29 พ.ค. 2545

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยมหิดล

การตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโดยวิธีอินโดล

อุรัญญา นนทราช

อภินันทนาการ
จาก
ห้องสมุดคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2543

ISBN 974-663-947-1

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล

วท
อ394ก
2543
ฉ.1

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโดยวิธีอินโดล

....

นางสาวอรัญญา นนทราช

ผู้วิจัย

....

อาจารย์ชาลี นาวานุเคราะห์ Ph.D.

ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุระ พัฒนเกียรติ ว.ท.ม.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....

รองศาสตราจารย์ฉัตรชัย ศรไชย พ.บ., ว.ท.ม.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....

ศาสตราจารย์เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์ Ph.D.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย

....

อาจารย์ชุมพร ยุวรี ว.ท.ม.

ประธานคณะกรรมการประจำหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีที่

เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร

คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโดยวิธีอินโดล

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตร

มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร

วันที่ 12 พฤษภาคม พ.ศ. 2543

....

นางสาวอรัญญา นนทราช

ผู้วิจัย

....

อาจารย์ชาลี นาวานุเคราะห์ Ph.D.

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุระ พัฒนเกียรติ ว.ท.ม.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....

นางนฤมล ตปนียะกุล M.Sc.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....

รองศาสตราจารย์ฉัตรชัย ศรไชย พ.บ., ว.ท.ม.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....

ศาสตราจารย์เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์ Ph.D.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย

....

รองศาสตราจารย์อนุชาติ พวงสำลี Ph.D.

คณบดี

คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาของ อาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่าน ได้แก่ ด.ร.ชาลี นาวานุเคราะห์ ผ.ศ.สุระ พัฒนเกียรติ์ ร.ศ. ฉัตรชัย ศรไชย และ ผ.อ.นฤมล ตปนียะกุล ที่ได้กรุณาแนะนำ และแก้ไขจุดบกพร่องของวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ ที่เอื้ออำนวยสถานที่และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ในการทำวิจัยส่วนใหญ่ของวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 นนทบุรี ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการขอเก็บข้อมูล โดยเฉพาะพี่ประนอม ชำนาญ ที่ช่วยกรุณาให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ น้องฝน น้องเก่ง ใหญ่ หนู ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างน้ำ ขอบพระคุณพี่ วันนี มากันต์ ส่วนวิเคราะห์คุณภาพสิ่งแวดล้อม กรมอนามัยที่ช่วยให้คำแนะนำ

ขอบพระคุณเพื่อน ๆ AT 11 ที่ให้กำลังใจ พี่ยุ้ย พี่เทียน แอน ไก่ ยุ จูน ตุ้ย เหน่ง แก้ว แจง โดยเฉพาะพี่ สาธิต ไทยทัตกุล ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์วัดอุณหภูมิ และเพื่อน ๆ น้อง ๆ ชาว MT ทั้ง ร.พ. วิภาวดี และ สินแพทย์ ที่ให้กำลังใจ ขอขอบพระคุณ คุณแม่ พี่ ๆ น้อง ๆ หลาน ๆ ที่ให้กำลังใจด้วย

อรัญญา นนทราช

Copyright by Mahidol University

3937301 ENAT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร ; วท.ม.
(เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร)

คำสำคัญ : การตรวจสอบ / น้ำบริโภค / แบคทีเรีย / วิธีอินโดล

อรัญญา นนทราช : การตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโดยวิธีอินโดล (BACTERIOLOGICAL EXAMINATION FOR DRINKING WATER BY INDOLE TEST) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาลี นาวานุเคราะห์ Ph.D., สุระ พัฒนเกียรติ ว.ท.ม., ฉัตรชัย ศรไชย พ.บ., ว.ท.ม. 62 หน้า, ISBN 974-663-947-1

การศึกษาการตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโดยวิธีอินโดล เป็นการตรวจแบบพบหรือไม่พบเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ 10 มล. ผสมกับตัวอย่างน้ำ 10 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เติมน้ำยาทดสอบอินโดล (Kovac's Reagent) แล้วสังเกตุสีแดงที่เกิดขึ้นในชั้นน้ำยาทดสอบ หากมีสีแดงอ่านผลบวก ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของ *Escherichia coli* ที่ต่ำสุดที่สามารถให้ผลบวกได้คือประมาณ 1 เซลล์/ 10 มล. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดผลบวกอินโดลที่อุณหภูมิ 25-40°ซ คือ 48 ชั่วโมง เมื่อบ่ม *Escherichia coli* รวมกับ *Entrobacter cloacae* สามารถให้ผลบวกอินโดลได้ทุกอัตราส่วน อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องใช้งานได้ไม่น้อยกว่า 3 เดือน

เมื่อตรวจสอบตัวอย่างน้ำบริโภคประเภทน้ำประปาจำนวน 116 ตัวอย่างในเขตศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 นนทบุรี โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน Standard Multiple-Tube Fermentation Technique (MTF) ในการตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์ม และวิธีอินโดลพบว่า วิธีมาตรฐานได้ผลบวก 33 ตัวอย่าง ผลลบ 83 ตัวอย่าง ส่วนวิธีอินโดลได้ผลบวก 45 ตัวอย่าง ผลลบ 71 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความแตกต่างของทั้งสองวิธีโดย Chi-square test พบว่า ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($\alpha = 0.05$) ค่าความถี่ที่คำนวณได้ P = 2.78 วิธีอินโดลมีค่าความไวร้อยละ 87.87 ค่าความจำเพาะเจาะจงร้อยละ 80.72 และประสิทธิภาพร้อยละ 82.75 วิธีอินโดลเป็นวิธีตรวจคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียอย่างง่าย เหมาะสำหรับใช้ตรวจคุณภาพน้ำบริโภคเพื่อคัดกรองหรือใช้ตรวจก่อนที่จะนำไปตรวจโดยวิธีมาตรฐาน เพื่อเป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ทรัพยากร และอุปกรณ์ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการ

Copyright by Mahidol University

3937301 ENAT/M : MAJOR : APPROPRIATE TECNOLOGY FOR RESOURCE DEVELOPMENT ; M.Sc. (APPROPRIATE TECNOLOGY FOR RESOURCE DEVELOPMENT)

KEY WORDS : BACTERIOLOGICAL/ DRINKING WATER / EXAMINATION/ INDOLE TEST

ARANYA NONTARACH : BACTERIOLOGICAL EXAMINATION FOR DRINKING WATER BY INDOLE TEST .THESIS ADVISORS : CHARLIE NAVANUGRAHA Ph.D., SURA PATTANAKIAT M.Sc., CHATCHAI SORNCHAI MD., M.Sc. 62 p. ISBN 974-663-947-1

The study of Bacteriological Examination of Drinking Water by Indole Test was studied for Present-Absent Test. An equal volume (10 ml.) of applied medium and drinking water were mixed and incubated at room temperature for 48 hours. After adding 10 drops of Kovac's Reagent , the red color which appeared on the Reagent's layer indicated positive. The results showed the fewest detectable quantity of *Escherichia coli* was 1 cell / 10 ml.. An effective time for incubation at 25-40°C was 48 hours. The incubation of *Escherichia coli* and *Entrobacter cloacae* could be detected by Indole Test for the entire ratio of the bacteria and an applied medium could be used at least 3 mouths after having been prepared.

When Indole test method was compared with Standard Multiple-Tube Fermentation (MTF) method for Fecal coliform by using 116 pipe water samples, the results showed that there were 33 samples for positive and 83 samples for negative; by MTF method, there were 45 samples for positive and 71 for negative; by Indole Test. No significant difference between these two methods was detected by Chi-square test at 95 % confident ($\alpha = 0.05$) P value = 2.78. Sensitivity, specificity and efficiency of Indole test showed at 87.87%, 80.72% and 82.75% , respectively. Indole test is a simplified method for bacterial examination of drinking water and as a screening test in order to save time , labour , cost and complicated equipment before a standard method is used.

Copyright by Mahidol University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญภาคผนวก	ญ
อธิบายคำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 ขอบเขตของการศึกษา	4
1.5 ข้อจำกัดของการศึกษา	5
1.6 คำจำกัดความของการศึกษา	5
1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.8 กรอบแนวคิด	7
2. ทบทวนวรรณกรรม	9
2.1 แหล่งน้ำและคุณภาพน้ำ	9
2.2 การตรวจวิเคราะห์ฟีคัลโคลิฟอร์มด้วยวิธีมาตรฐาน MTF	11
2.3 การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (SPC)	12
2.4 การดำรงชีพของแบคทีเรียและอาหารเพาะเลี้ยง	13
2.5 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย	16
2.6 ปฏิกิริยาของการทดสอบอินโดล	19
2.7 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	22

Copyright by Mahidol University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. วัตถุและวิธีการวิจัย	**28**
3.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้	28
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้	28
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	29
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	29
3.5 การตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีอินโดล	32
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย	33
4. ผลการศึกษาและอภิปราย	**37**
4.1 ผลการศึกษาส่วนที่ 1	37
4.2 ผลการศึกษาส่วนที่ 2	37
4.3 ผลการศึกษาส่วนที่ 3	39
4.4 ผลการศึกษาส่วนที่ 4	40
4.5 ผลการศึกษาส่วนที่ 5	40
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	**43**
5.1 สรุปผลการศึกษา	43
5.2 วิจารณ์ผลการศึกษา	43
5.3 ข้อดีข้อเสียของวิธีอินโดล	45
5.4 ข้อเสนอแนะ	46
รายการอ้างอิง	**47**
ภาคผนวก	**50**
ประวัติผู้วิจัย	**62**

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	10
ตารางที่ 2	แสดงช่วงของอุณหภูมิที่แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ต้องการ	16
ตารางที่ 3	อุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุดของประเทศไทยแบ่งตามภาคต่าง ๆ	17
ตารางที่ 4	แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อใช้ *E. coli* ปริมาณต่าง ๆ	37
ตารางที่ 5	แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อใช้เชื้อ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์/ 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	38
ตารางที่ 6	แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อบ่ม *E. coli* รวมกับ *E. cloacae*	39
ตารางที่ 7	แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อใช้ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์ / มล. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุแตกต่างกัน	40
ตารางที่ 8	แสดงผลการตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF	41
ตารางที่ 9	แสดงผลสรุปการเปรียบเทียบการตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF	41
ตารางที่ 10	แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF	42
ตารางที่ 11	เปรียบเทียบวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน	45
ตารางที่ 12	แสดงผลการตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐานMTF (ข้อมูลดิบ)	55-57
ตารางที่ 13	แสดงกลุ่มแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae	58

Copyright by Mahidol University

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการศึกษาประสิทธิผลของวิธี อินโดล ที่มีต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่สร้างขึ้น	7
ภาพที่ 2 แสดงกรอบแนวคิดขั้นตอนการเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีอินโดล กับวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจหาเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มโดยใช้น้ำบริโภคจากพื้นที่ศึกษา	8
ภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการย่อยสลายทริปโตฟานได้ผลผลิตเป็นอินโดล และเมทิลอินโดล	19
ภาพที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการย่อยทริปโตฟานแล้วได้ผลผลิตเป็นอินโดล กรดไพรูวิกและแอมโมเนีย	20
ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการเกิดสีของ อินโดล เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยา Kovac's	21
ภาพที่ 6 แผนผังการทดลองส่วนที่ 1	30
ภาพที่ 7 แผนผังการทดลองส่วนที่ 2	30
ภาพที่ 8 แผนผังการทดลองส่วนที่ 3	31
ภาพที่ 9 แผนผังการทดลองส่วนที่ 4	31
ภาพที่ 10 แผนผังการทดลองส่วนที่ 5	32
ภาพที่ 11 น้ำยา Kovac's	35
ภาพที่ 12 ชุดตรวจสอบวิธีอินโดล	35
ภาพที่ 13 อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ 10 มล.	36
ภาพที่ 14 อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์เติมน้ำตัวอย่าง 10 มล.	36
ภาพที่ 15 แสดงผลบวกลบเมื่อเติมน้ำยา Kovac's ลงไปในขวดที่บ่มครบ 48 ชั่วโมง	37

Copyright by Mahidol University

สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ 50
ภาคผนวก ข การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย 52
ภาคผนวก ค แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้น้ำตัวอย่างประเภทน้ำประปา (ข้อมูลดิบ) 54
ภาคผนวก ง แสดงกลุ่มแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae 58
ภาคผนวก จ ข้อมูลน้ำด้านต่าง ๆ ที่สำคัญ 59

Copyright by Mahidol University

อธิบายคำย่อ

ชม.	ชั่วโมง
ม.ม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
°ซ	องศาเซลเซียส
C. diversus	*Citrobacter diversus*
CFU	Colony Forming Unit / ml.
E. agglomerans	*Enterobacter agglomerans*
E. cloacae	*Enterobacter cloacae*
E. coli	*Escherichia coli*
GUD	Glucuronidase
K. oxytoca	*Klebseilla oxytoca*
MPN	Most Probable Number
MTF	Multiple Tube Fermentation Technique
MUG	4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide
SPC	Standard Plate Count

Copyright by Mahidol University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

น้ำ เป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ มนุษย์ใช้น้ำในกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การคมนาคมขนส่ง การอุตสาหกรรม การเกษตรกรรมและการอุปโภคบริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคน้ำที่สะอาดปลอดภัยมีความจำเป็นสำหรับคุณภาพชีวิตที่ดี ประชาชนในชนบทส่วนใหญ่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ลำคลอง บ่อสาธารณะ บ่อบาดาลและบ่อตื้น ซึ่งน้ำที่นำมาบริโภคนั้นอาจมีการปนเปื้อนของสิ่งต่าง ๆ เมื่อไม่ได้รับการบำบัดอย่างถูกวิธีแล้ว อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ น้ำที่จะนำมาบริโภคได้นั้นควรเป็นน้ำที่ผ่านการตรวจคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ทางกายภาพ ไม่ควรมีสี กลิ่น รส และความขุ่น ในทางเคมีไม่ควรมีสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ โลหะหนัก ซัลเฟต ฟอสเฟต เป็นต้น ทางจุลชีววิทยานั้นน้ำสำหรับการบริโภค ไม่ควรมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียจากอุจจาระและแบคทีเรียที่ทำให้คุณสมบัติอื่น ๆ ของน้ำเปลี่ยนไป (1) จากการสำรวจคุณภาพน้ำบริโภคในโครงการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำบริโภคในชนบท ของกรมอนามัย ปี พ.ศ. 2535-2536 (2) พบว่า ส่วนใหญ่ประชาชนในชนบทบริโภคน้ำที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะมาตรฐานคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย จากการสำรวจจำนวน 4,296 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวน 50.4 % ของตัวอย่างมีคุณภาพไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานทางแบคทีเรีย และจากการสำรวจคุณภาพน้ำอุปโภคบริโภคของประชาชนในเขตจังหวัดเชียงรายและพะเยาปี พ.ศ. 2537-2538 โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงราย (3) โดยตรวจตัวอย่างน้ำจาก น้ำบ่อตื้น น้ำบาดาล น้ำประปาหมู่บ้าน และน้ำฝน พบว่า มีตัวอย่างน้ำที่ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทางโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ร้อยละ 41.5 ของตัวอย่าง 239 ตัวอย่าง และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ร้อยละ 47.6 ของตัวอย่าง 189 ตัวอย่าง คุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรียนับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน โรคที่เกิดจากน้ำเป็นสื่อ (Water borne disease) ในการบริโภคน้ำที่ไม่สะอาดคือโรคอุจจาระร่วง เช่นโรค บิด ไข้รากสาด โรคอหิวาต์ ลำไส้อักเสบ เป็นต้น จากการศึกษาพฤติกรรมการใช้น้ำดื่มของชุมชนชาวไทยในชนบท (4) พบว่า ชาวบ้านไม่นิยมต้ม หรือกรองน้ำที่นำมาใช้ในการบริโภคเพราะเห็นว่าสิ้นเปลืองพลังงานและเวลา และไม่นิยมในรสชาติของน้ำต้ม ในสภาพแวดล้อมปัจจุบันนี้ ประชาชนในที่ยังใช้น้ำจากแหล่งน้ำตาม

Copyright by Mahidol University

ธรรมชาติ หากไม่ระมัดระวังในการป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายลงสู่แหล่งน้ำ และขาดความรู้ในการเลือกแหล่งน้ำที่นำมาใช้ในการบริโภค อาจเป็นอันตรายจากโรคดังกล่าว

ผู้ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากเชื้อโรคต่าง ๆ หากมีอาการรุนแรงอาจสูญเสียน้ำมากจนทำให้เกิดอาการช้อค หรือเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาทันที ดังนั้นการบริโภคน้ำสะอาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการดำรงชีวิต การมีสุขภาพดีถ้วนหน้าและมีผลต่อคุณภาพชีวิตที่ดี การเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอด้วยวิธีง่ายๆ จึงมีความจำเป็นและมีประโยชน์มากกว่าการตรวจด้วยวิธียุ่งยากซับซ้อนที่ตรวจน้อยครั้ง (5) เพื่อให้ชาวบ้านได้รับน้ำบริโภคที่ปลอดภัยและมีส่วนร่วมในการเฝ้าระวังด้วยตนเอง จึงควรใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อให้เหมาะสำหรับชาวบ้าน ควรเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนสามารถดำเนินการเองโดยอาสาสมัคร เพื่อสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจ และสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8 พ.ศ. 2540-2544 (6) ที่มุ่งเน้นให้คนมีการพัฒนาศักยภาพด้านสุขภาพและพลานามัย การมีส่วนร่วมในการเฝ้าระวังโรคภัยไข้เจ็บของอาสาสมัคร เป็นการดึงให้ประชาชนมีส่วนร่วมดังกล่าว

ในปัจจุบันการตรวจคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียใช้วิธีการมาตรฐาน Standard Multiple-Tube Fermentation Technique (MTF) เป็นหลัก และในการตรวจแบคทีเรียเพื่อเฝ้าระวังและควบคุมคุณภาพน้ำนั้น โดยทั่วไปไม่นิยมใช้การตรวจแบคทีเรียก่อโรคโดยตรงเพราะมีความยุ่งยาก แบคทีเรียก่อโรคมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรียอื่นๆ และจะมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้น้อยเมื่อออกจากร่างกาย ต่างจากแบคทีเรียไม่ก่อโรค (7) จึงนิยมใช้แบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้ความสกปรกของน้ำ คือโคลิฟอร์ม (Coliform bactteria) การทดสอบว่าแบคทีเรียนั้นมาจากอุจจาระหรือไม่ คือการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) แบคทีเรียชนิดนี้โดยปรกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นและถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ เมื่อมีการตรวจพบแบคทีเรียจำพวกนี้แสดงว่าน้ำมีการปนเปื้อนอุจจาระ เป็นตัวบ่งชี้ว่าอาจมีแบคทีเรียก่อโรคปนเปื้อนมา ดังนั้นน้ำจากแหล่งน้ำนั้น ๆ จึงเป็นน้ำที่ไม่ควรนำมาใช้บริโภค เพราะอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค

มาตรฐานน้ำดื่มขององค์การอนามัยโลกระบุว่าจะต้องมีค่าโคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* (*E. coli*) เท่ากับ 0 MPN/100 มิลลิลิตร (มล.) ส่วนมาตรฐานน้ำบริโภคในชนบทของไทยระบุว่า จะต้องมีค่าโคลิฟอร์ม $\leq$ 10 MPN/100 มล. และจะต้องไม่พบ *E. coli* (8) การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม มีการตรวจอยู่หลายวิธี วิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุขและเป็นมาตรฐานของ American Public health Association คือ วิธีมาตรฐาน Standard Multiple-Tube Fermentation Technique (MTF) (8,9) เป็นวิธีที่มาตรฐานที่นิยมใช้ในการตรวจน้ำจากแหล่งน้ำได้ทุกประเภท วิธีการตรวจจนถึงขั้นยืนยันใช้เวลานานถึง 72-96 ชั่วโมง ส่วนวิธี

Copyright by Mahidol University

Membrane Filter Technique ใช้ปริมาณน้ำที่มากกว่าวิธีมาตรฐาน MTF วิธีทั้งสองนั้นเป็นวิธีที่ต้องการใช้ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อม ใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะด้าน ใช้อุปกรณ์และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ ต้องอาศัยการเตรียมการทางห้องปฏิบัติการให้พร้อมก่อนที่จะมีการตรวจส่วนการตรวจ *E. coli* ในน้ำโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glucuronidase โดยการใช้สารเรืองแสง 4-methyiumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) (10,11,12,13) การใช้สาร Chromogenic Indoxyl-β-D-glucuronide (IBDG) (14,15,16,17) มีข้อจำกัดเรื่องอุปกรณ์ช่วยในการอ่านผล เช่นใช้หลอดอัลตราไวโอเลต และสารตั้งต้นของเอนไซม์ มีราคาแพงต้องซื้อจากต่างประเทศ

การทดสอบอินโดล เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามโรงพยาบาลทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งนิยมใช้เพื่อตรวจแยกเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ในการพิจารณาจำแนกเชื้อจำเป็นต้องอาศัยการแปลผลจาก biochemical tests ชนิดอื่น ๆ เช่น TSI, Lysine, Citrate, motile และ urease โดยมาก *E. coli* ให้ผลบวกกับอินโดล 98 % (9) ส่วนใหญ่แล้ว ฟีคัลโคลิฟอร์ม 100 % เป็น *E. coli* ประมาณ 90-98% (10,13,18,19) ดังนั้นจึงนำหลักการดังกล่าวมาทำการประยุกต์เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในน้ำบริโภคโดยวิธีอินโดล จึงจำเป็นจะต้องศึกษาประสิทธิผลและประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MTF

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิผลของวิธีอินโดล ที่มีต่อการตรวจสอบหา *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ดังนี้

1) เพื่อหาปริมาณต่ำสุดของเชื้อ *E. coli* ในน้ำ 10 มล. ที่สามารถให้ผลบวกได้โดยวิธี อินโดล เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2) เพื่อทราบระยะเวลาทีให้ผลบวกเมื่อบ่มเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 25 ,30 , 35 และ 40 °ซ แล้วทดสอบอินโดล เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ,48 และ 72 ชั่วโมง

3) เพื่อศึกษาผลการบ่มเชื้อ *E. coli* และกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ให้ผลลบกับอินโดลในที่นี้ใช้ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) เข้าด้วยกันเมื่อใช้อัตราส่วนของเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *E. cloacae* ดังนี้คือ 1:1, 1:2 , 1:3 , 1:4 และ 1:5. ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาที่เลือกจากส่วนที่ 2

4) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างกันคือ 2, 4 ,8 สัปดาห์และ 3 เดือน

Copyright by Mahidol University

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีอินโดลในการตรวจน้ำบริโภคประเภทน้ำประปา เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาตามที่เลือกจากส่วนที่ 2 กับวิธีมาตรฐาน Standard Multiple-Tube Fermentation Technique (MTF) ในการตรวจวิเคราะห์ฟีคัลโคลิฟอร์ม

1.3 ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 ตัวแปรอิสระ

1) ความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์

2) อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ

3) เวลาที่ใช้บ่มเชื้อ

4) อายุการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) ปริมาณอัตราส่วนต่างๆของเชื้ออื่นที่ผสมกับ *E. coli*

1.3.2 ตัวแปรตาม ผลการตรวจ Positive หรือ Negative

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

1.4.1 ตัวอย่างน้ำที่สร้างขึ้นใช้ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เตรียมปริมาณต่าง ๆ 7 ระดับ คือ ประมาณ 1 , 2 , 4 , 8 , 10 , 100 และ 1000 เซลล์ / 10 มล.

