Drinking water

คู่มือการปฏิบัติงาน

เรื่อง การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภค ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร

ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงานนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานของผู้รับผิดชอบและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง โดยเนื้อหาจะประกอบด้วยการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในน้ำที่ใช้สำหรับบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ที่มีคุณลักษณะเป็นไปตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ การอ่านผลการวิเคราะห์และรายงานผลการวิเคราะห์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์พร้อมวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งเสริมเทคนิควิธีในการสุ่มเก็บตัวอย่างและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภคสำหรับการส่งตรวจวิเคราะห์มาโดยสังเขป

ผู้จัดทำหวังว่าคู่มือการปฏิบัติงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่สนใจ หรือผู้ที่สนใจทั้งในและนอกภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทั้งผู้ที่ไม่เคยได้มีการเรียนรู้มาก่อนหรือผู้ที่มีความรู้พื้นฐานงานทางด้านการปฏิบัติงานทางจุลินทรีย์เบื้องต้น สามารถใช้คู่มือนี้ให้เกิดประโยชน์ได้ไม่มากก็น้อย หากท่านมีข้อเสนอแนะหรือพบข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สาวิณี ปฐมสุริยะพร
ผู้จัดทำ
พฤษภาคม 2566

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

คำนำ **ก**

สารบัญ **ข**

สารบัญรูป **ง**

สารบัญตาราง **ฉ**

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.4 ขอบเขตของคู่มือ 2

1.5 คำจำกัดความเบื้องต้น 3

บทที่ 2 โครงสร้างและบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ **4**

2.1 ประวัติความเป็นมาและข้อมูลเกี่ยวกับคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 4

2.2 ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ และเป้าหมาย 5

2.3 โครงสร้างการบริหารองค์กร 6

2.4 หน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งตามที่ได้รับมอบหมาย 9

บทที่ 3 หลักเกณฑ์และข้อควรระวังในการทำปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา **11**

3.1 กฎระเบียบที่เกี่ยวข้อง 11

3.2 จรรยาบรรณวิชาชีพ 15

3.3 หลักการปฏิบัติงาน PDCA 16

บทที่ 4 ขั้นตอนการปฏิบัติงานและการตรวจวิเคราะห์ **17**

4.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน 18

4.2 วิธีการและรายละเอียดการปฏิบัติงาน 21

หน้า

4.2.1 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยวิธี Most Probable Number (MPN) 22

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) 30

4.2.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) 34

4.3 การติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน 52

บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรค ข้อเสนอแนะ และการพัฒนางาน 54

5.1 ปัญหา/อุปสรรค แนวทางแก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงานและการพัฒนางาน 54

5.2 ข้อเสนอแนะ 56

บรรณานุกรม 57

ประวัติผู้เขียน 61

ภาคผนวก 62

- ภาคผนวก 1 สรุปประกาศและเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพเกี่ยวกับน้ำบริโภค น้ำบาดาลที่ใช้บริโภค น้ำประปาดื่มได้ และน้ำแข็ง **63**
- ภาคผนวก 2 รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี Most Probable Number (MPN) **66**
- ภาคผนวก 3 รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็ง ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) **74**
- ภาคผนวก 4 รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) **83**
- ภาคผนวก 5 เทคนิควิธีในการสุ่มเก็บตัวอย่างและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภคสำหรับการส่งตรวจวิเคราะห์ **88**

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ความเข้มข้น 2 เท่า ในหลอดทดลอง 22

รูปที่ 2 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB ในหลอดทดลอง 23

รูปที่ 3 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium ในหลอดทดลอง 23

รูปที่ 4 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar ในจานเพาะเชื้อ 24

รูปที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ในจานเพาะเชื้อ 24

รูปที่ 6 แสดงอาหาร Tryptone broth ในหลอดทดลอง 25

รูปที่ 7 แสดงอาหาร MR-VP broth ในหลอดทดลอง 25

รูปที่ 8 แสดงอาหาร Simmons citrate agar slant ในหลอดทดลอง 26

รูปที่ 9 แสดงชุดน้ำยาทดสอบ IMViC test 26

รูปที่ 10 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar ในจานเพาะเชื้อ 31

