

Determination of technical measurement uncertainty and method verification for coliform detection using the Multiple Tube Fermentation method in drinking water in sealed containers, ice, and raw water samples

Denchai Wongsrikaew^{1,2}, Mantana Jamklang¹, Chompunoot Wangboon¹,
Pongpat Kiatprasert², Watsana Penkhrue^{1*}

¹School of Preclinical Sciences, Institute of Science, Suranaree University of Technology,
111 University Avenue, Muang, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

²Analytical Laboratory Centre, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin
Campus, 145 Nok Mueang, Mueang Surin 32000, Thailand

*Corresponding author e-mail address: watsana.p@sut.ac.th

Received: 31 May 2025, Revised: 8 April 2026, Accepted: 22 April 2026

Abstract

Coliform bacteria are a group of microorganisms commonly used as bacteriological indicators for assessing the microbiological quality and hygiene of water and food products. However, most laboratories in Thailand still lack verification data for microbiological analytical methods in accordance with ISO 16140-3:2021, which is essential for enhancing laboratory competence and supporting ISO/IEC 17025 accreditation. The determination of the Standard Deviation for Intralaboratory Reproducibility (S_{IR}) and the method verification serves as definitive evidence that a laboratory can competently perform reference methods to ensure accurate and reliable results for clients. This study aimed to evaluate laboratory capability in quantifying coliform bacteria across various water samples, including bottled drinking water, ice, raw water, food-contact surface water, and deionized (DI) water. The evaluation determined the S_{IR} and the Estimated bias (eBias) using the Multiple Tube Fermentation (MTF) method based on ISO 16140-3:2021 protocol for the verification of reference methods in a single laboratory. Three inoculation levels were evaluated: low (1 cfu/mL), medium (10 cfu/mL), and high (20 cfu/mL). The results revealed an overall S_{IR} of 0.14. The eBias values for Group (A) samples were 0.00, 0.30, and 0.05 Log₁₀ MPN/100 mL; for Group (B) samples were 0.18, 0.01, and 0.02 Log₁₀ MPN/100 mL; and for Group (C) samples were 0.12, 0.06, and 0.05 Log₁₀ MPN/100 mL, respectively. The method verification demonstrated that both S_{IR} and the eBias values across all water types complied with the acceptability limit of ≤ 0.5 Log₁₀ MPN/100 mL specified by ISO 16140-3:2021. This confirms that the laboratory can successfully implement the MTF method according to APHA, AWWA, and WEF standards with high accuracy and reliability. Consequently, these findings support the laboratory's application for ISO/IEC 17025:2017 accreditation and demonstrate that this verified MTF technique is highly suitable for drinking water quality surveillance systems to protect public health.

Keywords: Verification ISO 16140, Intralaboratory reproducibility standard deviation, Estimated bias (eBias)

บทคัดย่อ

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bacteriological indicator) ในการตรวจคุณภาพน้ำและอาหาร เพื่อบ่งชี้ถึงสุขอนามัยและคุณภาพของน้ำและอาหารแต่อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลการทวนสอบวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาตามแนวทางของ ISO 16140-3:2021 ซึ่งจำเป็นต่อการยกระดับสมรรถนะห้องปฏิบัติการและการยื่นขอรับรอง ISO/IEC 17025 ทั้งนี้การหาค่าความเบี่ยงเบนของวิธีการทดสอบ (S_{IR}) และการทวนสอบวิธีการทดสอบ (Verification) เป็นการแสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการ สามารถปฏิบัติตามวิธีได้อย่างถูกต้อง และสร้างความมั่นใจแก่ผู้รับบริการว่าจะได้รับผลการทดสอบที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อตรวจสอบความสามารถของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำแข็ง น้ำดิบ น้ำสัมผัสอาหาร น้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI water) โดยการประเมินค่าความเบี่ยงเบนภายในห้องปฏิบัติการ (S_{IR}) และค่าความเอนเอียง (Estimated bias; eBias) ตามแนวทางของมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory ด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation ซึ่งเลือกกระดับการปนเปื้อน 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง ที่ 1 cfu/mL, 10 cfu/mL และ 20 cfu/mL ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าค่าความเบี่ยงเบน (S_{IR}) มีค่าเท่ากับ 0.14 และค่า eBias ของตัวอย่างกลุ่ม (ก) มีค่าเท่ากับ 0.00, 0.30 และ 0.05 Log₁₀ MPN/100 mL ตัวอย่างกลุ่ม (ข) ค่าเท่ากับ 0.18, 0.01 และ 0.02 Log₁₀ MPN/100 mL และตัวอย่างกลุ่ม (ค) มีค่าเท่ากับ 0.12, 0.06 และ 0.05 Log₁₀ MPN/100 mL จากการทวนสอบตัวอย่างน้ำทั้ง 3 ประเภท มีค่า S_{IR} และค่า eBias ไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ ที่ 0.5 log₁₀ MPN/100 mL แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์ม โดยใช้วิธี Multiple Tube Fermentation ตามวิธีมาตรฐานของ APHA, AWWA และ WEF ซึ่งมีผลการทดสอบถูกต้องเป็นที่น่าเชื่อถือและสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการยื่นขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ได้ ดังนั้นวิธีการทดสอบด้วยเทคนิค Multiple Tube Fermentation method จึงเหมาะสมสำหรับการใช้ในระบบเฝ้าระวังคุณภาพน้ำดื่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการประเมินและตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ซึ่งจะช่วยให้มั่นใจได้ถึงความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำแข็ง และน้ำดิบ และมีบทบาทสำคัญในการปกป้องสุขภาพของประชาชนทั้งในระดับชุมชนและระดับประเทศ

คำสำคัญ: ระบบ ISO 16140, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานความสามารถในการทำซ้ำ, การทวนสอบของวิธีวิเคราะห์

1. บทนำ (Introduction)

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีบทบาทสำคัญในการควบคุมความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริโภค เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือถูกต้องและสามารถใช้อ้างอิงได้ในระดับสากล ห้องปฏิบัติการจึงต้องดำเนินงานภายใต้ระบบคุณภาพที่สอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการ Good Laboratory Practice (GLP) และการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ [1] การได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ไม่เพียงแต่แสดงถึงความสามารถในการดำเนินการทดสอบอย่างถูกต้อง แต่ยังแสดงถึงระบบคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ มีการสอบเทียบเครื่องมืออย่างต่อเนื่อง มีการควบคุมเอกสาร และมีบุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรมอย่างเหมาะสม ซึ่งล้วนแล้วแต่ส่งเสริมความเชื่อมั่นจากหน่วยงานกำกับดูแล อุตสาหกรรม และผู้บริโภค [2]

