การทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธี Multiple-tube Fermentation Technique

วรัญญา เพชรมณี และ ชนิดา แซ่โค้ว*

ศูนย์บริการตรวจสอบและรับรองมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

***อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: chanida.sa@psu.ac.th**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ในน้ำบริโภคด้วยวิธี Multiple-Tube Fermentation Technique โดยใช้วิธีทดสอบอ้างอิงตาม Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, 2023 และดำเนินการทวนสอบตาม ISO 16140-3: 2021 ตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบประกอบด้วยน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำดื่มจากตู้กดน้ำ โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* DMST 4212 เป็นจุลินทรีย์เป้าหมาย ในระดับการปนเปื้อนต่ำ กลาง และสูง แต่ละระดับการปนเปื้อนแบ่งตัวอย่างทดสอบออกเป็น 2 test portion (A และ B) และประเมินผลการทวนสอบด้วยค่า Estimated Bias (eBias) โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่เติมเชื้อกับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายใน 0.1% peptone ผลการศึกษาพบว่าน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทมีค่า eBias ในระดับการปนเปื้อนต่ำ กลาง และสูงเท่ากับ 0.11, 0.00 และ 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL ส่วนน้ำดื่มจากตู้กดน้ำมีค่า eBias เท่ากับ 0.15, 0.13 และ 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในขอบข่ายการยอมรับคือน้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$ MPN/100 mL ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีทดสอบอ้างอิงมาใช้ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม ครอบคลุมตัวอย่างน้ำบริโภคของห้องปฏิบัติการ ผู้ใช้บริการทดสอบสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำบริโภคได้อย่างน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ: การทวนสอบวิธีทดสอบ, น้ำบริโภค, Total Coliforms, *Escherichia coli*, Estimated Bias (eBias), Multiple-tube Fermentation Technique, ISO16140-3

Method Verification for Total Coliforms and *Escherichia coli* in Potable Water by the Multiple-tube Fermentation Technique

Warunya Phetmanee and Chanida Saekow*

Center of Measurement and Standard Accreditation, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

***Corresponding author e-mail: chanida.sa@psu.ac.th**

Abstract

This study aimed to perform method verification for the detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*) in potable water using the Multiple-tube Fermentation Technique. The evaluation was based on the standard reference method from the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, 2023, and conducted in accordance with the ISO 16140-3: 2021 guidelines. The verification matrix included bottled drinking water and drinking water from vending machines. Samples were spiked with the reference strain *E. coli* DMST 4212 as the target microorganism at low, medium, and high contamination levels. Each contamination level was evaluated using two test portions (A and B). Method performance was evaluated using the Estimated Bias (eBias), calculated by comparing the spiked water samples against the reference culture suspension in 0.1% peptone water. The results demonstrated that for bottled drinking water, the eBias values at low, medium, and high contamination levels were 0.11, 0.00, and 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL, respectively. For drinking water from vending machines, the eBias values were 0.15, 0.13, and 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL, respectively. All obtained eBias values fell well within the acceptable performance criteria of less than 0.5 $\log_{10}$ MPN/100 mL demonstrate that the method is suitable for its intended use to implement this reference method accurately and appropriately for its drinking water testing scope. Consequently, clients and stakeholders can reliably utilize the test results for the safety and quality assessment of drinking water.

Keywords: Method Verification, Total Coliforms, *Escherichia coli*, Potable Water, Estimated Bias (eBias), Multiple-tube Fermentation Technique, ISO16140-3

บทนำ

น้ำบริโภค (Potable Water หรือ Drinking Water) หมายถึง น้ำที่มีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับการอุปโภคบริโภค รวมถึงการดื่ม การเตรียมอาหารและการใช้ในกิจกรรมสุขอนามัยส่วนบุคคล โดยไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการบริโภคตลอดช่วงชีวิตของมนุษย์ (World Health Organization, 2022) คุณภาพของน้ำจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องได้รับการควบคุมและตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอโดยเฉพาะทางด้านจุลชีววิทยา เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและนำไปสู่โรคติดต่อทางเดินอาหารได้ ในการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliforms) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ได้ถูกนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (Indicator Organisms) สำหรับประเมินสุขลักษณะและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำบริโภค

สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม Total Coliforms เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสและให้กรดร่วมกับแก๊สภายใน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน พืช น้ำ และทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลือดอุ่น แม้ว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคโดยตรง แต่การตรวจพบในน้ำ อาจบ่งชี้ถึงความบกพร่องของระบบผลิตน้ำหรือความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ (Saha et al., 2013) อย่างไรก็ตาม Total Coliforms เป็นเพียงตัวบ่งชี้คุณภาพน้ำในภาพรวม จึงมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อการปนเปื้อนจากอุจจาระมากกว่า ได้แก่ *E. coli* เพื่อประเมินความปลอดภัยของน้ำบริโภคเพิ่มเติม โดย *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยทั่วไปไม่ก่อให้เกิดอันตราย แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ ดังนั้นการตรวจพบ *E. coli* ในน้ำบริโภคถือเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการปนเปื้อนจากสิ่งปฏิกูลหรืออุจจาระและแสดงถึงความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ (World Health Organization, 2022) ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลกและเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภคในหลายประเทศจึงกำหนดให้ ต้องไม่พบเชื้อ *E. coli* ในน้ำบริโภค เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมีความจำเพาะต่อการปนเปื้อนจากอุจจาระมากกว่าแบคทีเรียกลุ่ม Total Coliforms (World Health Organization, 2022) สอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ซึ่งกำหนดเกณฑ์มาตรฐานให้แบคทีเรียกลุ่ม Total Coliforms และ *E. coli* ต้องมีค่าน้อยกว่า 1.1 MPN/100 mL (กระทรวงสาธารณสุข, 2568)

ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ วิธี Multiple-tube fermentation technique หรือ Most Probable Number (MPN) technique เป็นวิธีที่หลายองค์กรกำหนดไว้สำหรับการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Total Coliforms และ *E. coli* เช่น American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) และ International Organization for Standardization (ISO) เป็นต้น โดยนำตัวอย่างมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงด้วยอาหารคัดแยก (selective media) ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด แล้วนำจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวกมาประเมินด้วยการอ่านค่าจากตาราง MPN ซึ่งคำนวณด้วยวิธีการทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Osman, 2022)

แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับและใช้อย่างแพร่หลาย แต่ก่อนนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีการทวนสอบเพื่อยืนยันว่าสามารถนำวิธีทดสอบมาตรฐานไปใช้งานได้อย่างถูกต้องภายใต้สภาวะการปฏิบัติงานจริงของห้องปฏิบัติการ (ปรีชา จึงสมานุกูล, 2564) ทั้งนี้ ตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ห้องปฏิบัติการต้องแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้มีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและสามารถให้ผลการทดสอบที่เชื่อถือได้ภายใต้เงื่อนไขของห้องปฏิบัติการนั้น (International Organization for Standardization, 2017) โดยการทวนสอบวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยานิยมดำเนินการตามแนวทางของมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 ซึ่งกำหนดหลักเกณฑ์สำหรับการทวนสอบวิธีอ้างอิง (Reference Method) และวิธีทางเลือก (Alternative Method) ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้แล้วก่อนนำมาใช้งานในห้องปฏิบัติการ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตามวิธีทดสอบได้อย่างถูกต้อง และให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง เหมาะสม และสอดคล้องกับสมรรถนะที่กำหนดไว้ของวิธีทดสอบนั้น (International Organization for Standardization, 2021)

การศึกษานี้จึงได้ดำเนินการทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยอ้างอิงวิธีทดสอบตาม Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 24th Edition, 2023 ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวิธีทดสอบดังกล่าวไม่มีข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ดังนั้นการทวนสอบวิธีจึงต้องปฏิบัติตาม Annex F ของ ISO 16140-3: 2021 ซึ่งเป็นการทวนสอบเฉพาะรายการ [(Food) item verification] โดยการประมาณค่า Estimated Bias (eBias) จากการเปรียบเทียบผลลัพธ์ของตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย [artificially contaminated (food) item] กับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย [inoculum suspension (without (food) item)] โดยใช้