1.4.2 ตัวอย่างของน้ำที่ใช้ในขั้นตอนต่อมา ใช้ปริมาณของ *E. coli* ที่ต่ำที่สุดที่สามารถให้ผลบวกอินโดล ได้จากส่วนที่ 1

1.4.3 ตัวอย่างน้ำที่ทำการตรวจในขั้นตอนการเปรียบเทียบวิธีอินโดล กับวิธีมาตรฐาน MTF เป็นตัวอย่างน้ำบริโภคประเภทน้ำประปาเก็บจากจังหวัด อยุธยา อ่างทอง ปทุมธานี นนทบุรี และสมุทรปราการ เขตความรับผิดชอบของศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 นนทบุรี

1.4.4 น้ำยา Kovac's ที่ใช้คือ p-Dimethylaminobenzaldehyde ความเข้มข้น 5%

1.4.5 อุณหภูมิห้องขณะทำการศึกษา คืออุณหภูมิที่บันทึก ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

1.4.6 สภาพแวดล้อมของการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ ไม่ถูกแสงแดดโดยตรง

Copyright by Mahidol University

1.4.7 วิธีควบคุมในขั้นตอนการศึกษาประสิทธิผลของวิธีอินโดล ที่มีต่อ *E. coli* คือวิธี Standard plate count แบบ pour plate ที่ควบคุมปริมาณของ *E. coli* ที่ 100 เซลล์ / มล.

1.4.8 วิธีอินโดลที่ศึกษาเป็นวิธีที่ใช้ตรวจ *E. coli* ในน้ำเป็นวิธีเบื้องต้น (screening test) เท่านั้น

1.5 ข้อจำกัดของการศึกษา

1.5.1 วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม คือวิธี Standard Multiple-Tube Fermentation Technique สามารถตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม ได้ผลบวก $\geq$ 2 MPN/100 มล. ขึ้นไป ส่วนผลลบจะมีค่า < 2 MPN /100 มล และทำถึงขั้นยืนยันเท่านั้น

1.5.2 ผลบวก *E. coli* โดยวิธีอินโดล เมื่อเติมน้ำยา Kovac's เขย่าเล็กน้อยจะปรากฏสีแดงบนชั้นของน้ำยาอ่านผลได้ทันที ผลบวกจะปรากฏสีแดงอยู่นานมากกว่า 10 นาที ถ้าเกิดผลบวกเพียงขวดใดขวดหนึ่งจะถือว่าเป็นบวก

ผลลบ *E. coli* โดยวิธีอินโดล เมื่อเติมน้ำยา Kovac's เขย่าเล็กน้อยจะไม่ปรากฏสีแดงบนชั้นของน้ำยา สีของน้ำยาจะยังคงเดิมคือเป็นสีเหลืองอ่อนนานมากกว่า 10 นาที

1.6 คำจำกัดความของการศึกษา

1.6.1 โคลิฟอร์ม (5)

หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถใช้ออกซิเจน ย้อมติดสีแดงของแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโทสได้ ที่อุณหภูมิ 35-37°ซ ให้กรด แก๊สและอัลดิไฮด์ ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง สามารถเจริญได้ในเกลือไบล์ โดยทั่วไปโคลิฟอร์มหมายถึงแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae จำพวก Escherichia Citrobacter Enterobacter และ Klebsiella สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม อุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น น้ำที่มีสารอาหารปริมาณมาก ไม่ควรพบในน้ำดื่ม ถ้ามีการตรวจพบในน้ำดื่มแม้มิได้สัมพันธ์กับแบคทีเรียก่อโรค แสดงว่าน้ำนั้นได้รับการบำบัดไม่เพียงพอ หรือท่อมีการรั่วซึม

1.6.2 ฟีคัลโคลิฟอร์ม (5)

หมายถึงแบคทีเรียกลุ่มที่พบในลำไส้และอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น สามารถย่อยน้ำตาลแลคโทสได้ที่ 44.5°ซ แล้วให้แก๊ส โดยทั่วไปแล้วหมายถึงแบคทีเรียจำพวก Escherichia เป็นส่วนใหญ่ น้ำดื่มปริมาตร 100 มล. ไม่ควรตรวจพบฟีคัลโคลิฟอร์มเลย

Copyright by Mahidol University

1.6.3 *Escherichia coli* (5)

หมายถึงแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase และ β-galactosidase สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทส และมอนิทอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ ที่ 44.5°ซ แล้วให้กรด และแก๊ส สามารถสร้างอินโดลจากทริปโตฟาน บางสายพันธุ์เจริญได้ที่ 37°ซ แต่ไม่เจริญที่ 44.5°ซ บางสายพันธุ์ไม่สร้างแก๊ส *E. coli* ไม่สร้าง Oxidase และไม่ hydrolyse urea ในอุจจาระของคนมี *E. coli* อยู่ 10^9 ตัวต่อน้ำหนักอุจจาระ 1 กรัม สามารถตรวจพบได้ทั่วไปในน้ำทิ้งจากบ้านเรือน และดินที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระคน หรือสัตว์เลือดอุ่น ในทางสุขาภิบาลใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค น้ำบริโภค 100 มล.ไม่ควรมีเชื้อ *E. coli* อยู่เลย

1.6.4 MPN (Most Probable Number)

เป็นหน่วยที่แสดงถึงจำนวนแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้มากที่สุดในตัวอย่างน้ำ 100 มล. โดยวิธี Standard Multiple-Tube Fermentation Technique โดยอ่านจากหลอดที่ให้ผลบวกในตัวอย่างน้ำในขั้น Confirmed test แล้วนำไปเทียบค่าในตารางแสดงค่าดัชนี ซึ่งจะมี 3 ระดับ ระดับละ 5 หลอด ค่าที่อ่านได้คือ จำนวนของแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้มากที่สุดในตัวอย่างน้ำ 100 มล. มีหน่วยเป็น MPN/100 มล.

1.6.5 การทดสอบอินโดล

เป็น biochemical tests ชนิดหนึ่งในหลาย ๆ ชนิดที่ใช้ร่วมกันเพื่อตรวจแยก(Identify) เชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae หลักการคือ แบคทีเรียที่สามารถสร้างอินโดล จากทริปโตฟานได้จะเกิดผลบวกเมื่อเติมน้ำยา Kovac's อินโดลที่ถูกสร้างขึ้นมาทำปฏิกริยากับ aldehyde ที่มีอยู่ใน น้ำยา ทำให้เกิดสีแดงบนชั้นของน้ำยา เชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่แล้วให้ผลบวกกับอินโดล 98 %

1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

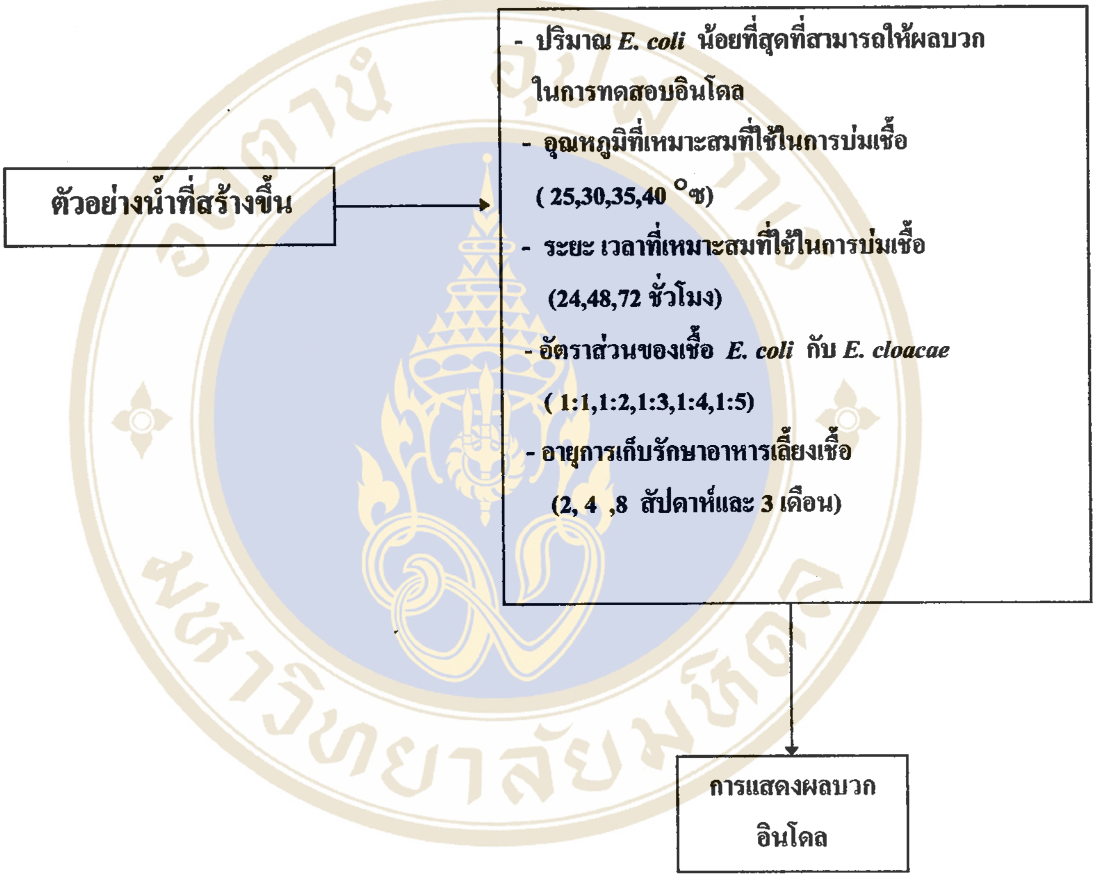
1.7.1 สามารถได้วิธีตรวจหา *E. coli* เบื้องต้น (screening test) ที่แสดงผลเป็น บวก หรือ ลบ (present-absent ,P-A TEST) มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน และสามารถใช้เป็นวิธีตรวจเบื้องต้นก่อนมีการตรวจเชิงปริมาณต่อไปได้

1.7.2 ใช้เวลาน้อยกว่าวิธีมาตรฐานซึ่งต้องใช้เวลา 3-5 วันในการอ่านผล ลดการเตรียมอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะมีการตรวจโดยวิธีมาตรฐาน MTF ดังนั้นถ้าหากมีการลดขั้นตอนนี้ย่อมทำให้เป็นการประหยัดแรงงาน อาหารเลี้ยงเชื้อ และทรัพยากรได้อีกทางหนึ่ง

Copyright by Mahidol University

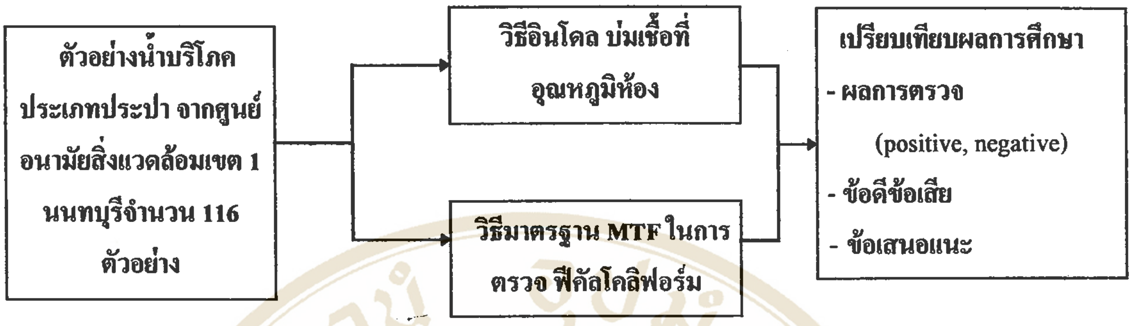
1.7.3 สามารถประยุกต์ใช้ตรวจคุณภาพน้ำในภาคสนาม หรือในท้องที่ทุรกันดารที่ขาดอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น เครื่องมือราคาแพง หรือขาดไฟฟ้าใช้ เป็นการประยุกต์ให้เป็นวิธีที่สามารถตรวจได้กับสภาวะอากาศในเมืองไทย

1.9 กรอบแนวคิด



ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการศึกษาประสิทธิผลของวิธี อินโดล ที่มีต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่สร้างขึ้น

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 2 แสดงกรอบแนวคิดขั้นตอนการเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีอินโดล กับวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจหาเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มโดยใช้น้ำบริโภคจากพื้นที่ศึกษา

Copyright by Mahidol University

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 แหล่งน้ำและคุณภาพน้ำ

แหล่งน้ำดิบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยขบวนการวัฏจักรของแหล่งน้ำนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แหล่งคือ (1)

น้ำจากบรรยากาศ คือน้ำที่ได้จากบรรยากาศเหนือผืนโลก เช่น น้ำฝน หิมะ น้ำค้าง เป็นต้น จัดว่าเป็นน้ำที่สะอาดถ้าไม่มีการปนเปื้อนจากสารมลพิษในอากาศ หรือจากภาชนะที่เก็บกัก

น้ำผิวดิน เป็นน้ำในธรรมชาติที่มีปริมาณมากที่สุด แหล่งน้ำนี้ ได้แก่ แม่น้ำ ทะเลสาบ ห้วย หนอง คลอง บึง ทะเลและมหาสมุทร คุณภาพของแหล่งน้ำจะเปลี่ยนไปตามภูมิประเทศและฤดูกาล

น้ำใต้ดิน หมายถึงน้ำที่อยู่ชั้นใต้ดินของพื้นโลก ได้แก่ น้ำบาดาล น้ำบ่อตื้น เป็นต้น

มลภาวะของน้ำ คือ น้ำที่มีความผิดปรกติไปจากธรรมชาติโดยการเติมบางสิ่งบางอย่างลงไป ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ภายในบริเวณนั้นไม่สามารถรับน้ำตามธรรมชาติที่ควรได้รับ ต่อมาปี ค.ศ. 1957 Gorlinski นักวิทยาศาสตร์อเมริกัน ได้แยกความหมายของคำว่าการปนเปื้อน Contamination ออกจากมลภาวะ กล่าวคือการปนเปื้อนควรใช้กับมลภาวะของน้ำที่เป็นภัยด้านสาธารณสุข ส่วนมลภาวะควรใช้กับน้ำเสียที่ไม่เป็นภัยด้านสาธารณสุขแต่เป็นภัยด้านการประมง ด้านเกษตร ด้านอุตสาหกรรม

สาเหตุสำคัญของปัญหาการเกิดมลภาวะของน้ำ คือ การเพิ่มขึ้นของประชากรอย่างรวดเร็ว การปฏิวัติทางด้านการเกษตรเพื่อตอบสนองความต้องการด้านอาหารที่เพิ่มขึ้น การเติบโตของโรงงานอุตสาหกรรม ต้นเหตุของการเกิดมลภาวะของแหล่งน้ำนั้นมีหลายแหล่ง จำแนกตามที่มาของสารมลภาวะได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ มลภาวะของน้ำที่เกิดจากน้ำโสโครกของแหล่งชุมชน (Domestic wastewater) มลภาวะของน้ำที่เกิดจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (Industrial wastewater) มลภาวะของน้ำที่เกิดจากการเกษตรกรรม (Agriculture wastewater)

น้ำโสโครกของแหล่งชุมชนที่ถูกปล่อยออกจากบ้านเรือน ตลาด และโรงพยาบาล เป็นน้ำโสโครกมาจากห้องน้ำ ห้องครัว และน้ำจากการซักล้างต่าง ๆ ซึ่งอาจมีสิ่งขับถ่ายของมนุษย์ปนเปื้อนมาด้วย น้ำโสโครกจากแหล่งชุมชนก่อให้เกิดผลกระทบต่อแหล่งน้ำด้านสาธารณสุข คืออาจเกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรค โรคติดเชื้อที่มีน้ำเป็นสื่อได้แก่ โรคบิด ไทฟอยด์ อหิวาตกโรค เป็นต้น ใน

Copyright by Mahidol University

ทางสาธารณสุขใช้แบคทีเรียเป็นดัชนีมาตรฐานคุณภาพน้ำ ซึ่งได้แก่โคลิฟอร์ม และ ฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยปกติจะอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นโดยไม่ก่อโรค ถ้าพบแบคทีเรียจำพวกนี้มากในแหล่งน้ำแห่งใดแห่งหนึ่งแสดงว่า แหล่งน้ำแห่งนั้นมีการปนเปื้อนของเสียจำพวกอุจจาระสูงมีโอกาสที่จะมีเชื้อก่อโรคบางชนิดที่เป็นอันตรายปะปนอยู่ในน้ำ

ในการที่จะเลือกแหล่งน้ำมาใช้ในการอุปโภคบริโภค เพื่อเกิดความปลอดภัยต่อสุขภาพแล้ว จะต้องเลือกน้ำที่มีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่าง ๆ คุณภาพน้ำที่สำคัญ ได้แก่

คุณภาพน้ำด้านกายภาพ เช่น ลักษณะความขุ่น สี ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ

คุณภาพน้ำทางด้านเคมี เช่น พีเอช ความกระด้าง ความเป็นกรด ด่าง ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ซัลเฟต ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แอมโมเนีย โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง และค่า DO BOD เป็นต้น

คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย เกิดจากจุลินทรีย์ เจือปนในน้ำ บางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในคน เช่นบิด อหิวาต์ ไทฟอยด์ ไข้รากสาด บางชนิดทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนไปเช่น แบคทีเรียจะสร้าง ซัลเฟอร์ เมื่อทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนจะได้ก๊าซไดรเจนซัลไฟด์ ทำให้น้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนไข่เน่า คุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรียนับว่าสำคัญที่สุด โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อน แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดี เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขหากประชาชนที่ดำเนินชีวิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นการบริโภคน้ำที่ปลอดภัยไม่มีการปนเปื้อนจึงเป็นสิ่งสำคัญ การตรวจสอบคุณภาพน้ำด้านแบคทีเรียมีหลายวิธี ได้แก่ การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard plate count) เป็นการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่มีในน้ำตัวอย่าง การตรวจหาโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม การวิเคราะห์เพื่อหาแบคทีเรียก่อโรคนั้นทำได้ยาก จึงใช้แบคทีเรียชนิดที่พบได้ตามปรกติในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อน คือโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม มีวิธีตรวจหลายวิธี ได้แก่ Standard Multiple-tube Fermentation (MTF) วิธีกรองผ่านเยื่อกรอง วิธีที่นิยมได้แก่วิธี MTF ซึ่งกล่าวในหัวข้อต่อไป ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

มาตรฐานคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรีย	ฟีคัลโคลิฟอร์ม MPN / 100 มล.	โคลิฟอร์ม MPN / 100 มล.
เกณฑ์คุณภาพน้ำดื่มของ WHO	0	0
เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบท	0	$\leq$ 10

Copyright by Mahidol University

2.2 การตรวจวิเคราะห์ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี Standard Multiple-tube Fermentation (MTF)(9,10)

Standard Multiple-tube Fermentation เป็นวิธีมาตรฐานสามารถหาจำนวนแบคทีเรียได้เป็นค่า MPN ของโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำจากแหล่งต่างๆ โดยการนำตัวอย่างมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ และอบเพาะเชื้อตามอุณหภูมิและเวลากำหนด อ่านผลจากแก๊สที่เกิดขึ้นโดยใช้ตาราง MPN Index การตรวจมี 3 ขั้นตอนคือ การตรวจสอบขั้นแรก (presumptive tests) การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed tests) การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (completed tests)

2.2.1. การตรวจสอบขั้นแรก (presumptive tests)เป็นการตรวจสอบหาแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดและแก๊ส โดย

1) การเตรียมหลอดอาหารเหลวแลคโทสหรือลอรีลทริปโทสมาเขียนสัญลักษณ์และปริมาณน้ำตัวอย่างที่ข้างหลอดทดลอง

2) เขย่าขวดเก็บตัวอย่างน้ำให้ผสมกันดี จากนั้นใช้ ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างด้วยวิธีปลอดเชื้อ ใส่ตัวอย่างน้ำตามระดับ 10, 1และ 0.1 มล. ในแถวที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ เขย่าหลอดเบา (ขึ้นกับตัวอย่างน้ำว่าเป็นน้ำจากที่ใดถ้าเป็นน้ำที่มีสกปรกมากมากอาจใช้ปริมาตรน้ำน้อยลง หรือถ้าเป็นน้ำบริโภคบรรจุขวดอาจใช้ตัวอย่างน้ำมากขึ้น)

3) นำหลอดทั้งหมดไปอบเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ±0.5 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านผลบวกจากการเกิดแก๊สที่หลอดหมัก ทุก 24 และ 48 ชั่วโมงถ้ายังให้ผลลบให้หมักต่อที่ 48 ชั่วโมง

2.2.2. การตรวจสอบขั้นยืนยัน (confirmed tests) เป็นการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลโดยการถ่ายเชื้อจากแลคโทสบรอธในขั้นแรก มาใส่ในอาหารเหลว และอีซีมีเดียมเพื่อคัดแยกกลุ่มที่ให้ผลบวกปลอมหรือเพื่อยืนยันผลของขั้นตอนแรก

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออีซีมีเดียมหลอดละ 10 มล. มาเท่ากับจำนวนผลบวกในขั้นตอนแรก

2) นำไปเปตขนาด 1 มล. ถ่ายเชื้อจากขั้นที่ 1 ใส่หลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้ออีซีหลอดละ 0.1 มล. หลอดต่อหลอด โดยวิธีปลอดเชื้อ

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้ออีซีมีเดียมไปอบเพาะเชื้อที่ 44.5±2 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่ให้ผลบวกจะมีลักษณะขุ่นและมีแก๊ส

นำค่าที่อ่านได้จากขั้นตอนแรกและขั้นตอนยืนยันมาอ่านค่าเทียบกับตาราง MPN index แล้วมาคำนวณหาปริมาณของฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยมีหน่วยเป็น MPN / 100 มล.

Copyright by Mahidol University

2.3 การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนี จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard plate count)(9)

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป โดยมีสมมติฐานว่าเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตหนึ่งเซลล์ในจานเพาะเชื้อ จะเจริญเติบโตเป็นหนึ่งโคโลนี ดังนั้น จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อ ก็คือจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำ

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

2.3.1 นำหลอดอาหารที่เตรียมแล้ว plate count agar มาต้มให้หลอมละลายอีกครั้ง แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 45 °ซ

2.3.2 เตรียมตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างน้ำที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์ควรมีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดโคโลนีในจานเพาะเชื้อ ระหว่าง 30-300 โคโลนี แต่ไม่สามารถจะทราบล่วงหน้าได้ว่า ตัวอย่างน้ำมีจำนวนโคโลนีเท่าใด เพื่อไม่ให้การทดลองผิดพลาดจึงควรทำการเจือจางตัวอย่างก่อนด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่างน้ำ เพื่อจะได้จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

การเจือจางตัวอย่างทำได้โดยการดูดตัวอย่างน้ำ 1 มล. ใส่ลงในหลอดซึ่งมีสารละลายเจือจางตัวอย่าง 9.0 มล. เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม ตัวอย่างน้ำในหลอดตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า (หรือ 10^{-1}) และถ้าต้องการให้เจือจางลงอีก ก็ถ่ายตัวอย่างน้ำนี้ลงใส่สารละลายเจือจางอีกหลอดต่อไป ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ

2.3.3 การถ่ายตัวอย่างน้ำลงในจานเพาะเชื้อ จานเพาะเชื้อจะต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อมาเรียบร้อยแล้ว เขียนสัญลักษณ์และรายละเอียดลงบนฝาจานให้ครบถ้วน เช่น ปริมาณของตัวอย่างน้ำ อัตราส่วนที่เจือจางและวันที่วิเคราะห์ เป็นต้น ใช้ปิเปตต์อันใหม่ที่ปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้ว 1 มล. ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45°ซ ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วหมุนจานเพาะเชื้อในทิศทางตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ในทิศทางขึ้นลง 5 ครั้ง และไปทางซ้ายและทางขวา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างน้ำผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจานเพาะเชื้อ

2.3.4 การเพาะเชื้อ หลังจากที่วุ้นอาหารในแข็งตัวแล้ว พลิกกลับจานเพาะเชื้อที่ให้ฝาอยู่ด้านล่าง แล้วนำจานเพาะเชื้อไปเก็บในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างน้ำ ถ้าน้ำสะอาดมีแบคทีเรียน้อยให้อบเพาะเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง ถ้าน้ำสกปรกมีแบคทีเรียมากให้อบเพาะเชื้อเพียง 24 ชั่วโมง

Copyright by Mahidol University

2.3.5 การนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล หลังจากที่บ่มในตู้อบเพาะเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมง นำจานออกจากตู้อบเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นควรเลือกนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี ถ้าไม่มีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ลงผลเป็น < 1 (น้อยกว่าหนึ่ง) CFU ถ้านับจำนวนโคโลนีได้จำนวนเลขหลักสิบ เช่น 35 หรือ 36 ให้ลงผลตามจำนวนที่นับได้ ถ้านับจำนวนโคโลนีได้จำนวนตัวเลขหลักร้อย ให้ปัดตัวเลขสุดท้ายเป็นศูนย์ เช่น 155 ปัดเป็น 160 หรือ 142 เป็น 140 เป็นต้น ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับจำนวนโคโลนีบนพื้นที่ 13 ตารางเซนติเมตร (13 ช่องบน) เป็นตัวแทนการกระจายแล้วคูณด้วย 5 เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีบนพื้นที่ 65 ตารางเซนติเมตร (พื้นที่ของจานเพาะเชื้อ) ถ้าจำนวนโคโลนี มากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับจำนวนโคโลนีพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร (4 ช่องบน) หารด้วย 4 และคูณด้วย 65 ถ้าบนพื้นที่ 1 ช่องหรือ 1 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 100 โคโลนี ให้นับเป็นมากกว่า 6,500 โคโลนี ถ้ามี Spreader ขนาดน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่จาน ให้นับเป็น 1 โคโลนี ถ้าขนาดมากกว่าครึ่งหนึ่งของจานให้ลงผลว่า "Spreader" โคโลนีที่ติดกันเป็นลูกโซ่ ให้นับเป็น 1 โคโลนี คำนวณจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำ ดังนี้

จำนวนแบคทีเรีย / มล. = จำนวนโคโลนี × จำนวนเท่าที่เจือจาง

2.4 การดำรงชีพของแบคทีเรียและอาหารเพาะเลี้ยง (21)

การดำรงชีพของแบคทีเรียนั้น ต้องอาศัยพลังงานและสารประกอบต่างๆ ทั้งในรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร เพื่อเป็นแหล่งของธาตุต่างๆ ที่แบคทีเรียต้องการ โดยเฉพาะคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์อาหารไว้ใช้ภายในเซลล์ และสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ในการเจริญเติบโต

2.4.1 ความต้องการสารอาหาร

1) ธาตุไนโตรเจน แบคทีเรียได้ธาตุไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ แบคทีเรียนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์โปรตีน และส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น เอนไซม์ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ เป็นต้น

2) ธาตุคาร์บอน แบคทีเรียต้องการธาตุคาร์บอนเพื่อไปสร้างเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และสร้างพลังงาน

3) เกลือแร่ของธาตุต่างๆ ได้แก่ K Mg Mn Fe P S Na Ca แบคทีเรียนำเกลือแร่ไปเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น โปรตีน เอทีพี และ เอนไซม์

Copyright by Mahidol University

4) วิตามินและ Growth factors หมายถึงสารเคมีที่เร่งการเจริญเติบโตการทำงานของแบคทีเรีย

5) น้ำ เป็นส่วนประกอบของไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย ใช้เป็นตัวทำละลายสารอาหารเพื่อให้นำเข้าสู่เซลล์ และใช้ในปฏิกิริยาต่าง ๆ

2.4.2 ความต้องการด้านฟิสิกส์

1) อุณหภูมิ เป็นสภาวะแวดล้อมที่มีอิทธิพลมากในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เพราะเมตาโบลิซึมต่าง ๆ จะสามารถดำเนินไปได้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปเอนไซม์จะถูกทำลาย หรือถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปเอนไซม์จะทำงานได้ช้าลง มีผลให้อัตราการเติบโตลดลง แบคทีเรียต้องการอุณหภูมิที่พอเหมาะกับการดำรงชีพของแต่ละชนิด ซึ่งจะสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียนั้นๆ แบคทีเรียก่อโรคมักจะอยู่ในอุณหภูมิปกติของร่างกายคือ 37°ซ หรือถ้าเป็นแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae จะเจริญอยู่ในช่วง 25-40°ซ ความต้องการอุณหภูมิที่พอเหมาะทำให้เราสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

Psychorophillic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่ 0-5°ซ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มักเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารในตู้เย็น

Mesophilic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีช่วงอุณหภูมิ 25-40°ซ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 °ซ ได้แก่แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และมีถิ่นอาศัยในร่างกายคน

Thermophilic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ๆ ในช่วง 50-55°ซ ได้แก่แบคทีเรียจำพวก Clostridium Bacillus เป็นต้น

2) พีเอช (pH) การเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ย่อมอาศัย พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเมตตาโบลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญ แบคทีเรียต่างชนิดกันย่อมมีค่าพีเอชที่เหมาะสมแตกต่างกันไป โดยทั่วไปมักจะเจริญได้ดีในช่วง 6 - 8 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นจึงต้องปรับพีเอชให้เหมาะสมในการเจริญเติบโตเสียก่อน การเจริญเติบโตของแบคทีเรียมักจะสร้างผลิตผล ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารอาหารออกมา เช่นการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตจะได้กรด กับแก๊ส มีผลให้พีเอชลดลง อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดจึงเติมบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมให้มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชเป็นไปอย่างช้า ๆ ได้แก่ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4

3) ออกซิเจน สามารถแบ่งแบคทีเรียตามความต้องการของออกซิเจนได้ดังนี้

Aerobe คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนอิสระ

Anaerobe คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอิสระ

Copyright by Mahidol University

Facultative Anaerobe คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่น *E. coli* จะอยู่ในประเภทนี้

2.4.3 อาหารเพาะเลี้ยง หมายถึง สารที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญและทวีจำนวนของแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีควรมีลักษณะมีสารอาหารเหมาะสมกับชนิดของแบคทีเรีย และมีความเข้มข้นพอสมควร มีความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมกับแบคทีเรียที่ใช้เลี้ยง โดยทั่วไปมีพีเอชประมาณ 6.5 - 7.5 มีความชื้นพอสมควรและปราศจากสารพิษและจุลินทรีย์ตัวอื่นชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อจำแนกตามลักษณะการใช้ประโยชน์ได้คือ

1) Enriched media เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มส่วนประกอบบางชนิด เช่น เลือด เซรุ่ม ไวตามิน หรือสารอาหารจากพืชหรือสัตว์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงธรรมดา เพื่อให้แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารนี้เจริญได้ดี

2) Selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารบางอย่างเข้าไปเพื่อยับยั้งแบคทีเรียตัวอื่นที่ไม่ต้องการ เช่นการเติม Crystal violet ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเติมออกซ์กัลล์ เพื่อยับยั้งแบคทีเรียตัวอื่นนอกจากโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เช่นใน Brilliant green lactose bile broth

3) Differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกแบคทีเรียโดยดูการเจริญเติบโต แล้วอาศัยความแตกต่างของลักษณะที่ปรากฏ เช่น การสร้างเอนไซม์ การสร้างกรด การดู hemolysis บน blood agar อาหารเลี้ยงเชื้ออีเอ็มบีจะปรากฏโคโลนีกลม แดงเข้ม มีจุดตรงกลาง หรือมีเงาโลหะสีทองบนผิวโคโลนี

4) Assay media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อตรวจสอบสารบางอย่างที่เกิดขึ้นจาก เมตาโบลิซึม ของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ไวตามิน กรดอะมิโน ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

5) Media for enumeration of bacteria เตรียมขึ้นเพื่อตรวจนับแบคทีเรียในน้ำนม น้ำ และอาหารต่าง ๆ ได้แก่ Plate count agar

6) Media for Characteristic เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทีละมาก ๆ ประโยชน์เพื่อใช้ศึกษาชนิดแบคทีเรีย หรือลักษณะโคโลนี เช่น nutrient broth หรือ nutrient agar

2.4.4 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้กันโดยทั่วไปมีส่วนประกอบดังนี้

1) โปรตีน ได้แก่ เปปโทน ทริปโทน หรือเคซีน โปรตีนจะถูกสลายให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ ซึ่งแบคทีเรียจะนำคาร์บอนและไนโตรเจนไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม

Copyright by Mahidol University

2) คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แลคโทส ซูโครส มอลโทส เป็นต้น น้ำตาลเหล่านี้จะถูกใช้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้พลังงาน ใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาชีวเคมี

3) บัฟเฟอร์ เติมลงไปเพื่อรักษาสภาพ ความเป็นกรด เป็นด่างของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4

4) สารยับยั้ง เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่ต้องการศึกษา ได้แก่ Eosin Desoxylcholate หรือยาปฏิชีวนะต่าง ๆ

5) Enrichments ได้แก่ วิตามิน เลือด Yeast extracts และซีรัม ที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

6) อินดิเคเตอร์ เป็นตัวทดสอบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียที่เราสนใจหรือไม่ เช่น ferric ion เพื่อดูการผลิต H_2S หรือสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่มีในตัวแบคทีเรีย สาร MUG , IBDG หรือการหาความเป็นกรดโดยแบคทีเรียสร้างขึ้นจากการเจริญเติบโต

7) วุ้น เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่สกัดได้จากสาหร่าย ใช้สำหรับทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งตัวในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดแข็ง

2.5 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (22)

สิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียได้แก่

2.5.1 อุณหภูมิ แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วง 25-40 $^{\circ}$ซ ช่วงของอุณหภูมิ 3 ช่วงที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (ตารางที่ 2) Minimum growth temperature คืออุณหภูมิต่ำสุดที่แบคทีเรียจะเจริญได้ Optimum growth temperature คืออุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย และสามารถแบ่งตัวได้เร็วที่สุดในช่วงอุณหภูมินี้ Maximum growth temperature คืออุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียสามารถจะเจริญได้

ตารางที่ 2 แสดงช่วงของอุณหภูมิที่แบคทีเรียชนิดต่างๆ ต้องการ (22)

ประเภทของแบคทีเรีย	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ซ)		
	ต่ำสุด	เหมาะสม	สูงสุด
Psychorophillic bacteria	0	5-25	25-45
Mesophilic bacteria	15-20	25-40	50-55
Thermophilic bacteria	30	43	60-85

Copyright by Mahidol University

ผลกระทบของอุณหภูมิที่สูง จะมีผลต่อโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ ขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก minimum temperature เอนไซม์ต่าง ๆ จะสามารถทำงานได้ดีขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป เอนไซม์จะหยุดชะงักไปทำให้โปรตีนและไขมันเสียสภาพ ส่วนผลกระทบต่ออุณหภูมิต่ำ จะมีผลทำให้การแบ่งตัวและเมตตาโบลิซึมช้าลง จนเกือบหยุดโดยแบคทีเรียยังไม่ตาย ดังนั้นเราจึงใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย

ตารางที่ 3 อุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุดของประเทศไทยแบ่งตามภาคต่าง ๆ (°ซ)

ภาค	ปี 2537	ปี 2538	ปี 2539	ปี 2540	ปี 2541
ภาคเหนือ	41.3-6.2 (26.1)	43.1-4.8 (26.3)	42.7-4.6 (25.9)	42.2-5.4 (26.3)	43.7-6.2
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	41.2-10.0 (26.8)	41.5-6.4 (26.8)	41.5-4.9 (26.3)	40.0-0.6 (26.9)	42.5-12.1
ภาคกลาง	41.0-10.5 (28.1)	41.0-9.4 (28.0)	41.5-9.0 (27.8)	41.3-2.0 (28.5)	43.0-12.5
ภาคตะวันออก	39.5-15.5 (27.9)	40.4-2.7 (27.9)	40.4-13.1 (27.6)	39.7-4.3 (28.3)	42.2-17.0
ภาคใต้ฝั่งตะวันออก	38.2-17.2 (27.3)	38.2-5.0 (27.4)	39.0-14.6 (27.1)	38.3-5.7 (27.5)	41.0-17.4
ภาคใต้ฝั่งตะวันตก	37.8-17.0 (27.4)	37.2-8.4 (27.5)	38.3-16.5 (27.4)	37.6-6.5 (27.7)	40.3-17.5

( ) คืออุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปี ยกเว้นปี พ.ศ. 2541 แหล่งที่มา(23)

ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน มีอุณหภูมิเฉลี่ยโดยทั่วไปประมาณ 26-29°ซ เป็นอุณหภูมิที่ *E. coli* สามารถเจริญได้ดี อุณหภูมิบรรยากาศโดยทั่วไปสามารถบ่มเชื้อ *E. coli* ในสภาพอุณหภูมิห้องได้ (อุณหภูมิที่เหมาะสม 25-40°ซ) อุณหภูมิสูงสุดต่ำสุดโดยทั่วไปตามภาคต่าง ๆ ของประเทศจะเห็นว่า ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางพื้นที่จะมีอุณหภูมิต่ำสุด 4-6.5°ซ (ตารางที่ 3) ส่วนอุณหภูมิสูงสุดของแต่ละภาคจะเห็นว่าเป็นอุณหภูมิที่ *E. coli* สามารถเจริญได้ดี

2.5.2 ออกซิเจน เป็นสิ่งที่แบคทีเรียบางตัวต้องการ ซึ่งแบ่งจำพวกแบคทีเรียตามความต้องการของ ออกซิเจนดังกล่าวมาแล้ว

2.5.3 ความดัน(Pressure) ที่มีผลต่อแบคทีเรียมี 2 ประเภทคือ

1) Hydrostatic pressure มีผลกระทบต่อแบคทีเรียไม่มากนัก ในสภาวะปกติแบคทีเรียจะแบ่งตัวได้ดี แต่ในสภาวะความดัน 600 บรรยากาศ จะไม่แบ่งตัว

2) Osmotic pressure หมายถึงปรากฏการที่น้ำซึมผ่านเยื่อเมมเบรนจากสารละลายที่เจือจางกว่าไปสู่สายละลายที่เข้มข้นกว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยอยู่ในอาหารเลี้ยง

Copyright by Mahidol University

เชื้อที่พอเหมาะ คือเจือจางกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์เล็กน้อย ทำให้อาหารเข้าสู่เซลล์ได้ แบคทีเรียบางชนิดสามารถอยู่ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่นจำพวก Vibrio

2.5.4 น้ำ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโปรโตพลาสซึม ซึ่งใช้ในขบวนการเมตตาโบลิซึมเพื่อดำรงชีวิต และใช้ละลายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เมื่อมีสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม แบคทีเรียบางชนิดจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสปอร์