การทวนสอบวิธีทดสอบ (Method verification) เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งครอบคลุมถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการในการดำเนินการทดสอบหรือสอบเทียบด้วยวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน โดยระบุไว้ในข้อกำหนด ข้อ 7.2.1.5 ว่าห้องปฏิบัติการจะต้องทวนสอบว่าสามารถดำเนินการตามวิธีทดสอบได้อย่างถูกต้องก่อนการนำมาใช้ โดยต้องมั่นใจว่าสามารถบรรลุสมรรถนะที่ต้องการและต้องจัดเก็บบันทึกของการทวนสอบระบบภายใต้ ISO/IEC 17025:2017 การทวนสอบวิธีทดสอบหมายถึงกระบวนการแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ (Validated method) สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้บริบทของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ และให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับสมรรถนะที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ (Validation study) การทวนสอบมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่าวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานที่ตั้งไว้และสามารถให้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือได้ในทางปฏิบัติ [3-4] ตามเอกสารแนวทางของ APHA (1998) [5] การทวนสอบวิธีเป็นสิ่งจำเป็นแม้ว่าวิธีทดสอบนั้นจะเป็นวิธีมาตรฐาน (Standard method) ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลก็ตาม เนื่องจากสมรรถนะของวิธีสามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อใช้ในบริบทของห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน เช่น ความชำนาญของผู้วิเคราะห์ เครื่องมือที่ใช้หรือสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ [6] โดยทั่วไปการทวนสอบวิธีมักประกอบด้วย การประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ เช่น ความถูกต้อง (Accuracy) ความแม่นยำ (Precision) ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดการรายงานผล (Limit of quantitation; LOQ) เพื่อตรวจสอบว่าวิธีทดสอบนั้นสอดคล้องกับข้อกำหนดของผู้มาใช้บริหารและมาตรฐานสากล

การตรวจสอบวิธีการทดสอบ (Method verification) ถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการประเมินความเหมาะสมของวิธีทดสอบที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ทั้งในแง่ของความสามารถในการใช้งานจริงและความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบจะดำเนินการผ่านการเปรียบเทียบผลการดำเนินงานที่ได้จากห้องปฏิบัติการกับข้อมูลจากการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ (Validation) ของวิธีนั้น [7] มีแนวปฏิบัติสากลหลายฉบับที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบวิธี เช่น แนวทางที่จัดทำโดย Analytical Laboratory Accreditation Criteria Committee (ALACC) ภายใต้ Official Methods of Analysis of AOAC International โดยแนวทางเหล่านี้มักจะกล่าวถึงลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบ เช่น ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Selectivity) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) [8] อย่างไรก็ตาม แนวทางข้างต้นเน้นในด้านเคมีวิเคราะห์เป็นหลักและมักไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้เหมาะสมกับวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา ซึ่งมีลักษณะของความแปรปรวน

และข้อจำกัดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่น ความไม่แน่นอนในตัวอย่างชีวภาพหรือปริมาณของจุลินทรีย์ที่อยู่ในระดับต่ำหรือไม่สม่ำเสมอ เพื่อตอบสนองความจำเป็นในการตรวจสอบวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา ในปี ค.ศ. 2021 องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization: ISO) ได้เผยแพร่มาตรฐานฉบับใหม่คือ ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory [9] ซึ่งเป็นแนวทางเฉพาะที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหารประเภทเดียว (Single food microbiology laboratory) ได้อย่างเหมาะสม [10] มาตรฐาน ISO 16140-3:2021 ให้อำนาจละเอียดที่ชัดเจนเกี่ยวกับขั้นตอนการทวนสอบวิธีทดสอบในบริบทของห้องปฏิบัติการเดียว โดยเฉพาะสำหรับการทดสอบจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งช่วยให้ห้องปฏิบัติการสามารถประเมินสมรรถนะของวิธีทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้มาแล้ว ว่ายังคงมีความเหมาะสมต่อการใช้งานในบริบทปัจจุบัน

การวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ถือเป็นดัชนีสำคัญที่ใช้ชี้วัดความสะอาดและความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนจากของเสียของมนุษย์และสัตว์ ในบรรดาแบคทีเรียเหล่านี้ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria; TCB) เป็นดัชนีมาตรฐานนิยมในการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนของเชื้อจากอุจจาระและสภาพแวดล้อมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ [11] แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) รูปร่างแท่ง (Rod-shaped) ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobes) และมีความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงมนุษย์และในอุจจาระของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น นอกจากนี้โคลิฟอร์ม (Coliform) บางชนิดยังสามารถพบได้ตามธรรมชาติในดิน น้ำ และพืช ซึ่งทำให้การตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดของการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในวงกว้าง [12] โดยทั่วไปแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria; FCB) เป็นโคลิฟอร์มที่สามารถทนความร้อนได้และพบเฉพาะในระบบทางเดินอาหารและอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่น แบคทีเรียในสกุล *Escherichia* โดยเฉพาะ *E. coli* เป็นตัวแทนที่สำคัญที่สุดของกลุ่มนี้ และถูกใช้เป็นดัชนีชี้ให้เห็นถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในระยะเวลาใกล้เคียงกับเวลาตรวจวัด [13] โคลิฟอร์มที่ไม่ใช่ฟีคัล (non-Fecal Coliform Bacteria) เป็นกลุ่มโคลิฟอร์มที่พบตามธรรมชาติในดินและพืช ตัวอย่างสกุลที่สำคัญ ได้แก่ *Enterobacter* และ *Citrobacter* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์มจากสิ่งแวดล้อม แม้จะไม่ใช่ตัวชี้วัดโดยตรงของการปนเปื้อนจากอุจจาระ แต่ก็สามารถสะท้อนถึงความเสี่ยงด้านสุขลักษณะได้เช่นกัน เนื่องจากแบคทีเรียโคลิฟอร์มมีความง่ายในการตรวจวัดและความสัมพันธ์กับการปรากฏของเชื้อก่อโรค จึงทำให้แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟีคัลโคลิฟอร์มยังคงเป็นพารามิเตอร์หลักในแนวทางการประเมินคุณภาพน้ำดื่มในระดับสากล ซึ่งรวมถึงข้อกำหนดจากองค์การอนามัยโลก (WHO) และหน่วยงานด้านสาธารณสุขของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก [14]

การตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นการตรวจหาแบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของน้ำ มาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ วิธีการหมักแบบหลายหลอด (Multiple-tube Fermentation technique) เป็นการตรวจหาโคลิฟอร์มเชิงปริมาณเพื่อหาความหนาแน่นของโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำและประเมินผ่านตาราง Most Probable Number (MPN) ซึ่งเป็นค่าจากการทดลองและคำนวณผลทางสถิติที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการประมาณจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตัวอย่าง

โดยเฉพาะในกรณีที่มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในระดับต่ำหรือไม่สามารถนับจำนวนได้โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงแบบปกติ วิธีนี้นิยมใช้ในงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่ม น้ำเสีย อาหาร และสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสามารถให้ค่าประมาณของปริมาณจุลินทรีย์ได้แม้ในกรณีที่จุลินทรีย์ไม่สามารถแยกออกเป็นโคโลนีชัดเจนบนอาหารวุ้น [15]

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำแข็ง และน้ำดิบ ด้วยวิธี Multiple-tube Fermentation ให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากลและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และ 2) เพื่อทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธี Multiple-tube Fermentation ในการวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มในตัวอย่างน้ำประเภทต่าง ๆ ด้วยวิธีการประเมินค่าเอนเอียงของผลการวัดโดยประมาณ (eBias) ของวิธีทดสอบตามแนวทางมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 ซึ่งจะช่วยยกระดับความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์และสนับสนุนมาตรการควบคุมคุณภาพด้านความปลอดภัยของน้ำบริโภคในระดับห้องปฏิบัติการ

2. วัสดุและวิธีวิจัย (Materials and methods)

2.1 การเตรียมตัวอย่างการทดสอบ

2.1.1 สำหรับตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำดิบ (น้ำที่ยังไม่ผ่านกระบวนการบำบัด เช่น น้ำจากแม่น้ำ ลำคลอง แหล่งน้ำใต้ดิน หรือน้ำบาดาล ซึ่งมักนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม) น้ำประปา ตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร (น้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารโดยตรง เช่น การล้างวัตถุดิบ ล้างอุปกรณ์ หรือเครื่องมือที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์อาหาร) และตัวอย่างน้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI) ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมีนาคม ถึง เมษายน พ.ศ. 2567 โดยให้เขย่าให้เข้ากันหลาย ๆ ครั้ง หรือเขย่าในแนวระนาบเดียวกันไม่น้อยกว่า 25 ครั้ง หากน้ำเต็มภาชนะให้เทออกเพื่อให้มีพื้นที่พอสำหรับการเขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วให้กรองตัวอย่างปริมาตร 100 mL (ดังแสดงในตารางที่ 1)

2.1.2 สำหรับตัวอย่างน้ำแข็ง ให้เตรียมตัวอย่างโดยแช่ก้อนน้ำแข็งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจากนั้นเปลี่ยนถุงโดยใช้ถุงปลอดเชื้อสวมทับ 2 ชั้น ทูบน้ำแข็งให้เป็นก้อนเล็ก ๆ อย่างเบาเมื่อรองจนกระทั่งน้ำแข็งละลายหรือทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 2-5 °C ภายใน 18 ชั่วโมง หรือละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิไม่น้อยกว่า 45 °C ไม่เกิน 15 นาที จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันก่อน เพื่อใช้กรองตัวอย่างในปริมาตร 100 mL

2.1.3 สำหรับน้ำแข็งหลอด น้ำแข็งก้อนขนาดเล็ก ให้เตรียมตัวอย่างโดยการทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใน 18 ชั่วโมง หรือละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิไม่น้อยกว่า 45 °C ไม่เกิน 15 นาที จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันเพื่อใช้กรองตัวอย่างปริมาตร 100 mL

ตารางที่ 1 ที่มาของแหล่งตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างน้ำ	กระบวนการปรับสภาพเส้นใย
ตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท ตัวอย่างน้ำแข็ง	ตัวอย่างจากผู้ประกอบการผลิตโรงน้ำดื่ม เชิงพาณิชย์และทางสรรพสินค้า
น้ำดิบ	ตัวอย่างจากลำคลอง และแหล่งน้ำใต้ดิน
น้ำประปา	ตัวอย่างจากน้ำประปาในพื้นที่ที่ทำการ การศึกษา
น้ำสัมผัสอาหาร	ตัวอย่างจากโรงงานผลิตอาหาร
น้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI)	ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.2.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY รุ่น SX-700
- 2.2.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Binder รุ่น BD-400
- 2.2.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Quintix 6100-15 TOP ความละเอียด 0.1 mg
- 2.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ SI Analytics รุ่น Lab885
- 2.2.5 ปิเปตต์อัตโนมัติขนาด 1-10 mL และขนาด 10-100 µL ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Research plus
- 2.2.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Safety Cabinet Class II) ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific รุ่น 1300 Series A2
- 2.2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific รุ่น GP20
- 2.2.8 เครื่องเขย่า (Vortex mixer) ยี่ห้อ OniLab รุ่น MX-S
- 2.2.9 Loop เขี่ยเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 µL
- 2.2.10 กระบอกตวงแบบแก้ว (Cylinder) ขนาด 1,000 mL และ 50 mL
- 2.2.11 เครื่องดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto dispenser) ยี่ห้อ Brad รุ่น Dispensette-s
- 2.2.12 ขวดฝาเกลียวขนาด 16x20 mm ที่ผ่านการตรวจสอบสารตกค้างและปราศจากเชื้อ

2.2.13 จานเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อ (Petri dish) ที่ผ่านการตรวจสอบสารตกค้างและปราศจากเชื้อ

2.2.14 หลอดดักก๊าซ Durham tube

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.3.1 Lauryl Tryptose broth (LST) ความเข้มข้น 2 เท่า ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี
- 2.3.2 Brilliant Green Lactose Bile broth 2% (BGLB) ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี
- 2.3.3 EC-MUG medium ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี
- 2.3.4 Tryptic Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี
- 2.3.5 Tryptic Soy Broth (TSB) ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี
- 2.3.6 MacConkey Agar ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมนี

2.4 การเตรียมเชื้อมาตรฐาน

2.4.1 นำเชื้อมาตรฐานกลุ่มที่ 1 [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella aerogenes* (ATCC 13048)], กลุ่มที่ 2 [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)] และกลุ่มที่ 3 [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) และ *Klebsiella aerogenes* (ATCC 13048)] จาก Stock culture มา Streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงใน Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 50 mL บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.4.2 เมื่อครบกำหนดนำ Tryptic Soy Broth (TSB) มาทำการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffered water) ตั้งแต่ 10⁻¹ จนถึง 10⁻⁸ และทำการนับปริมาณเชื้อในช่วงการเจือจางด้วยเทคนิค Pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) นำไปบ่มที่ 35 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.4.3 นับจำนวนโคโลนีบน PCA และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/mL)

2.4.4 ทำการเจือจางเชื้อตั้งต้นของแต่ละกลุ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาณเชื้อรวมกันประมาณ 35-75 cfu/400 mL

2.5 วิธีวิเคราะห์

2.5.1 การวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation technique เพื่อการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty of measurement)

2.5.1.1 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย 1 ตัวอย่าง ปริมาตร 400 mL ผู้ทดสอบแบ่งตัวอย่างเอง คนละ 200 mL

2.5.1.2 ตัวอย่างเดิมเชื้อ ผู้รับผิชอบเตรียมตัวอย่าง อย่างน้อยปริมาณ 1,000 mL ผู้ทดสอบแบ่งตัวอย่างเองคนละ 400 mL จากนั้นผู้รับผิชอบเดิมเชื้อโดยแบ่งเชื้อดังนี้

กลุ่มที่ 1 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella aerogenes* (ATCC 13048)

กลุ่มที่ 2 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

กลุ่มที่ 3 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) และ *Klebsiella aerogenes* (ATCC 13048) ให้ได้ปริมาณเชื้อรวมกันประมาณ 35-75 cfu/400 mL

2.5.1.3 ขั้นตอน Presumptive test ปิเปิดตัวอย่าง 10 mL ลงในหลอด LST broth ความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 10 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ บ่มเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขึ้น และเกิดก๊าซในหลอด ดักก๊าซ ให้อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก หลอดที่ไม่ขึ้น และไม่เกิดก๊าซ ให้นำไปบ่มที่ $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ จนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง และอ่านผลอีกครั้ง จากนั้นนำหลอดที่ให้ผลบวกไปทดสอบต่อในขั้น Confirmed test ต่อไป

2.5.1.4 ขั้น Confirmed test เชี่ยวหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกให้เข้ากัน แล้วถ่ายเชื้อแต่ละหลอด 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB broth หลอดต่อหลอด บ่มเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง สังเกตหลอด BGLB broth ที่ขึ้น และเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ให้อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ แล้วนำจำนวนหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวกไปอ่านค่าจากตาราง Most Probable Number (MPN) ดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่อรายงานผลเป็นค่า MPN/100 mL

2.5.2 การวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation technique เพื่อการประมาณค่า Estimated bias (eBias)

2.5.2.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative microbiological methods) ตามมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 ได้กล่าวถึง non-Challenging food item และ Challenging food item เพื่อใช้ในการยืนยัน (Verification)

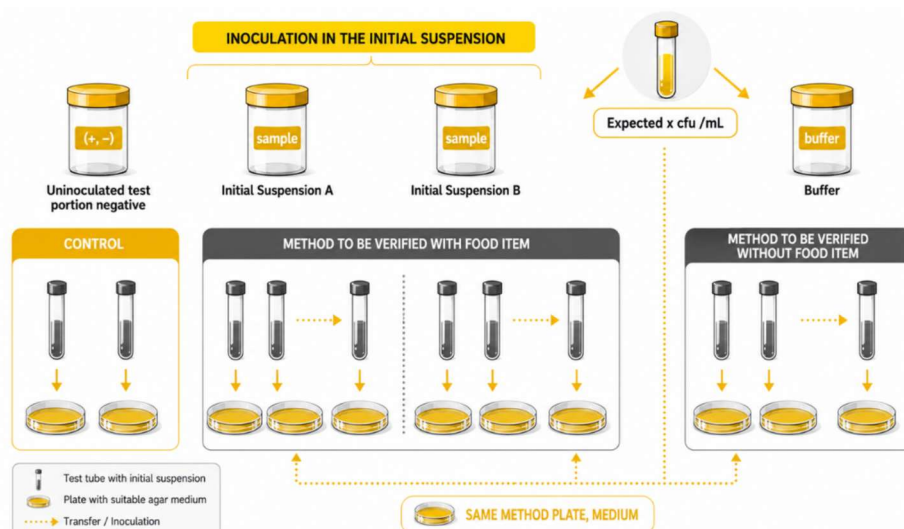
วิธีการในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้ใช้งาน (User laboratory) ต้องเลือกให้ครอบคลุมตามขอบเขตของวิธี (Scope of the method / Scope of validation) โดยทางห้องปฏิบัติการได้เลือกน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตัวอย่างน้ำประปา และตัวอย่าง น้ำ DI เป็นตัวอย่างที่ไม่ทำหายจากกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีอ้างอิงและอยู่ในขอบข่ายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ (non-Challenging food item) และเลือกตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร และน้ำแข็ง เป็นตัวอย่างที่ทำหายจากกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในขอบข่ายของวิธีอ้างอิงและอยู่ในขอบข่ายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ (Challenging food item) กำหนดให้ 1 ตัวอย่างวิเคราะห์โดยผู้ทดสอบ 2 คน (คนที่ 1 กำหนดเป็น A และคนที่ 2 กำหนดเป็น B) ซึ่งเป็นผู้รับผิดชอบเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ โดยระดับการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่าง และสารละลายให้เลือก 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง โดยพิจารณาเชื้อให้ครอบคลุมปริมาณที่พบในการทดสอบในงานประจำ และทำระดับละ 2 ข้ำ ดังแสดงในภาพที่ 1

2.5.2.2 ตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำดิบ น้ำแข็ง น้ำสัมผัสอาหาร น้ำประปา และน้ำ DI ที่มีการปนเปื้อนกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย 1 ตัวอย่าง ปริมาตร 400 mL ผู้ทดสอบแบ่งตัวอย่างเองคนละ 200 mL