E. coli DMST 4212 เป็นเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในการศึกษา ทั้งนี้ผลการทวนสอบที่ได้จะช่วยยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการทดสอบได้อย่างถูกต้องภายใต้สภาวะการปฏิบัติงานจริง ซึ่งเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ สามารถนำไปใช้ในการประเมินคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำบริโภค ตลอดจนสนับสนุนการควบคุมคุณภาพและการดำเนินงานตามข้อกำหนดของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภคตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025
2. เพื่อยืนยันความสามารถและสร้างความเชื่อมั่นในผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

ระเบียบวิธีวิจัย

เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

- ตู้บ่ม (Incubator)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
- UV lamp 365 nm
- เครื่องชั่ง (Balance)
- ปิเปตปราศจากเชื้อ ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- หลอดทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Double strength Lauryl tryptose broth (DLST)
- Brilliant green lactose bile broth (BGLB broth) 2%
- EC-MUG broth
- Tryptic soy broth (TSB)
- Tryptic soy agar (TSA)
- 0.1% peptone

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ทางห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อตาม ISO 11133: 2014/Amd.1/2018

เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน : *Escherichia coli* DMST 4212

วิธีการทดลอง/วิธีการวิจัย

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

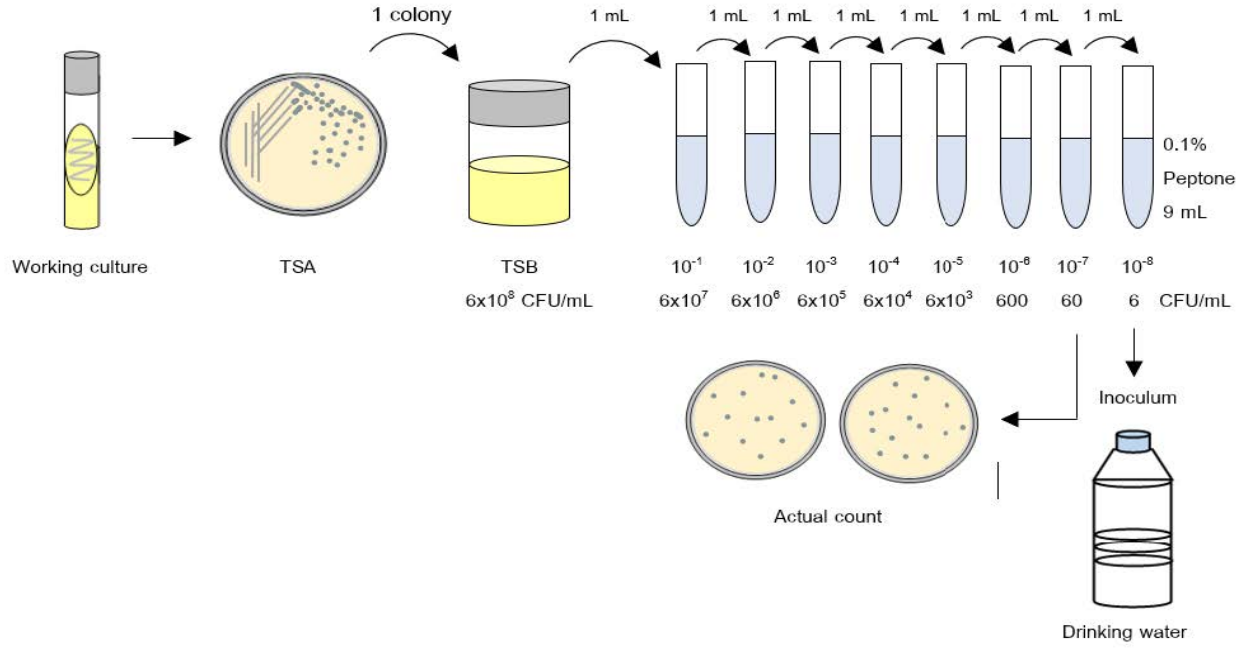
เตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับเติมลงในตัวอย่างทดสอบและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยใช้จุลินทรีย์เป้าหมายคือ *E. coli* DMST 4212 เป็นตัวแทนเชื้อในกลุ่ม Total Coliforms และ *E. coli* โดยคาดว่าจุลินทรีย์เป้าหมายปนเปื้อนในตัวอย่างในช่วง 1.1 - 23 MPN/100 mL ดังนั้นขั้นตอนการเติมจุลินทรีย์เป้าหมายลงในตัวอย่างเพื่อทวนสอบวิธีทดสอบ ต้องคำนึงถึงช่วงค่าดังกล่าวของเชื้อที่คาดว่าจะตรวจพบในแต่ละระดับการปนเปื้อน (Level of contamination) โดยกำหนดให้มีการเติมจุลินทรีย์เป้าหมาย 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (low), ระดับกลาง (medium) และระดับสูง (high) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในแต่ละระดับ

