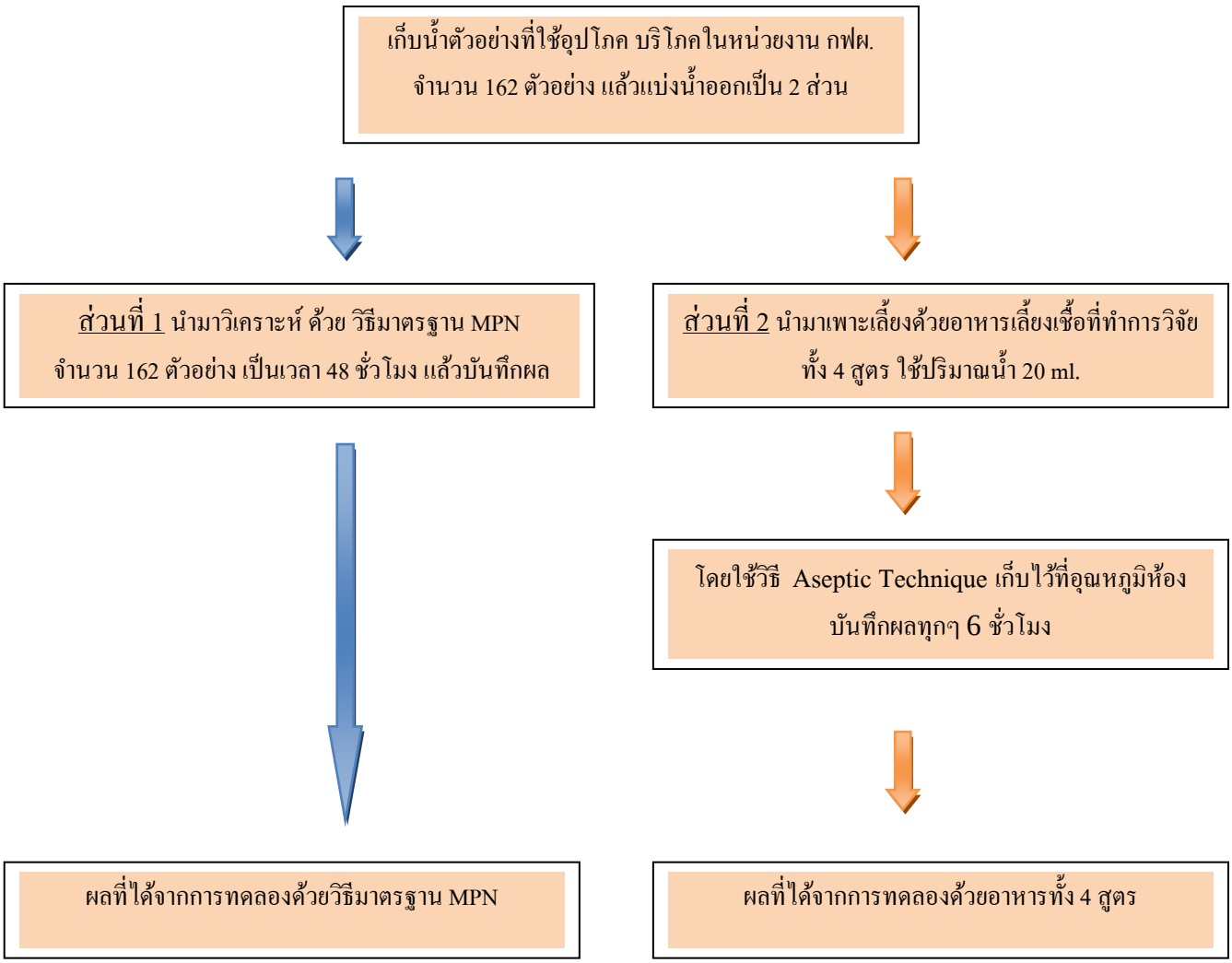
2) นำน้ำตัวอย่างมาแบ่งเป็น 2 ส่วน

น้ำตัวอย่างส่วนที่หนึ่งนำมาวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ด้วยวิธีมาตรฐานเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number หรือ Multiple-Tube Fermentation Technique) ภายใต้การบ่มเพาะในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วนำมาดูว่ามีก๊าซเกิดขึ้นในหลอด Durhams ในแต่ละหลอดหรือไม่ ถ้าหลอดใดมีก๊าซให้ใช้ Wire Loop ถ่ายจากหลอด Lauryl Tryptose Broth ที่มีก๊าซ ลงในหลอด Brilliant Green Bile Broth แล้วบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสต่ออีก 48 ชั่วโมง นำมาอ่านผล ถ้ามีก๊าซเกิดขึ้น ในหลอด Durhams แสดงว่าเป็นบวก ถ้าไม่มีก๊าซแสดงว่าเป็นลบ

3) น้ำตัวอย่างส่วนที่สองนำมาเพาะเลี้ยงด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการวิจัย 4 สูตร โดยอาหารที่ใช้ทั้ง 4 สูตร จะใช้สารอาหารตัวเดียวกันคือ Bacto Lactose กับ Bacto Peptone ยกเว้นในสูตรที่ 2 จะใช้ Bacto Peptone เป็นสารอาหารตัวเดียว แต่จะแตกต่างกันที่ปริมาณและสัดส่วนของสารเคมีอื่น ๆ ของแต่ละสูตร สำหรับวัสดุดูดซับที่ใช้กับอาหารทั้ง 4 สูตร ได้แก่สำลีก้อน สำลีแผ่น และกระดาษชำระ ทั้งนี้เพื่อให้วัสดุเก็บตัวอาหารได้ทั่วถึง และง่ายต่อการขนส่งไปยัง หน่วยงานส่วนภูมิภาคของ กฟผ.

โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด
เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องภายในห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม ฝ่ายแพทย์และอนามัย กฟผ.
พร้อมสังเกตและบันทึกการเปลี่ยนสีทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง
และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐาน ตรวจสอบความไวและความจำเพาะของการทดสอบ

รูปแบบการทดลอง



ผลที่ได้จากการทดลองด้วยวิธีมาตรฐาน MPN
มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองด้วยอาหารทั้ง 4 สูตร ตรวจสอบ
ด้วยความไวและความจำเพาะของการทดสอบ

3.6 ระยะเวลาในการศึกษาวิจัย

ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2555 ถึง เดือนมกราคม 2556

3.7 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้ความไวและความจำเพาะของการทดสอบ (มสธ , 2553) มีรายละเอียดดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 การคำนวณหาค่าของความความไวของการทดสอบและความจำเพาะของการทดสอบ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ	**วิธีมาตรฐาน**	
	ผลบวก	**ผลลบ**
ผลบวก	**a**	**b**
ผลลบ	**c**	**d**

3.7.1 ความไวของการทดสอบ (Sensitivity) หมายถึง ร้อยละของแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ตรวจพบซึ่งเป็นผลบวก (Positive) ที่ได้จากการทดสอบได้ผลบวกจากการทดสอบ

$$\text{Sensitivity} = \frac{a}{a+c} \times 100\%$$

3.7.2 ความจำเพาะของการทดสอบ (Specificity) หมายถึง ร้อยละของแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ตรวจได้ถูกต้องจากการทดสอบว่าเป็นผลลบ

$$\text{Specificity} = \frac{d}{b+d} \times 100\%$$

นิยาม

ค่าผลบวกแท้จริง (a) หมายถึง วิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกกับวิธีทดลองที่ให้ผลบวก

ค่าผลบวกเท็จ (b) หมายถึง วิธีมาตรฐานที่ให้ผลลบกับวิธีทดลองที่ให้ผลบวก

ค่าผลลบเท็จ (c) หมายถึง วิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกกับวิธีทดลองที่ให้ผลลบ

ค่าผลลบแท้จริง (d) หมายถึง วิธีมาตรฐานที่ให้ผลลบกับวิธีทดลองที่ให้ผลลบ

บทที่ 4
ผลการศึกษา

จากการทดลองใช้วัสดุดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดได้แก่สำลีก้อน สำลีแผ่น และกระดาษชำระ โดยใช้ขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิมซึ่งมีใช้งานในห้องปฏิบัติการ พบว่าสำลีก้อนและสำลีแผ่นสามารถดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่ากระดาษชำระ เมื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จพร้อมใช้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมสำเร็จไม่หกหรือไหลซึม จึงสามารถลดการเสียของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขนส่งไปยังหน่วยงานในพื้นที่อื่นๆได้ สำหรับสำลีทั้ง 2 ชนิดพบว่าสำลีชนิดแผ่นสามารถบรรจุลงขวดและล้างออกได้ง่ายกว่าสำลีชนิดก้อน ดังนั้นชุดตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มจึงใช้รูปแบบสำลีแผ่นเพราะมีความเหมาะสมมากที่สุด

การทดลองในครั้งนี้เก็บน้ำตัวอย่างจากหน่วยงานต่างๆใน กฟผ. จำนวน 162 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและสูตรอาหารที่คิดค้นขึ้น 4 สูตร สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตรนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และทำการบันทึกผลทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการวิเคราะห์ โคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐานกับสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร

น้ำตัวอย่างจำนวน 162 ตัวอย่างเมื่อตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน ให้ผลบวก 111 ตัวอย่าง ให้ผลลบ 51 ตัวอย่าง เมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้สูตรอาหารทั้ง 4 สูตรจะให้ผลแตกต่างกันตามระยะเวลา

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 เริ่มให้ผลบวกที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบ 36 ชั่วโมง ให้ผลบวกจำนวน 36 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 126 ตัวอย่าง

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ให้ผลเป็นบวก 109 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นลบ 53 ตัวอย่าง โดยที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงเริ่มให้ผลบวก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ให้ผลเป็นบวก 38 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นลบ 124 ตัวอย่าง โดยที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมงเริ่มให้ผลบวก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ให้ผลเป็นบวก 18 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นลบ 144 ตัวอย่าง โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงเริ่มให้ผลบวก

