กรมอนามัย

การทวนสอบวิธีการตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในน้ำบริโภค

ชื่อ นางสาวพชรภร แก้วสำราญ

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ ปฏิบัติการ
ตำแหน่งเลขที่ 2173
กลุ่มวิชาการทางจุลชีววิทยา
กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
กรมอนามัย

เพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ ชำนาญการ
ตำแหน่งเลขที่ 2173
กลุ่มงานวิชาการทางจุลชีววิทยา
กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

บทคัดย่อ

การทวนสอบความถูกต้องของวิธี Multiple Tube Fermentation หรือ Most Probable Number : MPN ที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* โดยการทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ ตาม ISO 16140-3 : 2021 เพื่อหาค่า (Estimate Bias) eBias ในตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด และน้ำประปา ซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มน้ำบริโภคที่ส่งตรวจกับกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย เลือกระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ (ระดับสูง ระดับกลาง ระดับต่ำ) ที่ 20 CFU/100 ml, 10 CFU/100 ml และ 1.5 CFU/100ml ค่า eBias ของน้ำดื่มในภาชนะบ รรจุปิดสนิทเท่ากับ 0.00, 0.05 และ 0.00 ตามลำดับ และค่า eBias ของน้ำดื่มในน้ำประปาเท่ากับ 0.18, 0.05 และ 0.00 ตามลำดับ ซึ่งค่า eBias จากการทวนสอบตัวอย่างน้ำทั้ง 2 ประเภท มีค่าไม่เกิน $0.5\log_{10}$ MPN/100ml เป็นไปตามเงื่อนไขการยอมรับ แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* โดยใช้วิธี Multiple Tube Fermentation ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed., 2017 ได้ตามที่วิธีมาตรฐานกำหนด และมีผลการทดสอบถูกต้อง เป็นที่น่าเชื่อถือ และสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการยื่นขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ได้

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานโครงการบรรลุผลสำเร็จไปด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากบุคลากรหลายท่าน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบพระคุณนางสาวยุพิน โจ้แปง ผู้อำนวยการกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขเอกสารการดำเนินงานโครงการ จนทำให้เอกสารงานการดำเนินงานโครงการฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทีมงานกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข สำหรับ เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่สำหรับใช้ในการดำเนินงานโครงการ

ขอขอบคุณบุคลากรกรมอนามัย ผู้มีความรู้ความเชี่ยวชาญที่ให้ความรู้ในเทคนิคเฉพาะด้านและแง่คิดใหม่ๆ ในการดำเนินงานโครงการของข้าพเจ้าเป็นผลให้การดำเนินงานโครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พชรภร แก้วสำราญ

สิงหาคม 2565

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
กิตติกรรมประกาศ	(2)
สารบัญ	(3)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	15
บทที่ 4 ผลการศึกษา	22
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก ก เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภค	43
ภาคผนวก ข วิธีการทดสอบหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition : 2017	48

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย มีภารกิจหลักคือ ตรวจวิเคราะห์ และทดสอบคุณภาพน้ำบริโภค/อุปโภค น้ำทิ้ง/น้ำเสีย และน้ำประเภทอื่นๆ ในการตรวจวิเคราะห์และทดสอบ ประกอบด้วยการตรวจด้านกายภาพ การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี-โลหะหนัก และการทดสอบทางจุลชีววิทยา โดยตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์และทดสอบเป็นตัวอย่างจากทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อนำผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำบริโภค และปรับปรุงคุณภาพน้ำประเภทต่างๆ เพื่อคุ้มครอง ดูแลสุขภาพของประชาชน ดังนั้นผลการตรวจวิเคราะห์และทดสอบจากห้องปฏิบัติการจึงต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ เป็นที่ยอมรับจากผู้รับบริการทั้งภาครัฐ เอกชน และผู้เกี่ยวข้อง

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย จึงได้จัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการและได้รับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการทั่วโลก เพื่อยืนยันว่าห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย มีความสามารถในการทดสอบและผลการทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือสามารถนำผลการทดสอบนั้นไปใช้ประโยชน์ และอ้างอิงต่อไปได้

ดังนั้นห้องปฏิบัติการทางด้านจุลชีววิทยา กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย จึงได้ดำเนินการขอรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ขอบข่ายการขอรับรองข้อมูลโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ อี. โคไล ในน้ำบริโภค โดยวิธี “Multiple Tube Fermentation Technique ตาม Standard Method for the Examination of Water and Waste Water 23rd Ed. ข้อ 9211B, 9221Eและ 9211F”[1]

จากข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของของห้องปฏิบัติการและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ข้อ 7.2.1.5 กำหนดว่า ห้องปฏิบัติการต้องทวนสอบว่า สามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้อง ก่อนนำวิธีการนั้นมาใช้ โดยต้องมั่นใจว่า สามารถดำเนินการได้ตามข้อกำหนด และต้องจัดเก็บบันทึกการทวนสอบไว้ ถ้าวิธีมีการแก้ไขโดยหน่วยงานที่จัดทำวิธีนั้น ห้องปฏิบัติการต้องทวบสอบใหม่ตามขอบเขตที่จำเป็น[2] ดังนั้นก่อนที่ห้องปฏิบัติการจะนำวิธี “Multiple Tube Fermentation Technique ตาม Standard Method for the Examination of Water and Waste Water 23rd Ed. ข้อ 9211B, 9221Eและ 9211F” มาใช้ในการทดสอบคุณภาพน้ำบริโภค จะต้องมีการทวนสอบวิธีก่อนนำมาใช้ เพื่อแสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย สามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้อง และสร้างความมั่นใจแก่

ผู้รับบริการว่าจะได้รับผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือ โดยห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตาม ISO 16140-3 : 2021 Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory)[3] ซึ่งเป็นการทวนสอบวิธีอ้างอิงและวิธีการทางเลือกที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการเดี่ยว โดยใช้แนวทางการทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ จากการหาค่า Estimated bias (eBias) ในกลุ่มตัวอย่างน้ำบริโภค ได้แก่ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท และน้ำประปา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบในการตรวจวิเคราะห์และทดสอบประจำวันของห้องปฏิบัติการ

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทวนสอบความใช้ได้ของวิธี Multiple Tube Fermentation ในการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยการหาค่าสัมบูรณ์ความแตกต่างของผลการทดสอบ (Estimate Bias ; eBias)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ทำให้มั่นใจได้ว่า ห้องปฏิบัติการของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย สามารถดำเนินการตรวจวิเคราะห์ได้ตามที่วิธีมาตรฐานกำหนดได้อย่างถูกต้อง และมีผลการทดสอบเป็นน่าเชื่อถือ

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. น้ำบริโภค

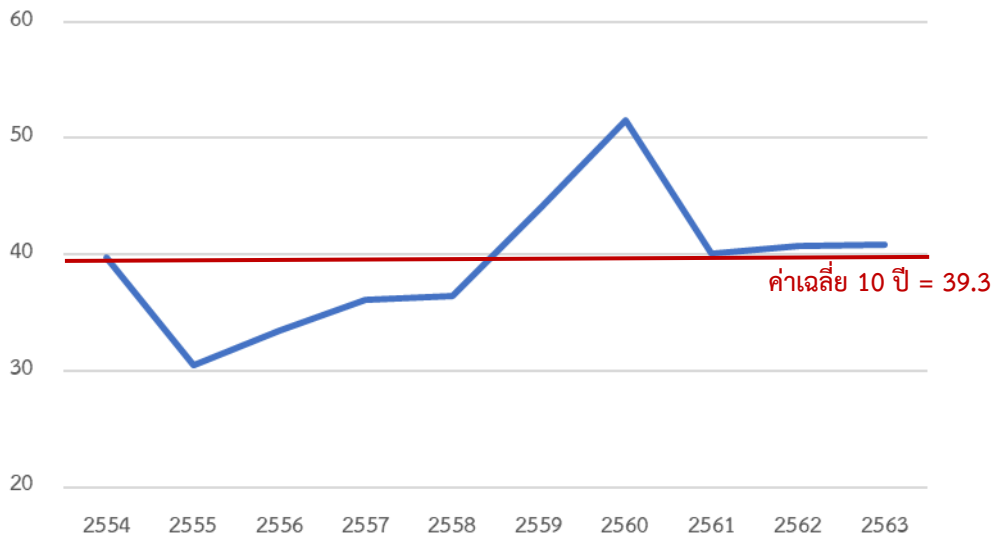
น้ำบริโภค หมายถึง น้ำที่ใช้ดื่ม รวมทั้งใช้ทำอาหารและเครื่องดื่ม แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 บรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิท

ประเภทที่ 2 ไม่บรรจุในภาชนะบรรจุ

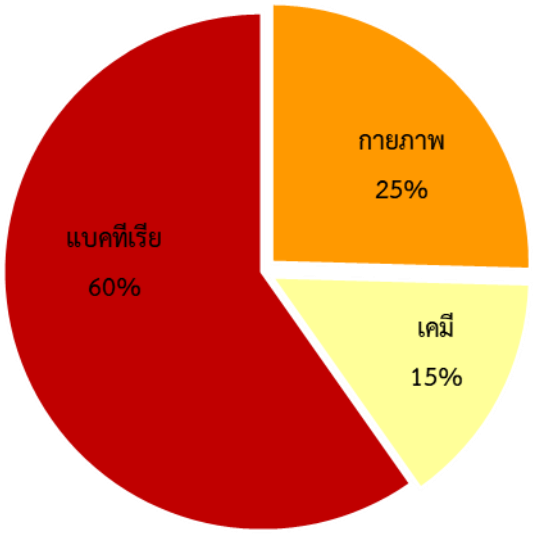
เนื่องจากน้ำบริโภคมีความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยของประชากรในทุกประเทศเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้น น้ำบริโภคจะต้องปราศจากสิ่งแปลมปลอมและกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์หรือเป็นที่น่ารังเกียจ[4]

จากการดำเนินการเพื่อเฝ้าระวังคุณภาพน้ำบริโภคโดยสำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย ในรอบ 10 ปี ที่ผ่านมา (พ.ศ. 2554 – พ.ศ. 2563)[5] โดยการสุ่มเฝ้าระวังคุณภาพน้ำบริโภคทั่วประเทศทั้งหมด 13,156 ตัวอย่าง เปรียบเทียบเกณฑ์ประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2553 พบว่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 – พ.ศ. 2563 น้ำบริโภคในครัวเรือนของประเทศไทยผ่านเกณฑ์น้ำประปาดื่มได้ เฉลี่ยร้อยละ 39.3 และมีแนวโน้มผ่านเกณฑ์น้ำประปาดื่มได้เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในปี พ.ศ. 2560 น้ำบริโภคในครัวเรือนผ่านเกณฑ์น้ำประปาดื่มได้มากถึงร้อยละ 51.5 ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงร้อยละของคุณภาพน้ำบริโภคครัวเรือนในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 – พ.ศ. 2563

สำหรับสาเหตุที่ทำให้คุณภาพน้ำบริโภคในครัวเรือนของประเทศไทยไม่ผ่านเกณฑ์น้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2553 นั้น มาจากการปนเปื้อนทางด้านแบคทีเรียโดยเฉลี่ยสูงมากถึงร้อยละ 61.8 ส่วนด้านกายภาพและเคมีมีเพียงร้อยละ 26.3 และ 15.3 ตามลำดับ[5] ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงร้อยละของคุณภาพน้ำบริโภคครัวเรือนที่ไม่ผ่านเกณฑ์จำแนกตามสาเหตุ 10 ปีย้อนหลัง

การตรวจคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียเป็นดัชนีที่จะบ่งชี้ถึงความสกปรกของน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น ไทยฟอยด์ บิด และอหิวาตกโรค สามารถตรวจพบได้ในอุจจาระ เมื่อถูกขับถ่ายปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำและจะมีผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพ สำหรับการตรวจสอบคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียส่วนใหญ่ จะตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ได้แก่ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria), ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (fecal coliform bacteria) และ *E. coli*

ข้อกำหนดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียของมาตรฐานน้ำบริโภคในประเทศไทยอยู่ 3 มาตรฐาน ซึ่งข้อกำหนดโดยหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบคือ สำนักคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุข, สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) กระทรวงอุตสาหกรรม และกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งมีรายละเอียดในข้อกำหนดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียแตกต่างกัน ดังนี้

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524)[6] และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534)[7] เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุปิดสนิท ได้กำหนดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียไว้ดังนี้

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	ต้องน้อยกว่า	2.2 MPN/100 ml.
E. coli	ต้องไม่พบ	

2. ประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค มาตรฐานเลขที่ มอก.257-2549 [4] ได้กำหนดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียไว้ดังนี้

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	ต้องน้อยกว่า	1.1 MPN/100 ml.
E. coli	ต้องตรวจไม่พบ	

3. ประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2563[8]

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	ต้องน้อยกว่า	1.1 MPN/100 ml.
E. coli	ต้องน้อยกว่า	1.1 MPN/100 ml.

2. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria)

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย คือกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หรือ 37 องศาเซลเซียส แล้วให้กรดและก๊าซภายในเวลา 24 – 48 ชั่วโมง[9] โดยทั่วไปสามารถพบโคลิฟอร์มแบคทีเรียได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืช ผัก รวมทั้งพบได้ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น[10] โคลิฟอร์มแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (non-pathogen) แต่ปริมาณของโคลิฟอร์มแบคทีเรียใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของน้ำและอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ก่อโรค (Enteric Pathogens) และมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีกว่า Enteric Pathogens จึงง่ายและสะดวกที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์ [11]

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 นอน-ฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal coliform bacteria) ที่พบได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ดิน และพืช ได้แก่ แบคทีเรียสกุล Enterobacter Citrobacter และ Klebsiella[12]

กลุ่มที่ 2 ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (fecal coliform bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสที่อุณหภูมิ 44 หรือ 44.5 องศาเซลเซียส ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล Escherichia[9]

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

E. coli จัดอยู่ในกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น

ในอุจจาระของคนมี *E. coli* ปนเปื้อนอยู่ 107 -109 เซลล์ต่อกรัม [13] ปกติ *E. coli* จะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่นโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมี *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนในอาหารหรือน้ำดื่ม[14]

3. การตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในน้ำบริโภค

การตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นการตรวจหาแบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงความสะอาดของน้ำ วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ เทคนิคการหมักแบบหลายหลอด (multiple tube fermentation technique) เป็นการตรวจหาโคลิฟอร์มเชิงปริมาณเพื่อหาความหนาแน่นของโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำและประเมินผลผ่านตาราง MPN (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นค่าจากการทดลองและคำนวณผลทางสถิติบ่งบอกถึงค่าเฉลี่ยของโคลิฟอร์มในตัวอย่าง (most probable number : MPN)

ตารางที่ 1 ค่า MPN และค่าความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับผลบวกและผลลบเมื่อใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด[1]

No. of Positive tubes (10 ml. Each)	MPN Index/ 100 ml.	95% Confidence Limit (Exact)	
		Lower	Upper
0	<1.1	-	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	13	-

วิธี Multiple-tube Fermentation Technique ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน[1] คือ

3.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase) เป็นขั้นตอนเมื่อแยกโคลิฟอร์มแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ โดยนำตัวอย่างน้ำใส่ในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth พร้อมหลอดดักก๊าซ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาตรวจผลการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส แล้วนำหลอดที่เกิดก๊าซไปทดสอบต่อในการตรวจสอบยืนยัน

3.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed phase) เป็นการยืนยันการตรวจพบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. Coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะสำหรับโคลิฟอร์มแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ดังนี้

3.2.1 การตรวจสอบยืนยันโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซทุกหลอดในขั้น presumptive test ถ่ายลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) แบบหลอดต่อหลอด บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง ตรวจผลบวกโดยดูการเจริญของเชื้อและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกเปรียบเทียบกับตาราง MPN (ตารางที่ 1) จะได้ผลโคลิฟอร์มแบคทีเรียเป็นค่า MPN/100 ml

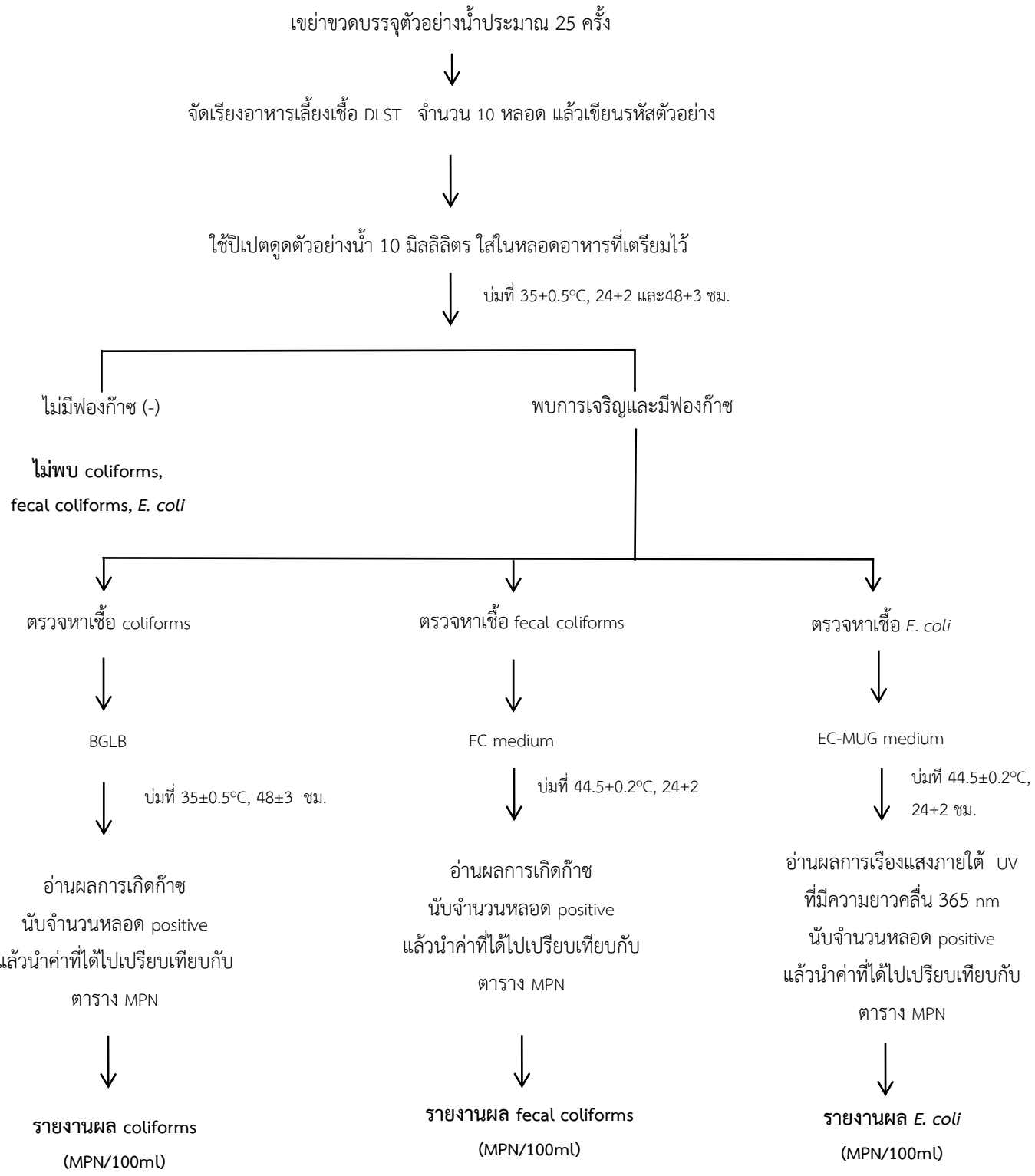
3.2.2 การตรวจสอบยืนยันฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซทุกหลอดในขั้น presumptive test ถ่ายลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC Medium (EC) แบบหลอดต่อหลอด บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง ภายใน 30 นาที หลังจากการถ่ายเชื้อตรวจผลบวก (positive) โดยดูการเจริญของเชื้อและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกเปรียบเทียบกับตาราง MPN (ตารางที่ 1) จะได้ผลฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียเป็นค่า MPN/100 ml

3.2.3 การตรวจสอบยืนยัน *E. coli* โดยนำเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซทุกหลอดในขั้น presumptive test ถ่ายลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-MUG Medium (EC-MUG) แบบหลอดต่อหลอด บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง ภายใน 30 นาที หลังจากการถ่ายเชื้อตรวจผลบวก (positive) โดยส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร

3.3 การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (complete phase)

ขั้นตอนนี้เป็นการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ โดยการนำเชื้อจากหลอดทดลองที่ให้ผลบวกในขั้น confirmed phase มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Endo agar LES หรือ Macconkey agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีสีชมพูแดง ผิวมันวาว ซึ่งคาดว่าจะเป็น *E. coli* ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth เพื่อตรวจสอบผลการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส และตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม

สำหรับการตรวจสอบโคลิฟอร์ม (coliforms) ในน้ำบริโภค ให้ดำเนินการเพียง 2 ขั้นตอน คือ presumptive phase และ confirmed phase เท่านั้น ไม่ต้องทำขั้นตอน complete test



รูปที่ 3 การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำ

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation) เป็นกระบวนการที่ใช้ในการตรวจสอบสมรรถนะของวิธีทดสอบ ว่าเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานหรือไม่ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า วิธีที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้รวมถึงเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ มีความเหมาะสมต่อการทดสอบ และให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นแก่ผู้รับบริการ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017[15] ต้องเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เป็นไปความต้องการของลูกค้าและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบในกรณีที่ลูกค้าไม่ได้ระบุวิธีทดสอบมาให้ห้องปฏิบัติการเลือกใช้วิธีทดสอบที่เป็นปัจจุบันให้กับลูกค้าดังนี้

1. เลือกใช้วิธีมาตรฐาน ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับประเทศ หรือเป็นวิธีในตำรา วารสารทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องซึ่งมีการรับรองโดยหน่วยงานด้านวิชาการที่เชื่อถือได้หรือมีชื่อเสียง

2. เลือกใช้วิธีไม่เป็นมาตรฐาน (non-standard method) วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเองวิธีที่มีการขยายหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (modified method) รวมทั้งการใช้วิธีมาตรฐานนอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือวิธีที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและ/หรือให้ผลรวดเร็ว

ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบนั้น ๆ ที่เป็นวิธีทางเลือก (alternative method) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference methods) ตามขั้นตอนในวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจสอบความถูกต้อง (validation of methods) หรือ การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (verification) เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติเลือกใช้มีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ในขอบเขตการยอมรับว่าผลการทดสอบที่ได้มีความน่าเชื่อถือตามข้อกำหนด 7.2.1.5 ห้องปฏิบัติการต้องทวนสอบว่าสามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้อง ก่อนนำวิธีการนั้นมาใช้ โดยต้องมั่นใจว่าสามารถดำเนินการได้ตามข้อกำหนด และต้องจัดเก็บบันทึกการทวนสอบไว้ ถ้าวิธีมีการแก้ไขโดยหน่วยงานที่จัดทำวิธีนั้น ห้องปฏิบัติการต้องทวนสอบใหม่ตามขอบเขตที่จำเป็น ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงต้องทวนสอบวิธีทั้งวิธีมาตรฐานหรือวิธีไม่เป็นมาตรฐานก็ตาม และสำหรับวิธีไม่เป็นมาตรฐาน ตามข้อกำหนดที่ 7.2.2.1 ห้องปฏิบัติการต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ไม่เป็นมาตวิธีที่มาตรฐานวิธีห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นเองและวิธีตามมาตรฐานที่ถูกใช้นอกขอบข่ายที่กำหนดไว้หรือมีการดัดแปลงวิธีมาตรฐาน การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต้องครอบคลุมขอบเขตตามความจำเป็น เพื่อให้เป็นไปตามความต้องการของการใช้งานหรือตามสาขาของการใช้งาน[2]