Level of contamination	Expected count		Inoculum concentration	
	MPN/100 mL	No. of positive tube	CFU/100 mL	CFU/test portion 120 mL
Low	1.1 - 3.6	1-3	3	3.6
Medium	5.1 - 9.2	4-6	9	10.8
High	12 - 23	7-9	18	21.6

ขั้นตอนการเตรียมและการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง

1. นำเชื้อ *E. coli* DMST 4212 จาก stock culture มา streak ลงบนอาหาร TSA จนได้โคโลนีเดี่ยว
2. ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและคุณสมบัติทางชีวเคมี (IMViC test)
3. เมื่อผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อสอดคล้องกับลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง ให้ทำการ subculture บนอาหาร TSA อีกครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยว
4. ใช้ loop ปราศจากเชื้อ เขี่ยเชื้อบน TSA 1 โคโลนี ถ่ายเชื้อลงอาหาร TSB 50 mL บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (โดยคาดว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากการบ่ม 24 ชั่วโมง จะมีค่าประมาณ $6x10^8$ CFU/mL)
5. เมื่อครบเวลาทำการเจือจางเชื้อ โดยดูดเชื้อจาก TSB 1 mL เจือจางลงใน 0.1% peptone 9 mL จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และทำการเจือจางต่อเนื่องจนถึง 10^{-8} จะได้เชื้อปริมาณ 6 CFU/mL สำหรับใช้เติมในตัวอย่างน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 1
6. ทำการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในระดับการปนเปื้อนที่ต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับเติมในตัวอย่างน้ำ

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมในตัวอย่างแต่ละระดับการปนเปื้อน

Level of contamination	Inoculum concentration		Inoculation	
	CFU/100 mL	CFU/test portion 120 mL	Dilution 10^{-8} (mL)	Sample (mL)
Low	3	3.6	0.6	119.4
Medium	9	10.8	1.8	118.2
High	18	21.6	3.6	116.4

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ห้องปฏิบัติการมีขอบข่ายรายการจัดอยู่ใน other categories กลุ่ม Environmental samples และวิธีอ้างอิงไม่มีข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังนั้นให้เลือกรายการทดสอบ ดังนี้

1. เลือกตัวอย่างรายการที่ไม่ท้าทาย 1 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผู้ใช้บริการทดสอบเป็นผู้เก็บตัวอย่างส่งตรวจยังห้องปฏิบัติการ

2. เลือกตัวอย่างรายการที่ท้าทาย 1 รายการได้แก่ น้ำดื่มจากตู้กดน้ำ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผู้ใช้บริการทดสอบเป็นผู้เก็บตัวอย่างส่งตรวจยังห้องปฏิบัติการ

3. แต่ละตัวอย่างถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) โดยการเขย่าขวดตัวอย่างขึ้นลง 25 ครั้ง

4. แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

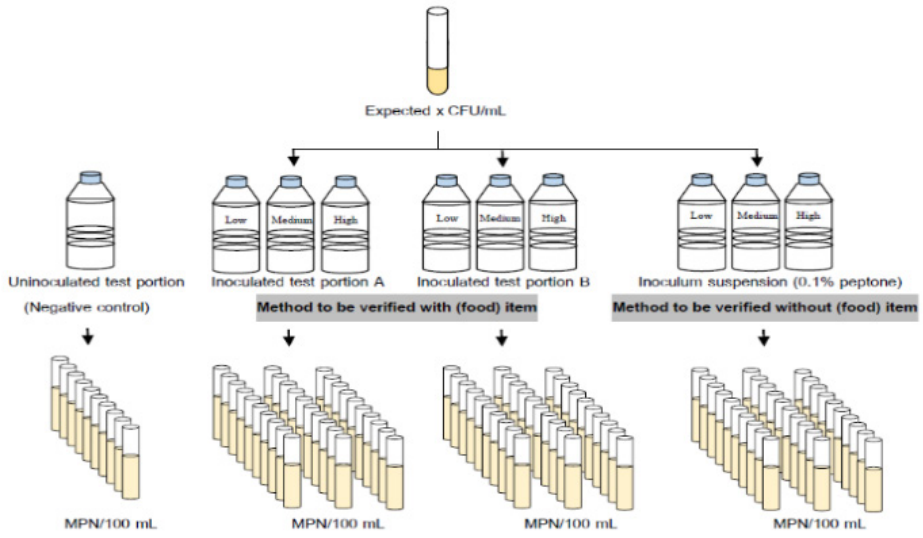
- Uninoculated test portion คือ ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำดื่มจากตู้กดน้ำที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายสำหรับเป็น negative control

- Artificially contaminated (food) item คือ ตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำดื่มจากตู้กดน้ำที่เติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในระดับการปนเปื้อนต่างๆ

- Inoculum suspension [without (food) item] คือ สารละลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายใน 0.1% peptone โดยไม่มีส่วนประกอบของน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำดื่มจากตู้กดน้ำ

5. แบ่งตัวอย่างทดสอบออกเป็น 2 test portion (A และ B) โดยให้แต่ละ test portion มีปริมาตร 120 mL

6. เติมเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงในแต่ละ test portion ตามระดับการปนเปื้อนที่กำหนด ดังแสดงตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การทวนสอบหาปริมาณเชื้อ (eBias) โดยการทำให้ปนเปื้อน

การหาค่า eBias

ดำเนินการทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำบริโภค โดยวิธีทดสอบอ้างอิงตาม Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 24th Edition, 2023 โดยแต่ละ test portion ดำเนินการทดสอบโดยผู้ทดสอบที่แตกต่างกัน Batch อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน และเครื่องมือที่แตกต่างกัน (เท่าที่ห้องปฏิบัติการมี) ดังนี้

1. Presumptive test ตัวอย่างน้ำบริโภค (MPN แบบ 10 หลอด)

เขย่าขวดตัวอย่างขึ้นลง 25 ครั้ง ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างน้ำ ใส่ใน DLST 10 หลอด หลอดละ 10 mL เขย่าหลอดทั้งหมดเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 ℃ เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการอ่านผล โดยหลอดที่มีการเจริญ (อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น) มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าให้ผลบวก ส่วนหลอดที่ไม่มีแก๊สให้บ่มต่อจนครบ 48±3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลใหม่อีกครั้ง นำหลอดที่มีการเจริญเพียงอย่างเดียวและหลอดที่มีการเจริญร่วมกับการสร้างแก๊สไปทดสอบต่อในขั้น Confirmed test

2. Confirmed test

นำหลอดที่ให้ผลบวกจากขั้น Presumptive test มาเขย่าเบา ๆ แล้วใช้ห่วงถ่ายเชื้อปราศจากเชื้อถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

BGLB สำหรับยืนยันการตรวจพบ Total Coliforms โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 ℃ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ตรวจสอบการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส หลอดที่เกิดแก๊สถือว่าให้ผลบวก หากไม่พบแก๊สให้นำไปบ่มต่อจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลซ้ำอีกครั้ง

EC-MUG Broth สำหรับยืนยันการตรวจพบ *E. coli* โดยนำหลอดทั้งหมดบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่ 44.5 ± 0.2 ℃ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ตรวจสอบการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สและการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 365 nm หลอดที่เกิดแก๊สและแสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ถือว่าให้ผลบวก

3. แปลผลจากจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกตามตาราง MPN Index ในหน่วย MPN/100 mL

4. นำจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจหาได้ในแต่ละ test portion มาเฉลี่ยและเปลี่ยนเป็นค่า $\log_{10}$ เพื่อคำนวณหาค่า eBias และประเมินผลตัวอย่างแต่ละประเภทในแต่ละระดับการปนเปื้อน โดย ค่า eBias =|$\log_{10}$ MPN/100 mL inoculum suspension (without [food] item) - mean $\log_{10}$ MPN/100 mL (artificially contaminated [food] item)|

การประเมินผลการทดสอบ

เกณฑ์การยอมรับ คือ ผลลัพธ์ในแต่ละระดับการปนเปื้อนของ artificially contaminated (food) items ต้องแตกต่างจาก inoculum suspension [without (food) item] < 0.5 $\log_{10}$ MPN/100 mL (eBias < 0.5 $\log_{10}$ MPN/100 mL)

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยการทำให้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย 3 ระดับ เพื่อการทวนสอบวิธีโดยการประมาณค่า eBias พบว่าตัวอย่างสารละลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย inoculum suspension [without (food) item] ใน 0.1% peptone ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3 คือ ตรวจพบเชื้อที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ, ระดับกลางและระดับสูงเท่ากับ 0.34, 0.71 และ 1.36 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามช่วงค่าของระดับการปนเปื้อนที่กำหนดไว้ โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อในสารละลาย 0.1% peptone ที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* จากตัวอย่างสารละลายเชื้อเป้าหมาย

Inoculation level	Result		
	Inoculum suspension [without (food) item]		
	No. of positive tube	MPN/100 mL	$\log_{10}$ MPN/100 mL
Low	2	2.2	0.34
Medium	4	5.1	0.71
High	9	23	1.36
Uninoculated	0	<1.1	-

การทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท ตรวจพบเชื้อโดยเฉลี่ยระหว่าง test portion A และ test portion B ที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ, ระดับกลางและระดับสูง เท่ากับ 0.45, 0.71 และ 1.36 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และตรวจพบจากตัวอย่างน้ำดื่มจากตู้กดน้ำ โดยเฉลี่ยระหว่าง test portion A และ test portion B ที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ, ระดับกลางและระดับสูง เท่ากับ 0.19, 0.84 และ 1.36 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำดื่มจากตู้กดน้ำที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งมีผลการทดสอบน้อยกว่า 1.1 MPN/100 mL สำหรับใช้เป็นชุดควบคุม และไม่ได้ถูกนำมาคำนวณค่า eBias เนื่องจากใช้เพื่อยืนยันการไม่ปนเปื้อนของตัวอย่างเท่านั้น

เมื่อนำผลการทดสอบทั้งหมดมาคำนวณหาค่า eBias พบว่าทั้งสองรายการทวนสอบในทุกระดับการปนเปื้อนมีค่า eBias น้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$ MPN/100 mL โดยรายการที่ไม่ท้าทายประเภทน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทมีค่า eBias ที่การปนเปื้อนระดับต่ำ, ระดับกลางและระดับสูง เท่ากับ 0.11, 0.00 และ 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ เช่นเดียวกับน้ำดื่มจากตู้กดน้ำซึ่งเป็นรายการทวนสอบที่ท้าทายพบว่า ค่า eBias ที่การปนเปื้อนระดับต่ำ, ระดับกลางและระดับสูง เท่ากับ 0.15, 0.13 และ 0.00 $\log_{10}$ MPN/100 mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท

Inoculation level	Test portion	Artificially contaminated (food) item				Result Artificially contaminated (food) item ($\log_{10}$ MPN/100 mL)	Mean result Artificially contaminated (food) item ($\log_{10}$ MPN/100 mL)
		Total Coliforms		*E. coli*			
		No. of positive tube	MPN/100 mL	No. of positive tube	MPN/100 mL		
Low	A	2	2.2	2	2.2	0.34	0.45
	B	3	3.6	3	3.6	0.56	
Medium	A	4	5.1	4	5.1	0.71	0.71
	B	4	5.1	4	5.1	0.71	
High	A	9	23	9	23	1.36	1.36
	B	9	23	9	23	1.36	
Uninoculated		0	<1.1	0	<1.1	-	-