รูปที่ 11 แสดงลักษณะ Egg yolk Tellurite Emulsion 31

รูปที่ 12 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ในหลอดทดลอง 31

รูปที่ 13 แสดงอาหารเหลว Buffered Peptone Water ในขวดดูแรน 34

รูปที่ 14 แสดงอาหารเหลว RVS Broth ในหลอดทดลอง 35

รูปที่ 15 แสดงอาหารเหลว MKTTn Broth ในหลอดทดลอง 35

รูปที่ 16 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar ในจานเพาะเชื้อ 36

รูปที่ 17 แสดงอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar slant 36

รูปที่ 18 แสดงลักษณะของ *E. coli* บนอาหาร EMB agar 67

รูปที่ 19 แสดงผลการทดสอบ Indole production test (I) ที่ให้ผลบวกและผลลบ 67

รูปที่ 20 แสดงผลการทดสอบ MR test (M) ที่ให้ผลบวกและผลลบ 67

รูปที่ 21 แสดงผลการทดสอบ VP test (Vi) ที่ให้ผลบวกและผลลบ 68

รูปที่ 22 แสดงผลการทดสอบ Citrate utilization test (C) ที่ให้ผลบวกและผลลบ 68

รูปที่ 23 แสดง Coagulase plasma, rabbit with EDTA ที่พร้อมใช้งาน 74

รูปที่ 24 แสดงการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอดของการทดสอบ Coagulase 75

หน้า

รูปที่ 25 แสดงชุดสีย้อมแกรม (Gram stain set) 76

รูปที่ 26 แสดงวิธีการเกลี่ยเชื้อ (smear preparation) 77

รูปที่ 27 แสดงการเตรียมอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค 79

รูปที่ 28 แสดงลักษณะเชื้อบนแผ่นกรองต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นบนอาหาร BP agar 79

รูปที่ 29 แสดงลักษณะโคโลนี *S. aureus* บน BP agar 80

รูปที่ 30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ oil immersion objective ของ *S. aureus* ที่กำลังขยาย 1000X 80

รูปที่ 31 แสดงผลการทดสอบ Coagulase test 80

รูปที่ 32 แสดงลักษณะของอาหารเอียงที่บรรจุในหลอดทดลอง และการ stab & streak ด้วยวิธี aseptic technique 83

รูปที่ 33 แสดงลักษณะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในอาหาร TSI agar slant 83

รูปที่ 34 แสดงลักษณะ *Salmonella* spp. จากการทดสอบด้วยอาหาร TSI agar slant 84

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1.2 แสดงสมรรถนะในการปฏิบัติงานและมาตรฐานการปฏิบัติงาน 12

3.3 แสดงหลักการปฏิบัติงาน PDCA 16

4.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงานและรายละเอียดการปฏิบัติงาน 18

4.3 ตารางการติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน 52

5.1 แสดงปัญหา/อุปสรรค แนวทางแก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงานและการพัฒนางาน 54

ผ.1 สรุปประกาศและเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพเกี่ยวกับน้ำบริโภค น้ำบาดาลที่ใช้บริโภค น้ำประปาดื่มได้ และน้ำแข็ง ที่เกี่ยวข้อง 63

ผ.2.1 แสดงค่า Most Probable Number (MPN) ทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด รายงานผลเป็น หน่วย MPN/100 มิลลิลิตร 66

ผ.2.2 แสดงผลการทดสอบ IMViC ของ Coliforms Bacteria 68

ผ.4 การอ่านและแปลผลการทดสอบของอาหาร TSI agar slant 84

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาเป็นงานบริการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาที่เป็นหนึ่งในพันธกิจของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อพัฒนาและเสริมสร้างคุณภาพชีวิตแก่ชุมชน ภาควิชาจุลชีววิทยาให้บริการแก่องค์กรทั้งภาครัฐและภาคเอกชนในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำ เครื่องดื่ม อาหาร ยา สมุนไพรและวัสดุอื่นๆ นอกจากนี้ ได้มีการบูรณาการการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยากับการเรียนการสอนและงานวิจัย ทั้งการให้บริการการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำและอาหาร (มาตรฐานตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุขในการขอใบอนุญาตจากองค์การอาหารและยา (อย.) แก่หน่วยงานภายนอก)