การทวนสอบวิธีทดสอบที่เป็นวิธีอ้างอิงหรือวิธีมาตรฐาน ตามมาตรฐาน ISO 16140-3 PART 3 : PROTOCAL FOR THE VERIFICATION OF REFERENCE METHODS AND VILIDATED ALTERNATIVE METHODS IN A SINGLE LABORATORY[3] เป็นแนวทางในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีมาตรฐานที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Validate reference methods) เพื่อแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการ ในการใช้วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้วว่าได้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีและเหมาะสมต่อการใช้งาน

4.1 หลักการทั่วไปของการทวนสอบวิธี มี 2 แบบ คือ

4.1.1 Implementation verification (ทวนสอบการนำไปใช้งาน) เป็นการแสดงความสามรถของห้องปฏิบัติการในการใช้วิธีที่ได้รับการตรวจสอบ (validated) แล้วได้อย่างถูกต้อง สอดคล้องกับผลการ validated

กรณีทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ (พบ/ไม่พบ) (qualitative method) ห้องปฏิบัติการจะต้องทบทวนข้อมูล validation และเลือกทวนสอบตัวอย่าง 1 รายการที่ตรงกับขอบข่าย validation และอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้ ถ้ารายการที่อยู่ในข้อมูล validation ไม่อยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้ ห้องปฏิบัติการต้องจัดหาตัวอย่างรายการดังกล่าวมาทวนสอบและต้องมีขนาด (sample size) เดียวกับการศึกษาในข้อมูลการ validation

กรณีทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ (quantitative method) ห้องปฏิบัติการเลือกทวนสอบตัวอย่างใดก็ได้ 1 รายการที่อยู่ในขอบข่าย validation โดยไม่จำเป็นต้องเป็นตัวอย่างเดียวกัน แต่ต้องอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการนำไปใช้

4.1.2 (food) item verification (ทวนสอบตามรายการ) เป็นการแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีทดสอบไปใช้กับตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายของห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายของ validation รวมถึงตัวอย่างที่ทดสอบในงานประจำของห้องปฏิบัติการ เพื่อแสดงความสามารถห้องปฏิบัติการในการทดสอบ (food)item ซึ่งอยู่ในขอบข่ายที่ห้องปฏิบัติการอ้างถึง และนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างถูกต้อง

4.2 การเลือกวิธีที่ใช้ในการทวนสอบ มี 2 แนวทางดังนี้

4.2.1 วิธีทดสอบที่มีข้อมูลการการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (validate)

หากต้องการทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ (qualitative method) ทั้งใน Implementation verification และ (food)item verification) ให้การหาค่า Estimated LOD_{50} ($eLOD_{50}$) ส่วนการทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ (quantitative method) หาค่า Intralaboratory reproducibility (S_{IR}) ใน Implementation verification และ Estimated bias (eBias) ใน (Food) item verification (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แนวทางการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสำหรับวิธีทดสอบที่มีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี[3]

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(food) item verification
Qualitative	Estimated LOD_{50} ($eLOD_{50}$)	✓	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility (S_{IR})	✓	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

4.2.2 วิธีทดสอบที่ใช้ไม่มีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (non-validate)

ในกรณีที่วิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (reference method) ที่ใช้ไม่มีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ให้ปฏิบัติตาม ISO 16140-3 : 2021 , Annex F (Protocol for the verification of non-validated reference methods in a single laboratory) ซึ่งกำหนดไว้ว่า วิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิงที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมาก่อนให้ทำการทวนสอบตามรายการ ((food) item verification) เท่านั้น ไม่ต้องทวนสอบการใช้งาน (Implementation verification) เนื่องจากไม่มีข้อมูลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีให้เรานำไปเทียบเคียง กรณีการทวนสอบวิธีเชิงคุณภาพ (qualitative method) ให้หาค่า Estimated LOD_{50} ($eLOD_{50}$) และกรณีทวนสอบวิธีเชิงปริมาณ (quantitative method) ให้หาค่า Estimated bias (eBias) เท่านั้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แนวทางการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสำหรับวิธีที่ไม่มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ[3]

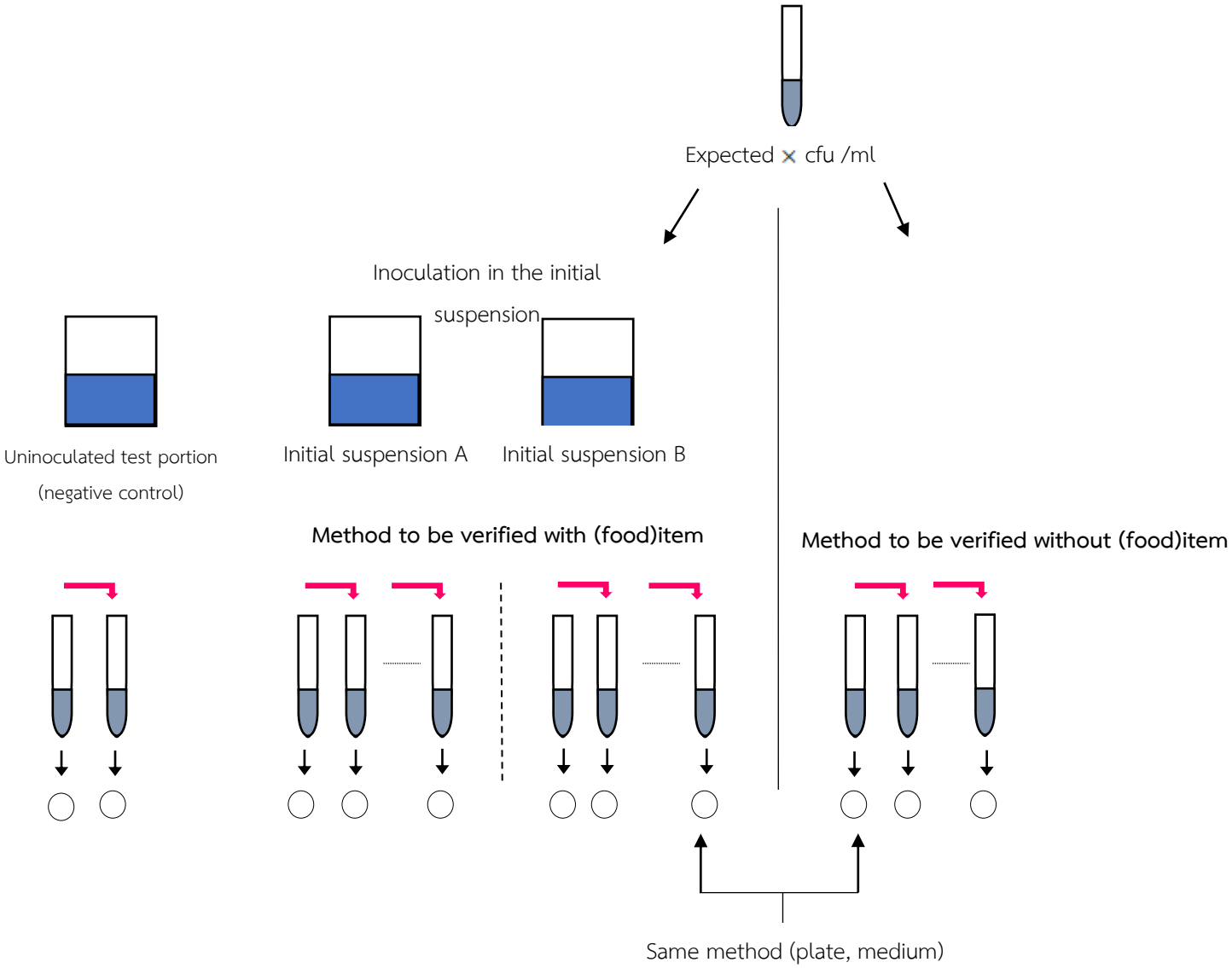
Method	Performance characteristic	Implementation verification	(food) item verification
Qualitative	Estimated LOD_{50} ($eLOD_{50}$)	Not applicable	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility (S_{IR})	Not applicable	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

4.4 การประมาณค่า Estimate Bias (eBias)

การประมาณค่า Estimate Bias (eBias) เป็นการทวนสอบเชิงปริมาณสำหรับการทวนสอบวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยห้องปฏิบัติการเลือกตัวอย่าง 1 รายการที่ไม่ท้าทายจากกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีอ้างอิงและอยู่ในขอบข่ายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ และเลือกตัวอย่างรายการที่ท้าท้ายอย่างน้อย 1 รายการจากแต่ละกลุ่มของตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ มาทำการทวนสอบโดยแต่ละรายการจะแบ่งเป็น 3 ชุดการทดสอบดังนี้

1) ตัวอย่างที่เติมเชื้อ
2) สารละลายที่เติมเชื้อ (inoculum suspension)
3) ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ (negative control)

ระดับการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่าง และสารละลายให้เลือก 3 ระดับ (ต่ำ กลาง สูง) โดยเจือจางเชื้อให้คลอบคลุมปริมาณที่พบในการทดสอบในงานประจำ และทำระดับละ 2 ซ้ำ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 วิธีการทวนสอบเพื่อหาค่า Estimate Bias (eBias)

การประเมินผลการทดสอบ ดูผลตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ (negative control) ต้องได้ผลเป็นลบเท่านั้น หากเป็นบวกจะถือว่าการทดสอบครั้งนี้ไม่สามารถนำมาใช้ได้ ถ้ามีผลเป็นลบให้นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากตัวอย่างที่เติมเชื้อ และสารละลายที่เติมเชื้อ (positive control) เปรียบเทียบตารางเพื่ออ่านค่า MPN แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า log จากตารางที่ 4 จากนั้นหาค่าความแตกต่างปริมาณเชื้อระหว่างตัวอย่างที่เติมเชื้อ และสารละลายที่เติมเชื้อทั้ง 3 ระดับ ซึ่งเกณฑ์การยอมรับต้องมีค่าต่างกันไม่เกิน “0.5 $\log_{10}$CFU/ml”

ตารางที่ 4 ค่า MPN และค่า $\log_{10}$MPN สำหรับผลบวกและผลลบเมื่อใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด

No. of Positive tubes (10 ml. Each)	MPN Index/ 100 ml.	$\log_{10}$MPN
0	<1.1	NA
1	1.1	0.0414
2	2.2	0.3424
3	3.6	0.5563
4	5.1	0.7076
5	6.9	0.8388
6	9.2	0.9638
7	12	1.0792
8	16	1.2041
9	23	1.3617
10	>23	NA

หมายเหตุ : NA - ไม่สามารถหาค่าได้ (Not Applicable)

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

การทวนสอบวิธีเชิงปริมาณโดยการหาค่า Estimate Bias (eBias) ตาม ISO 16140-3 : 2021 Annex F (Protocol for the verification of non – validated reference methods in a single laboratory) ซึ่งเป็นการทวนสอบวิธีอ้างอิงที่ยังไม่ได้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยจะทวนสอบเฉพาะรายการทดสอบ ((food) item verification) เท่านั้น

ตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบในครั้งนี้ เป็นตัวอย่างในกลุ่มน้ำบริโภคที่ส่งมาทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ด้วยวิธี MPN (Multiple Tube Fermentation) ณ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย โดยเลือกตัวอย่างน้ำ 2 รายการ ได้แก่ น้ำดื่มบรรจุภาชนะปิดสนิทและน้ำประปา โดยมีขั้นตอนการทวนสอบดังนี้