2.5.5 พีเอช เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ต่างๆทำงานได้มีประสิทธิภาพสูงสุด มีผลกระทบโดยตรงต่อเมตตาโบลิซึม ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นต้องปรับพีเอช ให้มีความเหมาะสมต่อแบคทีเรีย ช่วงพีเอชที่เหมาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ส่วนมากจะเจริญได้ดีที่พีเอช 6-8 ในสภาพธรรมชาติ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจะปล่อยของเสียออกมา ซึ่งจะทำให้พีเอชเป็นกรดมากขึ้นจนมีสภาพไม่เหมาะสม ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต้องเติมบัฟเฟอร์เพื่อช่วยให้พีเอชเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ พีเอชที่เหมาะสมสำหรับ *E. coli* คือ 5-9 และจะเจริญได้ไม่ดีนักหากพีเอชแตกต่างจากช่วงนี้ (24)

2.5.6 รังสี รังสีที่มีผลกระทบต่อแบคทีเรีย มีดังนี้

1) Ionizing Radiation เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา และ cathod ray เมื่อรังสีเหล่านี้ผ่านเซลล์จะทำให้เกิดไฮโดรเจนอิออน ไฮดรอกไซด์อิออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนั้นอาจทำให้เกิดการ mutation ของแบคทีเรียได้

2) Ultraviolet เป็นรังสีที่อันตรายน้อยกว่า Ionizing Radiation ซึ่งสามารถถูกดูดซึมโดยสารต่าง ๆ ได้มาก ขณะเดียวกันก็จะกระตุ้นโมเลกุลของสารให้มีพลังงานสูงขึ้น ทำให้เกิด H_2O_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนั้นทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด ช่วงคลื่นที่สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียคือช่วงคลื่น 200-290 นาโนเมตร ซึ่งแสงแดดที่ส่องมายังโลกแม้ว่าจะถูกดูดกลืนจากสิ่งต่าง ๆ ยังสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้

2.5.7 แรงตึงผิว มีผลต่อการดำรงชีพของแบคทีเรีย คือมีผลต่อการนำอาหารเข้าสู่เซลล์และการยึดเกาะผนังเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสิ่งแวดล้อมที่มีแรงตึงผิวที่ต่ำจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ ถูกทำลายได้ง่าย ดังนั้นในสภาพแวดล้อมที่มีผงซักฟอกซึ่งไปลดแรงตึงผิว จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

2.5.8 คลื่นเสียง คลื่นเสียง ultrasonic ที่มีความถี่ตั้งแต่ 200,000 รอบต่อนาทีขึ้นไปอาจทำให้ผนังเซลล์แตกโดยเฉพาะถ้ามีของแข็งรวมอยู่ด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและความหนาของเซลล์

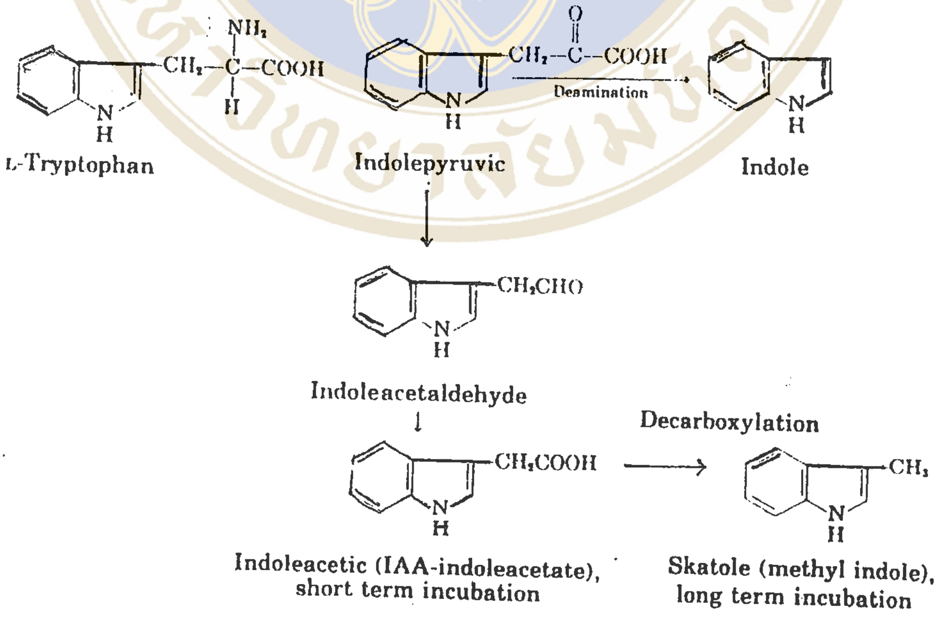
Copyright by Mahidol University

2.6 ปฏิกิริยาของการทดสอบอินโดล (25)

การทดสอบอินโดล เป็นการตรวจทางด้านชีวเคมี (Biochemical test) ชนิดหนึ่งในชีวเคมีหลาย ๆ ชนิดเพื่อตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae โดยอาศัยหลักการ คือ แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้าง อินโดลจากทริปโทฟาน (Tryptophan) ได้ โดยมากใช้พิจารณาร่วมกับชีวเคมีชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งสามารถใช้แยกเชื้อ Edwardsiella (+) ออกจากเชื้อ Salmonella (-) และเชื้อ *E. coli* (+) ออกจากเชื้อ Klebsiella (-) และ Enterobacter(-)

2.6.1 ปฏิกิริยาชีวเคมี ในการหมักย่อย

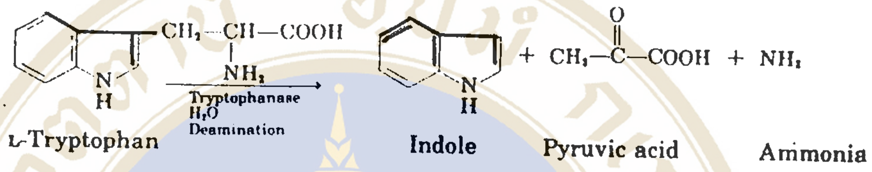
ทริปโทฟาน เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งซึ่งสามารถถูกออกซิไดซ์ได้โดย แบคทีเรียบางชนิด จะอยู่ในรูป อินโดล เมททิลอินโดล (Skatole) และอินโดลอะซิติก (Indoleacitate , IAA) เอนไซม์ภายในเซลล์ที่ชื่อ ทริปโทฟานเนส (Tryptophanase) ทำปฏิกริยาแบบไฮโดรไลซ์ ต่อสารทริปโทฟาน ปฏิกิริยาขั้นสมบรูณ์จะได้อินโดล ทริปโทฟานมีส่วนประกอบในรูป intermediate หลักคือ อินโดลไพรูวิก เมื่อเกิดปฏิกริยาดีอะมิเนชั่น (Deamination) แล้วได้ผลผลิตเป็น อินโดล ส่วน อินโดลอะซิติก (IAA) เมื่อเกิดปฏิกริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น (Decarboxylation) แล้วได้ผลผลิตเป็นเมทิลอินโดล (Skatole)ดังในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการย่อยสลายทริปโทฟานได้ผลผลิตเป็นอินโดลและเมทิลอินโดล

Copyright by Mahidol University

เอนไซม์ ทริปโทฟานเนส เกิดปฏิกิริยา ดีอะมิเนชั่นและไฮโดรไลเซชั่น กระทำต่อโมเลกุลของ ทริปโทฟาน โดยตรงบริเวณโดยมี Pyridoxal phosphate เป็นโคเอนไซม์ เกิดปฏิกริยาดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการย่อยทริปโทฟานแล้วได้ผลผลิตเป็นอินโดล กรดไพรูวิกและแอมโมเนีย

ในปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่นนั้น โมเลกุล NH_2 ซึ่งอยู่ทางด้านกรดไพรูวิก ถูกดึงออกมาแล้วกลายเป็น NH_3 มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 รูปแบบคือ ออกซิเดทีฟดีอะมิเนชั่น ได้ผลผลิตเป็นสารไม่อิ่มตัวคือ keto acid NH_3 และพลังงาน รูปแบบที่ 2 คือ รีดักทีฟดีอะมิเนชั่น ได้ผลผลิตเป็น NH_3 และพลังงาน โดยแบคทีเรียจะนำไปใช้ต่อไป การย่อยสลายทริปโทฟานนั้นได้ผลผลิตทั้งหมดเป็นอินโดล กรดไพรูวิก แอมโมเนีย และพลังงาน กรดไพรูวิก จะถูกนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม เช่น กระบวนการ ไกลโคไลติก หรือขบวนการเครบไซเคิลต่อไป ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงาน ส่วนแอมโมเนียจะถูกนำไปสร้างกรดอะมิโนต่อไป ส่วนอินโดลที่ปล่อยออกมานั้นตรวจวัดได้โดยสารเคมีซึ่งจะเป็นวิธีหนึ่งในการตรวจหาแบคทีเรีย

2.6.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาที่ใช้

1) อาหารเหลวทริปโทฟาน

ส่วนประกอบ คือ อาหารพื้นฐาน เปปโทน ทริปโทฟาน 1 % และโซเดียมคลอไรด์ โดยเตรียมโดยละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น ใช้ความร้อนจนละลายหมด จากนั้นแบ่งใส่หลอดหลอดละ 4 มล. นึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที ที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Copyright by Mahidol University

ทำการตรวจโดยเขี่ยเชื้อลงในหลอดบ่มเพาะเชื้อที่ 35°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยดน้ำยา Kovac's ลงไปโดยตรงในหลอดที่ทำการบ่มเพาะเชื้อแล้วเขย่าเบาๆ

2) การตรวจอินโดลโดยวิธี ไมโครเทคนิค (Micro technique)

อาหารเหลวทริปโทน ประกอบไปด้วย ทริปโทน 10 กรัม ,เนื้อวัวสกัด (beef extract) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

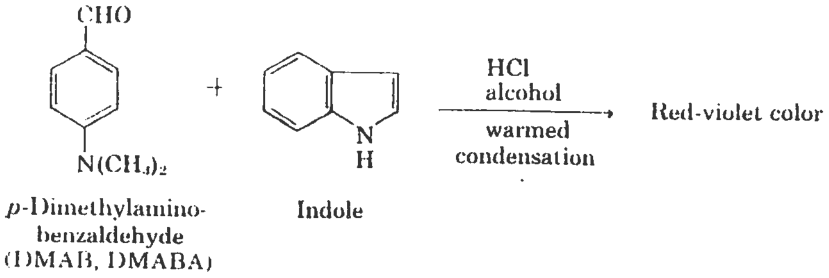
อาหารเหลวทริปโทฟาน ประกอบด้วยทริปโทฟาน 0.3 กรัม , เปปโทน 1 กรัม, K_2HPO_4 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.4-7.8

วิธีการตรวจคือการนำอาหารเหลวแบ่งใส่หลอดขนาด 10×75 มิลลิเมตร เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่อุ่น 37°ซ จากนั้นหยดน้ำยาลงในหลอด 4 หยด แล้วบ่มเชื้อ 6 นาทีถึง 2 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

3) น้ำยาที่ใช้ คือน้ำยา Kovac's ส่วนประกอบคือ

P-Dimetylaminobenzaldehyde	10.0 กรัม
Amyl หรือ isoamyl alcohol	150 มล.
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	50 มล.

ละลายสารเคมีด้วย Amyl alcohol จนหมด จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปอย่างช้า ๆ ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็น การควบคุมคุณภาพก่อนใช้คือ การนำเอาเชื้อมาทำการตรวจเพื่อเช็คคุณภาพของสารโดยใช้เชื้อ *E. coli* เป็นผลบวก และเชื้อ Klebsiella เป็นเชื้อที่ให้ผลลบ เก็บรักษาโดยเก็บในตู้เย็นประมาณ 4°ซ ถ้าไม่แน่ใจว่าคุณภาพของสารเสื่อมหรือไม่ให้ลองนำมาตรวจกับเชื้อที่ให้ผลบวก การเกิดปฏิกริยาเคมีคือเมื่อทำการตรวจแล้วเขย่าเล็กน้อย จะเกิดสีแดงหรือชมพูบนชั้นของน้ำยา เกิดการจับกันแน่นของโปรตีนโดยกรด ปฏิกิริยาการเกิดสีจะมีดังภาพที่ 3



ภาพที่ 5 แสดงการเกิดสีของ อินโดล เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยา Kovac's

Copyright by Mahidol University

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยทันทีเมื่อเติมน้ำยาที่มี p-Dimethylaminobenzaldehyde ที่มีกรดไฮโดรคลอริก ชั้นของแอลกอฮอล์จะสกัดและทำให้สีแดงเข้มข้นเกิดขึ้น สารสีแดงนี้สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ ถ้าเกิดผลลบจะไม่เกิดสารสีแดงในชั้นของแอลกอฮอล์

2.6.3 ข้อจำกัดของวิธีตรวจ

1) ถ้ามีการใช้อาหารเหลวเปปโทนแทนอาหารเหลวทริปโทฟาน ควรตรวจสอบคุณภาพน้ำยาด้วยเชื้อที่ให้ผลบวกและควรมีการตรวจสอบระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตาม อาหารเหลวเปปโทนยังไม่เหมาะสำหรับการตรวจสอบสอบมากนัก เนื่องจากมีความเข้มข้นของทริปโทฟาน ไม่เพียงพอ

2) ไม่ควรใช้อาหารเหลวเปปโตนที่มีกลูโคส เพราะเมื่อแบคทีเรียใช้น้ำตาลในขบวนการ ออกซิเดชั่นนั้น ทำให้แบคทีเรียไม่สร้างอินโดล และกรดที่เกิดจากการหมักย่อยนั้นทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยับยั้งเอนไซม์

3) พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ ทริปโทฟานเนส คือประมาณ 7.4-7.8

4) การบ่มเพาะเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการตรวจอินโดล นั้นควรเป็นการบ่มเพาะเชื้อในภาวะที่มีออกซิเจน

5) การเก็บน้ำยา Kovac's นั้นควรเก็บน้ำยาไว้ในตู้เย็น 4-10 °ซ ถ้าปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสีน้ำยาจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งจะทำให้ความไวของน้ำยาลดลง การเก็บน้ำยาควรเก็บไว้ในขวดสีชา

6) หากมีการเกิดผลบวกอ่อนๆ แสดงว่ามีแบคทีเรียอื่นที่ไม่สร้างอินโดลปนมาด้วย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อที่จะทำให้เห็นผลบวกได้ง่ายคือการตรวจจากโคโลนีของเชื้อทำแบบ spot test หรือการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้อินโดลได้มาก

2.7 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 ปริมาณ *E. coli* ที่มีในฟีคัลโคลิฟอร์ม

Feng และ Hartman ค.ศ. 1982 (10) ใช้สาร 4-methylumbelliferone glucuronide (MUG) เพื่อตรวจหา *E.coli* ซึ่งสารนี้จะถูก ไฮโดรไลซ์ โดย เอนไซม์ glucuronidase(GUD) ได้สารเรืองแสงออกมา สามารถเห็นการเรืองแสงได้ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ของแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งเอนไซม์นี้มีความจำเพาะกับ *E. coli* , Shigella และ Salmonella เท่านั้น ทำการตรวจหา *E. coli* โดยการนำสาร MUG เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth 100 ไมโครกรัม(μg) /

Copyright by Mahidol University

มล. หรือเทียบเท่า 100 มิลลิกรัม/1,000 มล. ตรวจตัวอย่างในอาหาร น้ำ และนม โดยทำในขั้นตอนแรกของวิธีการ MTF หลังจากอบเพาะเชื้อที่ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว หลังจากนั้นยืนยันด้วยอาหารเหลวอีซีที่ 45°ซ หลอดที่ให้แก๊สและเรืองแสงได้ 90 % ของหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นยืนยัน วิธีนี้สามารถตรวจหา *E. coli* ได้เร็วขึ้นโดยแนะนำว่าน่าจะมีการทดลองทำในไมโครเพลตต่อไป

ปี ค.ศ. 1990 Rice และคณะ (18) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Colilert โดยทำการตรวจหาเอนไซม์ GUD ใน *E. coli* ที่แยกมาจากตัวอย่างอุจจาระคน 460 ตัวอย่าง อุจจาระวัว 105 ตัวอย่าง และอุจจาระม้า 55 ตัวอย่าง พบว่า ให้ผลบวกการเรืองแสงในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 95.5 % และให้ผลบวกในระยะเวลา 28 ชั่วโมง 99.5 % แสดงว่าระหว่างอุจจาระของคนและสัตว์เชื้อ *E. coli* ให้ผลบวกกับเอนไซม์ GUD ได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจากการแยกเชื้อจากอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่นดังกล่าวพบว่า *E. coli* เป็นเชื้อที่พบได้มากที่สุด (> 90%)ในแบคทีเรียที่แยกได้

ปี ค.ศ. 1994 Walter และคณะ(20)ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ membrane lauryl sulphate broth (MLSB) และ membrane lactose glucuronide agar (mLGA) เพื่อตรวจหา *E. coli* และโคลิฟอร์มโดยวิธีกรองผ่านเยื่อกรองในคราวเดียวกัน ตรวจน้ำตัวอย่างทั้งหมด 174 ตัวอย่างโดย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MLSB บ่มเพาะเชื้อที่ 44 °ซ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ mLGA ซึ่งบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ *E.coli* จะให้โคโลนีสีน้ำเงิน นำโคโลนีที่ขึ้นมาตรวจยืนยันโดย *E.coli* จะให้กรดและแก๊สจากอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโทนแลคโตส ให้ผลบวกอินโดลจากทริปโทฟาน และให้ผลลบกับ Oxidase วิธี MLSB สามารถตรวจหา *E.coli* ได้ 92 % ส่วนวิธี mLGA ให้ผล 82 % ซึ่งในจำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกที่ 44°ซ เป็น *E. coli* 92 %

2.7.2 การใช้ วิธีอินโดลในการตรวจหา *E. coli*

Edberg และ kontnick ค.ศ. 1986 (26) ทำการศึกษาการตรวจหา *E. coli* ด้วยการวัดเอนไซม์ GUD โดยใช้วิธีรวดเร็วซึ่งมีการผลิตขึ้นมาเพื่อการค้าอยู่ 2 วิธีคือ Rapid Identificatiom Method(RIM) และวิธี Rapid Detection *E. coli* (RDE) เป็นวิธีที่รวดเร็วและสามารถตรวจใน1 หลอดเท่านั้น ประกอบด้วย สารทดสอบ *E. coli* ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงที่ 366 นาโนเมตร และสารทดสอบ Total coliform คือ *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG) จะเกิดสีเหลือง และสารทดสอบ Indole นำทั้งสองวิธีเปรียบเทียบกับวิธี Conventional โดยตรวจโคโลนีของเชื้อ *E. coli* 169 ตัวอย่าง และไม่ใช่ *E. coli* 150 ตัวอย่างพบว่าได้ผลไม่แตกต่างกัน วิธี RDE มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี RIM เล็กน้อย วิธีทั้งสองนี้ใช้เพื่อตรวจสอบโคโลนีของเชื้อที่ต้องการพิสูจน์ว่าเป็นโคลิฟอร์ม หรือ *E. coli*

ในปี ค.ศ. 1991 Sarhan และ Foster (27) ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด m-7FC ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กับวิธี Membrane Filter โดยเติม MUG ลงไป สามารถตรวจหาเอนไซม์

Copyright by Mahidol University

GUD ใน *E. coli* ได้ภายใน 7.5 ชั่วโมง ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจคือ 41.5°ซ และคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้การเรืองแสงช้าลง การเติมสาร MUG ที่ 50 ,100 และ 150 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. เกิดการเรืองแสงไม่แตกต่างกัน เมื่อตรวจตัวอย่างน้ำจากธรรมชาติโดยวิธี Membrane Filtration พบว่า มีผลลบปลอม 6.1 % และผลบวกปลอม 3.7 % ทำการตรวจยืนยัน *E. coli* ด้วยการถ่ายเชื้อลงใน EMB แล้วทำการยืนยันด้วย Biochemical test คืออินโดล Methylred Voges-Proskauer test และ Citrate

ปี ค.ศ. 1994 Walter และคณะ (19) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ membrane lauryl sulphate broth (MLSB) และ membrane lactose glucuronide agar (mLGA) เพื่อตรวจหา *E. coli* และ total coliform โดยวิธี membrane filtration ในคราวเดียวกัน ตรวจน้ำตัวอย่างทั้งหมด 174 ตัวอย่าง โดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ MLSB บ่มเพาะเชื้อที่ 44 °ซ เปรียบเทียบกับ อาหารเลี้ยงเชื้อ MLGA ซึ่งบ่มเพาะเชื้อที่ 37°ซ นำโคโลนีที่ขึ้นมาตรวจยืนยันโดย *E. coli* จะให้กรดและแก๊สจากอาหารเลี้ยงเชื้อเปบโทนแลคโตสให้ผลบวกอินโดล จากทริปโทฟานและให้ผลลบกับ Oxidase