น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทเป็นน้ำดื่มที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เพราะมีความสะดวกในการใช้และมีความรู้สึกว่าปลอดภัยจากการดื่มน้ำที่บรรจุในขวด การน้ำดื่มเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อทั้งมนุษย์และสัตว์สิ่งมีชีวิตต้องดื่มอย่างน้อยวันละ 8 แก้วต่อวันแก้วละ 240 มิลลิลิตร โดยกฎหมายประเทศไทยเกี่ยวกับการจัดหาน้ำดื่มในบ้านเรือน โรงงานหรือสถานประกอบกิจการ มีการกำหนดเกี่ยวกับคุณภาพน้ำดื่มไว้ กล่าวคือ กระทรวงอุตสาหกรรมได้กำหนดให้จัดน้ำสะอาดสำหรับดื่มตามมาตรฐานน้ำบริโภค อ้างอิงตามเกณฑ์มาตรฐานเกี่ยวกับคุณภาพน้ำดื่มระดับสากล ที่สำคัญคือ WHO Guideline for drinking – water quality ขององค์การอนามัยโลก (ปราโมช, 2560) ซึ่งการตรวจสอบคุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงความสกปรกของน้ำ น้ำดื่มในประเทศไทยได้มาจากแหล่งน้ำบาดาล และน้ำประปาที่กรองผ่านขั้นถ่านเพื่อดูดกลิ่น ตามด้วยการผ่านเรซินเพื่อลดความกระด้างและสารอื่น ๆ และขั้นตอนสุดท้ายคือ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียที่อาจจะปนเปื้อนมากับน้ำ ด้วยการผ่านแสงอัลตราไวโอเลตหรือโอโซน และเนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร หากคุณภาพน้ำที่บริโภคไม่เหมาะสมทางด้านคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาก็อาจจะทำให้เกิดโรคทั้งแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง เช่น โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (acute diarrhea) โรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (severe diarrhea) โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โรคบิด (dysentery) ซึ่งเชื้อก่อโรคที่มักจะเป็นสาเหตุของโรคที่มีอาการรุนแรงและมีการระบุให้ตรวจเป็นไปตามเกณฑ์ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขกำหนด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น การตรวจคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้สามารถมั่นใจได้ว่าน้ำที่เราใช้นั้นสะอาดและเหมาะสมกับการบริโภคหรือไม่ น้ำบริโภคที่ผู้ผลิตนำมาส่งตรวจวิเคราะห์ ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ มีความสะอาด และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2.วัตถุประสงค์

1) เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำเพื่อการบริโภค
2) เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้อง ทำซ้ำได้เหมือนเดิมและให้การปฏิบัติงานเป็นไปตามมาตรฐานเดียวกัน
3) เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำเพื่อการบริโภค
2) มีเอกสารอ้างอิงในการทำงานและการปฏิบัติงานเป็นไปตามมาตรฐานเดียวกัน
3) ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

4. ขอบเขตของคู่มือ

คู่มือการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทนี้ เป็นคู่มือการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กันภายในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้จัดทำได้มีการปรับบางขั้นตอนจากวิธีมาตรฐานที่ใช้อ้างอิง จะระบุถึง ขั้นตอนวิธีการตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี Most Probable Number (MPN) มาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค การอ่านผลวิเคราะห์ ตัวอย่างการวิเคราะห์น้ำบริโภคนั้นจะเป็นตัวอย่างน้ำที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทจากผู้ผลิต ทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อเป็นการยืนยันลักษณะของน้ำบริโภคว่าเหมาะสมแก่การบริโภคหรือไม่ ทั้งเป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข เพื่อสุขอนามัยที่ดีของบุคคลทั่วไป นักศึกษา บุคลากร หรือเจ้าหน้าที่ที่ได้บริโภคน้ำจากผู้ผลิตนั้น ๆ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์นี้ใช้ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อการอ่านผลการวิเคราะห์และรายงานผลการวิเคราะห์ ทั้งมีการทวนสอบวิธีเป็นการยืนยันขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เชื้อมาตรฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเป็นตัวแทนน้ำบริโภค พร้อมอธิบายวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งบอกถึงเทคนิควิธีในการสุ่มเก็บตัวอย่างและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภคเพื่อการส่งตรวจวิเคราะห์มายังห้องปฏิบัติการด้วย