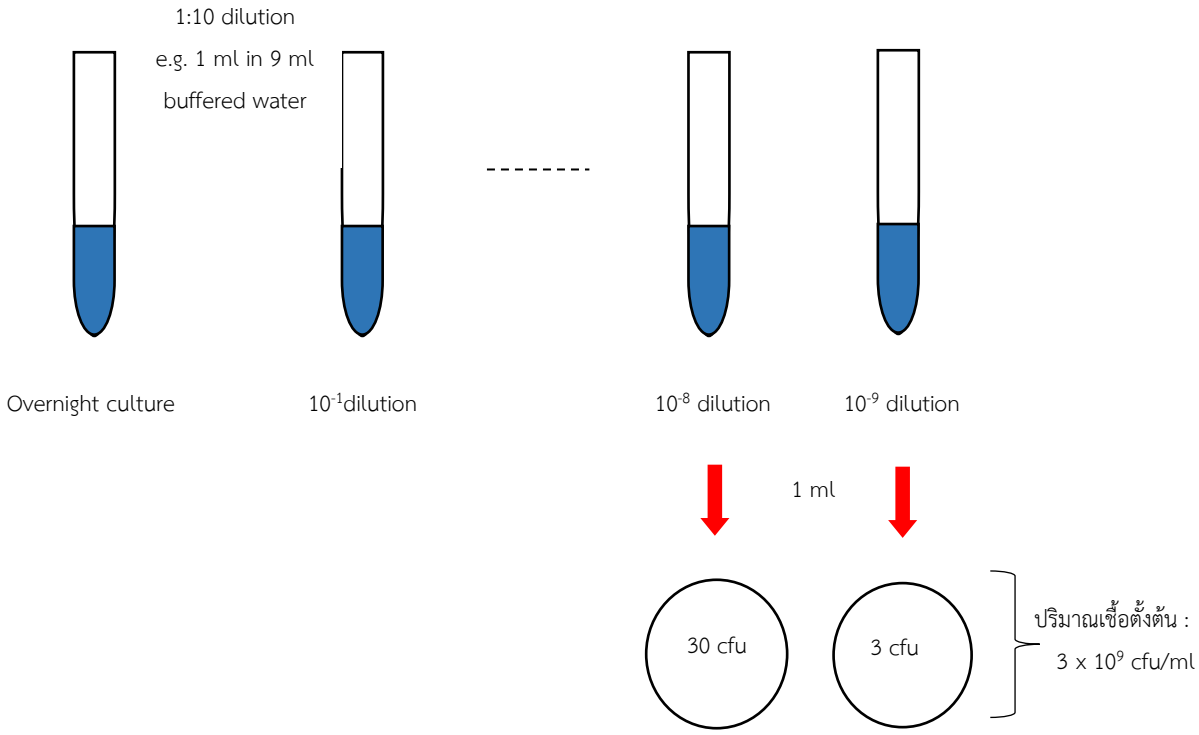
1. การเตรียมเชื้อมาตรฐานตั้งต้น

1.1 นำเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จาก stock culture มา streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35±1 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

1.3 เมื่อครบกำหนดนำ Tryptic Soy Broth (TSB) มาทำการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water) ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-9} และทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจาง ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ 35±1°C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

1.4 นับจำนวนโคโลนีบน PCA จะทราบปริมาณเชื้อตั้งต้น (CFU/ml) ดังแสดงในรูปที่ 5

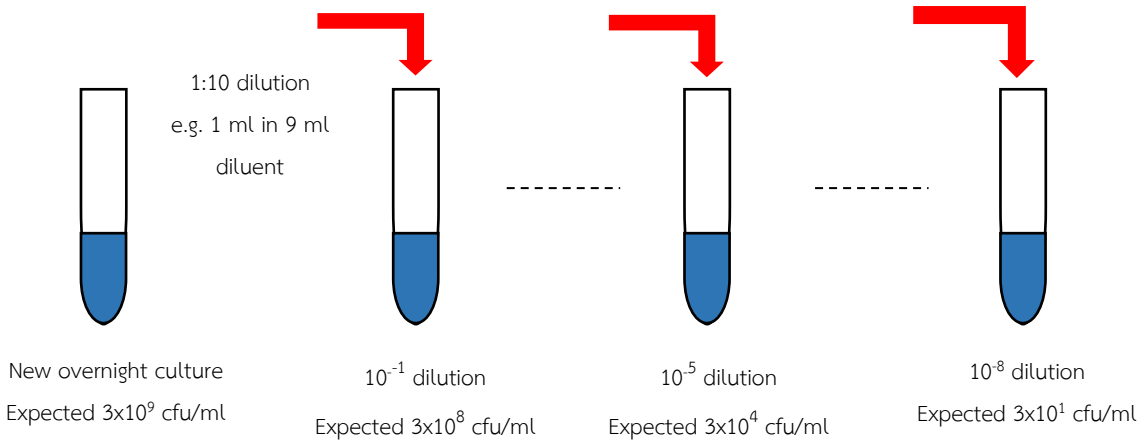


รูปที่ 5 แสดงการเตรียมเชื้อมาตรฐานตั้งต้น

2. การเจือจางเชื้อมาตรฐานสำหรับเติม (spike) ลงในตัวอย่างทดสอบ

2.1 เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* อีกครั้งในสภาวะเดิมที่เคยนับได้

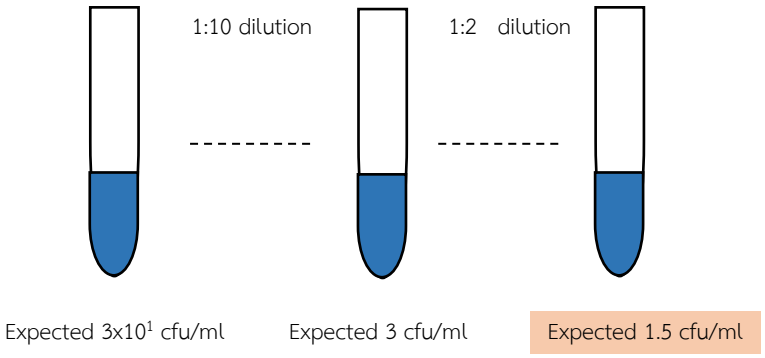
2.2 เจือจางเชื้อแบบ Ten- Flod dilution ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water) จนถึงความเข้มข้น 10^{-8} (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงการเจือจางเชื้อมาตรฐาน

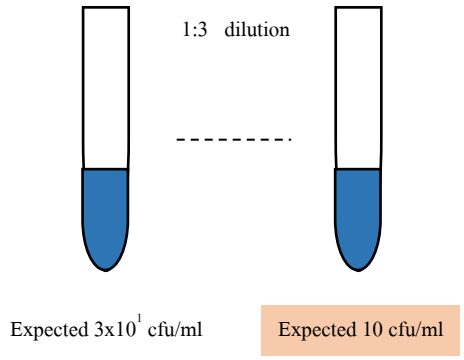
2.3 นำเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีความเข้มข้น 10^{-8} ซึ่งมีปริมาณเชื้อคาดหวัง 3 x 10^{1} CFU/ml มาทำการเจือจางด้วย buffered water ให้อยู่ในช่วงที่พบในงานประจำ 3 ระดับ (ต่ำ กลาง สูง) ดังนี้

- **ระดับการปนเปื้อนต่ำ** เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 1.5 cfu/ml โดยเริ่มจากการปิเปตเชื้อตั้งต้นที่ 3 x 10^{1} CFU/ml มาเจือจางแบบ Ten- Flod dilution ด้วย buffered water จนถึงความเข้มข้น 10^{-9} จะได้ปริมาณเชื้อ 3 CFU/ml จากนั้นเจือจางต่อแบบ 1: 2 โดยปิเปตเชื้อจากหลอดที่คาดว่ามีปริมาณเชื้อ 3 CFU/ml ปริมาตร 5 ml ใส่ลงใน buffered water 5 ml จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 1.5 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 7



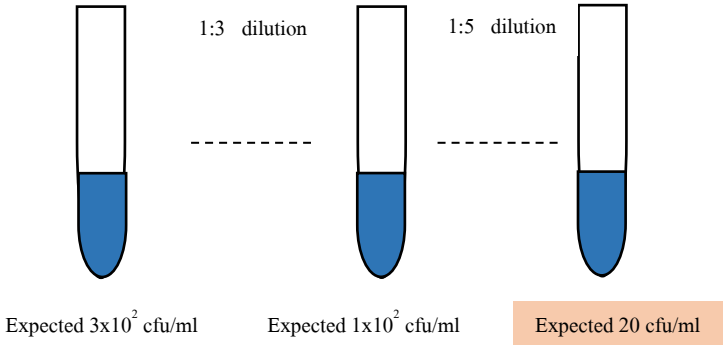
รูปที่ 7 แสดงการเจือจางเชื้อระดับการปนเปื้อนต่ำเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อคาดหวัง 1.5 cfu/ml

- ระดับการปนเปื้อนกลาง เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 10 cfu/ml โดยการเจือจางแบบ 1: 3 เริ่มจากการปิเปตเชื้อตั้งต้นที่ 3 x 10^{1} CFU/ml ปริมาตร 4 ml ใส่ลงใน buffered water 8 ml จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 3 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงการเจือจางเชื้อระดับการปนเปื้อนกลางเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อคาดหวัง 10 cfu/ml

- **ระดับการปนเปื้อนสูง** เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 20 cfu/ml โดยเริ่มจากการปิเปตเชื้อตั้งต้นที่ 3 x 10^2 CFU/ml มาเจือจางแบบ 1:3 ด้วย buffered water จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 1 x 10^2 CFU/ml จากนั้นเจือจางต่อแบบ 1: 5 โดยปิเปตเชื้อจากหลอดที่คาดว่ามีปริมาณเชื้อ 1 x 10^2 CFU/ml ปริมาตร 2 ml ใส่ลงใน buffered water 8 ml จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 20 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงการเจือจางเชื้อระดับการปนเปื้อนสูงเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อคาดหวัง 20 cfu/ml

3. การเตรียมตัวอย่างในการทวนสอบวิธีเชิงปริมาณโดยการหาค่า Estimate Bias (eBias)

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการทวนสอบตามรายการ ((food) item verification) เลือกรายการที่ใช้ในการทวนสอบจากกลุ่มตัวอย่างน้ำบริโภคของกองห้องปฏิบัติการกรมอนามัย จำนวน 2 รายการ คือ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท และน้ำประปา โดยจะแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลองดังนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ประกอบด้วย

- ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ปริมาตร 100 ml. ไม่เติมเชื้อ (negative control)
- ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ปริมาตร 100 ml. จำนวน 6 ขวด
  เติมเชื้อที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ระดับ ขวดละ 1 ml. ระดับละ 2 ขวด (test portion A และ B)

3.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำประปา ประกอบด้วย

- ตัวอย่างน้ำประปา ปริมาตร 100 ml. ไม่เติมเชื้อ (negative control)
- ตัวอย่างน้ำประปา ปริมาตร 100 ml. จำนวน 6 ขวด
  เติมเชื้อที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ระดับ ขวดละ 1 ml. ระดับละ 2 ขวด (test portion A และ B)

3.3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับนับจำนวนเชื้อ ประกอบด้วย

- สารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ml. ไม่เติมเชื้อ (negative control)
- สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 ml. จำนวน 6 ขวด

เติมเชื้อที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ระดับ ขวดละ 1 ml. ระดับละ 2 ขวด (test portion A และ B)

4. การทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ด้วยวิธี MPN

เมื่อเตรียมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเรียบร้อยแล้ว นำมาทดสอบเพื่อหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ Escherichia coli ด้วยวิธี Multiple-tube Fermentation Technique มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบขั้นต้น (presumptive phase)

เรียงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ตัวอย่างละ 10 หลอด จากนั้นเขย่าขวดตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth หลอดละ 10 ml จนครบ 10 หลอด เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่เติมตัวอย่างแล้วเบาๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เมื่อบ่มครบ 24 ± 2 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างมาหมุนวนเบาๆ ดูการเจริญของเชื้อ

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความขุ่นและไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

นำหลอดที่ให้ผลบวกไปทดสอบต่อในขั้นยืนยัน (confirmed phase) ส่วนหลอดที่ให้ผลลบ นำไปบ่มต่อจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง อ่านผลอีกครั้ง ถ้าพบมีการเจริญของเชื้อแต่ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ให้รายงานผลเป็นบวกและนำมาทดสอบต่อในขั้นยืนยัน (confirmed phase) ด้วย

4.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed phase)

4.2.1 การทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่ให้ผลบวกจากขั้นต้น (presumptive phase) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 ลูปหรือมากกว่าจากแต่ละหลอด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile 2% broth (BGLB) แบบหลอดต่อหลอด ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อ

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN จะได้ผลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เป็นค่า MPN/100 ml

4.2.2 การทดสอบหาปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่ให้ผลบวกจากขั้นต้น (presumptive phase) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 ลูป จากแต่ละหลอด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-Medium แบบหลอดต่อหลอดด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 44.5 ± 0.2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ภายใน 30 นาทีหลังจากการถ่ายเชื้อ เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างมาเขย่าเบาๆ ดูการเจริญและการสร้างก๊าซของเชื้อ

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซและมีการเจริญของเชื้อ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซและไม่มีการเจริญของเชื้อ

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN จะได้ผลฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เป็นค่า MPN/100 ml.