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
1	1,600	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
2	540	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	170	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
4	49	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
5	1,600	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
6	420	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
7	920	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
8	23	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	16,000	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	24,000	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
12	79	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
13	8.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	8.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
17	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

18	**33**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
19	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	13	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
25	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
27	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	14	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-		+	-	-	-	-	+	+
32	2,400	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
33	2,400	-	-	-	-		+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
34	700	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
35	540	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
36	920	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+

37	540	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
38	23	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
39	540	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
40	2,400	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
41	17	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
42	6.8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
43	8.3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	79	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
46	130	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
47	350	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
48	13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
49	21	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
50	17	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
51	110	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
52	130	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
53	49	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
54	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

56	9.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	6.8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
59	6.8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
62	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	4,900	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
64	13,000	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
65	7,900	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
66	23,000	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
67	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	170	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
69	2,300	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
70	2,300	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
71	2,300	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
72	1,300	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
73	13,000	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

74	24,000	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
75	24,000	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
76	2,400	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
77	2,400	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
78	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
79	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	1600	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
85	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	130	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
87	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

93	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
99	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	1,600	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
104	1,200	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
105	920	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
106	49	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
107	49	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
108	23	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
109	33	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
110	9.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

111	13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
112	79	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
113	49	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
114	540	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
115	21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
116	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
118	8.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121	23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
122	14	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
123	7.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
124	13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
125	23	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
126	49	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
127	70	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
128	170	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
129	350	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+

130	78	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
131	13	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
132	49	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
133	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
135	14	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
136	110	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
137	540	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
138	2,300	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
139	33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
140	2,300	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
141	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142	<1.8	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
143	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
146	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
147	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
148	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

149	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	8.3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
151	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	<1.8	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
153	230,000	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
154	230,000	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
155	230,000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
156	2,300	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 4 -1 ผลการทดลองการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโคลิฟอร์ม 4 สูตรในระยะเวลาต่างๆ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN (ต่อ)จำนวน 162 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร																							
		สูตรที่ 1						สูตรที่ 2						สูตรที่ 3						สูตรที่ 4					
		6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36	6	12	18	24	30	36
157	2,300	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
158	540	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
159	<1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
160	1,600	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
161	220	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
162	220	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : เมื่อตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน ค่าปริมาณโคลิฟอร์ม < 1.8 MPN/100 ml. หมายถึงตรวจไม่พบโคลิฟอร์มในตัวอย่างน้ำ ผลที่ได้จากการอ่านผลการทดสอบจะได้ค่า 0-0-0 เมื่อเปิดตารางแปลผลเป็นค่าปริมาณโคลิฟอร์มจะได้ค่า < 1.8 MPN/100 ml.

4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานและการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรทั้ง 4 สูตร

จากวิธีมาตรฐานจำนวน 162 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 111 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 51 ตัวอย่าง เมื่อนำน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตร สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของโคลิฟอร์มในน้ำดื่มได้ ถ้ามีการปนเปื้อนโคลิฟอร์มจะแสดงโดยการอ่านค่าให้เป็นผลบวก และถ้าหากไม่มีการปนเปื้อนโคลิฟอร์มจะแสดงโดยการอ่านค่าให้เป็นผลลบ และในการทดลองสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 4 สูตร พบว่าในสูตรอาหารเลี้ยงเชื่อสูตรที่ 2 จะให้ผลบวก 109 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 52 ตัวอย่าง ซึ่งถือว่าให้ผลใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานมากที่สุด โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงเริ่มให้ผลบวก ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2
ตารางแสดงความสัมพันธ์ค่าผลบวกและผลลบระหว่างการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานและการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรทั้ง 4 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	วิธีวิเคราะห์มาตรฐาน MPN	
	+	-
48	**111**	**51**

เวลา (ชั่วโมง)	วิธีวิเคราะห์โดยการใช้สูตรอาหารทั้ง 4 สูตร							
	สูตร 1		สูตร 2		สูตร 3		สูตร 4	
	+	-	+	-	+	-	+	-
6	0	162	0	162	0	162	0	162
12	0	162	10	152	0	162	2	160
18	9	153	53	109	7	155	3	159
24	38	124	**109**	**53**	39	123	19	143
30	69	93	110	52	79	83	65	97
36	96	66	111	51	89	73	89	73