2.7.3 การตรวจหา *E. coli* โดยการทดสอบ เอนไซม์ glucuronidase

Ley และคณะ ค.ศ. 1987(14) ทำการตรวจหา *E. coli* โดยวิธีการใช้สาร Indoxyl-β-D-glucuronide ตรวจหา เอนไซม์ glucuronidase โดยทำการศึกษาในขั้นแรกโดยใช้สารสังเคราะห์ขบวนการสังเคราะห์ขั้นสุดท้ายได้สาร Indoxyl-β-D-glucuronide ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในวิธี Membrane Filtration โคโลนีของ *E. coli* จะให้สารสีน้ำเงินออกมาซึ่งมีความชัดเจนและมีความจำเพาะต่อ *E. coli* มาก

อาภากร เรียงรุ่งโรจน์ พ.ศ. 2537 (12) ทำการศึกษาตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในอาหารด้วย สาร 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ GUD ซึ่งมีอยู่ใน *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ แลคโทสผสม MUG ทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์เปรียบเทียบที่อุณหภูมิห้อง และ 35°ซ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.1$) นำวิธีการมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยตรวจกับตัวอย่างอาหาร 50 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ $R = -0.8558$ มีค่า sensitivity = 100% ค่า specificity =81.25% ค่า efficiency = 94 % วิธีนี้สามารถบ่งบอกถึงการปนเปื้อนของ *E. coli* ในอาหารได้สูง และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้

อโณทัย พุ่มอยู่ พ.ศ. 2538 (13) ทำการตรวจวิเคราะห์หา *E. coli* ในน้ำดื่มโดยวิธีการเรืองแสงโดยใช้สาร MUG ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ m-7FC โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ MUG 50 μg /มล. ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการตรวจตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิ 41.5±0.5°ซ ได้แก่น้ำฝนและน้ำประปา จำนวน 100 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN พบว่าผลการตรวจ วิธีทั้ง 2

Copyright by Mahidol University

ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ วิธีนี้มีความไว = 77.6 % ความจำเพาะเจาะจง = 84.3% efficiency = 81%

2.7.4 การตรวจหาโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ

วัฒนา เกตุมงคลฉวี พ.ศ. 2533 (28) ได้ทำการศึกษาโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ m-FC medium มาประยุกต์เพื่อทำการตรวจหา ฟีคัลโคลิฟอร์มอย่างง่าย โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มล. เติม bromocresol purple 0.35 % เป็นอินดิเคเตอร์แทน resolic acid โดยใช้วิธี Multiple-tube fermentation (MPN) เป็นวิธีเปรียบเทียบ โดยวิธีนี้จะดูจากสีที่เปลี่ยน และพีเอชที่เปลี่ยน จากการตรวจตัวอย่างน้ำบริโภคคือน้ำบาดาล น้ำประปา น้ำฝน น้ำสระ และน้ำบ่อตื้น พบว่าผลการตรวจไม่แตกต่างจากวิธี MPN (p = 0.05) เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก แต่ใช้อุณหภูมิบ่มที่ 44.5°ซ

พัชรี จันลือชัย พ.ศ. 2533 (29) ประยุกต์ใช้ H_2 S-test ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ enteric bacteria ในน้ำดื่มแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูการเกิด H_2S ของเชื้อ Salmonella และ *E. coli* ที่อุณหภูมิห้องผลการศึกษาแผ่นดูดซับ 3 ชนิดคือ กระดาษทิชชู สำลี และ absorbent pad ของ membrane filter พบว่าแผ่นดูดซับที่เหมาะสมที่สุด คือ absorbent pad ของ membrane filter เชื้อ Salmonella paratyphi ให้ผลจากการทดลองถูกต้อง 100 % ส่วนเชื้อ *E.coli* ไม่ให้ผลบวกกับการทดลองนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อ H_2 S-test ประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)	1.5 กรัม
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (Feric ammonium citrate)	0.75 กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)	1.0 กรัม
เปปโตน(Peptone)	20 กรัม
Teepol	1 มล.
น้ำกลั่น	50 มล.

อาภากร เรียงรุ่งโรจน์ พ.ศ. 2537(12) ทำการศึกษาตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในอาหารด้วย สาร 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ D-glucuronidase ซึ่งมีอยู่ใน *E.coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ แลคโทสผสม MUG โดยใช้อุณหภูมิห้อง อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ประกอบด้วย

เปปโตน	10 กรัม
แลคโทส	10 กรัม
โซเดียมดีซอกซีลโคเลต (Sodium desoxycholate)	1 กรัม
MUG	50 มิลลิกรัม

นฤมล ตปนียะกุล พ.ศ. 2537(30) ได้สร้างชุดทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำอย่างง่ายเพื่อเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สะดวก ประหยัด ชาวชนบทสามารถดำเนินการตรวจ

Copyright by Mahidol University

ตรวจสอบได้ด้วยตนเอง คืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ว 110 ใช้ตรวจสอบน้ำบริโภคประเภทต่างๆ 540 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 10 มล. โดยบ่มเชื้อโดยใช้อุณหภูมิภาคสนาม เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MTF พบว่า ถ้าปริมาณโคลิฟอร์มมีน้อยกว่า 2 และไม่มากกว่า 10 MPN/100 มล. มีความสอดคล้องถึง 88 % ถ้าปริมาณโคลิฟอร์มอยู่ระหว่าง 2-10 MPN/100 มล. มีความสอดคล้องถึง 90% มีค่า sensitivity = 90% ค่า specificity = 86 % พบว่ามีอายุการใช้งานนานไม่น้อยกว่า 6 เดือนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ประกอบด้วย

เปปโตน	10 กรัม
แลคโทส	10 กรัม
เนื้อสกัด (beef extract)	6 กรัม
ดีวัว (Oxgall)	5 กรัม
ฟีนอลเรด	0.05 กรัม

อโณทัย พุ่มอยู่ 2538(14) ทำการตรวจวิเคราะห์หา *E.coli* ในน้ำดื่มโดยวิธีการเรืองแสง โดยใช้สาร MUG ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ m-7FC โดยใช้อุณหภูมิ 41.5±0.5°ซ โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ MUG 50 μg /มล. ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการตรวจตัวอย่างน้ำ ได้แก่น้ำฝนและน้ำประปาอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ประกอบด้วย

เปปโตน	4 กรัม
ยีสสกัด (yeast extract)	3 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
โซเดียมดีซอกซีลโคเลต (Sodium desoxycholate)	1 กรัม
โวเดียมลอรีลซัลเฟต (Sodium lauryl Sulfate)	0.1 กรัม
MUG	50 มิลลิกรัม

ศิริลักษณ์ โรจนประเสริจกิจ 2540 (31) ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในอาหารด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SI-2 เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MPN วิธี SI-2 เป็นวิธีที่สร้างขึ้นโดยกองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัยใช้ตรวจโคลิฟอร์มในอาหารและภาชนะสัมผัส อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวคือ แลคโทสบรอทผสมอิดิเคเตอร์ บรอมไธมอลบลู ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ประกอบด้วย

เปปโตน	10 กรัม
แลคโทส	10 กรัม
โซเดียมดีซอกซีลโคเลต (Sodium desoxycholate)	1 กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromtymal Blue)	0.02 กรัม

จากการผลการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีภายใน 24 ชั่วโมง กำหนดค่า MPN coliform ต่อกรัม ≤ 100 มีค่าความไว = 81% ความจำเพาะ =100%และประสิทธิภาพ = 91%

Copyright by Mahidol University

กำหนดค่า MPN coliform ต่อกรัม ≤ 500 มีค่าความไว = 100% ความจำเพาะ =74% และประสิทธิภาพ = 91% ศึกษาอายุการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 28-31 °ซ และไม่ถูกแสงแดดปรากฏว่าสามารถใช้งานได้ไม่น้อยกว่า 6 เดือน

Copyright by Mahidol University

บทที่ 3

วัตถุและวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

1) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
2) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่สามารถปรับอุณหภูมิได้
3) ตู้อบแห้ง (Hot-Air Oven)
4) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
5) Hotplate magnetic stirrer
6) เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข
7) เครื่องวัด pH ชนิดตัวเลข
8) หลอดแก้วพร้อมฝาอลูมิเนียมขนาด 20×150 และขนาด 10 ×100 มิลลิเมตร
9) หลอดหมักแก๊สขนาด 6×50 มิลลิเมตร
10) ขวดแก้วขนาด 24 มล. พร้อมฝาเกลียวแบรคคาไลท์
11) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flasks) ขนาด 100, 250 , 500 และ1,000 มล.
12) ปิเปตขนาด 10 มล., 5 มล. และ 1 มล.
13) แท่งแก้ว
14) จานเพาะเชื้อ
15) เทอร์โมมิเตอร์ชนิดบันทึกข้อมูลสูงสุด-ต่ำสุด

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก)

1) อาหารเหลวแลคโทส
2) อาหารเหลวอีซีมีเดียม
3) อาหารแข็ง Nutrient Agar
4) อาหารเหลว Brain Heart Infusion
5) อาหารเหลวเปปโทน

Copyright by Mahidol University

6) อาหารเหลวประยุกต์วิธีอินโดล

7) น้ำยา Kovac's

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

3.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1) *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล การเตรียมตัวอย่างน้ำเตรียมตัวอย่างเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์

นำ *E. coli* บริสุทธิ์สายพันธุ์ ATCC 25922 (เก็บใน Nutrient Agar slant ที่อุณหภูมิ 4 °ซ) มาทำการเพาะเชื้อใน Nutrient Agar plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วนำเชื้อมาถ่ายลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (brain heart infusion) อบเพาะเชื้อต่อที่ 35°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเจือจางด้วยอาหารเหลวเปปโทน วัดค่า ดูดกลืนแสง (Optical density ;OD) ที่ ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ให้ได้ OD = 0.16 จะได้จำนวนเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์ / มล. ทำการเจือจางเชื้อต่อโดยใช้ อาหารเหลวเปปโทนให้ได้ปริมาณของเชื้อตามความต้องการ แล้วนำไปทำการทดลองทันทีหลังเตรียมเชื้อเสร็จแล้ว ทราบปริมาณเชื้อที่เตรียมโดยวิธี SPC แบบ Pour Plate (บทที่ 2 ข้อ 2.3) โดยการนับโคโลนี ที่ปริมาณของเชื้อที่ 100 เซลล์ /มล.

2) *E. cloacae* (local isolate strains) ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเตรียมเช่นเดียวกับ *E. coli* ข้างต้น

3.3.2 ตัวอย่างน้ำประเภทน้ำประปาจำนวน 116 ตัวอย่าง ที่เก็บจากจังหวัดต่าง ๆ ในเขตศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 ได้แก่ อยุธยา อ่างทอง ปทุมธานี นนทบุรี และสมุทรปราการ

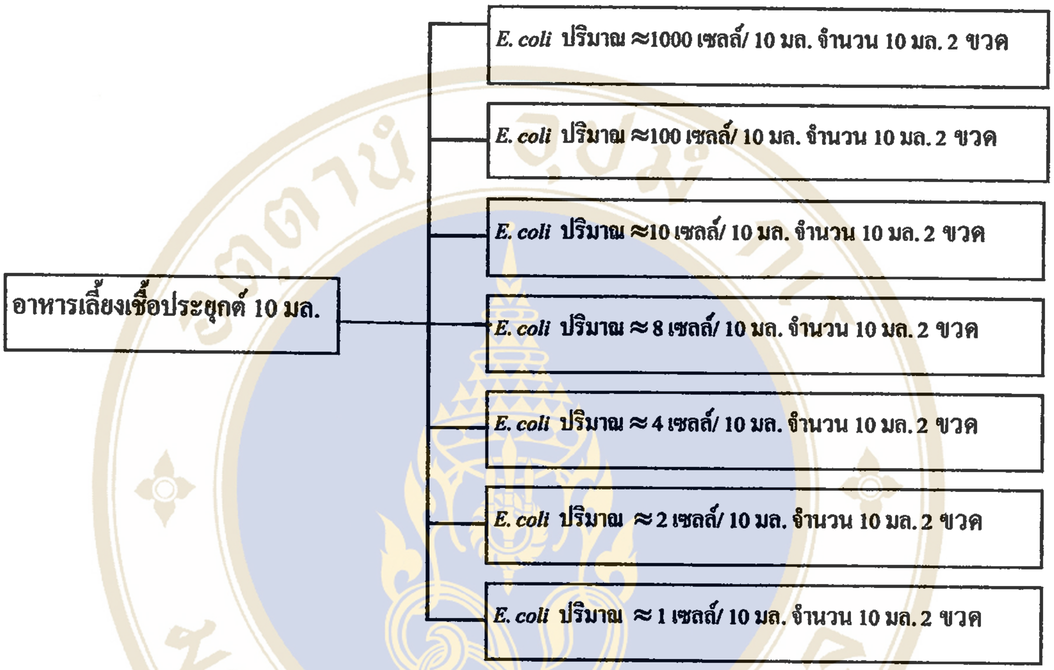
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยแบ่งการศึกษาออกเป็น 5 ส่วนคือ

3.4.1 ส่วนที่ 1 การศึกษาหาปริมาณเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์ที่ต่ำสุดที่ให้ผลอินโดลเป็นบวกในอุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาบ่มเชื้อจนถึง 72 ชั่วโมง ใช้เชื้อ *E. coli* ที่บริสุทธิ์ (เตรียมตามวิธีในหัวข้อ 3.2)นำมาเจือจางให้มีปริมาณแตกต่างกัน 7 ระดับ คือประมาณ 1 , 2 , 4 , 8 , 10 , 100 และ 1000 เซลล์ /10 มล. นำน้ำที่เตรียมความเข้มข้นละ 10 มล.ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ 10 มล. ที่เตรียมไว้ในขวดแก้ว ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง การอ่านผลกระทำโดยการแบ่งจากขวดแก้วใส่หลอดทดลองจำนวน 2 มล. เติมน้ำยา Kovac's 3-5 หยด ลงในหลอด

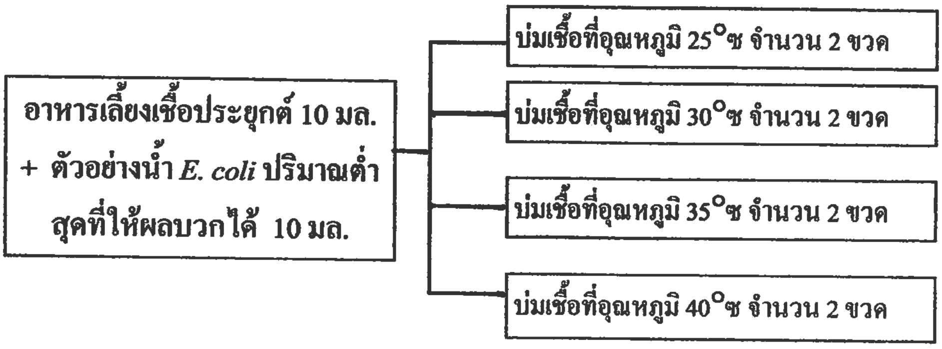
Copyright by Mahidol University

ทดลองแต่ละหลอดเขย่าเล็กน้อย หากให้ผลบวกที่เกิดขึ้นจะมีสีแดงบนชั้นของน้ำยา Kovac's หากเป็นผลลบจะไม่มีการเปลี่ยนสีของน้ำยา Kovac's ทำการอ่านผลภายใน 10 นาทีนับตั้งแต่เติมน้ำยา ทราบปริมาณเชื้อที่เตรียมนับโดยวิธี SPC (ข้อ 2.3) ที่ 100 เซลล์ / มล. ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุด



ภาพที่ 6 แผนผังการทดลองส่วนที่ 1

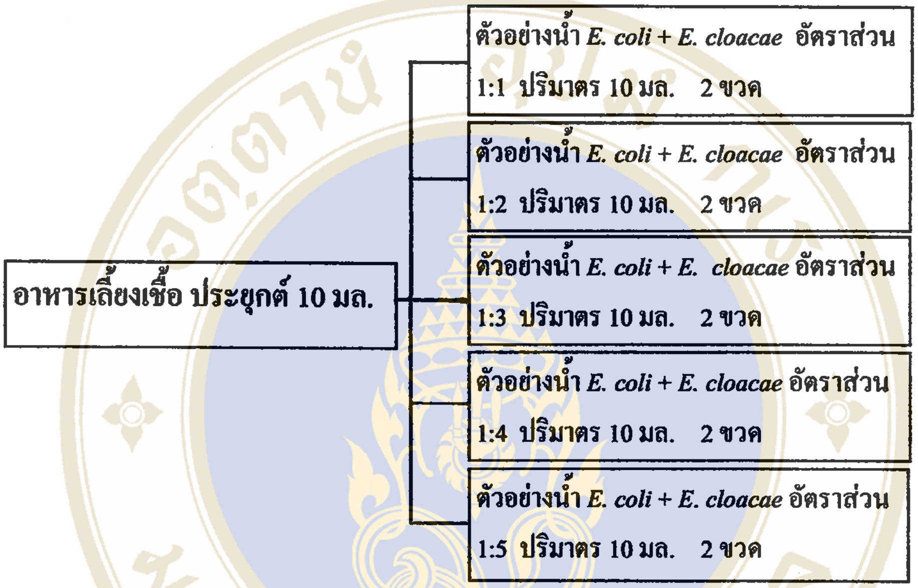
3.4.2 ส่วนที่ 2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดผลบวกโดยวิธีอินโดล เมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ในการบ่มเชื้อ *E. coli* โดยใช้ปริมาณเชื้อต่ำที่สุดที่ให้ผลบวกอินโดลโดยได้ข้อมูลจากส่วนที่ 1 ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 °ซ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อ่านผลอินโดล ทุก 24 ชั่วโมง ทราบปริมาณเชื้อที่เตรียมนับโดยวิธี SPC (ข้อที่ 2.3) เลือกเวลาที่เหมาะสมในการให้ผลบวกอินโดลเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุด



ภาพที่ 7 แผนผังการทดลองส่วนที่ 2

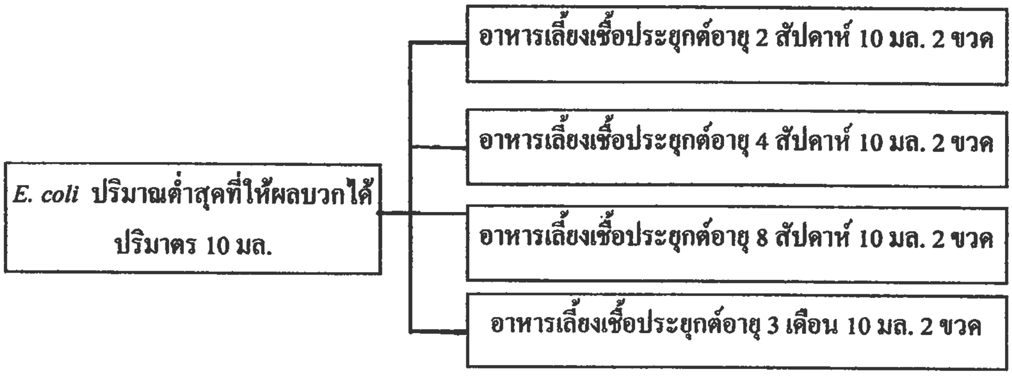
Copyright by Mahidol University

3.4.3 ส่วนที่ 3 การศึกษาการให้ผลบวกอินโดลเมื่อใช้เชื้อ *E. coli* บ่มรวมกับโคลิฟอร์มอื่นที่ให้ผลอินโดลลบโดยใช้เชื้อ *E. cloacae* ใช้อัตราส่วนของ *E. coli* และ *E. cloacae* ดังนี้คือ 1:1, 1:2 , 1:3 , 1:4 และ 1:5 เชื้อทั้งสองมีความปริมาณเชื้อ ประมาณ 1 เซลล์/มล. ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาตามที่ได้ข้อมูลจากส่วนที่ 2 แล้วอ่านผลอินโดล ทราบปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *E. cloacae* ที่เตรียมโดยวิธี SPC (ข้อที่ 2.3) ทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุด



ภาพที่ 8 แผนผังการทดลองส่วนที่ 3

3.4.4 ส่วนที่ 4 เป็นการศึกษาอายุการเก็บรักษาของอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ เมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2, 4, 8 สัปดาห์และ 3 เดือน แล้วนำมาทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในน้ำตัวอย่างโดยใช้ *E. coli* ปริมาณต่ำสุดที่สามารถให้ผลบวกได้จากส่วนที่1 โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องครบตามเวลาที่เลือกจากส่วนที่ 2 แล้วทำการอ่านผลอินโดลทำการทดลองทั้งหมด 5 ชุด



ภาพที่ 9 แผนผังการทดลองส่วนที่ 4

Copyright by Mahidol University

3.4.5 ส่วนที่ 5 เปรียบเทียบการตรวจหา *E. coli* โดยวิธีอินโดล กับวิธีมาตรฐาน MTF ในตัวอย่างน้ำบริโภคในประเภทน้ำประปา โดยเติมน้ำตัวอย่าง 10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ ทำการตรวจบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องครบตามเวลาที่เลือกจากส่วนที่ 2 ทำการอ่านผลอินโดลเช่นเดียวกับการทดลองส่วนที่ 1 ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ส่วนวิธีมาตรฐาน MTF ใช้ตัวอย่างจากน้ำประปา 116 ตัวอย่าง เก็บจากจังหวัดในเขตศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 นนทบุรี วิธีการตรวจตามหัวข้อ 2.2

ภาพที่ 10 แผนผังการทดลองส่วนที่ 5

3.5 การตรวจตัวอย่างน้ำด้วยวิธี อินโดล

นำขวดตัวอย่างน้ำเขย่าประมาณ 20 ครั้ง ใส่ตัวอย่างน้ำจำนวน 10 มล. ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ทั้ง 2 ขวด ที่มีปริมาณอาหาร 10 มล. เขย่าเบา ๆ จนอาหารผสมกันดี บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเติมน้ำยา Kovac's 10 หยดลงในขวดแต่ละขวดเขย่าเล็กน้อย หากเป็นผลบวกจะมีสีแดงบนชั้นของน้ำยา Kovac's หากเป็นผลลบจะไม่มีการเปลี่ยนสีของน้ำยา Kovac's ทำการอ่านผลภายใน 10 นาทีนับตั้งแต่เติมน้ำยา สำหรับการศึกษาครั้งนี้การอ่านผลกระทำโดยการแบ่งจากขวดแก้วใส่หลอดทดลองจำนวน 2 มล. เติมน้ำยา Kovac's 3-5 หยด ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดทำการอ่านผลภายใน 10 นาทีนับตั้งแต่เติมน้ำยา หากมีผลบวกเกิดขึ้นในหลอดใดหลอดหนึ่งหรือทั้งสองหลอด ถือว่าเป็นผลบวก

Copyright by Mahidol University

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย

3.6.1 ทดสอบความแตกต่างในขั้นตอนการศึกษาประสิทธิผลของวิธีอินโดล และการเปรียบเทียบวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำบริโภคประเภทน้ำประปา โดยใช้ Chi-square test

3.6.2 คำนวณค่า sensitivity specificity และค่า efficiency ของวิธีอินโดล

3.6.3 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียระหว่างวิธีอินโดลกับวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์ม

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

i1336880l

ภาพที่ 11 น้ำยา Kovac's

ภาพที่ 12 ชุดตรวจสอบอินโดล ประกอบด้วยน้ำยา Kovac's และอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์

Copyright by Mahidol University

ภาพที่ 13 อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ 10 มล.