2.5.2.3 ตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำดิบ น้ำแข็ง น้ำสัมผัสอาหาร น้ำประปา และน้ำ DI ที่เดิมเชื่อมาตรฐาน กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 โดยผู้รับผิดชอบเตรียมตัวอย่างอย่างน้อย 1,000 mL จากนั้นผู้ทดสอบแบ่งตัวอย่างเองคนละ 400 mL และการเจือจางเชื่อมาตรฐานสำหรับเดิม Spike ลงในตัวอย่างทดสอบ โดยนำเชื่อมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเจือจาง 10^{-8} ซึ่งมีปริมาณเชื้อคาดหวัง 3×10^1 cfu/mL มาทำการเจือจางด้วย Buffered water ให้อยู่ในช่วงที่พบในงานประจำ 3 ระดับ (ต่ำ กลาง สูง) ตามการทดสอบใน Protocol 1 ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนี้

(1) ระดับการปนเปื้อนระดับต่ำ ให้เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 1.5 cfu/mL โดยเริ่มจากการปิเปิดเชื้อตั้งต้นที่ 3×10^1 cfu/mL มาเจือจาง แบบ Ten – Fold dilution ด้วย Buffered water จะได้ปริมาณเชื้อ 3 cfu/mL จากนั้นเจือจางต่อให้สัดส่วนแบบ 1 ต่อ 2 โดยปิเปิดเชื้อจากหลอดที่คาดว่าจะมีปริมาณเชื้อ 3 cfu/mL ปริมาตร 5 mL ใส่ลงใน Buffered water ปริมาตร 5 mL จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 1.5 cfu/mL

(2) ระดับการปนเปื้อนระดับกลาง เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 10 cfu/mL โดยการเจือจาง ให้สัดส่วนแบบ 1 ต่อ 3 เริ่มจากการปิเปิดเชื้อตั้งต้นที่ 3×10^1 cfu/mL ปริมาตร 4 mL ใส่ลงใน Buffered water ปริมาตร 8 mL จะได้ สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาดหวัง 10 cfu/mL



รูปที่ 1 ขั้นตอนการทวนสอบเพื่อหา Estimated bias (eBias)

(3) ระดับการปนเปื้อนระดับสูง เตรียมสารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาคหวัว 20 cfu/mL โดยเริ่มจากการเปิดเชื้อตั้งต้นที่ 3×10^2 cfu/mL มาเจือจางแบบ 1 ต่อ 3 ด้วย Buffered water จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาคหวัว 1×10^2 cfu/mL จากนั้นเจือจางสัดส่วนแบบ 1 ต่อ 5 โดยเปิดเชื้อจากหลอดที่คาดว่าปริมาณเชื้อ 1×10^2 cfu/mL ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน Buffered water ปริมาตร 8 mL จะได้สารละลายที่มีปริมาณเชื้อคาคหวัว 20 cfu/mL

2.5.2.4 การศึกษาครั้งนี้ เป็นการทวนสอบตามรายการ [(Food) Item Verification] เลือกวิธีการที่ใช้ในการทวนสอบจากกลุ่มตัวอย่างห้องปฏิบัติการจำนวน 6 รายการ คือ ตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำดื่มสำหรับบริโภค น้ำประปา และน้ำ DI โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 100 mL/ขวด จำนวน 2 ขวดต่อตัวอย่างที่ทำการทดสอบ เพื่อกำหนดเป็น Test portion A (สำหรับผู้ทดสอบคนที่ 1) และ B (สำหรับผู้ทดสอบคนที่ 2) โดยผู้ทดสอบแต่ละคนทำการเติมเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 mL/ขวด

2.5.2.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับนับจำนวนเชื้อประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 mL ไม่เติมเชื้อ (Negative control) และ สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 mL จำนวน 42 ขวด

2.5.2.6 ขั้นตอน Presumptive test เปิดตัวอย่างปริมาตร 10 mL ลงในหลอด LST broth ความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 10 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °C บ่มเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขึ้น และเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ให้อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก หลอดที่ไม่ขึ้นและไม่เกิดก๊าซ ให้นำไปบ่มที่ 35 ± 0.5 °C จนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง และอ่านผลอีกครั้ง จากนั้นนำหลอดที่ให้ผลบวกไปทดสอบต่อในขั้น Confirmed test ต่อไป

2.5.2.7 ขั้น Confirmed test เขย่าหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกให้เข้ากัน แล้วถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอดปริมาตร 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB broth หลอดต่อหลอด บ่มเพาะเชื้อที่ 35 ± 0.5 °C เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง สังเกตหลอด BGLB broth ที่ขึ้นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ให้อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ แล้วนำจำนวนหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวกไปอ่านค่าจากตาราง Most Probable Number (MPN) ดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่อรายงานผลเป็นค่า MPN/100 mL

2.5.2.8 ดำเนินการทดสอบตาม ข้อ 2.5.2.6 และข้อ 2.5.2.7 จากนั้นประเมินผลการทดสอบจากผลตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ (Negative control) ต้องได้ผลเป็นลบเท่านั้นหากเป็นบวกจะถือว่าทดสอบครั้งนี้ไม่สามารถนำมาใช้ได้ถ้ามีผลเป็นลบให้นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากตัวอย่างที่เติมเชื้อ และสารละลายที่เติมเชื้อ Positive control เปรียบเทียบตารางเพื่ออ่านค่า MPN แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า log (ตารางที่ 2) จากนั้นหาค่าความแตกต่างปริมาณเชื้อระหว่างตัวอย่างที่เติมเชื้อ และสารละลายที่เติมเชื้อทั้ง 3 ระดับ ซึ่งเกณฑ์การยอมรับต้องมีค่าต่างกันไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ cfu/mL

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty of measurement)

จากการวิเคราะห์ Coliform ด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation technique เพื่อการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty of measurement) ซึ่งมาตรฐาน ISO 16140-3 กำหนดว่าผลการทดสอบจะต้องอยู่ในช่วง 6.9-23 MPN Index/100 mL และเกณฑ์การยอมรับได้ต้องมีค่าต่างกันไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ cfu/mL จากการศึกษาตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ก) น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำประปา และน้ำ DI ตัวอย่างน้ำ (ข) น้ำแข็ง และน้ำแข็งยูนิต ตัวอย่างกลุ่ม (ค) ตัวอย่างน้ำดื่มสำหรับบริโภค น้ำบาดาล และน้ำลำคลอง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณ

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย อยู่ในช่วง <1.1 ถึง >23 MPN Index/100 mL (ตารางที่ 3) และต้องตัดผลการทดสอบของตัวอย่างน้ำบางตัวอย่าง เช่น ตัวอย่าง No.1, No.10 และ No.15 เนื่องจากจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก (Positive tube) ในขั้นตอน Confirmed test มีจำนวนน้อยกว่า 5 หลอด หรือมากกว่า 9 หลอด ซึ่งไม่สามารถนำไปคำนวณความแปรปรวนและค่า Log ได้ ดังนั้นข้อมูลผลการทดลองทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (S_{IR}) ของการวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำดื่มสำหรับบริโภค น้ำประปา และน้ำ DI พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.14 ดังแสดงในตารางที่ 4 ค่า S_{IR} จากข้อมูลการวิเคราะห์เท่ากับ 0.14 ซึ่งน้อยกว่า $2S_R$ ของข้อมูล validation report ที่มีค่าน้อยที่สุด Reproducibility standard deviation (Intermediate inoculation level) $S_R = 0.18$ ตาม Validation study ของ ISO 21528-2:2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count technique [16] ซึ่งผ่านเกณฑ์ Acceptability limit และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kemala และคณะ [17] ของดังนั้น ห้องปฏิบัติการสามารถนำผลไปประเมินใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไปได้

3.2 การประมาณค่าการเอนเอียง Estimated bias (eBias)

เนื่องจากห้องปฏิบัติการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory แต่มาตรฐานดังกล่าวไม่ได้ระบุค่าความเอนเอียง (eBias) หรือความจำเพาะความเลือก (Selectivity) ที่ยอมรับได้ (Acceptance criteria) สำหรับวิธีการนั้น ๆ ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องดำเนินการ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยตนเอง (In-house Verification/Validation) โดยการสร้างและประเมินพารามิเตอร์ประสิทธิภาพหลัก ดังนี้ 1) eBias เพื่อประเมินความแม่นยำ (Trueness) 2) วิธี S_{IR} (Selectivity Index Ratio) เพื่อประเมินความสามารถในการจำเพาะเจาะจงต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้กลุ่มสารละลายบัฟเฟอร์ (B*) เป็น Negative control เพื่อยืนยันความปลอดเชื้อของสารละลายเจือจางและอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยืนยันความปลอดเชื้อ (Sterility check) หากพบการเจริญในกลุ่ม B* ชุดการทดลองนั้นจะถูกปฏิเสธ (Rejected) และไม่นำไปคำนวณค่า eBias จากการศึกษาค่า Estimated bias (eBias) ของการวิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรีย น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท

ตารางที่ 2 ค่า MPN, 95% Confidence Limits, และค่า $\log_{10}$ MPN สำหรับผลบวก และผลลบเมื่อใช้ตัวอย่าง 10 mL จำนวน 10 หลอด

No. of Positive tubes (10 mL Each)	MPN Index/100 mL	95% Confidence Limits (Exact)		$\log_{10}$ MPN
		Lower	Upper	
0	<1.1	-	3.4	NA
1	1.1	0.051	5.9	0.0414
2	2.2	0.37	8.2	0.3424
3	3.6	0.91	9.7	0.5563
4	5.1	1.6	13	0.7076
5	6.9	2.5	15	0.8388
6	9.2	3.3	19	0.9638
7	12	4.8	24	1.0792
8	16	5.8	34	1.2041
9	23	8.1	53	1.3617
10	>23	13	-	NA

น้ำดิบ น้ำแข็ง และตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร น้ำ DI ด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation technique โดยแสดงตามตารางที่ 6 การคำนวณค่าของ eBias ที่ระดับการปนเปื้อนระดับสูง ระดับกลาง และระดับต่ำ คือ 20, 10 และ 1 CFU/mL ตามลำดับ พบว่าผลการประมาณ eBias ในตัวอย่างน้ำ 3 กลุ่ม ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ก) น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำประปา และน้ำ DI ตัวอย่างน้ำ (ข) น้ำแข็ง และน้ำแข็งยูนิท และตัวอย่างกลุ่ม (ค) ตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร น้ำบาดาล และน้ำลำคลอง ดังตารางที่ 7 โดยผลการทดสอบ

ค่าตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ก) มีค่า eBias value เท่ากับ 0, 0.3 และ 0.05 ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ข) มีค่า eBias value 0.18, 0.01 และ 0.02 และตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ค) มีค่า eBias value 0.12, 0.06 และ 0.05 ตาม ISO16140-3:2021 กำหนดให้ Acceptability limit คือ ค่า Absolute difference (eBias) ต้องไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับโคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation technique ที่ถูกทวนสอบจึงสามารถนำไปใช้ได้อย่างถูกต้องในห้องปฏิบัติการที่ทำการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 แสดงการคำนวณ S_{IR} ของ MPN Coliforms ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการศึกษา

No.	Laboratory sample (i)*	Sample type**	Test portion (j)	No. Positive tube	Coliforms MPN result in 100 mL (x_j)
1	1	น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท	A	3	3.6
	1		B	3	3.6
2	2	น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท	A	5	6.9
	2		B	9	23
3	3	น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท	A	5	6.9
	3		B	5	6.9
4	4	น้ำแข็ง	A	8	16
	4		B	7	12
5	5	น้ำแข็ง	A	7	12
	5		B	6	9.2
6	6	น้ำแข็ง	A	6	9.2
	6		B	5	6.9
7	7	น้ำสัมผัสอาหาร	A	6	9.2
	7		B	5	6.9
8	8	น้ำสัมผัสอาหาร	A	5	6.9
	8		B	7	12
9	9	น้ำสัมผัสอาหาร	A	6	9.2
	9		B	7	12
10	10	น้ำ DI	A	0	<1.1
	10		B	0	<1.1
11	11	น้ำ DI	A	6	9.2
	11		B	8	16
12	12	น้ำ DI	A	7	12
	12		B	8	16
13	13	น้ำประปา	A	7	12
	13		B	6	9.2
14	14	น้ำประปา	A	6	9.2
	14		B	6	9.2