5. คำจำกัดความเบื้องต้น

มหาวิทยาลัย	หมายถึง	มหาวิทยาลัยศิลปากร
คณะ	หมายถึง	คณะวิทยาศาสตร์
ภาควิชา	หมายถึง	ภาควิชาจุลชีววิทยา
การตรวจวิเคราะห์	หมายถึง	การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์
เชื้อจุลินทรีย์	หมายถึง	Coliforms, Fecal coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp.
น้ำบริโภค	หมายถึง	น้ำดื่ม, น้ำกรอง, น้ำประปาดื่มได้, น้ำบาดาลที่ใช้บริโภค
ภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท	หมายถึง	บรรจุภัณฑ์ที่หลังจากบรรจุน้ำบริโภคและปิดสนิทแล้ว ไม่มีการรั่ว ซึม หรือปริแตก สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของน้ำและอากาศได้ดี ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำบริโภค สามารถเก็บรักษาน้ำบริโภคได้เป็นเวลานานโดยไม่ทำให้คุณภาพน้ำบริโภคเปลี่ยนแปลง โดยส่วนมากจะบรรจุในลักษณะที่เป็นขวด เช่น ขวดพลาสติกหรือขวดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดสนิท เป็นต้น
ข้อกำหนด	หมายถึง	เกณฑ์คุณลักษณะที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง “ น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท” และประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 416 (พ.ศ. 2563) เรื่อง “มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค”
ผลการวิเคราะห์	หมายถึง	ผลจากการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในน้ำตามข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุข
ผู้ผลิต/ผู้รับบริการ	หมายถึง	ผู้ที่ต้องการส่งตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภค ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ทั้งภาครัฐและภาคเอกชน ตัวแทนบริษัท ห้าง ร้านค้า หรือบุคคลทั่วไป

บทที่ 2

โครงสร้างและบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เป็นหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบใน 5 พันธกิจหลัก ได้แก่ พันธกิจด้านการผลิตบัณฑิต การวิจัย การบริการวิชาการ การทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรมและการบริหารงานตามหลักธรรมาภิบาล มีสำนักงานคณบดี รับผิดชอบสนับสนุนการบริหารงานภายในคณะ มีการบริหารจัดการและพัฒนาทรัพยากรที่ดีสอดคล้องกับวิสัยทัศน์ พันธกิจ ค่านิยมและเป้าหมายของคณะวิทยาศาสตร์ โครงสร้างการบริหารองค์กรรวมถึงบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของ นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร นักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในงานด้านการบริการวิชาการแก่หน่วยงานภายในและหน่วยงานภายนอก มีดังนี้

1. ประวัติความเป็นมาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ และเป้าหมาย
3. โครงสร้างการบริหารองค์กร
4. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 ประวัติความเป็นมาและข้อมูลเกี่ยวกับคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรตั้งอยู่ ณ วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม เป็นคณะที่ 7 ของมหาวิทยาลัยศิลปากร และเป็นคณะวิชาแรกของมหาวิทยาลัยศิลปากรที่เปิดสอนทางด้านวิทยาศาสตร์ โดยเล็งเห็นถึงความจำเป็นและความก้าวหน้าของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในอนาคต ได้รับมติเห็นชอบจากสภามหาวิทยาลัยศิลปากรให้จัดตั้งขึ้นเมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2514 จากนโยบายที่จะขยายงานทางด้านวิชาการและการศึกษาของมหาวิทยาลัยไปสู่ด้านอื่นนอกเหนือไปจากด้านศิลปะและโบราณคดี คณะฯ เริ่มรับนักศึกษา รุ่นแรกปี พ.ศ. 2515 ในสาขาวิชาคณิตศาสตร์ สาขาวิชาสถิติ และสาขาวิชาชีววิทยา ต่อมาปี พ.ศ. 2517 มีการแบ่งส่วนราชการเป็นหน่วยงานภาควิชาคณิตศาสตร์ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาฟิสิกส์ และสำนักงานเลขานุการ ในปี พ.ศ. 2532 ได้จัดตั้งภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมขึ้นอีก 1 ภาควิชา