4.3

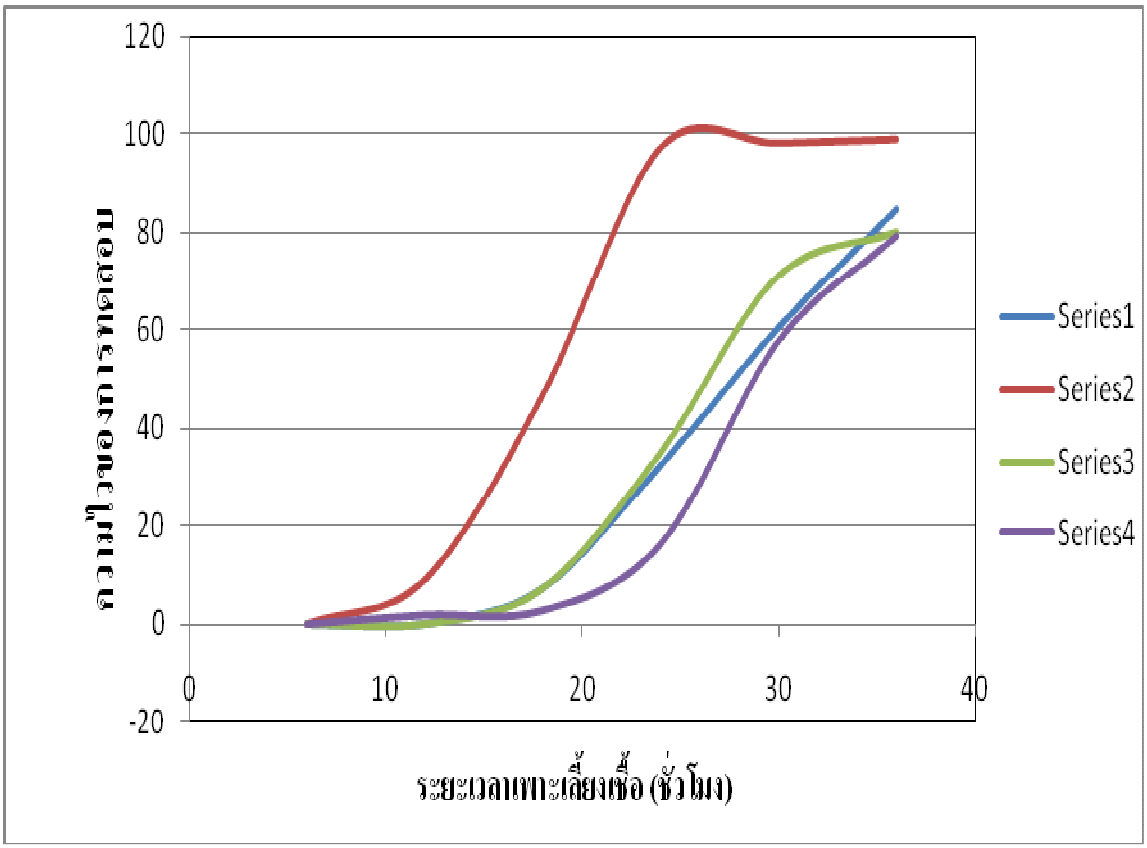
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความไวและความจำเพาะของการทดสอบการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำโดยใช้วิธีการมาตรฐานกับการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ4 สูตร

จากการทดลองแล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะเป็นการทดสอบความถูกต้องของผลบวกและผลลบ ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่ 2 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยมีค่าความไวร้อยละ 97.3 และมีความจำเพาะร้อยละ 98.0 ซึ่งความไวและความจำเพาะของการทดสอบสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือสูงกว่าร้อยละ 95

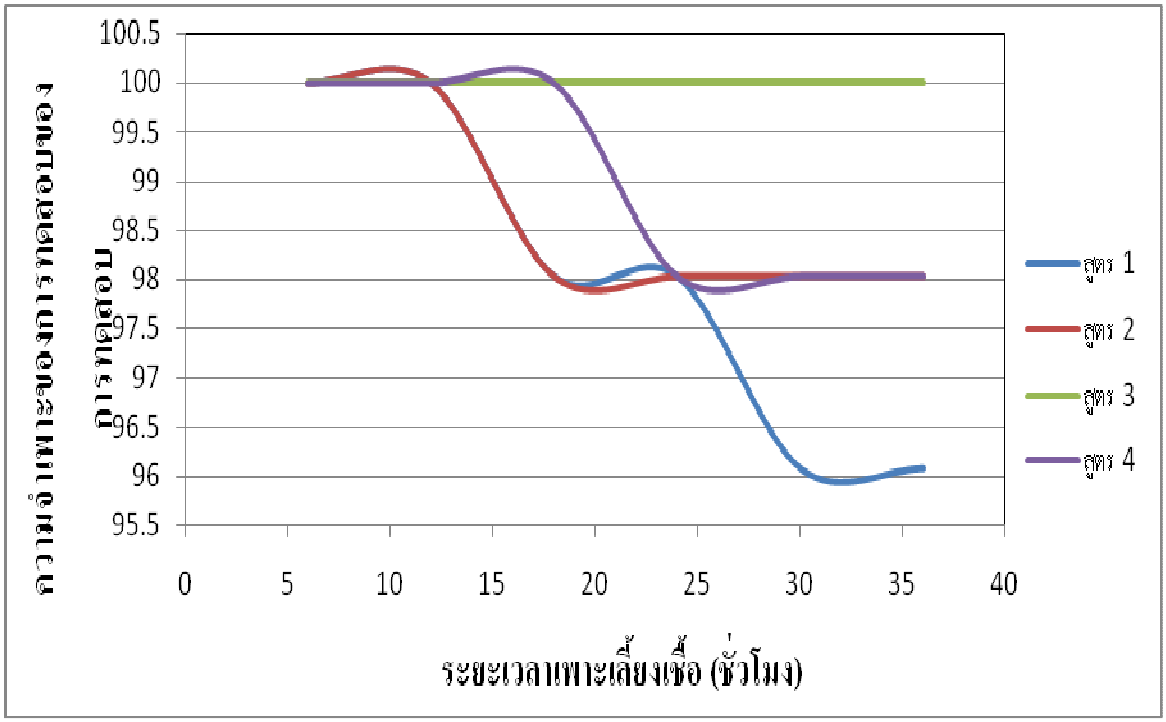
ตารางที่ 4-3 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของการทดสอบการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำทั้ง 4 สูตร เทียบกับวิธีมาตรฐาน