ภาพที่ 14 อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ที่เติมน้ำตัวอย่าง 10 มล.

Copyright by Mahidol University

ภาพที่ 15 การแสดงผลเมื่อเติมน้ำยา Kovac's ลงไปในขวดที่บ่มครบ 48 ชั่วโมง
ขวดซ้ายคือ ขวดที่ยังไม่เติมน้ำยา
ขวดกลางคือ เมื่อเติมน้ำยาแล้วน้ำยาจะไม่เปลี่ยนสี แสดงผลลบ
ขวดขวาคือ เมื่อเติมน้ำแล้วเกิดสีแดงบนชั้นของน้ำยา แสดงผลบวก

Copyright by Mahidol University

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปราย

4.1 ผลการศึกษาส่วนที่ 1

การศึกษาหาปริมาณต่ำสุดของ *E. coli* ที่สามารถให้ผลบวกอินโดลได้ โดย *E. coli* เตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1000 , 100 , 10 , 8 , 4 , 2 และ 1 เซลล์/ 10 มล. บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทดสอบอินโดล โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุด ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อใช้ *E. coli* ปริมาณต่าง ๆ

การทดลองชุดที่	1000 เซลล์/10 มล.	100 เซลล์/10 มล.	10 เซลล์/10 มล.	8 เซลล์/10 มล.	4 เซลล์/10 มล.	2 เซลล์/10 มล.	1 เซลล์/10 มล.
1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

หมายเหตุ อุณหภูมิห้องที่ทำการบันทึกอยู่ในช่วง 22-30 °ซ , (/) แสดงผลอินโดลทั้ง 2 ซ้ำ

จากการทดลองพบว่าปริมาณต่ำสุดของ *E . coli* ที่สามารถให้ผลบวกอินโดลได้ที่อุณหภูมิห้อง คือ ประมาณ 1 เซลล์ / 10 มล. อุณหภูมิห้องมีค่า 22-30°ซ โดยใช้เวลาทั้งหมด 72 ชั่วโมง ทราบปริมาณเชื้อที่เตรียมโดยวิธี SPC ในชุดที่ 1, 2 และ 3 ได้ 117, 130 และ 127 เซลล์ / มล. ตามลำดับ การทดลองทั้ง 3 ชุดสามารถให้ผลบวกได้เหมือนกันทั้ง 3 ชุดดังในตารางที่ 4 ดังนั้นในการตรวจน้ำตัวอย่าง สามารถตรวจสอบหาแบคทีเรียได้ ถ้าในน้ำนั้นมีอย่างน้อย 1 เซลล์ / 10 มล. ใช้ปริมาณเซลล์ที่ ประมาณ 1 เซลล์ / 10 มล. ในการทดลองขั้นต่อไป

4.2 ผลการศึกษาส่วนที่ 2

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดผลบวกอินโดล การทดลองนี้ใช้ปริมาณ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์ /10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์ 10 มล. โดยแยกการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ

Copyright by Mahidol University

ต่าง ๆ คือ 25 , 30 , 35 และ 40 °ซ ทำการบ่มเป็นเวลาเป็นเวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดสอบอินโดล ทุก 24 ชั่วโมง สังเกตผลบวกที่เกิดขึ้น โดยทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุด แยกบ่มตามอุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อใช้เชื้อ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์/ 10 มล.บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ชุดที่	อุณหภูมิ 25°ซ (ชม.)			อุณหภูมิ 30°ซ (ชม.)			อุณหภูมิ 35°ซ (ชม.)			อุณหภูมิ 40°ซ (ชม.)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24.	48	72
1	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
2	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
3	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
4	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
5	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
6	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
9	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
10	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
รวม	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

หมายเหตุ วิธี SPC ทั้ง 10 ชุดนับจำนวนเชื้อได้ค่าเฉลี่ย 130 CFU

จากผลการทดลองเมื่อใช้ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์ /10 มล. ทำการบ่มเพาะที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 , 30 , 35 และ 40°ซ เป็นเวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมงทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุด เมื่อบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25 °ซ สามารถให้ผลบวกได้ที่ 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป ส่วนที่อุณหภูมิ 30 , 35 และ 40°ซ สามารถให้ผลบวกได้ที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป การทดลองขั้นต่อไปซึ่งใช้ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์ / 10 มล. บ่มเพาะที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาบ่มนาน 48 ชั่วโมงเพื่อให้สามารถทดสอบผลบวกได้

สรุป คือการตรวจอินโดลสามารถทำการตรวจได้ในที่ซึ่งอุณหภูมิ 25-40 °ซ โดยใช้เวลาในการบ่มนาน 48 ชั่วโมง การทดลองส่วนต่อไปใช้เวลาบ่มนาน 48 ชั่วโมง

Copyright by Mahidol University

4.3 ผลการศึกษาส่วนที่ 3

การศึกษาการเกิดผลบวกอินโดลของ *E. coli* เมื่อบ่มเพาะรวมกับ *E. cloacae* โดยมีอัตราส่วนของเชื้อทั้งสองแตกต่างกัน ทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุด ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อบ่มเชื้อ *E.coli* รวมกับ *E. cloacae*

การทดลองชุดที่	ผลการทดสอบอินโดลเมื่อบ่ม *E. coli* และ *E. cloacae* ในอัตราส่วนต่าง ๆ				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
5	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
6	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
8	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
9	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
รวม	10	10	10	10	10

หมายเหตุ อุณหภูมิห้อง 29-32 °ซ , ควบคุมผลบวกโดย *E. coli* ได้ผลบวก
ควบคุมผลลบโดย *E. cloacae* ได้ผล ลบวิธี SPC ของ *E. cloacae* ได้ 120 CFU
วิธี SPC ของ *E. coli* ทั้ง 10 ชุด ได้ค่าเฉลี่ย 122 CFU

จากการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อ *E. coli* และ *E. cloacae* รวมกันด้วยอัตราส่วน ต่าง ๆ 1:1 1:2 , 1:3 , 1:4 และ 1:5 โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถให้ผลบวกอินโดลได้ทุกอัตราส่วน อุณหภูมิห้องที่วัดได้มีค่า 29-32°ซ

สรุปคือ การตรวจสอบอินโดล สามารถให้ผลบวกได้แม้จะมีการรบกวนการเจริญเติบโตจากแบคทีเรียที่ให้ผลอินโดลลบ ในอัตราส่วน 1:1 1:2 , 1:3 , 1:4 และ 1:5 ดังนั้นในการตรวจตัวอย่างน้ำ สามารถตรวจสอบอินโดลได้แม้จะมีแบคทีเรียอื่นที่ไม่สร้างอินโดลปนมากับน้ำตัวอย่างด้วย

Copyright by Mahidol University

4.4 ผลการศึกษาส่วนที่ 4

การศึกษาอายุการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 , 4, 8 สัปดาห์ และ 3 เดือน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุการเก็บต่าง ๆ กัน บ่มเพาะเชื้อกับ *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์/10 มล. ที่อุณหภูมิห้อง 22-35°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบอินโดล โดยทำการทดลอง 5 ชุด ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อบ่ม *E. coli* ประมาณ 1 เซลล์/10 มล. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุแตกต่างกัน

การทดลองชุดที่	อายุการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้			
	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	3 เดือน
1	+/+	-/+	-/+	+/+
2	+/+	+/+	+/+	+/+
3	+/+	+/+	+/+	+/+
4	+/+	-/+	+/+	-/+
5	+/+	+/+	+/+	+/+
รวม	5	5	5	5

หมายเหตุ อุณหภูมิห้องที่ทำการวัดอยู่ในช่วง 22-35°ซ วิธี SPC ของ *E. coli* ได้ค่าเฉลี่ย 85 CFU

จากการทดสอบ 5 ชุด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บเป็นระยะเวลา 2 4 8 สัปดาห์ และ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้องสามารถทดสอบอินโดลได้ทั้งหมด

4.5 ผลการศึกษาส่วนที่ 5

เป็นการทดลองเปรียบเทียบการตรวจหา *E. coli* โดยวิธี อินโดล กับการตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐาน MTF โดยใช้ตัวอย่างน้ำบริโภคประเภทน้ำประปา ทำการตรวจน้ำตัวอย่างโดยวิธีอินโดลโดยใช้น้ำ 10 มล. กับอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม ใช้ระบบ 5, 5, 5 (ข้อ 2.2) บ่มเชื้อตามวิธีมาตรฐานสามารถอ่านค่าได้ตั้งแต่ 2 MPN เป็นต้นไป ในที่นี้ถือว่าค่าที่อ่านได้ตั้งแต่ 2 MPN จะถือว่าเป็นผลบวก ทำการตรวจควบคู่กันโดยใช้น้ำตัวอย่างน้ำประปาในเขตศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 1 นนทบุรีทั้งหมด 116 ตัวอย่างได้ผลการทดลองดังตารางที่ 8

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจตัวอย่างน้ำ โดยวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF

หน่วย : ตัวอย่าง

ค่า MPN ที่อ่านได้โดยวิธีมาตรฐาน (MPN / 100 มล.)	ผลการตรวจโดยวิธีอินโดล			% ความสอดคล้อง
	ผลลบ(ตัวอย่าง)	ผลบวก(ตัวอย่าง)	รวม(ตัวอย่าง)	
0	67	16	83	80.7
2	4	13	17	76.5
4	-	2	2	100
8 - 80	-	7	7	100
80 - 1600	-	7	7	100
รวม	71	45	116	

จากการตรวจตัวอย่างน้ำประเภทน้ำประปาทั้งหมด 116 ตัวอย่าง วิธีอินโดลได้ผลบวกทั้งหมด 45 ตัวอย่าง คิดเป็น 38.8 % ได้ผลลบ 71 ตัวอย่าง คิดเป็น 61.2 % วิธีมาตรฐาน MTF ได้ผลบวก 33 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.4% ได้ผลลบ 83 ตัวอย่างคิดเป็น 71.6 % สามารถเขียนเป็นตารางสรุปได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลสรุปการเปรียบเทียบการตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF

หน่วย : ตัวอย่าง

ผลการตรวจ	วิธีการตรวจ	
	วิธีอินโดล(ตัวอย่าง)	วิธีมาตรฐาน MTF(ตัวอย่าง)
บวก	45	33
ลบ	71	83
รวม	116	116

เมื่อนำการตรวจทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ดังตารางที่ 10 ได้ดังนี้

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF

หน่วย : ตัวอย่าง

		ผลวิธีมาตรฐาน		
		+	-	รวม
ผลการตรวจโดยวิธีอินโดล	+	29	16	45
	-	4	67	71
	รวม	33	83	116

จากผลการตรวจตัวอย่างน้ำประปา 116 ตัวอย่างพบว่าผลอินโดลบวกและวิธีมาตรฐาน MTF บวกมีทั้งหมด 29 ตัวอย่าง ผลอินโดลบวกและวิธีมาตรฐาน MTF ลบ 16 ตัวอย่าง ผลอินโดลลบและวิธีมาตรฐาน MTF บวก 4 ตัวอย่าง ผลอินโดลลบและวิธีมาตรฐาน MPN ลบ 67 ตัวอย่าง คำนวณค่าทางสถิติได้ดังนี้คือ

ค่าความไว (SENSITIVITY) ของการทดสอบ = $\frac{29 \times 100}{33}$ = 87.87 %

วิธีอินโดลจะสามารถตรวจพบผลบวกได้ร้อยละ 87.87 ของทั้งหมดที่สามารถเกิดผลบวกได้โดยวิธีมาตรฐาน

ค่าความจำเพาะเจาะจง (SPECIFICITY) ของการทดสอบได้ = $\frac{67 \times 100}{83}$ = 80.72 %

วิธีอินโดลจะสามารถตรวจพบผลลบได้ร้อยละ 80.72 ของทั้งหมดที่สามารถเกิดผลลบได้โดยวิธีมาตรฐาน

ค่าประสิทธิภาพ(EFFICIENCY) ของการทดสอบ = $\frac{29 + 66}{116}$ = 82.75 %

ค่าประสิทธิภาพของวิธีอินโดล คือความสามารถของวิธีอินโดลที่จะให้ผลการตรวจที่เป็นจริง(บวกและลบ) ตรงตามวิธีมาตรฐาน MTF ได้ร้อยละ 82.75 ของทั้งหมดที่ตรวจโดยวิธีมาตรฐาน

การทดลองเปรียบเทียบการตรวจหา *E. coli* โดยวิธี อินโดล กับการตรวจหาฟีคัลโคลิฟอร์มโดยวิธีมาตรฐาน MTF โดยใช้ตัวอย่างน้ำบริโภคประเภทน้ำประปา ทำการตรวจน้ำทั้งหมด 116 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความแตกต่างของทั้งสองวิธีโดย Chi-square test พบว่า ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($\alpha = 0.05$) ค่า P ที่คำนวณได้ = 2.78

Copyright by Mahidol University

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

วิธีอินโดลที่ทำการศึกษาเพื่อเป็นวิธีตรวจคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียนั้น เป็นแบบพบหรือไม่พบเชื้อ สามารถตรวจน้ำตัวอย่างน้ำที่มี *E .coli* อย่างน้อย 1 เซลล์/ 10 มล. ใช้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 25 - 40°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียอื่นที่ให้ผลอินโดลลบไม่รบกวนการเกิดผลบวกอินโดล และอายุการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อมีอายุไม่น้อยกว่า 3 เดือน เหมาะสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรียเบื้องต้นก่อนที่จะมีการตรวจเชิงปริมาณ หรือการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำที่จำเป็นต้องตรวจเป็นประจำสม่ำเสมอ เนื่องจากน้ำบริโภคคาดว่ามีฟีคัลโคลิฟอร์มปนเปื้อนไม่มากนัก การเฝ้าระวังโดยการตรวจแบบวิธีมาตรฐานเพียงอย่างเดียวอาจไม่จำเป็น การตรวจเบื้องต้นเพื่อคัดกรองก่อน อาจมีความเหมาะสมกว่าถ้าตัวอย่างน้ำมีเป็นจำนวนมาก เพื่อเป็นการช่วยประหยัดแรงงาน ทรัพยากร และเวลา

5.2 วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาหาปริมาณต่ำสุดของ *E. coli* ที่สามารถให้ผลบวกอินโดลได้ ผลคือสามารถให้ผลบวกอินโดลที่ ประมาณ 1 เซลล์/10 มล. ในการเตรียม *E. coli* บริสุทธิเพื่อเจือจางให้ได้ปริมาณต่าง ๆ ขั้นตอนทั้งหมดอาจไม่สามารถทำให้เสร็จภายใน 30 นาทีตามทฤษฎี ดังนั้นทำให้ในขั้นตอนวิธีควบคุมค่าการนับโคโลนีได้ค่าที่เกิน 100 CFU

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดผลบวกอินโดล พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมงเนื่องจากนานเกินพอที่จะเกิดผลบวกได้ ส่วนอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 25°ซ ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดลองไว้ สำหรับบางพื้นที่การตั้งขวดไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิอบอุ่น เช่น ในกล่องใกล้บริเวณหุงต้ม หรือในกล่องสีดำตั้งไว้กลางแดดในฤดูหนาว อาจทำให้การตรวจเป็นไปได้ เนื่องจากเมืองไทยเป็นเมืองร้อน เมื่อนำไปใช้งานในสภาพพื้นที่ที่มีอุณหภูมิ 25-30°ซ สามารถใช้เวลาในการบ่มสั้นลงคือ 24 ชั่วโมง จะเป็นการลดเวลาการทำงานลงได้

Copyright by Mahidol University

การศึกษาการเกิดผลบวกอินโดลเมื่อบ่ม *E. coli* รวมกับแบคทีเรียอื่นที่ให้อินโดลลบ ในการศึกษาใช้ *E. cloacae* เป็นตัวแทน การทดลองพบว่าสามารถเกิดผลอินโดลบวกได้แม้จะมีแบคทีเรียอื่นเจือปนมากับน้ำตัวอย่าง ผลการศึกษาของวัฒนา(28) ได้ทำการแยกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบที่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน MTF พบ *E. cloacae* *E. agglomerans* *C . freundii* *E. coli* *K. pneumoniae* และ *E. tarda* ซึ่งในความเป็นจริงน้ำในธรรมชาติพบแบคทีเรียอื่น ๆ นอกเหนือจาก *E .coli* อีกมากมาย ซึ่งผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาในที่นี้ เนื่องจากตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างน้ำบริโภค มีการบำบัดก่อนเบื้องต้นซึ่งจะพบแบคทีเรียอื่น ๆ ไม่มากนัก จึงใช้ตัวอย่างแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว

การศึกษาการเกิดผลบวกเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถใช้งานได้แม้เก็บรักษาไว้นาน 3 เดือน การทดลองพบว่าสามารถเกิดผลบวกได้ทุกชุด อย่างไรก็ตามส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำตาลและโปรตีน ดังนั้นการเก็บรักษาแม้ไม่ได้เก็บในตู้เย็น ควรเก็บในกล่องมิดชิดไม่ถูกแสงแดดโดยตรง เพราะความร้อนจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเสียได้ง่าย

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจตัวอย่างน้ำประปา ระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยทำการตรวจตัวอย่างน้ำประปาทั้งหมด 116 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิธีมาตรฐานได้ผลบวก 33 ตัวอย่าง ผลลบ 83 ตัวอย่าง วิธีอินโดลได้ผลบวก 45 ตัวอย่าง ผลลบ 71 ตัวอย่าง จากตารางที่ 13 จะเห็นว่า วิธีอินโดลได้ผลบวกและวิธีมาตรฐานได้ผลลบ 16 ตัวอย่าง อธิบายได้ว่าเกิดจากแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่ ฟีคัลโคลิฟอร์มซึ่งสามารถสร้างอินโดลได้ แบคทีเรียที่สามารถให้ผลอินโดลบวกได้คือ *E. agglomerans* *C. diversus* , *K. oxytoca*, *Proteus vulgaris* หรือเป็น *E. coli* ชนิดที่ไม่สร้างแก๊สแต่สามารถสร้างอินโดล ส่วนวิธีมาตรฐานได้ผลบวกและวิธีอินโดลได้ผลลบคือ 4 ตัวอย่าง(คิดเป็นผลลบลวงเท่ากับ 3.4 %) อย่างไรก็ตามน้ำ 4 ตัวอย่างนั้นมีค่า 2 MPN/100มล. ซึ่งเกือบเป็น 0 MPN/100มล. อธิบายได้ว่า อาจเป็นแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มชนิดที่สร้างแก๊สแต่ไม่สร้างอินโดล หรือปริมาณน้ำที่ใช้ในวิธีมาตรฐานเท่ากับ 55.5 มล.ซึ่งมากกว่าวิธีอินโดล ที่ใช้เพียงขวดละ 10 มล. 2 ขวด ทำให้มีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียได้มากกว่า