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำดื่มจากตู้กดน้ำ

Inoculation level	Test portion	Artificially contaminated (food) item				Result Artificially contaminated (food) item ($\log_{10}$ MPN/100 mL)	Mean result Artificially contaminated (food) item ($\log_{10}$ MPN/100 mL)
		Total Coliforms		*E. coli*			
		No. of positive tube	MPN/100 mL	No. of positive tube	MPN/100 mL		
Low	A	1	1.1	1	1.1	0.04	0.19
	B	2	2.2	2	2.2	0.34	
Medium	A	5	6.9	5	6.9	0.84	0.84
	B	5	6.9	5	6.9	0.84	
High	A	9	23	9	23	1.36	1.36
	B	9	23	9	23	1.36	
Uninoculated		0	<1.1	0	<1.1	-	-

ตารางที่ 6 การประเมินผลการทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภค

(Food) item		For comparison: Mean result Artificially contaminated (food) item (log_{10} MPN/test portion)	For comparison: Result Inoculum suspension [without (food) item] (log_{10} MPN/100 ml)	eBias	Conclusion ≤ 0.5 log_{10}
น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท	Low	0.45	0.34	0.11	Accept
	Medium	0.71	0.71	0.00	Accept
	High	1.36	1.36	0.00	Accept
น้ำดื่มจากตู้กดน้ำ	Low	0.19	0.34	0.15	Accept
	Medium	0.84	0.71	0.13	Accept
	High	1.36	1.36	0.00	Accept

สรุปผลการวิจัย

จากการทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภคด้วยวิธี MPN อ้างอิงตาม Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, 2023 โดยดำเนินการทวนสอบตามแนวทางของ ISO 16140-3:2021 พบว่าตัวอย่างน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทซึ่งเป็นรายการทวนสอบที่ไม่ท้าทายและตัวอย่างน้ำดื่มจากตู้กดน้ำซึ่งเป็นรายการทวนสอบท้าทาย ให้ค่า eBias ในทุกระดับการปนเปื้อน น้อยกว่า 0.5 log_{10} MPN/100 mL ซึ่งอยู่ในขอบเขตการยอมรับ แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีทดสอบมาตรฐานมาใช้ในการทดสอบได้อย่างเหมาะสม ถูกต้อง ผู้ใช้บริการทดสอบสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำบริโภคได้อย่างน่าเชื่อถือ

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทวนสอบวิธีทดสอบหา Total Coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภคด้วยวิธี Multiple-tube fermentation ตามมาตรฐานอ้างอิงของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, 2023 ซึ่งดำเนินการทวนสอบตามแนวทางของ ISO 16140-3: 2021 (Annex F) โดยกำหนดให้ประเมินผลการทวนสอบด้วยค่า eBias จากรายการทวนสอบ 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างทั่วไปที่ไม่ท้าทาย ได้แก่ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและตัวอย่างท้าทาย ได้แก่ น้ำดื่มจากตู้กดน้ำ พบว่า ผลการทดสอบในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในสารละลายเจือจาง (0.1% peptone) และน้ำบริโภคทั้ง 2 กลุ่ม ไม่พบการเจริญของเชื้อ Total Coliforms และ *E. coli* จึงมั่นใจได้ว่าค่า eBias ที่ได้เป็นผลจากปริมาณเชื้อที่เติมลงไปอย่างแท้จริง ไม่ได้เป็นผลจากจุลินทรีย์พื้นถิ่น (Background microflora) ที่มาจากตัวอย่างน้ำหรือการปนเปื้อนจากกระบวนการทดสอบ

เมื่อพิจารณาค่า eBias จากน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทมีค่า eBias ต่ำกว่าเกณฑ์ 0.5 log_{10} MPN/100 mL ในทุกระดับการปนเปื้อน สอดคล้องตามทฤษฎี เนื่องจากเป็นตัวอย่างไม่ท้าทายที่ปราศจากปัจจัยรบกวนที่อาจส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย ในขณะที่น้ำดื่มจากตู้กดน้ำแม้จะมีความเสี่ยงจากสภาพแวดล้อมที่สูงกว่า เช่น อาจมีสารอินทรีย์ละลายน้ำ สารเคมีจากไส้กรองหรือคลอรีนที่ตกค้าง ซึ่งอาจส่งผลรบกวนการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย แต่ผลการคำนวณค่า eBias ยังคงให้ค่าน้อยกว่า 0.5 log_{10} MPN/100 mL ในทุกระดับการปนเปื้อน เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่ใช้มีความทนทานต่อสภาวะรบกวนสูงและห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีทดสอบนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำบริโภคได้อย่างครอบคลุมทั้งตัวอย่างน้ำที่ไม่ท้าทายและท้าทาย