วิธีการตรวจ		ความไว ของการทดสอบ	ความจำเพาะ ของการทดสอบ
สูตร 1	6 ชั่วโมง	0	100
	12 ชั่วโมง	0	100
	18 ชั่วโมง	7.2	98.0
	24 ชั่วโมง	33.3	98.0
	30 ชั่วโมง	60.3	96.1
	36 ชั่วโมง	84.7	96.1
สูตร 2	6 ชั่วโมง	0	100
	12 ชั่วโมง	9.0	100
	18 ชั่วโมง	46.8	98.0
	24 ชั่วโมง	**97.3**	**98.0**
	30 ชั่วโมง	98.2	98.0
	36 ชั่วโมง	99.1	98.0
สูตร 3	6 ชั่วโมง	0	100
	12 ชั่วโมง	0	100
	18 ชั่วโมง	6.3	100
	24 ชั่วโมง	35.1	100
	30 ชั่วโมง	71.2	100
	36 ชั่วโมง	80.2	100
สูตร 4	6 ชั่วโมง	0	100
	12 ชั่วโมง	1.8	100
	18 ชั่วโมง	2.7	100
	24 ชั่วโมง	16.2	98.0
	30 ชั่วโมง	57.7	98.0
	36 ชั่วโมง	79.3	98.0

จากตาราง ที่ 4-3 เมื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของการทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำทั้ง 4 สูตร ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 ความไวของการทดสอบ



ภาพที่ 4.2 ความจำเพาะของการทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองได้แก่การใช้สูตรอาหารทั้ง 4 สูตรกับวิธีการมาตรฐานพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 , 3 และ 4 มีความไวของการทดสอบร้อยละ 84.7 , 80.1 และ 79.3 ตามลำดับ มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับคือร้อยละ 95 อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามสูตรจึงไม่เหมาะสมในการตรวจสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ผลการทดลองที่ระยะเวลา ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป พบว่าผลการทดสอบใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยพบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบสูงกว่าร้อยละ 95 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 จึงเหมาะสมสำหรับนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ โดยใช้ระยะเวลาเพาะเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อที่สั้นที่สุด และมีค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยมีค่าความไวของการทดสอบร้อยละ 97.3 และค่าความจำเพาะของการทดสอบ ร้อยละ 98.0

4.4 Detection limit

จากการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตร พบว่าสูตรอาหารที่ 2 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถพบปริมาณโคลิฟอร์มมากกว่า 6 MPN/100 ml จะให้ผลบวกในระดับที่สามารถยอมรับได้

6 MPN/ 100 ml. คือ จำนวนที่เราสามารถอ่านค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถอ่านค่าในรูปของผลบวกได้ในปริมาณที่สูง เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ที่ 1, 3 และ 4 จะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 30- 36 ชั่วโมงจึงจะสามารถอ่านค่าเป็นผลบวกได้ ดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ตารางแสดงการเกิดเชื้อโคลิฟอร์ม ณ เวลาต่างๆ ของแต่ละสูตรอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (MPN/100 ml)	ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)					
		6	12	18	24	30	36
สูตร 1	>1000	-	-	5	13	19	3
	400-500	-	-	2	2	6	-
	160-246	-	-	-	5	5	2
	52-96	-	-	-	3	1	1
	6-11	-	-	-	4	13	17
	<6	-	-	-	-	2	1
สูตร 2	>1000	-	9	19	4	-	-
	400-500	-	-	11	1	-	-
	160-246	-	-	3	10	-	-
	52-96	-	-	-	6	-	-
	6-11	-	-	13	27	1	1
	<6	-	-	-	-	1	-
สูตร 3	>1000	-	-	7	19	9	-
	400-500	-	-	-	4	7	-
	160-246	-	-	-	6	3	-
	52-96	-	-	-	3	3	1
	6-11	-	-	-	5	19	9
	<6	-	-	-	-	-	1
สูตร 4	>1000	-	-	-	11	19	1
	400-500	-	1	-	2	8	1
	160-246	-	-	1	1	7	3
	52-96	-	-	-	-	3	1
	6-11	-	-	-	1	9	17
	<6	-	-	-	-	1	-