No.	Laboratory sample (i)*	Sample type**	Test portion (j)	No. Positive tube	Coliforms MPN result in 100 mL (x_{ij})
15	15	น้ำประปา	A	10	>23
	15		B	10	>23
16	16	น้ำแข็งยูนิต	A	7	12
	16		B	5	6.9
17	17	น้ำแข็งยูนิต	A	7	12
	17		B	5	6.9
18	18	น้ำแข็งยูนิต	A	6	9.2
	18		B	5	6.9
19	19	น้ำบาดาล	A	8	16
	19		B	8	16
20	20	น้ำบาดาล	A	8	16
	20		B	9	23
21	21	น้ำบาดาล	A	8	16
	21		B	9	23

*Laboratory sample (i) หมายถึง ตัวเลขแสดงลำดับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

**Test portion (j) หมายถึง ผู้ทดสอบตัวอย่างโดย A คือผู้ทดสอบคนที่ 1 และ B คือผู้ทดสอบคนที่ 2

ตารางที่ 4 การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (S_{IR})

No.	Laboratory sample	Sample type	Test portion (j)	No. Positive tube	Coliforms MPN result in 100 mL	$\log_{10}$ coliforms MPN/ 100 mL $y_{ij} = \log 10 (x_{ij})$	Difference $\log_{10}$ coliforms MPN/ 100 mL $y_{iA} - y_{iB}$	Squared differences $(y_{iA} - y_{iB})^2$
1	2	น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท	A	5	6.9	0.8388	0.5229	0.2734
	2		B	9	23	1.3617		
2	3	น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท	A	5	6.9	0.8388	0.0000	0.0000
	3		B	5	6.9	0.8388		
3	4	น้ำแข็ง	A	8	16	1.2041	-0.1249	0.0156
	4		B	7	12	1.0792		
4	5	น้ำแข็ง	A	7	12	1.0792	-0.1154	0.0133
	5		B	6	9.2	0.9638		
5	6	น้ำแข็ง	A	6	9.2	0.9638	-0.1250	0.0156
	6		B	5	6.9	0.8388		
6	7	น้ำดื่มบรรจุขวด	A	6	9.2	0.9638	-0.1250	0.0156
	7		B	5	6.9	0.8388		
7	8	น้ำดื่มบรรจุขวด	A	5	6.9	0.8388	0.2404	0.0578
	8		B	7	12	1.0792		

No.	Laborator y sample	Sample type	Test portion (j)	No. Positive tube	Coliforms MPN result in 100 mL	Log ₁₀ coliforms MPN/ 100 mL $y_{ij} = \log 10 (x_{ij})$	Difference $\log_{10}$ coliforms MPN/ 100 mL $y_{iA} - y_{iB}$	Squared differences $(y_{iA} - y_{iB})^2$
8	9	น้ำส้มผัสดอาหาร	A	6	9.2	0.9638	0.1154	0.0133
	9		B	7	12	1.0792		
9	11	น้ำ DI	A	6	9.2	0.9638	0.2403	0.0577
	11		B	8	16	1.2041		
10	12	น้ำ DI	A	7	12	1.0792	0.1249	0.0156
	12		B	8	16	1.2041		
11	13	น้ำประปา	A	7	12	1.0792	-0.1154	0.0133
	13		B	6	9.2	0.9638		
12	14	น้ำประปา	A	6	9.2	0.9638	0.0000	0.0000
	14		B	6	9.2	0.9638		
13	16	น้ำแข็งยูนิต	A	7	12	1.0792	0.2404	0.0578
	16		B	5	6.9	0.8388		
14	17	น้ำแข็งยูนิต	A	7	12	1.0792	0.2404	0.0578
	17		B	5	6.9	0.8388		
15	18	น้ำแข็งยูนิต	A	6	9.2	0.9638	0.1250	0.0156
	18		B	5	6.9	0.8388		
16	19	น้ำบาดาล	A	8	16	1.2041	0.0000	0.0000
	19		B	8	16	1.2041		
17	20	น้ำบาดาล	A	8	16	1.2041	-0.1576	0.0248
	20		B	9	23	1.3617		
18	21	น้ำลำคลอง	A	8	16	1.2041	-0.1576	0.0248
	21		B	9	23	1.3617		
SUM =								0.6624
$0.6624/(2 \times 18) =$								0.0184
$S_{IR} \sqrt{0.0184} =$								0.14

ตารางที่ 5 ผลของค่า S_{IR} เปรียบเทียบกับค่า S_R จาก ISO 21528-2:2017

Food item	S_{IR} Value	The mean value of SR ISO 21528-2:2017
Pasteurized Milk Acceptance Criteria	0.14	0.18
		$S_{IR} \leq 2 \times 0.18$ $0.14 < 0.36$ (Comply with the requirement)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบแสดงค่าเฉลี่ย และ $\log_{10}$ ของ ผลการทดสอบหาปริมาณ Coliforms (MPN/100 mL) และแสดงค่า Estimated bias (eBias)

Infection concentration level	Test portion	Test results			eBias = $ \bar{y}_{item} - \bar{y}_{control} $	Acceptance results
		Coliforms MPN result in 100 mL	Mean	$\bar{y}$ = Log ₁₀ Mean MPN/100 ml		
Low (B*) (1 cfu/mL)	A	1.1	1.65	0.22	0.00	pass
	B	2.2				
Intermediate (B*) (10 cfu/mL)	A	6.9	8.05	0.90	0.00	pass
	B	9.2				
High (B*) (20 cfu/mL)	A	23	17.50	1.24	0.00	pass
	B	12				
Low (n) (1 cfu/mL)	A	1.1	1.65	0.22	0.00	pass
	B	2.2				
Intermediate (n) (10 cfu/mL)	A	16	16.00	1.20	0.30	pass
	B	16				
High (n) (20 cfu/mL)	A	23	19.50	1.29	0.05	pass
	B	16				
Low (๗) (1 cfu/mL)	A	1.1	1.10	0.04	0.18	pass
	B	1.1				
Intermediate (๗) (10 cfu/mL)	A	6.9	8.05	0.91	0.01	pass
	B	9.2				
High (๗) (20 cfu/mL)	A	16	16.00	1.20	0.02	pass
	B	16				
Low (๘) (1 cfu/mL)	A	2.2	2.20	0.34	0.12	pass
	B	2.2				
Intermediate (๘) (10 cfu/mL)	A	9.2	9.20	0.96	0.06	pass
	B	9.2				
High (๘) (20 cfu/mL)	A	16	19.50	1.29	0.05	pass
	B	23				
uninoculated	<1.1					