ตัวอย่างประปาที่นำมาตรวจในช่วงนี้ เป็นตัวอย่างน้ำประปาในช่วงมีการรณรงค์ให้ดื่มได้ ดังนั้นจะมีตัวอย่างน้ำที่ค่าฟีคัลโคลิฟอร์มได้ผลบวก มีจำนวนน้อย (28.4 % ของตัวอย่างน้ำทั้งหมด) หากการตรวจตัวอย่างน้ำโดยวิธีมาตรฐาน MTF ได้ผลบวกจำนวนมากอาจจะทำให้การคำนวณชัดเจนและทำให้ค่าความไวของการตรวจสูงขึ้น จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าค่าฟีคัลโคลิฟอร์มของวิธีมาตรฐานตั้งแต่ 4 MPN/100 มล. เป็นต้นไป ผลของวิธีอินโดลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน 100 % ส่วน ค่าฟีคัลโคลิฟอร์ม ≤2 MPN/100 มล. ผลของวิธีอินโดลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน 80 %

Copyright by Mahidol University

อย่างไรก็ตามค่าทางสถิติที่คำนวณ เช่น ความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของการตรวจวัดของวิธีอินโดลได้ค่าเกิน ร้อยละ 80 ขึ้นไปซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีใช้สารเรืองแสงจากผลการศึกษาของ อโณทัย (13) ได้ค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ ร้อยละ 77.5 84.3 และ 81 ตามลำดับ ในการตรวจตัวอย่างน้ำจะเห็นว่าวิธีอินโดลมีความไวมากกว่าวิธีใช้สารเรืองแสง

5.3 ข้อดีข้อเสียของวิธีอินโดล

ข้อดีของวิธีอินโดลใช้เวลาทั้งหมดในการตรวจน้อยกว่าวิธีมาตรฐาน คือประมาณ 48 ชั่วโมงก็สามารถให้ผลบวก ลบได้ ในขณะที่วิธีมาตรฐานใช้เวลาในการตรวจ 48-96 ชั่วโมง วิธีอินโดล ราคาถูกกว่าวิธีมาตรฐานเมื่อเทียบต่อ 1 ตัวอย่าง คือราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 6 บาท ส่วนวิธีมาตรฐานมีราคาอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 13-34 บาท จากผลการศึกษาการตรวจน้ำบริโภคประเภทน้ำประปาในพื้นที่ ได้ผลลบ 61 ตัวอย่างใน 100 ตัวอย่าง หากตรวจโดยวิธีมาตรฐานใน 100 ราย จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1300 - 3400 บาท หากมีการตรวจเบื้องต้นก่อนแม้จะเพิ่มค่าตรวจโดยวิธีอินโดลประมาณ 600 บาท แต่จะสามารถประหยัดรายที่ให้ผลลบไป 61 รายคิดเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 793-2074 บาท นอกจากนั้นวิธีอินโดล ใช้ปริมาณน้ำตัวอย่างและอุปกรณ์น้อยทำให้ลดปริมาณงานที่ทำ สามารถใช้เตรียมเพื่อตรวจตัวอย่างน้ำนอกสถานที่ได้โดยใช้อุปกรณ์ไม่ยุ่งยากนัก และอ่านผลง่ายโดยสังเกตุสีแดงเมื่อหยดน้ำยาเท่านั้น

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน MTF

ข้อเปรียบเทียบ	วิธีอินโดล	วิธีมาตรฐานMTF
1. เวลาที่ใช้ในการตรวจ	48 ชม.	48-96 ชม.
2. ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยา (100 ตัวอย่าง)	600 บาท	1300-3400 บาท (ไม่รวมค่าวัสดุอื่น ๆ)
3. ความสะดวกในการอ่านผล	ง่าย โดยดูสีแดงที่เกิดขึ้นบนชั้นของน้ำยา	รอดูแก๊สที่สร้างขึ้นแล้วเทียบจากตารางดัชนี
4. บุคลากร	บุคลากรทั่วไป	เจ้าหน้าที่เฉพาะที่ฝึกฝนมาแล้ว
5. พื้นที่และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการทำงาน	ใช้พื้นที่น้อย ใช้งานในภาคสนาม ได้ใช้อุณหภูมิห้องในการบ่มเชื้อ	ใช้ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อม ต้องมีตู้บ่มเชื้อที่ได้มาตรฐาน

Copyright by Mahidol University

ข้อเสียของวิธีอินโดลคือ ใช้ตรวจตัวอย่างน้ำแบบวิธีเชิงคุณภาพ คือแบบ พบ ไม่พบเชื้อเท่านั้น ไม่สามารถตรวจเชิงปริมาณได้ น้ำยา Kovac's ต้องเก็บรักษาในตู้เย็น หากมีการนำไปใช้งานในภาคสนาม ควรแบ่งใส่ขวดสีชาขนาดเก็บในกระติกน้ำแข็งให้พอกับการใช้งานในระยะสั้น นอกจากนั้นน้ำยา Kovac's มีกลิ่นฉุน และมีสภาพเป็นกรด ดังนั้นในการใช้งานควรใส่ถุงมือ และหลีกเลี่ยงการสูดคม หลังจากใช้งานเสร็จสิ่งที่เหลือจากการตรวจถือเป็นขยะที่ต้องกำจัดให้ถูกวิธี

สำหรับการตรวจตัวอย่างน้ำประเภทอื่น ๆ ที่มีค่า พีเอช สูงหรือต่ำมาก ๆ ซึ่งผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษาไว้ อย่างไรก็ตามวิธีอินโดลมีบัฟเฟอร์ในตัว จึงไม่น่าจะมีผลมากสำหรับการการเจริญเติบโตของ *E. coli* (ความสามารถในการดำรงชีพของ *E. coli* มีพีเอช 5-9)

แนวทางในการนำไปใช้งานระดับท้องถิ่นนั้น ควรมีการอบรมการใช้สำหรับเจ้าหน้าที่ เช่นอาสาสมัครประจำตำบลหรือหมู่บ้าน ควรเก็บชุดตรวจสอบไว้กับเจ้าหน้าที่ เมื่อมีการใช้งาน ควรแจกจ่ายน้ำยาตรวจสอบให้พอสำหรับการใช้งานในระยะสั้น พร้อมทั้งแนะนำวิธีการใช้การเก็บรักษา สำหรับในบางพื้นที่ที่ฤดูหนาวมีอุณหภูมิต่ำ เช่นภาคเหนือ อาจทำไม่สามารถบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้ อาจแก้ปัญหาโดยการนำไปไว้ในที่อุ่นเช่น ในกล่องใกล้เตาหุงต้มอาหารหรือในกล่องสีดำตั้งไว้กลางแดดในฤดูหนาว ทำให้การตรวจเป็นไปได้ จากนั้นควรมีการเก็บรวบรวมของเหลือจากการใช้งานไว้ที่เดียวกัน เพื่อการกำจัดอย่างถูกวิธี

5.4 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาโดยใช้ตัวอย่างน้ำประเภทอื่นที่นอกเหนือจากน้ำประปา เช่นน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำฝน น้ำบาดาล น้ำบ่อ เป็นต้น
2. ศึกษาทดลองลดส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Beef extract , Bile salt ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนของการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้
3. ศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีตรวจหา *E. coli* ในน้ำบริโภควิธีอื่น ๆ ซึ่งมีผู้ทำวิจัยมาแล้วเช่นโดยวิธีการใช้สารเรืองแสง

Copyright by Mahidol University

รายการอ้างอิง

1. เปี่ยมศักดิ์ มานะเศวต. มลภาวะของแหล่งน้ำ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525:113-21
2. กองอนามัยสิ่งแวดล้อม. กรมอนามัย. สถานการณ์คุณภาพน้ำบริโภคประเทศไทย ตุลาคม 2535-กันยายน 2536 : กระทรวงสาธารณสุข, 2536.
3. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงราย. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การศึกษาคุณภาพน้ำอุปโภค-บริโภคในเขตจังหวัดเชียงรายและพะเยา.วารสารกรมวิทยาศาสตรการแพทย์. 2539;38(3):193-202
4. อรพินทร์ พิทักษ์มหาเกตุ และ อมรา สุนทรธาดา . การศึกษาคุณภาพ ปริมาณ พฤติกรรมการใช้น้ำดื่มของชุมชนชาวไทยในชนบท การวิจัยเชิงคุณภาพ. สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล , พ.ศ. 2529.
5. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. Vol.1. 2nd ed.1993 :8-24.
6. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. เอกสารประกอบแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 พ.ศ. 2540-2544. 2539: 58
7. กรรณิการ์ สิริสิงห์. เคมีของน้ำ น้ำโสโครกและการวิเคราะห์. กรุงเทพมหานคร: บริษัทสารมวลชนจำกัด, 2522: 294-336
8. ฝ่ายวิเคราะห์คุณภาพสิ่งแวดล้อม. กองอนามัยสิ่งแวดล้อม. กรมอนามัย. กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, พิมพ์ครั้งที่ 2 . 2538.
9. American Puplic Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington DC: APHA,1995 :9-1-70.
10. Feng PC and Hartman PA. Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia coli* . Appl. Environ. Microbiol. 1982; 43:1320-9.
11. Edberg SC, Allen MJ, Smith DB. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliform and *Escherichia coli* from drinking water : comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 1988;54: 1595-1601.

Copyright by Mahidol University

12. อาภากร เรียงรุ่งโรจน์. การศึกษาเพื่อประยุกต์วิธีการตรวจหาเชื้อ E. coli ในอาหารด้วย MUG. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สาธารณสุขศาสตร์) สาขาอนามัยสิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.

13. อโนทัย พุ่มอยู่. การตรวจหา *Escherichia coli* ในน้ำดื่มโดยวิธีการเรืองแสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สาธารณสุขศาสตร์) สาขาอนามัยสิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2538.

14. Ley AN, Bowers RJ, Wolfe S. Indoxyl-β-D-glucuronide. A novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichai coli* in environmental samples. Can. J.Microbiol. 1988;34:690-3 .

15. Brenner KP, Rankin CC, Roybal YR, Stelma GN, Scarpino PV, Dufour AP. New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in water. Appl. Environ. Microbiol. 1993 ; 59:3534-44.

16. Ciebin BW, Brodsky MH, Eddington R, Horsnell G, Choney A, Palmateer G, Ley AN, Joshi R, Shears G. Comparative Evaluation of Modified m-FC and m-TEC Media for Membrane Filter Enumeration of *Escherichia coli* in water. Appl. Environ. Microbiol. 1995 ; 61:3940-2.

17. Brenner KP, Rankin CC, Sivaganian M and Scarpino PV. Comparison of the Recoveries of *Escherichia coli* and Total Coliform from Drinking Water by the MI Agar Method and the USEPA Approved Membrane Filter Method . Appl. Environ. Microbiol .1996; 62:203-8.

18. Rice EW, Allen MJ, Edberg SC. Efficacy of β-Glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the Defined Substrate Technology. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56:1203-5.

19. Walter KS , Fricker EJ , Fricker CR . Observation on the use of a medium detecting β-Glucuronidase activity and lactose fermentation for the simultaneous detection of *Escherichia coli* and coliform . Letters in Applied Microbiology . 1994 ; 19: 47-9.

20. American Puplic Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. Washington DC: APHA,1989:9-101-102

21. บัญญัติ สุขศรีงาม. จุลชีววิทยาทั่วไป . กรุงเทพมหานคร: โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์. พิมพ์ครั้งที่ 3, 2534: 166-170.

Copyright by Mahidol University

22. ทวี จิตไมตรี . แบคทีเรียวิทยาทั่วไปและปฏิบัติการสำหรับวิศวกรสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เอส.ดี.เพรส. พิมพ์ครั้งที่ 1, 2529: 173-185.

23. ข้อมูลจากฝ่ายเผยแพร่ข้อมูล กรมอุตุนิยมวิทยา กระทรวงคมนาคม

24. Umbarger H. *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* Cellular and Molecular biology . vol 2 . American society for microbiology D.C., 1996; 1543-1552.

25. Jean F, Mac Fandin. Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Baltmore : Williams & Wilkins, 1980 : 173-181.

26. Edberg SC and Kontnick CM. Comparision of β-Glucuronidase-Based Substrate Systems for Identification of *Escherichia coli* . J. Clin.Microbiol. 1986;24:368-71.

27. Sarhan HR, Foster HA. A rapid fluorogenic method for the detection of *Escherichia coli* by the production of β-glucuronidase. J. of Appl. Bacteriol. 1991; 70 :394-400.

29. วัฒนา เกตุมงคลฉวี. วิธีตรวจฟีคัลโคลิฟอร์มในน้ำอย่างง่าย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาสภาวะแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2533.

30. พัชรี จันลือชัย. การประยุกต์ใช้ H_2S-test ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Enteric bacteria ในน้ำดื่มแบบปริมาณวิเคราะห์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาอนามัยสิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2533.

31. นฤมล ตปนียะกุล. การตรวจสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำบริโภคด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสม กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์,2537.

32. ศิริลักษณ์ โรจนประเสริฐกิจ. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียในอาหารด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SI-2 กับวิธีมาตรฐาน MPN . วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540.

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

อาหารเหลวแลคโทส (Lactose broth)

เนื้อสกัด	3 กรัม
เปปโทน	5 กรัม
แลคโทส	5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

วิธีเตรียมคือ ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกันโดยใช้ความร้อน เมื่ออาหารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันปรับพีเอชให้ได้ค่า 6.9 ±0.2 เตรียมหลอดทดลองขนาด 20 ×150 มม. ใส่หลอดหมักขนาด 6 × 50 มม. ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ในกรณีที่ต้องการอาหารเหลวเข้มข้นเป็น 2 เท่า ให้เพิ่มส่วนประกอบเป็น 2 เท่า

อาหารเหลวอีซีมีเดียม

ทริปโทส	20 กรัม
แลคโทส	5 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	4 กรัม
โพแทสเซียมไฮไดโดรเจนฟอสเฟต	1.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5 กรัม
เกลือไบล์ (Bile Salts No. 3)	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

วิธีเตรียมคือ ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกันโดยใช้ความร้อน ปรับความเป็นพีเอชให้ได้ค่า 6.9 ±0.2 เตรียมหลอดทดลองขนาด 20×150 ม.ม. ใส่หลอดหมักขนาด 6×50 ม.ม. ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารแข็ง Nutrient Agar

วิธีเตรียมคือ ชั่งผง Nutrient agar มา 23 กรัม ใส่น้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายเป็นเนื้อเดียวกันจนหมดด้วยความร้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ที่ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อนำขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 15 มล. เมื่อ Nutrient agar แข็งตัว คว่ำจานลงและทำการเก็บในตู้เย็นใช้สำหรับการเตรียมเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์

Copyright by Mahidol University

Nutrient agar สำหรับใช้เพื่อการทำ Standard plate count โดยการใส่อาหารที่หลอมละลายลงในหลอดปริมาตร 20 มล.จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ ที่ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเหลว Brain Heart Infusion

ชั่งผง Brain Heart Infusion สำเร็จรูป 37 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. จากนั้นแบ่งใส่หลอดขนาด 10X100 มม. หลอดละ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเหลวเปปโทน

ชั่งผงเปปโทน 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 ±0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเหลวประยุกต์ วิธีอินโดล ประยุกต์มาจากอีซีมีเดียม มีส่วนประกอบดังนี้คือ

ทริปโทน (tryptone)	20	กรัม
เนื้อสกัด(beef extract)	3	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	8	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
เกลือไบล์ (bile salt no. 3)	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม คือละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกันโดยใช้ความร้อน เมื่ออาหารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.6 เตรียมขวดแก้วขนาด 24 มล.พร้อมฝาเกลียว ใส่อาหารลงในขวดขวดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

น้ำยา Kovac's

p-Dimetylaminobenzaldehyde	10.0 กรัม
amyl หรือ isoamyl alcohol	150 มล.
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	50 มล.

ละลายสารเคมีด้วย amyl alcohol จนหมด จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ลงไปอย่างช้า ๆ ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชาไว้ในตู้เย็นเป็นสต๊อก ขวดที่ใช้งานเป็นประจำ ควรเป็นขวดสีชาขนาดเล็กที่แบ่งใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย มีฝาเกลียวแบบหยด ก่อนใช้งานควรนำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ข
วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการตรวจวิเคราะห์ต้องเก็บอย่างถูกวิธี เพื่อจะได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ซึ่งแสดงถึงคุณภาพที่แท้จริงของน้ำ ข้อควรพิจารณาในการเก็บตัวอย่างน้ำควรคำนึงถึงอุปกรณ์การเก็บน้ำตัวอย่าง จุดเก็บ วิธีการเก็บ ความถี่ในการเก็บ การเก็บรักษาคุณภาพตัวอย่างน้ำ และการส่งตัวอย่างน้ำเข้าห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

1) ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ควรเป็นขวดแก้วกว้างความจุประมาณ 125 ลูกบาศก์เซนติเมตรพร้อมทั้งฝาจุกแก้ว ผ่านการล้างให้สะอาด คว่ำ หรืออบให้แห้ง ปิดฝาจุกให้สนิทด้วยกระดาษอะลูมิเนียมตั้งแต่ฝาขวดถึงขวดสำหรับจับตอนเปิดหรือบรรจุลงในกระป๋องโลหะ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ขวดเก็บตัวอย่างน้ำต้องปราศจากเชื้อโรคหรือสิ่งเจอปนโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 160°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สำหรับตัวอย่างน้ำประปาหรือน้ำดื่มบางชนิด ที่มีคลอรีนอิสระตกค้างเหลืออยู่ในตัวอย่างน้ำ คลอรีนอิสระตกค้างนี้จะมีผลในการทำลายแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำต่อไป จำเป็นต้องถูกกำจัดเสียโดยการเติมสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ซึ่งมีความเข้มข้น 10% จำนวน 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในขวดเปล่าก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

2) สำลี

3) แอลกอฮอล์ 70%

4) ตะเกียงแอลกอฮอล์

การเลือกจุดเก็บตัวอย่างน้ำ

เนื่องจากแหล่งน้ำมีหลายประเภท การเลือกจุดเก็บเพื่อเป็นตัวแทนที่ดีควรพิจารณาดังนี้

1) น้ำดื่ม ถ้าเป็นระบบประปามีท่อจ่ายน้ำ ควรเก็บตัวอย่างน้ำจากจุดที่น้ำออกจากระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำจากต้นทางท่อจ่ายน้ำและปลายทางท่อจ่ายน้ำ ถ้าระบบท่อจ่ายน้ำมีเส้นท่อแยกออกไปอีก ควรเก็บตัวอย่างที่ท่อจ่ายน้ำที่แยกแขนงออกไปด้วย ถ้าเป็นน้ำจากบ่อตื้นหรือบ่อบาดาล เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อโดยตรง ถ้าจำเป็นให้ใช้ภาชนะที่สะอาดสุ่มเก็บหรือรองรับ แล้วถ่ายใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

2) น้ำดิบเพื่อการประปา เช่น แม่น้ำ ทะเลสาบ ลำธารหรืออ่างเก็บน้ำ เป็นต้น ให้เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณกลางลำน้ำ หรือใกล้จุดสูบน้ำระหว่างความลึก 1 เมตร หรือเท่ากับความลึกของจุดสูบน้ำ

3) น้ำผิวดิน เก็บตัวอย่างน้ำเหนือ ใต้ และบริเวณแหล่งมลภาวะที่บริเวณ 1/4, 1/2 และ 3/4 ของความกว้างของแหล่งน้ำ ในกรณีที่แหล่งน้ำไม่กว้างมาก และต้องการเก็บเพียง 1 ตัวอย่างต่อ 1 จุด ให้เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณกึ่งกลางน้ำที่ระดับความลึกใกล้ผิวน้ำนั้น

วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

<u>เก็บตัวอย่างน้ำจากก๊อก</u>

1) ทำความสะอาดหัวก๊อกโดยใช้ผ้าสะอาดเช็ด

2) ปิดน้ำที่ค้างอยู่ในท่อทิ้งไปก่อนโดยเปิดก๊อกให้น้ำไหลเต็มที่เป็นเวลา 1-2 นาทีแล้วปิดก๊อก

3) ใช้ไฟลนปากก๊อกเพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 1 นาที

4) เปิดก๊อกเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำโดยเปิดให้น้ำไหลปานกลางและทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที

Copyright by Mahidol University

5) บรรจุน้ำตัวอย่างลงในขวดเก็บตัวอย่าง โดยการนำขวดที่บรรจุอยู่ในกระป๋องซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ถือไว้ด้วยมือขวา แล้วคว่ำลงบนมือซ้าย ดึงกระป๋องใบล่างออก จับก้นขวดตั้งขึ้น เปิดจุกขวดโดยจับบนกระดาษอะลูมิเนียม ลนไฟรอบปากขวด นำไปรองน้ำจากก๊อกให้ได้ประมาณ 4/5 ของขวด(ประมาณ 100 มล.) ก่อนปิดจุกลนไฟรอบปากขวดและจุกอีกครั้งหนึ่งปิดจุกให้แน่น แล้วบรรจุลงในกระป๋อง