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบวิธีการมาตรฐาน กับการเพาะเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร พบว่าการเพาะเชื้อโดยใช้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1 , 3 และ 4 มีความไวของการทดสอบต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามสูตรจึงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม สำหรับการเพาะเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ผลการวิจัยพบว่ามีค่าความไวของการทดสอบและความจำเพาะของการทดสอบสูงและใช้เวลาเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าความไวและความจำเพาะ
ของการทดสอบเท่ากับร้อยละ 97.3 และร้อยละ 98.0 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับได้คือร้อยละ 95 โดยอาหารสูตรใหม่นี้สามารถใช้ทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรดหรือกรดอ่อน ๆ ได้ และมีปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มตั้งแต่ 6 MPN/100 ml ซึ่งมีขีดจำกัดของการตรวจวัดได้ดีกว่าชุด Egat Aqua Test I เดิม ที่สามารถตรวจสอบน้ำที่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์มตั้งแต่ 13 MPN/100 ml ขึ้นไป

ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าส่วนประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม Egat Aqua test คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และรูปแบบที่เหมาะสม คือ การใช้สำลีแผ่นเป็นวัสดุดูดซับ ซึ่งชุดทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำที่ได้นี้ใช้ชื่อว่า “Egat Aqua Test II”

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 **Egat Aqua Test II** ใช้ทดสอบน้ำที่มีแบคทีเรียโคลิฟอร์มต่ำกว่า 6 MPN/100 ml ไม่ได้ ถ้ามีข้อสงสัยในการทดสอบต้องตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐานซ้ำ

5.2.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้หรือชุดตรวจ Egat Aqua Test II ใช้เวลาเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง สูตรนี้ใช้หลักการจับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มผลิตขึ้น จึงควรดำเนินการวิจัยต่อเนื่องโดยใช้หลักการอื่น ๆ หรือเทคโนโลยีอื่นที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อรวดเร็วกว่า 24 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

1. APHA, AWWA, WEF . 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater . 20 th Edition . United Book Press : Maryland.

2. APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater . 21 th Edition . United Book Press : Maryland.

3. D.H. Tambeekar , et. al. . 2007 . Evaluation of hydrogen sulfide test for detection of fecal coliform contamination in drinking water from various sources . African Journal of Biotechnology Vol. 6(6) March.

6. J. Pillai , et. al . 2008. H_2S Paper strip method A bacteriological test for faecal coliforms in drinking water at various temperatures. Murdoch University. Australia.

7. Jothikumar N. and Rao K.S. . 2000. "A field test for the assessment of faecal contamination of potable water" Journal of Environmental Monitoring 2 (2).

8. Mary Kay . 2011 . Shaker Agitation Rate and Orbit Affect Groth of Cultured Bacteria . Thermo scientific.

9. Munoz E.F. and Silverman M.P. 1979. "Rapid, Single- step most-probable-number method for enumerating fecal coliform in effluents form sewage treatment plants" Journal of Applied Environmental Microbiology 37(3) March.

10. Peter Feng , Stephen D. Weagant and Michael A. Grant . 2002 . Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria [online]. Available from: www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods , [2011 , Oct 10]

11. Raina M. , et. al . 2009. Environmental Microbiology. 2 nd Edition. Elservier Inc. , USA .

12. Suwan Tewari , et. al . 2002 . Evaluations of simple microbial tests for detection of fecal coliforms directly at 44.5 ^{0}C . Industrial Toxicology Research Centre . India.

13. Teresa Thiel , et. al . 1999. Introduction to Bacteria : Science in the Real World . University of Missouri .

14. Van Pouche S.O. and Nelis H.J. . 2000 . "A 210- min solid phase cytometry test for the enumeration of Escherichia coli in drinking water" Journal of Applied Environmental Microbiology 89(3) September.

15. Warren L.S., Benoit R.E. and Jossee J.A. 1978. "Rapid enumeration of Fecal Coliforms in water by a Colorimetric beta-galactosidase assay". Journal of Applied Environmental Microbiology 31(1) January.

16. การประปานครหลวง. 2536. มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภค . ราชกิจจานุเบกษา.

17. กรมทรัพยากรธรณี. 2521. มาตรฐานคุณภาพน้ำ . ราชกิจจานุเบกษา.

18. กรมอนามัย. 2543. เกณฑ์คุณภาพน้ำประปา . [online]. Available from: http://rldc.anamai.moph.go.th , [2011 , Oct 10]

19. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา. 2011. การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ [online]. Available from: http://www.marine. Chanthaburi.buu.ac.th , [2011 , Oct 10]

20. ตลาดแลบ. 2011. การผลิตไวน์จากมันสำปะหลัง [online]. Available from: www.Taladlab.talad.com , [2011 , Oct 10]

21. ทิพยรัตน์. 2553. ระดับความเชื่อมั่น (Confident level) [online]. Available from: http://www.idls.ru.ac.th/report [2012,Feb 20]

22. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช . 2553 . วิทยาการระบาดและการประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ในงานสาธารณสุข . บัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 5 .

23. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช . 2553 . สถิติและระเบียบวิธีวิจัยในงานสาธารณสุข . บัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 5 .