โดยที่ $\bar{y}_{item}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากตัวอย่างน้ำที่เติมเชื้อ (Inoculated/Spiked Food Item) ที่แปลงเป็นค่า $\log_{10}$

$\bar{y}_{control}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติมเชื้อ (Positive Control/Reference Value) ที่แปลงเป็นค่า $\log_{10}$

ตารางที่ 7 ค่า eBias ตัวอย่างน้ำ (Food Item Verification)

Food Item	eBias value		
	Low	Medium	High
ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ก) น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำประปา และน้ำ DI	0.00	0.30	0.05
ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ข) น้ำแข็ง และน้ำแข็งยูนิท	0.18	0.01	0.02
ตัวอย่างน้ำกลุ่ม (ค) ตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร น้ำบาดาล และน้ำลำคลอง	0.12	0.06	0.05

4. สรุป (Conclusion)

จากการหาความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิค Technical uncertainty และการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับตรวจสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำดิบ น้ำแข็ง และตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร และน้ำ DI โดยอาศัยวิธี Multiple Tube Fermentation (MTF) ตามมาตรฐาน APHA (2017) ซึ่งตัวอย่างน้ำที่นำมาใช้ในการทวนสอบเป็นการสุ่มเก็บจากพื้นที่ศึกษา และได้มีการเติมเชื้ออ้างอิงในระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับสูง ระดับกลาง และระดับต่ำ เพื่อตรวจสอบความสามารถของห้องปฏิบัติการในการดำเนินการตามวิธีทดสอบดังกล่าวกระบวนการทวนสอบดำเนินการภายใต้แนวทางของมาตรฐาน ISO 16140-3:2021 ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติสำหรับการทวนสอบวิธีที่ยังไม่ผ่านการรับรองในห้องปฏิบัติการเดี่ยว (Single-laboratory verification) โดยใช้ค่าความเอนเอียงโดยประมาณ Estimated bias (eBias) เป็นดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ ผลการทวนสอบพบว่าในตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท น้ำดิบ น้ำแข็ง ตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร และน้ำ DI มีค่าการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน S_{IR} เท่ากับ 0.14 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การทวนสอบวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (Verification of microbiological method) เป็นการทดสอบเชิงปริมาณแบบ non-Validated reference method ซึ่งน้อยกว่า $2S_{IR}$ ของข้อมูล ที่มีค่าน้อยสุด จึงผ่านเกณฑ์ Acceptability limit และค่า eBias ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง (ก), (ข) และ (ค) ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำ กลาง และสูง มีค่าความเอนเอียงที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์การยอมรับ (Acceptability limit) ที่กำหนดไว้ไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ MPN/100 mL (ISO 16140-3:2021) แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการทดสอบตามวิธีการดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ ผลการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงกับค่าจริงของปริมาณเชื้อที่เติมในตัวอย่าง ซึ่งสะท้อนถึงความแม่นยำและความเที่ยงตรงของกระบวนการวิเคราะห์

ดังนั้น วิธีการ Multiple Tube Fermentation technique นี้สามารถนำไปใช้ในระบบเฝ้าระวังด้านความปลอดภัยของน้ำบริโภค เพื่อประเมินและติดตามการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยเสริมสร้างความมั่นใจในคุณภาพน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำดิบ ตัวอย่างน้ำสัมผัสอาหาร และน้ำ DI ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการคุ้มครองสุขภาพของประชาชนในระดับชุมชนและประเทศ

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้สนับสนุนความวิจัยขอขอบคุณ (1) ศูนย์ทดสอบทางวิทยาศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (2) ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (3) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์

วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) และ (4) กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) (NRIS number: 160348)

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Jena GB, Chavan S. Implementation of Good Laboratory Practices (GLP) in basic scientific research: Translating the concept beyond regulatory compliance. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017;89:20-25. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.010>
- [2] Anastasopoulos G. The new ISO/IEC 17025:2017. *CAL LAB: The International Journal of Metrology*. 2017;30-35.
- [3] Trishch R, Maletska O, Hrinchenko H, Artiukh S, Burdeina V, Antonenko N. Development and validation of measurement techniques according to ISO/IEC 17025:2017. In: 2019 IEEE 8th International Conference on Advanced Optoelectronics and Lasers (CAOL); 2019 Sep 6–8; Sozopol, Bulgaria. p. 1-6. <https://doi.org/10.1109/CAOL46282.2019.9019539>
- [4] Mehta B. Implementing ISO/IEC 17025:2017. 2nd ed. Milwaukee: ASQ Quality Press; 2019.
- [5] American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and waste water. 20th ed. Washington (DC): APHA; 1998.
- [6] American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and sewage. 2nd ed. New York: APHA; 1912.
- [7] Lombard B. ISO Standardization and validation of reference testing methods—Validation of alternative methods in food microbiology. *Japanese Journal of Food Microbiology*. 2010;27(1):8-20. <https://doi.org/10.5803/jsfm.27.8>
- [8] Honsa JD, McIntyre DA. ISO 17025: Practical benefits of implementing a quality system. *Journal of AOAC International*. 2003;86(5):1038-1044. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.5.1038>
- [9] International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. (ISO 16140-3:2021). Geneva: ISO; 2021.
- [10] Lombard B, Leclercq A. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140

- standard. Food Analytical Methods. 2011;4:163-172.
<https://doi.org/10.1007/s12161-010-9154-4>
- [11] Paruch AM, Mæhlum T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. Ecological Indicators. 2012;23:140-142.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.03.026>
- [12] Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology. 2000;88(S1):106S-116S.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>
- [13] Leclerc H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. Annual Reviews of Microbiology. 2001;55:201-234.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.201>
- [14] World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality: Incorporating the first and second addenda. Geneva: WHO; 2022.
- [15] Ahmed T, Baidya S, Acharjee M, Rahman T. Qualitative analysis of drinking water through the most probable number (MPN) method. Stamford Journal of Microbiology. 2013;3(1):9-16.
<https://doi.org/> <https://doi.org/10.3329/sjm.v3i1.22745>
- [16] International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique. (ISO 21528-2:2017). Geneva: ISO; 2017.
- [17] Nagur KS, Surati S, Sitorus AAM, Cahyaningsih E, Putri F, Wilasti Y. Implementation of ISO 16140-3:2021 for enumeration of Enterobacteriaceae in food products. Journal of Food and Drug Safety. 2023;4(1):88-96.
<https://doi.org/10.54384/eruditio.v4i1.195>