6) พันรอบต่อของกระป๋องด้วยกระดาษกาวย่น 2-3 รอบ

7) ปิดฉลากให้เรียบร้อย

8) นำกระป๋องบรรจุตัวอย่างน้ำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-10°ซ

9) นำส่งห้องปฏิบัติการทันที

<u>การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป</u>

1) เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตามวิธีในข้อ 5)

2) ถือขวดส่วนล่าง จุ่มลงใต้แหล่งน้ำโดยหันปากขวดสวนทางกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำที่ระดับความลึก 20-30 เซนติเมตร จากผิวน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 4/5 ของขวด ปิดจุกนำขวดตัวอย่างบรรจุในกระป๋องและปิดฉลากข้างกระป๋อง

<u>การเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำ</u>

1) เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตามวิธีในข้างต้น ใช้เชือกผูกขวดและถ่วงติดกับพื้น

2) หย่อนขวดเก็บตัวอย่างลงในบ่อ ระวังอย่างให้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำไปถูกบริเวณขอบบ่อ

3) หย่อนขวดให้จมลงใต้ระดับน้ำที่ความลึกประมาณ 20-30 เซนติเมตร ปล่อยให้น้ำไหลเข้าขวดจนเต็ม

4) ดึงขวดเก็บตัวอย่างน้ำขึ้น เทน้ำส่วนหนึ่งทิ้งให้ระดับน้ำเหลือเพียง 4/5 ของขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ปิดจุกขวดเก็บตัวอย่างน้ำบรรจุในกระป๋องแล้วปิดฉลาก

<u>การเก็บรักษาตัวอย่างน้ำ</u>

ตัวอย่างน้ำที่จะนำไปวิเคราะห์ทางแบคทีเรียจะต้องเก็บรักษาไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพและส่งให้ถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็ว ถ้าตัวอย่างน้ำไม่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ภายใน 1 ชั่วโมง จะต้องเก็บรักษาคุณภาพตัวอย่าง ดังนี้

1) ถ้าการขนส่งไม่เกิน 6 ชั่วโมง ให้แช่ตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 4-10°ซ และเมื่อถึงห้องปฏิบัติการให้แช่เย็นทันทีในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-10°ซ และวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากได้รับตัวอย่างน้ำ

2) ในการขนส่งที่เกิน 6 ชั่วโมง โดยทั่วไปให้วิเคราะห์ในภาคสนามในกรณีที่ไม่มีอุปกรณ์วิเคราะห์ทางภาคสนาม ให้แช่เย็นตัวอย่างน้ำในอุณหภูมิ 4-10°ซ และวิเคราะห์ภายใน 30 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำ

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้น้ำตัวอย่างประเภทน้ำประปา(ข้อมูลดิบ)

ลำดับที่/ระหัสน้ำ	แหล่งที่มา	ฟีคัลโคลิฟอร์ม (MPN/100มล.)	ผล MTF	ผลอินโดล	หมายเหตุ
1 SDW 35	สมุทรปราการ	0	-	-	11 ม.ค. 42
2 SDW 41	,,	0	-	-	
3 SDW 45	นนทบุรี	0	-	-	
4 SDW 46	,,	0	-	-	
5 SDW 47	,,	0	-	-	
6 SDW 48	,,	0	-	+	
7 SDW 49	,,	0	-	+	
8 SDW 50	,,	0	-	-	
9 SDW 51	,,	0	-	+	
10 SDW 52	,,	0	-	+	
11 SDW 53	,,	2	+	+	
12 SDW 54	,,	0	-	-	
13 SDW 55	ปทุมธานี	8	+	+	
14 SDW 56	,,	0	-	-	
15 SDW 57	,,	2	+	+	
16 SDW 58	,,	2	+	+	
17 SDW 59	,,	2	+	+	
18 SDW 60	,,	0	-	-	
19 SDW 61	,,	0	-	-	
20 SDW 62	,,	0	-	+	
21 PWS 10	,,	0	-	-	
22 P 57	,,	0	-	-	
23 P 59	สมุทรปราการ	2	+	+	19 ม.ค. 42
24 P 60	,,	0	-	-	
25 P 61	,,	0	-	-	
26 P 62	,,	0	-	-	
27 P 63	,,	0	-	+	

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 11 (ต่อ) แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้น้ำตัวอย่างประเภทน้ำประปา(ข้อมูลดิบ)

ลำดับที่/ระหัสน้ำ	แหล่งที่มา	ฟีคัลโคลิฟอร์ม (MPN/100มล.)	ผล MTF	ผลอินโดล	หมายเหตุ
28 P 64	„	2	+	+	
29 P 65	„	0	-	-	
30 P 66	„	0	-	+	
31 P 67	„	0	-	+	
32 P 68	„	0	-	-	
33 P 69	„	0	-	-	
34 P 70	„	0	-	-	
35 P 71	„	0	-	-	
36 GWP 6	„	0	-	-	
37 GWP 7	„	0	-	w	
38 RWP 3	„	0	-	-	
39 SDW 63	อยุธยา	2	+	+	8 ก.พ. 42
40 SDW 65	„	0	-	-	
41 SDW 66	„	13	+	+	
42 P 73	„	80	+	+	9 ก.พ. 42
43 P 74	„	2	+	+	
44 P 75	„	0	-	-	
45 P 76	ปทุมธานี	0	-	+	
46 P 77	„	0	-	-	
47 P 78	„	0	-	-	
48 VWS 2	„	0	-	-	
49 P 79	ร.พ. บำราศ	0	-	-	15 ก.พ. 42
50 P 80	„	0	-	-	
51 GWP 8	„	0	-	-	
52 P 81	ปทุมธานี	500	+	+	
53 P 82	„	8	+	+	
54 P 83	„	2	+	-	
55 P 84	„	240	+	+	
56 P 85	„	0	-	-	
57 P 86	„	0	-	-	

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 11 (ต่อ) แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้น้ำตัวอย่างประเภทน้ำประปา(ข้อมูลดิบ)

ลำดับที่/ระหัสน้ำ	แหล่งที่มา	ฟีคัลโคลิฟอร์ม (MPN/100มล.)	ผล MTF	ผลอินโดล	หมายเหตุ
58 SDW 68	,,	2	+	-	
59 SDW 69	,,	2	+	-	
60 SDW 70	,,	0	-	+	
61 SDW 71	,,	0	-	-	
62 SDW 72	นนทบุรี	0	-	-	16 ก.พ. 42
63 SDW 73	,,	0	-	-	
64 SDW 74	,,	0	-	-	
65 SDW 75	,,	0	-	-	
66 SDW 76	,,	0	-	-	
67 SDW 77	,,	0	-	-	
68 SDW 78	,,	0	-	-	
69 SDW 79	,,	0	-	-	
70 SDW 80	,,	0	-	-	
71 SDW 81	,,	0	-	-	
72 P 88	สมุทรปราการ	0	-	-	23 ก.พ. 42
73 P 89	,,	2	+	+	
74 P 90	,,	4	+	+	
75 P 91	,,	0	-	-	
76 P 92	,,	0	-	-	
77 P 93	,,	2	+	+	
78 P 94	,,	0	-	-	
79 P 95	,,	4	+	+	
80 P 96	,,	0	-	-	
81 P 97	,,	0	-	-	
82 P 98	,,	0	-	-	
83 SDW 82	จ. ปทุมธานี	500	+	+	3 มี.ค. 42
84 SDW 83	,,	500	+	+	
85 SDW 84	,,	13	+	+	
86 SDW 85	อยุธยา	300	+	+	
87 SDW 86	,,	0	-	+	

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 11 (ต่อ) แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีอินโดลและวิธีมาตรฐาน ในการตรวจฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้น้ำตัวอย่างประเภทน้ำประปา(ข้อมูลดิบ)

ลำดับที่/ระหัสน้ำ	แหล่งที่มา	ฟีคัลโคลิฟอร์ม (MPN/100มล.)	ผล MTF	ผลอินโดล	หมายเหตุ
88 SDW 87	,,	0	-	-	
89 SDW 88	,,	0	-	+	
90 SDW 89	,,	0	-	+	
91 SDW 90	,,	80	+	+	
92 SDW 91	,,	>1600	+	+	
93 SDW 92	,,	>1600	+	+	
94 SDW 93	,,	50	+	+	
95 SDW 94	ปทุมธานี	0	-	-	9 มี.ค. 42
96 SDW 95	,,	0	-	-	
97 SDW 96	,,	0	-	-	
98 SDW 97	,,	0	-	-	
99 SDW 98	,,	0	-	-	
100 SDW 99	,,	0	-	-	
101 SDW 100	,,	0	-	-	
102 SDW 101	,,	0	-	-	
103 SDW 102	,,	0	-	-	
104 PWS 13	,,	2	+	-	
105 P 99	นนทบุรี	0	-	-	
106 P 100	,,	0	-	w	
107 P 101	,,	2	+	+	
108 P 102	,,	2	+	+	
109 P 103	,,	0	-	-	
110 P 104	,,	0	-	w	
111 P 105	,,	0	-	-	
112 P 106	,,	0	-	-	
113 P 107	,,	0	-	-	
114 P 108	,,	0	-	-	
115 P 109	,,	0	-	-	
116 P 110	,,	2	+	w	

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ง

แสดงกลุ่มแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae

ตารางที่ 12 แสดงกลุ่มแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae

กลุ่มแบคทีเรีย (Tribe)	สกุล (genus)	ชนิด (Species)
Escherichieae	Escherichia	*E. coli*
	Shigella	*S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii , S. sonnei*
Edwardsielleae	Edwardsiella	*E. tarda*
Salmonelleae	Salmonella	*S. typhi , S. paratyphi, S. enteritis ,S. choleraesuis S. typhimurium*
	Arizona	*A. hinshawii*
	Citrobacter	*C. frundii , C. diversus*
Klebsielleae	Klebsiella	*K. pneumoniae , K. ozaenae K. rhinoscleromatis, K. oxytoca*
	Enterobacter	*E. cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans*
	Seratia	*S. marcescens, S. liquefaciens, S. rubdaea*
Proteeae	Proteus	*P. vulgaris, P. mirabillis*
	Providencia	*P. alcalifaciens, P. stuartii P. retteri*
	Morganella	*M. morganii*
Erwinieae	Erwinia	*E. caticida*
Yersinieae	Yersinia	*Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseutuberculosis, Y. ruckeri, Y. entermedia*

ที่มา : APHA ,1989(21)

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก จ
ข้อมูลน้ำด้านต่าง ๆ ที่สำคัญ

สี

สีของน้ำเกิดจากสารละลายที่ละลายในน้ำ เช่นน้ำที่มีปริมาณเหล็กสูงมักมีสีเหลืองอ่อน สีของน้ำมักไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคน้ำ แต่อาจบอกให้ทราบถึงประเภทของสิ่งเจือปนในน้ำ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบท กำหนดให้คุณภาพน้ำบริโภคมีค่าสีไม่เกิน 15 หน่วยแพลททินัมโคบอลท์

ความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างเกิดจาก สารที่ละลายในน้ำแล้วแตกตัวให้อนุมูล กรดด่าง มีค่าตั้งแต่ 0- 14 ในสภาวะเป็นกลาง ค่า พีเอช จะมีค่าเท่ากับ 7 ในน้ำใต้ดินอาจมีพีเอชต่ำกว่า 6 เนื่องจากมี คาร์บอนไดออกไซด์ละลายอยู่ในปริมาณสูง ค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต และมีคุณสมบัติการกัดกร่อนของน้ำ โดยปกติค่า พีเอชเป็นตัวควบคุมการผลิตน้ำประปา ใช้ในการตกตะกอน เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทควรมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-8.5

ความขุ่น

ความขุ่นเกิดจากสารที่ไม่ละลายน้ำขนาดเล็กแขวนลอยในน้ำ อาจเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ก็ได้ มีผลต่อสุขภาพอนามัยน้อย แต่ทำให้น้ำไม่ชวนดื่ม มีผลต่อการกรองทำให้เครื่องกรองอุดตันเร็ว ลดประสิทธิภาพของคลอรีนต่อการฆ่าเชื้อโรคในน้ำ เนื่อจากสารแขวนลอยจะห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำมีค่าความขุ่นได้ไม่เกิน 10 หน่วยเอ็นทียู

ปริมาณสารละลายที่เหลือจากการระเหย

ปริมาณสารละลายที่เหลือจากการระเหย เป็นดัชนีบ่งชี้ว่าในน้ำบริโภคมีสารที่ละลายน้ำเจือปนมากน้อยแค่ไหน สารละลายที่เจือปนได้แก่สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียมในรูปของสารประกอบ ไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต คลอไรด์ ซัลเฟต เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดค่าปริมาณสารละลายที่เหลือจากการระเหยมีค่าไม่เกิน 1000 มิลลิกรัมต่อน้ำบริโภค 1 ลิตร

ความกระด้าง

ความกระด้าง เกิดจากเกลือแคลเซียม และแมกนีเซียม แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ความกระด้างชั่วคราวเกิดจากเกลือไบคาร์บอเนตของแคลเซียม และแมกนีเซียม และความกระด้างถาวร เกิดจากเกลื่อซัลเฟตของ ธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม ความกระด้างมีผลต่อการซักล้าง ทำให้เปลืองสบู่ ทำให้เกิดตะกรันในหม้อน้ำ และทำให้น้ำมีรสเฝื่อน เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดค่า ความกระด้างไม่เกิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

คลอไรด์

คลอไรด์ เกิดจากเกลือคลอไรด์ในธรรมชาติที่ละลายน้ำได้ดี ถ้ามีเกลือคลอไรด์อยู่ในน้ำมาก มักทำให้น้ำไม่ชวนดื่ม แต่ไม่มีผลต่อสุขภาพอนามัย เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีคลอไรด์ได้ไม่เกิน 250 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

Copyright by Mahidol University

ซัลเฟต

ซัลเฟต เกิดจากเกลือแร่ในธรรมชาติทำให้น้ำกระด้างถาวร ถ้ามีซัลเฟตละลายในน้ำมากจะทำให้เกิดท้องร่วงได้ โดยเฉพาะหากมีแมกนีเซียมอยู่ด้วย โดยทั่วไป ซัลเฟตจะมีผลทำให้เกิดรสเค็มได้น้อยกว่าคลอไรด์ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมี ซัลเฟตได้ไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

ฟลูออไรด์

ฟลูออไรด์ เกิดจากแร่ฟลูออไรด์ในธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ ฟลูออร์สปาร์ ไครโอไลท์ และแอพพาไทด์ ซึ่งละลายน้ำได้ดี จึงทำให้พบฟลูออไรด์ในน้ำและอาหารบางชนิดในปริมาณเล็กน้อย ฟลูออไรด์ถ้ามีอยู่ในน้ำเกิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ฟันผิดปกติ ถ้ามีอยู่เกิน 3-8 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้ กระดูกผิดปกติ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีฟลูออไรด์ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไนเตรท

ไนเตรท เกิดจารที่แบคทีเรียบางชนิดย่อยสลายสารอินทรีย์ ในน้ำผิวดินจะพบไนเตรทได้ในปริมาณน้อย แต่น้ำใต้ดินจะพบในปริมาณมากได้ ไนเตรทนอกเหนือจากเกิดจากการเน่าเปื่อยของสิ่งมีชีวิตแล้วยังเกิดจากปุ๋ยที่ใช้ในการเกษตรกรรมและจากน้ำเสียได้ด้วย ไนเตรทมีพิษต่อร่างกายหากอยู่ในน้ำบริโภคปริมาณที่สูง โดยเฉพาะในเด็กทารก ทำให้เป็นโรค Methyemoglobinemia ทำให้ร่างกายขาด ออกซิเจน เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีค่าไนเตรทได้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

เหล็ก

เหล็ก ในน้ำธรรมชาติโดยส่วนใหญ่จะพบเหล็กอยู่ด้วยเสมอ เกิดจากสารประกอบของเหล็กซึ่งละลายน้ำได้ดีในที่ที่มีอากาศน้อย เมื่อสัมผัสกับอากาศจะตกตะกอนเป็นสีน้ำตาลแดง ขุ่นและมีกลิ่น ถ้ามีปริมาณเหล็กมากเกินไป จะทำให้เกิดปัญหาในการซักล้าง และทำให้เกิดกลิ่น รสที่ไม่พึงประสงค์ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีเหล็กได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

แมงกานีส

แมงกานิส เกิดจากสารประกอบแมงกานิสในดิน สามารถละลายน้ำได้ดีในที่ที่มีอากาศน้อย และเมื่อถูกอากาศจะตกตะกอน ในน้ำถ้าพบแมงกานีสมากจะเกิดปัญหาในการซักล้าง เนื่องจากจะทำให้น้ำมีสีและเกาะติดกับภาชนะ และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีค่าแมงกานิสได้ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทองแดง

ทองแดง อาจพบได้ทั้งในน้ำดิบและน้ำประปา อาจพบได้ถ้ามีการเติมเกลือซัลเฟตของทองแดงในการทำน้ำประปา ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้รสชาดไม่ชวนดื่ม ถ้าร่างกายรับทองแดงเข้าไปมาก 60-100 มิลลิกรัม อาจทำให้เกิดผิดปกติกับกระเพาะอาหารได้ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีทองแดงได้ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สังกะสี

สังกะสี มีประโยชน์ต่อร่างกายทางโภชนาการ ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้รสไม่ชวนดื่ม โดยปกติสังกะสีจะเข้าสู่น้ำประปาได้จากการสึกกร่อนของสังกะสี และเข้าสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติได้โดยการทิ้งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีสังกะสีได้ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Copyright by Mahidol University

ตะกั่ว

ตะกั่ว เป็นสารพิษที่มีผลร้ายแรงต่อสุขภาพอนามัย เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกาย เมื่อได้รับสารตะกั่วจำนวนมากในระยะสั้น ๆ จะมีอาการระคายเคืองกระเพาะและลำไส้ ชา เป็นตะคริว กล้ามเนื้ออ่อนเพลีย โลหิตจาง คันตามร่างกาย ถ้าได้รับสารตะกั่วจำนวนน้อย จะสะสมในร่างกาย จะมีอาการเบื่ออาหาร ท้องผูก อ่อนเพลีย เกิดการเสื่อมของสมอง ปวดศรีษะ ปวดเมื่อกล้ามเนื้อ สาเหตุที่มีการเจือปนของตะกั่วในแหล่งน้ำเนื่องมาจาก การปล่อยน้ำเสียของโรงงานหลอมและชุบโลหะ การเชื่อม การบัดกรี จากโรงงานแบตเตอรี จากเหมืองแร่ นอกจากนั้นเกิดจากการเผาไหม้น้ำมันเบนซิน เป็นตะกั่วออกไซด์เกิดน้ำฝนชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ

โครเมี่ยม

โครเมี่ยม เป็นอันตรายต่อคนมาก ทำให้เป็นแผลอักเสบ ปวดตามข้อ มีอาการอ่อนเพลีย เกิดเป็นพิษในเม็ดเลือด ทางเดินหายใจอักเสบ นอกจากนี้ยังเป็นสารก่อกลายพันธ์ และสารก่อมะเร็งอีกด้วย โครเมี่ยมเข้าสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติได้จากการระบายน้ำเสียของโรงงานชุบโลหะ เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีค่าโครเมี่ยมได้ไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

แคดเมียม

แคดเมียม เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูง เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายเพียงเล็กน้อย ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียนอาเจียน มีผลต่อระบบไต ความดันโลหิตสูง เส้นเลือดฝอยแข็งตัว หัวใจวาย เป็นแผลเรื้อรังในปอด ถุงลมโป่งพอง และทำให้กระดูกมีรูปร่างผิดปกติ พบแคดเมียมได้เนื่องจากการปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมประเภททำโลหะผสม ชุบโลหะ เซรามิค อุตสาหกรรมถ่ายรูป โรงงานทำแบตเตอรี โรงงานทำพลาสติก และในปุ๋ยที่ใช้ในเกษตรกรรม เกณฑ์คุณภาพน้ำบริโภคในชนบทกำหนดให้น้ำบริโภคมีแคดเมียมได้ไม่เกิน 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร

Copyright by Mahidol University

อุดตาน สุขุม คุณ มหาวิทยาลัยมหิดล สำนักหอสมุด

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวอรัญญา นนทราช
วัน เดือน ปีเกิด	8 มิถุนายน 2512
สถานที่เกิด	จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น, พ.ศ. 2530-2533 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล, พ.ศ. 2539-2542 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร
ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน	นักเทคนิคการแพทย์ ร.พ. สินแพทย์ นักเทคนิคการแพทย์ ร.พ. วิภาวดี

Copyright by Mahidol University