4.2.3 การทดสอบหาปริมาณ *E. coli*

เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ที่ให้ผลบวกจากขั้นต้น (presumptive phase) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 ลูป จากแต่ละหลอด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-MUG Medium แบบหลอดต่อหลอดด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic Technique) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 44.5 ± 0.2 °C 24 ± 2 ชั่วโมง ภายใน 30 นาทีหลังจากการถ่ายเชื้อ เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง ส่องดูการเรืองแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 365 nm.

ผลบวก : พบการเรืองแสงสีฟ้า (bright blue fluorescence)

ผลลบ : ไม่พบการเรืองแสงสีฟ้า

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN จะได้ผล *E. coli* เป็นค่า MPN/100 ml

5. การประมาณค่า Estimate Bias (eBias)

การประมาณค่า Estimate Bias (eBias) โดยนำปริมาณเชื้อที่หาได้ในรูปของ log_{10} MPN/100ml มาหาค่าสัมบูรณ์ความแตกต่างของปริมาณเชื้อที่ในตัวอย่างกับปริมาณในสารละลายบัฟเฟอร์ ในแต่ละระดับการปนเปื้อน

เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits) ค่า eBias ที่คำนวณได้ในแต่ละระดับต้องมีค่าไม่เกิน 0.5 log_{10}MPN/100 ml.

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli*

1.1 ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท

ผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ในแต่ละระดับการปนเปื้อนมีผลการทดสอบดังนี้

1.1.1 ระดับการปนเปื้อนต่ำ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก
- test portion A ให้ผลบวก 1 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 1.1 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 2 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 2.2 MPN/100ml.

1.1.2 ระดับการปนเปื้อนกลาง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก
- test portion A ให้ผลบวก 6 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 9.2 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 5 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 6.9 MPN/100ml.

1.1.3 ระดับการปนเปื้อนสูง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก
- test portion A ให้ผลบวก 8 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 16 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 9 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 23 MPN/100ml.

1.1.4 ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทไม่เติมเชื้อ (negative control) ไม่พบหลอดให้ผลบวก มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* เท่ากับ <1.1 MPN/100ml. หรือตรวจไม่พบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท

ประเภทตัวอย่าง	**ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)**	**Test portion**	**Positive tube of LST**	**Positive BGLB**	**Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC Medium**	**Fecal Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC MUG**	***E. coli* MPN/100 ml**
น้ำดื่มบรรจุภาชนะปิดสนิท	ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1	1	1.1	1	1.1	1	1.1
		B	2	2	2.2	2	2.2	2	2.2
	กลาง (10 CFU/ml)	A	6	6	9.2	6	9.2	6	9.2
		B	5	5	6.9	5	6.9	5	6.9
	สูง (20 CFU/ml)	A	8	8	16	8	16	8	16
		B	9	9	23	9	23	9	23
	ไม่เติมเชื้อ (negative control)		0	0	<1.1	0	<1.1	0	<1.1

1.2 ตัวอย่างน้ำประปา

ผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำประปา ในแต่ละระดับการปนเปื้อนมีผลการทดสอบดังนี้

1.2.1 ระดับการปนเปื้อนต่ำ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 1 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 1.1 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 1 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 1.1 MPN/100ml.

1.2.2 ระดับการปนเปื้อนกลาง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 6 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 9.2 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 5 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 6.9 MPN/100ml.

1.2.3 ระดับการปนเปื้อนสูง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 8 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 16 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 8 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 16 MPN/100ml.

1.2.4 ตัวอย่างน้ำประปาไม่เติมเชื้อ (negative control) ไม่พบหลอดให้ผลบวก มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* เท่ากับ <1.1 MPN/100ml. หรือตรวจไม่พบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำประปา

ประเภทตัวอย่าง	**ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)**	**Test portion**	**Positive tube of LST**	**Positive BGLB**	**Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC Medium**	**Fecal Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC MUG**	***E. coli* MPN/100 ml**
น้ำประปา	ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1	1	1.1	1	1.1	1	1.1
		B	1	1	1.1	1	1.1	1	1.1
	กลาง (10 CFU/ml)	A	6	6	9.2	6	9.2	6	9.2
		B	5	5	6.9	5	6.9	5	6.9
	สูง (20 CFU/ml)	A	8	8	16	8	16	8	16
		B	8	8	16	8	16	8	16
	ไม่เติมเชื้อ (negative control)		0	0	<1.1	0	<1.1	0	<1.1

1.3 สารละลายบัฟเฟอร์

ผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในสารละลายบัฟเฟอร์ ในแต่ละระดับการปนเปื้อนมีผลการทดสอบดังนี้

1.3.1 ระดับการปนเปื้อนต่ำ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 1 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 1.1 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 2 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 2.2 MPN/100ml.

1.3.2 ระดับการปนเปื้อนกลาง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 6 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 9.2 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 6 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 9.2 MPN/100ml.

1.3.3 ระดับการปนเปื้อนสูง โคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* จาก

- test portion A ให้ผลบวก 8 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 16 MPN/100ml.
- test portion B ให้ผลบวก 9 หลอด มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* 23 MPN/100ml.

1.3.4 ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทไม่เติมเชื้อ (negative control) ไม่พบหลอดให้ผลบวก มีปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* เท่ากับ <1.1 MPN/100ml. หรือตรวจไม่พบ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในสารละลายบัฟเฟอร์

ประเภทตัวอย่าง	**ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)**	**Test portion**	**Positive tube of LST**	**Positive BGLB**	**Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC Medium**	**Fecal Coliforms MPN/100 ml**	**Positive EC MUG**	***E. coli* MPN/100 ml**
สารละลายบัฟเฟอร์	ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1	1	1.1	1	1.1	1	1.1
		B	2	2	2.2	2	2.2	2	2.2
	กลาง (10 CFU/ml)	A	6	6	9.2	6	9.2	6	9.2
		B	6	6	9.2	6	9.2	6	9.2
	สูง (20 CFU/ml)	A	8	8	16	8	16	8	16
		B	9	9	23	9	23	9	23
	ไม่เติมเชื้อ (negative control)		0	0	<1.1	0	<1.1	0	<1.1

2. ผลการประมาณค่า Estimate Bias (eBias)

2.1 คำนวณหาปริมาณเชื้อที่เติมในแต่ละระดับจากผลการทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) ของผลการทดสอบแต่ละระดับความเข้มข้นเชื้อและคำนวณค่า $\log_{10}$ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยและค่า Log_{10} ของผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในสารละลายบัฟเฟอร์

ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)	Test portion	ผลการทดสอบ		
		MPN/100 ml	Mean	Log_{10} Mean MPN/100 ml
ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1.1	1.65	0.22
	B	2.2		
กลาง (10 CFU/ml)	A	9.2	9.2	0.96
	B	9.2		
สูง (20 CFU/ml)	A	16	19.5	1.29
	B	23		
uninoculated		<1.1		

2.2 ผลการประมาณค่า Estimate Bias (eBias) ในน้ำดื่มบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท

คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ของผลการทดสอบแต่ละระดับความเข้มข้นเชื้อและคำนวณค่า log_{10}

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยและค่า log_{10} ของผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท

ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)	Test portion	ผลการทดสอบ		
		MPN/100 ml	Mean	Log_{10} Mean MPN/100 ml
ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1.1	1.65	0.22
	B	2.2		
กลาง (10 CFU/ml)	A	9.2	8.05	0.91
	B	6.9		
สูง (20 CFU/ml)	A	16	19.5	1.29
	B	23		
uninoculated		<1.1		

และหาค่าสัมบูรณ์ความแตกต่างระหว่าง ค่า log_{10} ของผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำในภาชนะบรรจุปิดสนิทกับผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่า Estimate Bias (eBias) ในน้ำดื่มบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ	A	B	eBias | A -B |
	ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำในภาชนะบรรจุปิดสนิท (log_{10} MPN/100 ml)	ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ (log_{10} MPN/100 ml)	
ต่ำ	0.22	0.22	0
กลาง	0.91	0.96	0.05
สูง	1.29	1.29	0

2.2 ผลการประมาณค่า Estimate Bias (eBias) ในน้ำประปา

คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ของผลการทดสอบแต่ละระดับความเข้มข้นเชื้อและคำนวณค่า log_{10}

ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยและค่า log_{10} ของผลการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำประปา

ระดับความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)	Test portion	ผลการทดสอบ		
		MPN/100 ml	Mean	Log_{10} Mean MPN/100 ml
ต่ำ (1 CFU/ml)	A	1.1	1.1	0.04
	B	1.1		
กลาง (10 CFU/ml)	A	9.2	8.05	0.91
	B	6.9		
สูง (20 CFU/ml)	A	16	16	1.20
	B	16		
uninoculated		<1.1		

และหาค่าสัมบูรณ์ความแตกต่างระหว่าง ค่า log_{10} ของผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำประปากับผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงค่า Estimate Bias (eBias) ในน้ำประปา

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ	A	B	eBias | A -B |
	ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำประปา (log_{10} MPN/100 ml)	ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ (log_{10} MPN/100 ml)	
ต่ำ	0.04	0.22	0.18
กลาง	0.91	0.96	0.05
สูง	1.20	1.29	0

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการดำเนินงาน

จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเชิงปริมาณของโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation ตามวิธี Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed., 2017 ในตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุภาชนะปิดสนิทและน้ำประปา โดยดำเนินการทวนสอบวิธีตาม ISO 16140-3 : 2021 Annex F (Protocol for the verification of non – validated reference methods in a single laboratory) โดยการหาค่า Estimate Bias (eBias) พบว่า

- ในตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุภาชนะปิดสนิท ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำ, กลาง และสูง มีค่า eBias 0, 0.05 และ 0 ตามลำดับ

- ในตัวอย่างน้ำประปา ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำ, กลาง และสูง มีค่า eBias 0.18, 0.05 และ 0 ตามลำดับ

ค่า eBias ที่ได้ทั้งหมดมีค่าไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limits) 0.5 $\log_{10}$MPN/100 ml. ซึ่งแสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตามวิธีดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง มีผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำประปาได้ใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อจริงที่เติม

2. ข้อเสนอแนะ

การวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข กรมอนามัย สามารถตรวจสอบหาปริมาณโคลิฟอร์ม, ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* ด้วยเทคนิค Multiple Tube Fermentation ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater Edition 23rd : 2017 ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล แต่อย่างไรก็ตาม การได้มาซึ่งผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ นอกจากการทดสอบที่มีประสิทธิภาพและถูกต้องแล้ว ยังต้องมีการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control) เช่น การควบคุมสถานที่และสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการทดสอบ การประเมินความสามารถของผู้ทดสอบ การควบคุมคุณภาพของเครื่องมือ การควบคุมคุณภาพของเครื่องแก้ว การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการประกันคุณภาพของผลการทดสอบของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ว่ามีความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) และมีความน่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้ ด้วยการควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอนการทดสอบเพื่อพัฒนาไปสู่การเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017

เอกสารอ้างอิง

1. Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton, Eugene W. Rice, editors. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 23rd ed. Washington: Sheridan Books; 2017. 68 – 80.

2. สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ. มอก.17025-2561[อินเตอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 8 มกราคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.tisi.go.th.

3. ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods in validated alternative methods in a single laboratory. Geneva: International Organization for Standardization; 2021.