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ พชรภร แก้วสำราญ (2566) ซึ่งได้ทำการทวนสอบวิธีทดสอบหาปริมาณ Total Coliforms, Fecal coliforms และ *E. coli* โดยใช้ตัวอย่างน้ำบริโภค 2 รายการ คือ น้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและน้ำประปา พบว่าผลการทวนสอบให้ค่า eBias ผ่านเกณฑ์การยอมรับในทุกระดับการปนเปื้อนสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าเลือกใช้รายการทดสอบท้าทายที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างน้ำบริโภคที่พบเป็นประจำในแต่ละห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการทวนสอบวิธีทดสอบว่าเป็นกระบวนการที่มีความจำเป็นสำหรับทุกห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการทวนสอบวิธีทดสอบให้ค่า eBias อยู่ในขอบข่ายการยอมรับทั้ง 2 รายการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีทดสอบอ้างอิงมาใช้ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม ครอบคลุมในขอบข่ายตัวอย่างน้ำบริโภคของห้องปฏิบัติการและระดับปริมาณเชื้อที่ตรวจพบได้จากตัวอย่าง ดังนั้นผู้ใช้บริการทดสอบจากห้องปฏิบัติการจึงสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการประเมินคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำบริโภคด้านจุลินทรีย์ได้อย่างน่าเชื่อถือ

อย่างไรก็ตาม เนื่องด้วยวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยา ตลอดจนแนวทางการดำเนินการทวนสอบวิธีทดสอบ มีการทบทวน ปรับปรุงและแก้ไขให้สอดคล้องกับความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์โดยหน่วยงานหรือองค์กรที่กำหนดมาตรฐานอยู่เป็นระยะ ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องติดตามและตรวจสอบความทันสมัยของเอกสารมาตรฐานให้เป็นปัจจุบันอย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้หากมีการเปลี่ยนแปลงในสาระสำคัญของวิธีการอ้างอิงที่มีผลต่อความสามารถในการวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการทวนสอบวิธีทดสอบใหม่ตามความจำเป็น เพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบที่ส่งมอบให้แก่ผู้ใช้บริการทดสอบยังคงเป็นไปตามวิธีมาตรฐานฉบับล่าสุดและรักษาความน่าเชื่อถือในระดับสากลได้อย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์บริการตรวจสอบและรับรองมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. (2568). *ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 462) พ.ศ. 2568 เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท.* ราชกิจจานุเบกษา, 142(ตอนพิเศษ 386 ง), 15-20.

ปรีชา จึงสมานุกูล. (2564). *การทวนสอบวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา ISO 16140-3: 2021 Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in single laboratory* [เอกสารประกอบการอบรม]. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พชรภร แก้วสำราญ. (2566). *การทวนสอบวิธีการตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ Escherichia coli ในน้ำบริโภค* [ผลงานวิชาการเพื่อประเมินตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับชำนาญการ]. กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุข, กรมอนามัย.

American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2023). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (24th ed.). APHA Press.

International Organization for Standardization. (2017). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (ISO/IEC Standard No. 17025:2017). https://www.iso.org/standard/66912.html

International Organization for Standardization. (2021). *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory (ISO Standard No. 16140-3:2021).* https://www.iso.org/standard/66324.html

Osman, E. (2022). Practice 4: Most probable number technique. In O. Erkmen (Ed.), *Microbiological analysis of foods and food processing environments* (pp. 31-37). Academic Press.

Saha, U., Sonon, L., Turner, P., Kissel, D., Vendrell, P. F., & Atiles, J. H. (2013). *Household water quality: Coliform bacteria in your water* (Circular No. 858-7). University of Georgia Cooperative Extension.

World Health Organization. (2022). *Guidelines for drinking-water quality* (4th ed., incorporating the 1st and 2nd addenda). World Health Organization.