ปัจจุบันมหาวิทยาลัยศิลปากรมีสถานะเป็นมหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐ มีพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2559 บังคับใช้ และประกาศมหาวิทยาลัยศิลปากร เรื่อง การแบ่งหน่วยงานภายในของส่วนงานของมหาวิทยาลัยศิลปากร (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 ทำให้มีการแบ่งส่วนงานในคณะวิชาออกเป็น 14 ส่วนงาน ได้แก่ สำนักงานคณบดี ภาควิชาคณิตศาสตร์ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาฟิสิกส์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาสถิติ ภาควิชาคอมพิวเตอร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีคณะวิทยาศาสตร์ ศูนย์บริการวิชาการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านสีและการเคลือบผิว ศูนย์ความเป็นเลิศของวัสดุแนวใหม่ และศูนย์สอบเทียบเครื่องวัดรังสีอาทิตย์

2.2 ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ และเป้าหมาย

ปณิธาน

คณะวิทยาศาสตร์มุ่งพัฒนาการศึกษาเพื่อผลิตบัณฑิตผู้รอบรู้วิชาการ ยึดมั่นคุณธรรม เพียบพร้อมด้วยจริยธรรมและมีจิตสำนึกรับผิดชอบสังคม อีกทั้งยังมุ่งค้นคว้าวิจัยเสริมสร้างองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ ตลอดจนเพื่อการพัฒนาชุมชนและประเทศชาติเป็นสำคัญ

วิสัยทัศน์

เป็นคณะวิทยาศาสตร์ที่เป็นเลิศทางวิชาการ และเป็น 1 ใน 5 ของคณะวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยในด้านวิจัย ในปี 2568

คำอธิบาย

เป็นคณะวิทยาศาสตร์ที่เป็นเลิศทางวิชาการ หมายถึง การบริหารวิชาการตามแนวทาง EdPEx criteria เป็น 1 ใน 5 ของคณะวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยในด้านวิจัย ในปี 2568 หมายถึง มีการทำวิจัยและการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในฐานข้อมูลระดับนานาชาติอยู่ในระดับ 1 ใน 5 ของคณะวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย

พันธกิจ

1. สร้างบุคลากรในสายวิชาชีพด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ให้มีความรอบรู้ มีสติปัญญา มีความคิด วิเคราะห์ และมีความรับผิดชอบต่อสังคม
2. ค้นคว้า วิจัย และสร้างองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
3. ให้บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแก่สังคม เพื่อสร้างความเข้มแข็งแก่ชุมชน และเป็นการพัฒนาขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศในเวทีโลกต่อไป
4. สร้างความเป็นเลิศทางศิลปะและงานสร้างสรรค์ โดยใช้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
5. การบริหารจัดการ (บริหารงานตามหลักธรรมาภิบาล)

ค่านิยมหลัก SC WIN (Success, Custom focus, Wisdom, Integrity, Novelty)

เป้าหมาย

1. เป็นคณะที่ถูกเลือกเพื่อเข้าศึกษาติดอันดับ 1 ใน 5 ของคณะวิทยาศาสตร์ในประเทศ
2. เป็นคณะที่สร้างผลงานวิจัยคุณภาพสูง เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. เป็นศูนย์กลางการให้บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในภูมิภาคตะวันตก/ภาคกลางตอนล่าง
4. เป็นคณะที่มีการบริหารองค์กรเพื่อความเป็นเลิศ

2. 3. โครงสร้างการบริหารองค์กร

2.3.1 โครงสร้างการบริหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โครงสร้างการบริหารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หลังจากมีสถานะเป็นมหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐ ได้มีการแบ่งหน่วยงานภายในคณะวิชาออกเป็น 14 ส่วนงาน คือ 1 สำนักงาน 8 ภาควิชา และ 5 ศูนย์ความรู้ ประกอบด้วย

1. สำนักงานคณบดี แบ่งเป็น 4 งานหลัก ได้แก่ งานบริหารและธุรการ งานคลังและพัสดุ งานบริการการศึกษา และงานแผนและประกันคุณภาพการศึกษา