24. สุมิตร จำปา และสินีนาฏ สุนทรหิรัญวงศ์. 2543. รายงานการวิจัยโคลิฟอร์มแบคทีเรีย . กองอนามัย ฝ่ายแพทย์และอนามัย การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย .

25. สำนักงานสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.2534. มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภค. ราชกิจจานุเบกษา.

26. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2549. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค . ราชกิจจานุเบกษา.

27. องค์การอนามัยโลก . 2536. มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภค . [online]. Available from: www.who.int , [2011 , Oct 10]

ภาคผนวก ก

วิธีการเก็บและรักษาตัวอย่าง

วิธีการเก็บน้ำตัวอย่าง

1. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำทางแบคทีเรียต้องล้างให้สะอาด และผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

2. ถ้าในตัวอย่างน้ำมีคลอรีนหลงเหลือต้องเติม $Na_2S_2O_3$ เพื่อไปทำลายคลอรีนที่มีอยู่ในน้ำก่อน และผลของการวิเคราะห์ทางแบคทีเรียที่ได้ก็จะบอกถึงจำนวนแบคทีเรียที่มีจริง ๆ ในน้ำตัวอย่าง ณ เวลาที่ทำการเก็บ โดยเติม $Na_2S_2O_3$ ลงในขวดสำหรับเก็บตัวอย่างที่สะอาดก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ โดยเติม 0.1 มิลลิลิตรของ 10% $Na_2S_2O_3$ ลงในขวดตัวอย่างขนาด 4 ออนซ์ หรือ 120 มิลลิลิตร (ซึ่งจะทำลายคลอรีนประมาณ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวอย่าง) ปิดจุก เอากระดาษ foil หุ้มนำเข้าอบ

3. ขวดเก็บตัวอย่างควรปิดจุกอยู่ตลอดเวลาจนกว่าจะถึงเวลาเก็บ ในการเก็บตัวอย่างต้องระวังอย่าให้ดินเข้าไปและไม่ให้จับปากขวดหรือคอขวด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ให้จับตรงก้นขวด ให้เก็บตัวอย่างโดยไม่ต้องล้างขวดก่อน

4. ตัวอย่างที่เป็นน้ำจากก๊อก ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณหัวก็อกให้ทั่วใช้ไฟลนบริเวณหัวก๊อกนานประมาณ 1 นาที เปิดน้ำทิ้งประมาณ 1 – 2 นาที นำขวดแก้วไร้เชื้อ รองน้ำโดยวิธี Aseptic technique ปริมาตรของตัวอย่างที่เก็บไม่ควรน้อยกว่า 100 มิลลิลิตร ให้เหลือที่ว่างไว้ประมาณ 2.5 เซนติเมตรหรือ 1 นิ้ว จากปากขวดเพื่อความสะดวกในการเขย่าตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์

5. ตัวอย่างที่เป็นน้ำดิบ ใช้ภาชนะที่สะอาดตักน้ำใส่ขวดแก้วไร้เชื้อ โดยวิธี Aseptic technique เช่นเดียวกัน

6. ปิดฝาขวดให้แน่นทันทีที่เก็บ

7. ติดฉลากข้างภาชนะบรรจุตัวอย่างและระบุรายละเอียด

8. นำขวดใส่ในถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง รัดปากถุงให้แน่นด้วยหนังยาง เก็บรักษาตัวอย่างระหว่างขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ

การรักษาตัวอย่าง (Preservation and storage)

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางแบคทีเรียควรทำทันทีภายหลังจากเก็บตัวอย่าง เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้น ถ้าไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมงหลังการเก็บควรแช่ในน้ำแข็งระหว่างขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

อุณหภูมิของตัวอย่างที่เก็บมาควรรักษาให้ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสเสมอระหว่างขนส่ง และควรใช้เวลาในการขนส่งไม่เกิน 6 ชั่วโมง
เมื่อถึงห้องปฏิบัติการให้แช่ตู้เย็นทันทีและทำการวิเคราะห์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง
ในกรณีที่ใช้เวลาในการขนส่งเกินกว่า 6 ชั่วโมง ต้องแช่ตัวอย่างในตู้เย็นหรือน้ำแข็งในกล่องโฟมหรือกระติกตลอดเวลา และใช้เวลาในการขนส่งไม่เกิน 30 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติจากตารางความสัมพันธ์ 2 ทาง

ตัวอย่างการนำผลการวิจัยหาความสัมพันธ์ทางสถิติจากตารางความสัมพันธ์ 2 ทาง

ในการวิจัยต้องนำผลวิจัยที่ได้จากการทดลอง 213 ตัวอย่างโดยทดสอบในสภาวะที่แตกต่างกัน คือการใช้เครื่องเขย่า (Shaker) การเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ35 ± 0.5และ 44 .5 ± 0.2 องศาเซลเซียสเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิมคือเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความสัมพันธ์ 2 ทางก่อนที่จะวิเคราะห์หาความไวของทดสอบและความจำเพาะของการทดสอบ ซึ่งจะยกตัวอย่างการหาความสัมพันธ์ จำนวน 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างการทดสอบที่ 36-45 ดังนี้ โดยใช้วิธีการใช้เครื่องเขย่า (Shaker) โดยใช้เวลาเพาะเชื้อที่ 16 ชั่วโมง