4. กระทรวงอุตสาหกรรม. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม (ฉบับที่ 281) พ.ศ.2549. เรื่องยกเลิกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค เล่ม 1 ข้อกำหนดคุณภาพและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 123, ตอนที่ 64 ง (ลงวันที่ 6 กรกฎาคม 2549)

5. กรมอนามัย. สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ. รายงานผลการดำเนินงานเฝ้าระวังคุณภาพน้ำบริโภคครัวเรือน. [อินเตอร์เน็ต]. 2564. 2562 [เข้าถึงเมื่อ 9 กรกฎาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://foodsan.anmai.moph.go.th/th/water-quality

6. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 61) พ.ศ.2524. เรื่องน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 98 ตอนที่ 157 ฉบับพิเศษ (ลงวันที่ 24 กันยายน 2524)

7. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 135) พ.ศ.2534. เรื่องน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 3041 ตอนที่ 61 (ลงวันที่ 2 เมษายน 2534)

8. กรมอนามัย. ประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2563. เรื่องเกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ (ลงวันที่ 13 กรกฎาคม 2563)

9. Bartram J. and Balance R. World Health Organization. Water Quality Mornitoring – A practical to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes. 1 9 9 6 . UNEP/WHO : Geneva. Available from : https://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/wqmchap10.pdf

10. Public Health Ontario. Drinking Water Quality – Indicator Bacteria (Total Coliforms and *E. coli*). 2020. Available from : http://www.publichealthontario.ca

11. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. Geneva; 2017. p. 297 -297.

12. Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. In: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease. IWA Publishing, London (Chapter 13), pp. 289–315.

13. Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., and Struijk C.B. Advances in the Bacteriology of the Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. Annual Review of Microbiology. [Internet]; 2001. 55 : 201-234. Available from : https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.201

14. New York Stage Department of Health. Coliform Bacteria in Drinking Water Supplies. 2017. [Internet]. Available from : https://www.health.ny.gov/environmental/water/drinking/coliform_bacteria.htm

15. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.

ภาคผนวก ก

เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภค

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ.2524)

รายการทดสอบ	หน่วย	มาตรฐานที่กำหนด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สี (Colour)	ฮาเซนยูนิต	ไม่เกิน 20	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(ซิลิกา)	ไม่เกิน 5	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่มีกลิ่น แต่ไม่รวมถึงกลิ่นคลอรีน	
ทางเคมี			
5. ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 500	TS Dried at 103-105°C
6. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 100	EDTA Titrimetric
7. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
8. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
9. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
10. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Ion Chromatography
11. โครเมียม (Chromium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
12. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
13. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.5	ICP
14. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.1	ICP
15. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
16. ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.002	ICP
17. ไนเตรท (Nitrate) คำนวณเป็นไนโตรเจน	(มก./ล.)	ไม่เกิน 4.0	Auto-Cadmium Reduction
18. ฟีนอล (Phenol)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.001	Distillation & Colorimetric
19. ซีลีเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
20. เงิน (Silver)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
21. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Turbidimetric
22. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 5.0	ICP
23. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.5	Ion Selective Electrode
ทางจุลชีววิทยา			
24. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 2.2	Multiple-Tube Fermentation Technique
25. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
26. สแตฟฟีโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
27. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
28. คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 วันที่ 24 กันยายน 2524

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2534)

รายการทดสอบ	หน่วย	มาตรฐานที่กำหนด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สี (Colour)	ฮาเซนยูนิต	ไม่เกิน 20	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(ซิลิกา)	ไม่เกิน 5	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่มีกลิ่น แต่ไม่รวมถึงกลิ่นคลอรีน	
ทางเคมี			
5. ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 500	TS Dried at 103-105°C
6. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 100	EDTA Titrimetric
7. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
8. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
9. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.005	ICP
10. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Ion Chromatography
11. โครเมียม (Chromium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
12. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
13. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.3	ICP
14. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
15. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
16. ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.002	ICP
17. ไนเตรท (Nitrate) คำนวณเป็นไนโตรเจน	(มก./ล.)	ไม่เกิน 4.0	Auto-Cadmium Reduction
18. ฟีนอล (Phenol)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.001	Distillation & Colorimetric
19. ซีลีเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
20. เงิน (Silver)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
21. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Turbidimetric
22. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 5.0	ICP
23. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.5	Ion Selective Electrode
24. อลูมิเนียม (Aluminium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.2	ICP
25. อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต (ABS)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.2	Extraction & Colorimetric
26. ไซยาไนด์ (Cyanide)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.1	Ion Chromatography
ทางจุลชีววิทยา			
27. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 2.2	Multiple-Tube Fermentation Technique
28. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
29. สแตฟฟีโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
30. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
31. คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2) ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 108 ตอนที่ 61 วันที่ 2 เมษายน 2534

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริโภค ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม มาตรฐานเลขที่ มอก.257-2549

รายการทดสอบ	หน่วย	เกณฑ์ที่กำหนดสูงสุด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สี (Colour)	(แพลทินัม - โคบอลต์)	5	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(เอ็นทียู)	ไม่เกิน 5	Nephelometirc
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	6.5 ถึง 8.5	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
5. รส (Taste)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
ทางเคมี			
6. ปริมาณสารที่ละลายทั้งหมด (Total Dissolved Solids)	(มก./ล.)	500	TDS Dried at 180°C
7. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	0.3	ICP
8. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	0.05	ICP
9. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	1.0	ICP
10. สังกะสี (Zine)	(มก./ล.)	3	ICP
11. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)		100	EDTA Titrimetric
12. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	200	Ion Chromatography
13. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	250	Ion Chromatography
14. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	0.7	Ion Chromatography
15. ไนเตรท (Nitrate as Nitrogen)	(มก./ล.)	4	Ion Chromatography
16. ลิเนียร์อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต (LAS)	(มก./ล.)	0.2	Extraction & Colorimetric
17. ฟีโนลิกซับสแตนซ์ (Phenolic substances, as Phenol)	(มก./ล.)	0.001	Distillation & Colorimetric
สารเป็นพิษ			
18. ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	0.001	ICP
19. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	0.01	ICP
20. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	0.01	ICP
21. ซีลีเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	0.01	ICP
22. โครเมียม (Chromium)	(มก./ล.)	0.05	ICP
23. ไซยาไนด์ (Cyanide)	(มก./ล.)	0.07	Ion Chromatography
24. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	0.003	ICP
25. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	0.7	ICP
ทางจุลวิทยา			
26. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 1.1	Multiple-Tube Fermentation Technique
27. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
28. สแตฟฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
29. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
30. คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 123 ตอนที่ 64ง วันที่ 6 กรกฎาคม 2549

เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ ประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2563

พารามิเตอร์	หน่วยวัด	ค่ามาตรฐาน	วิธีวิเคราะห์
ด้านกายภาพ			
ความขุ่น (Turbidity)	เอ็นทียู	ไม่เกิน 5	Nephelometry
สีปรากฏ (Apparent color)	แพลตตินัมโคบอลท์	ไม่เกิน 15	Spectrophotometric-single-wavelenght,visual comparison method
ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	6.5 – 8.5	Electrometric method
ด้านเคมีทั่วไป			
ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total dissolved solids)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 500	TDS dride at 180 องศาเซลเซียส, Gravimetric, Electrometric method
ความกระด้าง (Hardness)	มิลลิกรัมต่อลิตร (as $CaCO_3$)	ไม่เกิน 300	EDTA titrimetric
ซัลเฟต (Sulfate)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 250	Turbidimetry, ion chromatography
คลอไรด์ (Chloride)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 250	Argentometry, ion chromatography
ไนเตรท (Nitrate)	มิลลิกรัมต่อลิตร (as NO_3^-)	ไม่เกิน 50	Cadmium reduction, ion chromatography, spectrophotometry
ไนไตรท์ (Nitrite)	มิลลิกรัมต่อลิตร (as NO_2^-)	ไม่เกิน 3	Cadmium reduction, ion chromatography, spectrophotometry
ฟลูออไรด์ (Fluoride)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.7	ion chromatography, SPADNS colorimetric method, ion-selective electrode
ด้านเคมี (โลหะหนัก)			
เหล็ก (Iron)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.3	AAS (flame), ICP, spectrophotometry
แมงกานีส (Manganese)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.3	AAS (flame), ICP, spectrophotometry
ทองแดง (Copper)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 1	AAS (flame), ICP, spectrophotometry
สังกะสี (Zinc)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 3	AAS (flame), ICP, spectrophotometry
ด้านเคมี (โลหะหนักที่เป็นพิษ)			
ตะกั่ว (Lead)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.01	AAS (graphite furnace), ICP
โครเมียมรวม (Total chromium)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.05	AAS (graphite furnace), ICP
แคดเมียม (Cadmium)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.003	AAS (graphite furnace), ICP
สารหนู (Arsenic)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.01	AAS (vapor generation technique), ICP, graphite furnace
ปรอท (Mercury)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่เกิน 0.001	AAS (vapor generation technique), ICP, Automatic direct mercury analyzer
ด้านชีวภาพ			
โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total coliforms bacteria)	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ	Present-Absence Test
	เอ็มพี่เอ็น ต่อ 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 1.1	MPN method
อีโคไล (*Escherichia coli*)	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ	Present-Absence Test
	เอ็มพี่เอ็น ต่อ 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 1.1	MPN method

แหล่งที่มา : ประกาศกรมอนามัย พ.ศ.2563. เรื่องเกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ (ลงวันที่ 13 กรกฎาคม 2563)

ภาคผนวก ข

วิธีการทดสอบหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม

ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition : 2017

วิธีการทดสอบหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition : 2017 ; Part 9221B

9221 B. Standard Total Coliform Fermentation Technique

1. **Samples**

Collect samples as directed in Section 9060A, using sample containers specified in Section 9030B.19. Follow the QC guidelines for sample bottles described in Section 9020B.5*d*. Ensure that samples meet laboratory-acceptance criteria upon receipt.

2. **Quality Control**

All phases of the fermentation technique (9221B–G) require adherence to the quality assurance/quality control (QA/QC) guidelines presented in Section 9020, including, but not limited to, analytical QC (Section 9020B.9), instrumentation/equipment (Sections 9020B.4 and 9030B), and supplies (Section 9020B.5). Refer to Table 9020:I for key QC procedures. Also, note the sections pertaining to appropriate storage and preparation of dehydrated culture media and water quality (Sections 9050 and 9020B.5*f*).

Use commercial dehydrated media when possible, and ensure that their formulations match those specified here because commercial formulations may vary. Prepared fermentation media can be stored in tightly capped tubes or bottles for up to 3 months in the dark, if temperatures are between 1 and 30°C and evaporation is less than 10% of the original volume. If the tubes were refrigerated after sterilization, they should be incubated overnight at room temperature (20°C) before use and those showing growth or bubbles should be discarded to avoid false-positive results. To demonstrate acceptable medium performance, positive and negative culture controls should be tested before first use and as otherwise specified (see Table 9020:VI). Sterility, volume per tube, and pH should also be verified and recorded. To demonstrate comparability between batches of media, perform a use test [Section 9020B.5*f*2)].

If a laboratory is switching to the multiple-tube fermentation technique, analysts ideally should first conduct parallel tests with the previous method to demonstrate applicability and comparability. The results of many coliform performance studies are available in the literature, and the rates of false-positive and -negative results can differ among various media. Users should carefully select the medium and procedure that best fits their needs.

3. **Presumptive Phase**

Use lauryl tryptose broth in this phase of the multiple-tube test, following the QC guidelines cited in 9221B.2.

a. Reagents and culture medium: Lauryl tryptose broth:

Tryptose. . . . . 20.0 g

Lactose . . . . . 5.0 g

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4). . . . . .2.75 g

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) . . . . . 2.75 g

Sodium chloride (NaCl). . . . . 5.0 g

Sodium lauryl sulfate. . . . . .0.1 g

Reagent-grade water . . . . . 1 L

Add dehydrated ingredients to water, mix thoroughly, and heat to dissolve. Before sterilization, dispense enough medium into fermentation tubes containing inverted vials (also known as Durham tubes) to cover the inverted vial at least one-half to two-thirds after sterilization. Alternatively, omit the inverted vial and add 0.01 g/L bromocresol purple to lauryl tryptose broth (to determine acid production, an indicator of a positive result in this part of the coliform test). Close tubes with metal or heat-resistant plastic caps.

Prepare in accordance with Table 9221:I, making lauryl tryptose broth concentrated enough that adding 100-, 20-, or 10-mL portions of sample to the medium will not reduce ingredient concentrations below those of the standard medium. Autoclave medium at 121°C for 12 to 15 min. Ensure that inverted vials, if used, are free of air bubbles. Medium pH should be 6.8±0.2 after sterilization.