ตารางที่ ข-1 ตัวอย่างการนำผลวิจัยหาความสัมพันธ์ทางสถิติจากตารางความสัมพันธ์

ตัวอย่าง	อุณหภูมิห้อง	เครื่องเขย่า					
	48	8	16	24	36	40	48
36	+	-	-	+	+	+	+
37	+	-	-	+	+	+	+
38	+	-	+	+	+	+	+
39	+	-	+	+	+	+	+
40	+	-	+	+	+	+	+
41	+	-	-	+	+	+	+
42	+	-	+	+	+	+	+
43	+	-	+	+	+	+	+
44	+	-	+	+	+	+	+
45	+	-	-	+	+	+	+

ตารางที่ ข-2 ตารางนำมาหาความสัมพันธ์ 2 ทางดังนี้

การทดสอบที่สภาวะต่าง ๆ	การทดสอบที่อุณหภูมิห้อง	
	ผลบวก	ผลลบ
ผลบวก	a (6)	b (0)
ผลลบ	c (4)	d (0)

ช่อง a หมายถึง วิธีการทดสอบได้ผลบวกทั้ง 2 วิธี ซึ่งมี 6 ตัวอย่าง

ช่อง b หมายถึง วิธีการเดิมคือเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องให้ผลลบแต่วิธีใช้เครื่องเขย่า (Shaker) ให้ผลบวก มี 0 ตัวอย่าง

ช่อง c หมายถึง วิธีการเดิมคือเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องให้ผลบวกแต่วิธีใช้เครื่องเขย่า (Shaker) ให้ผลลบ มี 4 ตัวอย่าง

ช่อง d หมายถึง วิธีการทดสอบได้ผลลบทั้ง 2 วิธี ซึ่งมี 0 ตัวอย่าง

จากความสัมพันธ์สองทางที่ได้นำ การคำนวณหาค่าของความเชื่อถือได้ (reliability)

ความไวของการทดสอบ

$$\text{Sensitivity} = \frac{a}{a+c} \times 100\%$$

แทนค่า

$$\text{Sensitivity} = \frac{6}{6+0} \times 100\%$$

ความจำเพาะของการทดสอบ

$$\text{Specificity} = \frac{d}{b+d} \times 100\%$$

แทนค่า

$$\text{Specificity} = \frac{0}{0+0} \times 100\%$$

ภาคผนวก ค

ภาพการทดลอง

รูปที่ ค- 1-2 การอ่านผลการทดสอบแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยใช้น้ำยา Egat Aqua test

ภาคผนวก ง

สูตรอาหารเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้ง 4 สูตร

สูตรอาหารเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้ง 4 สูตร

สูตรที่ 1

ส่วนประกอบ

1. Bacto Lactose	15-20	% โดยน้ำหนัก
2. Bacto Peptone	65-70	% โดยน้ำหนัก
3. di K_2HPO_4	6-8	% โดยน้ำหนัก
4. $Na_2S_2O_3$	2-3	% โดยน้ำหนัก
5. Teepol	2-5	% โดยน้ำหนัก
6. L-Cystine	1-2	% โดยน้ำหนัก

สูตรที่ 2

ส่วนประกอบ

1. Bacto Peptone	80-82	% โดยน้ำหนัก
2. di K_2HPO_4	5-7	% โดยน้ำหนัก
3. Iron (|||) Ammonium Citrate Green	2-4	% โดยน้ำหนัก
4. $Na_2S_2O_3$	3-6	% โดยน้ำหนัก
5. Teepol	3-6	% โดยน้ำหนัก
6. L-Cystine	1-2	% โดยน้ำหนัก

สูตรที่ 3

ส่วนประกอบ

1. Bacto Lactose	15-20	% โดยน้ำหนัก
2. Bacto Peptone	20-25	% โดยน้ำหนัก
3. Bile Salt No.3	8-15	% โดยน้ำหนัก
4. Beef Extract	2-4	% โดยน้ำหนัก
5. di K_2HPO_4	1-3	% โดยน้ำหนัก
6. Ferric Ammonium Citrate Green	1-3	% โดยน้ำหนัก
7. $Na_2S_2O_3$	1-3	% โดยน้ำหนัก
8. Teepol	1-3	% โดยน้ำหนัก

9. L-Cystine	0.5-1	% โดยน้ำหนัก

สูตรที่ 4

ส่วนประกอบ

1. Bacto Lactose	35-40	% โดยน้ำหนัก
2. Bacto Peptone	35-40	% โดยน้ำหนัก
3. Oxgall	7.5-15	% โดยน้ำหนัก
4. Bile Salt No.3	2-5	% โดยน้ำหนัก
5. Beef Extract	5-10	% โดยน้ำหนัก
6. Phenolphthalein	1-2	% โดยน้ำหนัก