TABLE 9221:I. PREPARATION OF LAURYL TRYPTOSE BROTH

Inoculum *mL*	Amount of Medium in Tube *mL*	Volume of Medium Inoculum *mL*	Dehydrated Lauryl Tryptose Broth Required *g/L*
1	10 or more	11 or more	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

b. Procedure:

1) Arrange fermentation tubes in rows of five or ten tubes each in a test tube rack. The number of rows and the sample volumes selected depend on the quality and character of the water to be examined. For potable water, 100 mL must be tested. Use five 20-mL portions, ten 10-mL portions, or one 100-mL portion (a single bottle). For nonpotable water, use five tubes per dilution (of 10, 1, 0.1 mL, etc.).

When making dilutions and measuring diluted sample volumes, follow the precautions given in Section 9215B.2. Use Figure 9215:1 as a guide to preparing dilutions. Shake sample and dilutions vigorously 5 s (about 25 times). Inoculate each tube in a set of five with replicate sample volumes in increasing decimal dilutions, if decimal quantities of the sample are used. Mix test portions in the medium by gentle agitation.

2) Promptly incubate inoculated tubes or bottles, any culture controls, and/or sterility blanks at 35 0.5°C. After 24 2 h, swirl each tube or bottle gently and examine it for growth, gas, and/or acidic reaction (shades of yellow color) and, if no gas or acidic reaction is evident, re-incubate and re-examine at the end of 48 3 h. Record presence or absence of growth, gas, and/or acid production. If the inner vial is omitted, growth with acidity (yellow color) signifies a presumptive-positive reaction.

c. Interpretation: Detection of an acidic reaction (yellow color) and/or gas in the tubes or bottles within 48 3 h constitutes a presumptive-positive reaction. Submit tubes or bottles with a presumptive-positive reaction to the confirmed phase (9221B.4).

The absence of acidic reaction and/or gas formation at the end of 48 3 h of incubation constitutes a negative test. Submit drinking water samples demonstrating growth without a positive gas or acidic reaction to the confirmed phase (9221B.4).

4. Confirmed Phase

a. Culture medium: Use BGLB broth fermentation tubes for the confirmed phase, following QC guidelines cited in 9221B.2.

Brilliant green lactose bile broth:

Peptone 10.0g

Lactose. . . . . 10.0 g

Oxgall . . . . . 20.0 g

Brilliant green. . . . . 0.0133 g

Reagent-grade water. . . . . 1 L

Add dehydrated ingredients to water, mix thoroughly, and heat to dissolve. Before sterilization, dispense medium into fermentation tubes with an inverted vial, ensuring sufficient volume of medium to cover the inverted vial at least one-half to two-thirds after sterilization. Close tubes with metal or heat-resistant plastic caps. Autoclave medium at 121°C for 12 to 15 min. Ensure that inverted vials are free of air bubbles. Medium pH should be 7.2±0.2 after sterilization.

b. Procedure*:* Promptly submit all presumptive tubes or bottles showing growth, any amount of gas, or acidic reaction within 24±2 h of incubation to the confirmed phase. If additional presumptive tubes or bottles show active fermentation or acidic reaction at the end of a 48±3 h incubation period, promptly submit these to the confirmed phase. To confirm presumptive coliform colonies growing on a solid medium using fermentation media, see Section 9222B.4*g*.

Gently shake or rotate presumptive tubes or bottles showing gas or acidic growth to resuspend the organisms. With a sterile loop 3.0 to 3.5 mm in diameter, transfer one or more loopfuls of culture to a fermentation tube containing BGLB broth. Alternatively, insert a sterile wooden applicator at least 2.5 cm into the culture, promptly remove, and plunge applicator to the bottom of fermentation tube containing BGLB broth. Remove and discard applicator. Repeat for all other presumptive-positive tubes. Analysts may simultaneously inoculate BGLB broth for total coliforms and EC broth for thermotolerant (fecal) coliforms (see 9221E) or EC-MUG broth for *Escherichia coli* (see 9221F). However, if using the same loop or wooden applicator stick to inoculate a culture into more than one medium, inoculate the most inhibitory medium (BGLB broth) last.

Promptly incubate the inoculated BGLB broth tubes at 35±0.5°C. Any amount of gas formed in the inverted vial of the BGLB broth fermentation tube at any time within 48±3 h constitutes a positive confirmed phase. To estimate the coliform density, calculate the MPN value from the number of positive BGLB tubes as described in 9221C.

c. Alternative procedure*:* Use this alternative only for polluted water or wastewater known to produce positive results consistently.

If all presumptive tubes are positive in two or more consecutive dilutions within 24 h, then only submit to the confirmed phase the highest-dilution tubes (smallest sample inoculum) in which all tubes are positive, along with any positive tubes in still higher

dilutions. Submit to the confirmed phase all tubes in which gas or acidic growth is produced in 24 to 48 h.

5. Completed Phase

The completed test as described here is not required for drinking-water compliance sample analyses. For nonpotable water samples collected under the Clean Water Act, the requirement that 10% of all total-coliform-positive tubes be subjected to the completed test on a seasonal basis no longer exists. The completed test is included here as a QC recommendation and for use when testing results are uncertain. As additional testing for thermotolerant (fecal) coliforms and/or *E. coli* is required of positive coliform tests, further testing using EC and/or EC-MUG broths is considered a completed test. For QC purposes, if no positive drinking-water samples are received within a quarter, then analyze at least one positive source-water sample to confirm that media respond appropriately.

To verify the presence of coliform bacteria and to provide QC data for nonpotable water-sample analysis, use the completed test on at least one positive sample per quarter. If no positive sample occurs within a quarter, perform a QC check using a known positive sample. Analysts may simultaneously inoculate presumptive-positive media into both BGLB broth for confirmation of total coliforms and EC broth for thermotolerant (fecal) coliforms (9221E) or EC MUG broth for *Escherichia coli* (9221F) as long as BGLB broth is inoculated last. Positive results from incubation in EC and/or EC-MUG broths at elevated temperature (44.5±0.2°C) can be considered a completed test. Parallel positive BGLB broth cultures with negative EC or EC-MUG broth cultures indicate the presence of nonfecal coliforms. Parallel positive EC or EC-MUG tubes and negative BGLB broth cultures indicate the presence of thermotolerant (fecal) coliforms or *E. coli*, respectively. Alternatively, the completed test for positive total coliforms may be performed as follows.

a. Culture media and reagents: Follow the QC guidelines cited in 9221B.2.

1) *LES Endo agar*—See Section 9222B.2*a*. Use 100-15-mm Petri plates.

2) *MacConkey agar:*

Peptone . . . . . 17 g

Proteose peptone. . . . . 3 g

Lactose . . . . . 10 g

Bile salts . . . . . 1.5 g

Sodium chloride (NaCl) . . . . . 5 g

Agar . . . . . 13.5 g

Neutral red. . . . . 0.03 g

Crystal violet . . . . . 0.001 g

Reagent-grade water . . . . . 1 L

Add ingredients to water, mix thoroughly, and heat to boiling to dissolve. Sterilize by autoclaving for 15 min at 121°C. Temper agar after sterilization and pour into Petri plates (100×15 mm). Medium pH should be 7.1±0.2 after sterilization.

3) *Nutrient agar:*

Peptone . . . . . 5.0 g

Beef extract . . . . . 3.0 g

Agar . . . . . 15.0 g

Reagent-grade water . . . . . 1 L

Add ingredients to water, mix thoroughly, and heat to dissolve. Before sterilization, dispense in screw-capped tubes. Autoclave at 121°C for 15 min. Medium pH should be 6.8 ±0.2 after sterilization. After sterilization, immediately place tubes in an inclined position so the agar will solidify with a sloped surface. Tighten screw caps after cooling and store in a protected, cool storage area.

4) *Gram-stain reagents*—Reagents are commercially available as prepared solutions.

a) *Ammonium oxalate-crystal violet (Hucker's)*—Dissolve 2 g crystal violet (90% dye content) in 20 mL 95% ethyl alcohol. **CAUTION: *Flammable.*** Dissolve 0.8 g $(NH_4)_2C_2O_4\,H_2O$ in 80 mL reagent-grade water. Mix the two solutions and age for 24 h before use. Filter through paper into a staining bottle.

b) *Lugol's solution, Gram's modification*—Grind 1 g iodine crystals and 2 g KI in a mortar. Add reagent-grade water, a few milliliters at a time, and grind thoroughly after each addition until solution is complete. Rinse solution into an amber glass bottle with the remaining water, using a total of 300 mL.

c) *Counterstain*—Dissolve 2.5 g safranin dye in 100 mL 95% ethyl alcohol. Add 10 mL to 100 mL reagent-grade water. **CAUTION: *Flammable.***

d) *Acetone alcohol*—Mix equal volumes of ethyl alcohol (95%) with acetone. **CAUTION: *Flammable.***

b. Procedure:

1) Using aseptic technique, streak one LES Endo agar (Section 9222B.2*a*) or MacConkey agar plate from each presumptive positive tube of BGLB broth as soon as possible after gas is observed. Streak plates in a manner to ensure the presence of some discrete colonies separated by at least 0.5 cm. To obtain a high proportion of successful isolations if coliform organisms are present, use the following approach:

a) Use a sterile 3-mm-diam loop or an inoculating needle slightly curved at the tip;

b) tap and incline the fermentation tube to avoid picking up any membrane or scum on the needle;

c) insert the end of the loop or needle into the liquid in the tube to a depth of approximately 0.5 cm; and

d) streak a plate for isolation with the curved section of the needle in contact with the agar to avoid a scratched or torn surface. Flame the loop between the second and third quadrants to improve colony isolation. Incubate plates, inverted, at 35± 0.5°C for 24±2 h.

2) The colonies developing on LES Endo agar are defined as *typical* (pink to dark red with a green metallic surface sheen) or *atypical* (pink, red, white, or colorless colonies without sheen) after 24 h incubation. Typical lactose-fermenting colonies developing on MacConkey agar are red and may be surrounded by an opaque zone of precipitated bile. From each plate, pick one or more typical, well-isolated coliform colonies or, if no typical colonies are present, pick two or more colonies considered most likely to be coliforms. Transfer growth from each isolate to a single-strength lauryl tryptose broth fermentation tube and onto a nutrient agar slant.

If needed, use a colony-magnifying device to provide optimum magnification when colonies are picked from the LES Endo or MacConkey agar plates. When transferring colonies, choose well-isolated ones and barely touch the colony surface with a flame-sterilized, air-cooled transfer needle to minimize the danger of transferring a mixed culture. Incubate secondary broth tubes (lauryl tryptose broth with inverted fermentation vials) at 35± 0.5°C for 24± 2 h; if gas is not produced within 24± 2 h, reincubate and examine again at 48±3 h. Microscopically examine Gram-stained preparations from those 24-h nutrient agar slant cultures corresponding to the secondary tubes that show gas.

3) Gram-stain technique—The Gram stain may be omitted from the completed test for potable-water samples only because Gram-positive bacteria and spore-forming organisms in drinking water rarely survive this selective screening procedure.

Various modifications of the Gram stain technique exist. Use Hucker's modification (as follows) for staining smears of pure cultures; include a Gram-positive and a Gram-negative culture as controls.

On one slide, prepare separate light emulsions of the test bacterial growth and positive and negative control cultures using drops of distilled water on the slide. Air-dry, fix by passing slide through a flame, and stain for 1 min with ammonium oxalatecrystal violet solution. Rinse slide in tap water and drain off excess; apply Lugol's solution for 1 min.

Rinse stained slide in tap water. Decolorize for approximately 15 to 30 s with acetone alcohol by holding the slide between the fingers and letting acetone alcohol flow across the stained smear until the solvent flows colorlessly from the slide. Do not overdecolorize. Counterstain with safranin for 15 s, rinse with tap water, blot dry with absorbent paper or air dry, and examine microscopically. Gram-positive organisms are blue; Gramnegative organisms are red. Results are acceptable only when controls have given proper reactions.

c. Interpretation*:* Formation of gas in the secondary tube of lauryl tryptose broth within 48±3 h and demonstration of Gram-negative, nonspore-forming, rod-shaped bacteria from the agar culture constitute a positive result for the completed test, demonstrating that a member of the coliform group is present.

วิธีการทดสอบหาปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition : 2017 ; Part 9221E

9221 E. Thermotolerant (Fecal) Coliform Procedure

Traditionally called *fecal coliforms,* thermotolerant coliforms (those that ferment lactose to produce gas at 44.5°C) have been documented in organically rich waters or tropical climates in the absence of recent fecal contamination. So when looking for evidence of fecal contamination, testing for *E. coli*—a more specific indicator—is recommended. Nevertheless, regulations may require that thermotolerant (fecal) coliforms be identified and enumerated.

To test for thermotolerant coliforms, use one of the multiple tube procedures described here or the membrane-filter methods described in Sections 9222D and E. In the multiple-tube fermentation technique, thermotolerant coliforms are identified by their ability to ferment lactose to produce gas at 44.5±0.2°C within24±2 h.

1. Thermotolerant Coliform Test (EC Medium)

The thermotolerant coliform test using EC medium is applicable to investigations of drinking water, stream pollution, unfiltered raw water sources, wastewater treatment systems, bathing waters, seawaters, and general water-quality monitoring. Do not use EC medium to directly isolate thermotolerant coliforms from water; prior enrichment in a presumptive medium is required for optimum recovery of thermotolerant coliforms. (To test presumptive coliform colonies growing on solid media, refer to Section 9222G.3*c*)

a. EC medium: Prepare EC medium following QC guidelines cited in 9221B.2.

Tryptose or trypticase . . . . . 20.0 g

Lactose . . . . . 5.0 g

Bile salts mixture or bile salts No. 3 . . . . . 1.5 g

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4). . . . . 4.0 g

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) . . . . . 1.5 g

Sodium chloride (NaCl). . . . . 5.0 g

Reagent-grade water. . . . . 1 L

Add dehydrated ingredients to water, mix thoroughly, and heat to dissolve. Before sterilization, dispense sufficient medium in fermentation tubes with an inverted vial to cover

the inverted vial at least one-half to two-thirds after sterilization. Close tubes with metal or heat-resistant plastic caps. Autoclave medium at 121°C for 12 to 15 min. Ensure that inverted vials are free of air bubbles. Medium pH should be 6.9±0.2 after sterilization.

b. Procedure:

1) After incubation, gently shake or rotate fermentation tubes or bottles showing gas, growth, or acidity to resuspend the organisms. Promptly use a sterile 3- to 3.5-mm-diam loop to transfer one or more loopfuls of culture from bottles or tubes showing growth with acid and/or gas production to a fermentation tube containing EC broth. Alternatively, insert a sterile wooden applicator at least 2.5 cm into the culture, promptly remove, and plunge applicator to the bottom of a fermentation tube containing EC broth. Remove and discard applicator. Repeat for all other presumptive-positive tubes and incubate at 44.5±0.2°C. Simultaneous inoculation into EC broth and/or EC-MUG broth along with BGLB broth is acceptable, if the most inhibitory medium (BGLB broth) is inoculated last.

2) Place all EC tubes into a circulating water bath (preferably with a gabled cover) within 30 min after inoculation. Incubate inoculated EC broth tubes at 44.5±0.2°C for 24±2 h. Maintain a sufficient water depth in the water bath incubator to immerse tubes to the upper level of the medium.

c. Interpretation: Gas production with growth in an EC broth culture within 24±2 h or less is considered a positive thermotolerant (fecal) coliform reaction. Failure to produce gas (with little or no growth) constitutes a negative reaction. If multiple tubes are used, calculate the MPN of thermotolerant coliforms from the number of positive EC broth tubes, as described in 9221C. When using only one tube for subculturing from a single presumptive bottle, report as the presence or absence of thermotolerant coliforms. If heavy growth occurs with no gas production, subject the culture to a thermotolerant coliform or *E. coli* test using a different medium.

2. Thermotolerant (Fecal) Coliform Direct Test (A-1 Medium)

a. A-1 medium: This medium may be used to directly isolate thermotolerant coliforms from unfiltered source water, treated wastewater, and seawater, but not drinking water. Follow guidelines in 9221B.1 for sample collection. Unlike EC medium, A-1 medium does not require prior enrichment in a presumptive medium for optimum recovery of thermotolerant coliforms. Use QC guidelines cited in 9221B.2.

Lactose . . . . . 5.0 g

Tryptone . . . . . 20.0 g

Sodium chloride (NaCl). . . . . 5.0 g

Salicin. . . . . 0.5 g

Polyethylene glycol p-isooctylphenyl ether* . . . . . 1.0 mL

Reagent-grade water . . . . . 1 L

Heat to dissolve solid ingredients, add polyethylene glycol p-isooctylphenyl ether, and adjust to pH 6.9±0.1. For 10-mL samples, prepare double-strength medium so the final concentration of ingredients after sample addition is correct. Before sterilization, dispense sufficient medium in fermentation tubes with an inverted vial to cover the inverted vial at least one-half to two-thirds after sterilization. Close with metal or heat-resistant plastic caps. Sterilize by autoclaving at 121°C for 10 min. Ensure that inverted vials are free of air bubbles. Store in the dark at room temperature for not longer than 7 d. Ignore precipitate formed during storage.

b. Procedure: Inoculate tubes of A-1 broth as directed in 9221B.3b. Incubate for 3 h at 35±0.5°C. Transfer tubes to a water bath at 44.5±0.2°C and incubate for another 21± 2 h.

Interpretation: Gas production in any A-1 broth culture within 24 h or less is a positive reaction [i.e., thermotolerant (fecal) coliforms are present]. Calculate the MPN of hermotolerant (fecal) coliforms from the number of positive A-1 broth tubes, as described in 9221C.

วิธีการทดสอบหาปริมาณ *E. coli* ตาม Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition : 2017 ; Part 9221F

9221 F. Escherichia coli Procedure Using Fluorogenic Substrate

Escherichia coli is a member of the indigenous fecal flora of warm-blooded animals. The presence of *E. coli* in water is considered a specific indicator of fecal contamination and the possible presence of enteric pathogens. Tests for *E. coli* are applicable to the analysis of drinking, surface, ground, and waste water. Testing for *E. coli* can be performed using the multiple tube procedure described here, by the membrane filter method described in Section 9222G, or by the chromogenic enzyme substrate tests described in Section 9223. Other *E. coli* procedures are presented in 9221G.

For the *E. coli* test using EC-MUG medium, *E. coli* is defined as the species of coliform bacteria that possesses the enzyme -glucuronidase, which can cleave the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- -D-glucuronide (MUG), thus releasing the fluorogen within 24±2 h or less when grown in EC-MUG medium at 44.5±0.2°C.

1. *Escherichia coli* Test (EC-MUG Medium)

The use of EC-MUG medium to detect *E. coli* is applicable to investigations of drinking water, stream pollution, unfiltered raw water sources, wastewater treatment systems, bathing waters, seawaters, and general water-quality monitoring. Do not use EC-MUG for the direct isolation of *E. coli*; prior enrichment in a presumptive medium is required for optimum recovery. (To test presumptive coliform colonies growing on solid media, refer to Section 9222G.2.)

Use EC-MUG medium to test for *E. coli* in a total coliform positive culture, following QC guidelines cited in 9221B.2.

a. EC-MUG medium: Prepare EC-MUG medium following QC guidelines cited in 9221B.2.

Tryptose or trypticase . . . . . 20.0 g

Lactose . . . . . 5.0 g

Bile salts mixture or bile salts No. 3. . . . . 1.5 g

Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4). . . . . .4.0 g

Potassium dihydrogen phosphate (KH2PO4) . . . . . 1.5 g

Sodium chloride (NaCl). . . . . 5.0 g

4-Methylumbelliferyl- -D-glucuronide (MUG) . . . . . 0.05 g

Reagent-grade water . . . . . .1 L

Add dehydrated ingredients to water, mix thoroughly, and heat to dissolve. Before sterilization, dispense in tubes that do not fluoresce under long-wavelength (365–366 nm) ultraviolet (UV) light. An inverted tube is not necessary. Close tubes with metal or heat-resistant plastic caps. Medium pH should be 6.9±0.2 after sterilization for 15 min at 121°C.

b. Procedure:

1) Gently shake or rotate fermentation tubes or bottles showing growth, gas, or acidity to resuspend the organisms. Using a sterile 3- or 3.5-mm-diam loop, transfer one or more loopfuls of growth from the fermentation tube or bottle to EC-MUG broth. Alternatively, insert a sterile wooden applicator stick at least 2.5 cm into the culture, promptly remove, and plunge applicator to the bottom of a fermentation tube containing EC-MUG broth.

2) Place all EC-MUG tubes in water bath within 30 min after inoculation. Incubate inoculated EC-MUG tubes and negative controls for 24± 2 h in a circulating water bath (preferably with a gable cover) maintained at 44.5± 0.2°C. Maintain a sufficient water depth in the water-bath incubator to immerse tubes to the upper level of medium.

c. Interpretation: Examine all tubes exhibiting growth for fluorescence using a 6W, 365–366 nm long-wavelength UV lamp. The presence of bright blue fluorescence is considered a positive result for *E. coli*. Growth in the absence of bright blue fluorescence is considered a negative result. To help interpret results and avoid misidentifying weak autofluorescence of the medium or glass tubes as a positive response, include in the assay a positive control [a known *E. coli* (MUG-positive) culture], a negative control [a thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* (MUG-negative) culture], and an uninoculated medium control. The distance between the UV lamp and the tubes should be such that the *E. coli* positive control shows distinct fluorescence while the MUG-negative and uninoculated controls do not. If using multiple tubes, calculate the MPN for *E. coli* from the number of positive EC-MUG broth tubes, as described in 9221C. When using only one tube, or subculturing from a single presumptive bottle or colony, report as the presence or absence of *E. coli*.

2. Simultaneous Determination of Thermotolerant Coliforms and *E. coli*

The presence of thermotolerant coliforms and *E. coli* can be determined simultaneously by including an inverted vial (Durham tube) in tubes of EC-MUG broth. Prepare EC-MUG broth according to 9221F.1.

a. Setup: Before sterilization dispense, in fermentation tubes with an inverted vial, sufficient medium to cover the inverted vial at least one-half to two-thirds after sterilization. Close with metal or heat-resistant caps. Medium pH should be 6.9± 0.2 after sterilization for 15 min at 121°C.

b. Procedure:

1) Gently shake or rotate fermentation tubes or bottles showing growth, gas, or acidity to resuspend the organisms. Using a sterile 3- or 3.5-mm-diam loop, transfer one or more loopfuls of growth from the fermentation tube or bottle to EC-MUG broth. Alternatively, insert a sterile wooden applicator stick at least 2.5 cm into the culture, promptly remove, and plunge applicator to the bottom of a fermentation tube containing EC-MUG broth.

2) Place all EC-MUG tubes in water bath within 30 min after inoculation. Incubate inoculated EC-MUG tubes, along with positive and negative controls, for 24 ±2 h in a circulating water bath (preferably with a gable cover) maintained at 44.5± 0.2°C. Maintain a sufficient water depth in the water-bath incubator to immerse tubes to the upper level of medium.

c. Interpretation: Examine all tubes exhibiting growth and/or gas for fluorescence using a 6W, 365–366 nm long-wavelength UV lamp. Growth with gas production is considered a positive result for thermotolerant coliforms. The presence of bright blue fluorescence is considered a positive result for *E. coli*. Tubes with growth and/or gas *and* fluorescence are considered positive for both thermotolerant coliforms and *E. coli*. Tubes with growth and/or gas but without bright blue fluorescence are considered positive for thermotolerant coliforms and negative for *E. coli.*

Due to indigenous autofluorescence of media or glass tubes/ inserts, use caution in interpreting results. To help interpret results, include in each assay a positive control [a known *E. coli* (MUG-positive) culture], a negative control [a thermotolerant *Klebsiella*

pneumoniae (MUG-negative) culture], and an uninoculated medium control. The distance between the UV lamp and the tubes should be such that the *E. coli* positive control shows distinct fluorescence while the MUG-negative and uninoculated controls do not. If multiple tubes are used, calculate the MPN for *E. coli* and thermotolerant coliforms from the number of positive EC-MUG broth tubes, as described in 9221C. When using only one tube, or subculturing from a single presumptive bottle or colony, report the presence or absence of *E. coli* and thermotolerant coliforms.