2. ภาควิชา 8 ภาควิชา ได้แก่ ภาควิชาคณิตศาสตร์ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาฟิสิกส์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาสถิติ ภาควิชาคอมพิวเตอร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา (นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร (นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ))

3. ศูนย์ความรู้ 5 ศูนย์ ได้แก่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ ศูนย์บริการวิชาการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านสี และการเคลือบผิว ศูนย์ความเป็นเลิศด้านวัสดุแนวใหม่ และศูนย์สอบเทียบเครื่องวัดรังสีอาทิตย์

2.3.2 โครงสร้างการบริหารภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

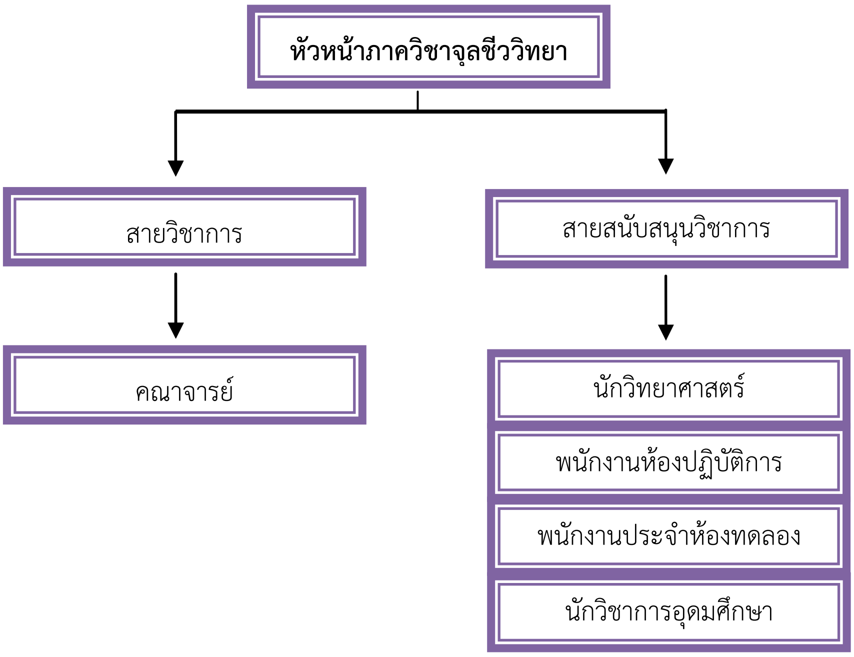
ภาควิชาจุลชีววิทยาเปิดสอนในระดับปริญญาบัณฑิต และบัณฑิตศึกษา จัดการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต 1 สาขาวิชา คือ จุลชีววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต 1 สาขาวิชา คือ จุลชีววิทยา และหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต 1 สาขาวิชา คือ จุลชีววิทยา การศึกษาของภาควิชาฯ ว่าด้วยศาสตร์ของจุลินทรีย์ทั้งที่มีประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย และเห็ดรา มุ่งให้ความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจขั้นพื้นฐานของจุลชีพ ตลอดจนถึงการศึกษาเทคโนโลยีชั้นสูง สามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้ บัณฑิตจุลชีววิทยาเป็นผู้พร้อมที่จะประกอบอาชีพทั้งในภาครัฐและเอกชนมีทักษะในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัยสำหรับงานทางด้านจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม และเทคนิคต่าง ๆ ในการศึกษาระดับชีวโมเลกุล

ปณิธาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

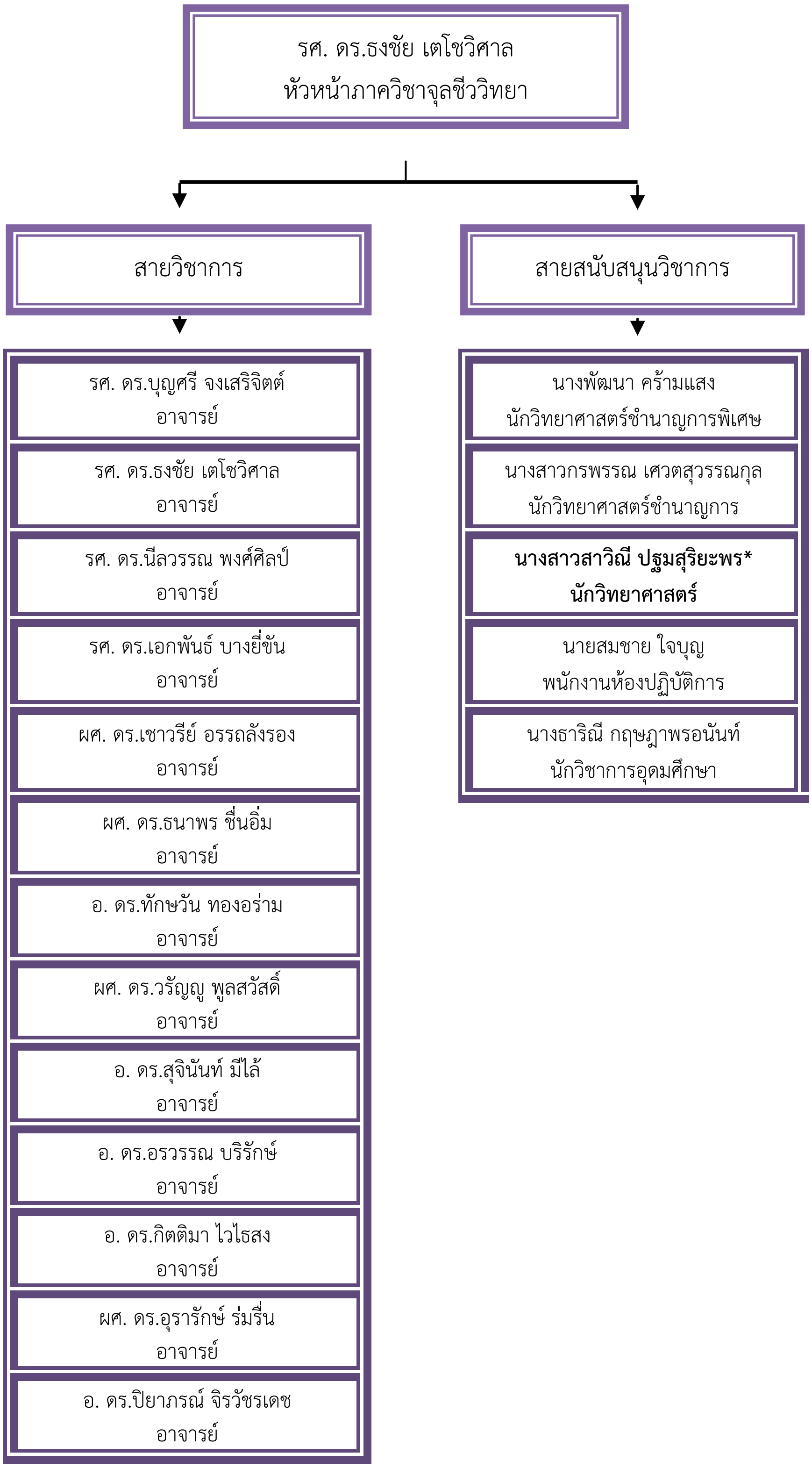
เสริมสร้างคุณภาพการศึกษา การค้นคว้าวิจัย และให้บริการวิชาการ เพื่อผลิตบัณฑิตที่มีความรู้ ความสามารถคุณธรรมและจริยธรรม วัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อผลิตบัณฑิตที่มีความรู้ ความสามารถ และทักษะทางจุลชีววิทยาที่สามารถประยุกต์องค์ความรู้ในการปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้แก่ภาครัฐและเอกชน
2. เพื่อผลิตบัณฑิตที่มีคุณธรรมและจริยธรรม
3. เพื่อผลิตผลงานวิจัยที่มีคุณภาพ เป็นที่ยอมรับของนานาชาติและสามารถนำองค์ความรู้ไปปรับใช้ได้
4. เพื่อใช้ความรู้ความสามารถในการให้บริการทางวิชาการแก่สังคม

โครงสร้างการบริหารภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร มีดังนี้


หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
สายวิชาการ
สายสนับสนุนวิชาการ
คณาจารย์
นักวิทยาศาสตร์
พนักงานห้องปฏิบัติการ
พนักงานประจำห้องทดลอง
นักวิชาการอุดมศึกษา

แผนภูมิโครงสร้างการปฏิบัติงานของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร



รศ. ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

สายวิชาการ

รศ. ดร.บุญศรี จงเสริจิตต์
อาจารย์

รศ. ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
อาจารย์

รศ. ดร.นีลวรรณ พงศ์ศิลป์
อาจารย์

รศ. ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน
อาจารย์

ผศ. ดร.เชาวรีย์ อรรถลังรอง
อาจารย์

ผศ. ดร.ธนาพร ชื่นอิ่ม
อาจารย์

อ. ดร.ทักษวัน ทองอร่าม
อาจารย์

ผศ. ดร.วรัญญู พูลสวัสดิ์
อาจารย์

อ. ดร.สุจินันท์ มีไล้
อาจารย์

อ. ดร.อรวรรณ บริรักษ์
อาจารย์

อ. ดร.กิตติมา ไวไธสง
อาจารย์

ผศ. ดร.อุรารักษ์ ร่มรื่น
อาจารย์

อ. ดร.ปิยาภรณ์ จิรวัชรเดช
อาจารย์

สายสนับสนุนวิชาการ

นางพัฒนา คร้ามแสง
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

นางสาวกรพรรณ เศวตสุวรรณกุล
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร*
นักวิทยาศาสตร์

นายสมชาย ใจบุญ
พนักงานห้องปฏิบัติการ

นางธาริณี กฤษฎาพรอนันท์
นักวิชาการอุดมศึกษา

*ผู้จัดทำคู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้

2.4 หน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งตามที่ได้รับมอบหมาย

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของ นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ ตามที่ได้รับมอบหมาย มีดังนี้

2.4.1 หน้าที่ความรับผิดชอบหลัก

2.4.1.1 งานบริการวิชาการ (การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์)

1. เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและตรวจเช็คสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับงานบริการการตรวจวิเคราะห์น้ำ เครื่องดื่ม อาหาร ยาสมุนไพร และวัสดุอื่น ๆ
2. ตรวจรับตัวอย่างงานบริการวิชาการ ด้านวิเคราะห์จุลินทรีย์ น้ำ เครื่องดื่ม อาหาร ยาสมุนไพร และวัสดุอื่น ๆ
3. จัดทำบันทึกขออนุมัติโครงการให้บริการทางวิชาการ งานด้านการวิเคราะห์จุลินทรีย์
4. ดำเนินการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์จากตัวอย่างที่ได้รับ (เช่น น้ำ ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างละ 4 ชนิด)
5. จัดทำรายงานผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์
6. จัดทำบันทึกขอเบิกค่าบริการวิชาการการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์
7. ดูแลและบำรุงเครื่องมือ ครุภัณฑ์ภายในห้องปฏิบัติการงานบริการวิชาการ

2.4.1.2 การเตรียมปฏิบัติการ (วัสดุและอุปกรณ์, อาหารเลี้ยงเชื้อ, เชื้อจุลินทรีย์)

เตรียมปฏิบัติการในรายวิชาต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. รายวิชา 518 202 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป General microbiology laboratory
2. รายวิชา 518 302 ปฏิบัติการวิทยาเห็ดรา Mycology laboratory
3. รายวิชา 518 332 ปฏิบัติการชีววิทยาและเทคโนโลยีของยีสต์ Yeast biology and technology laboratory

และเป็นผู้ช่วยเตรียมปฏิบัติการ

4. รายวิชา 518 204 ปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา
5. รายวิชา 518 322 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์นม Dairy product microbiology laboratory
6. รายวิชา 518 422 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารเพื่อสุขภาพ Food microbiology for health laboratory

2.4.2 ภาระงานรอง

1. ให้บริการแก่นักศึกษา เช่น การเบิกจ่าย ยืม-คืนอุปกรณ์ วัสดุเครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีในห้องปฏิบัติการ
2. จัดเก็บอุปกรณ์หลังเลิกปฏิบัติการ
3. ดูแลและบำรุงเครื่องมือ ครุภัณฑ์ภายในห้องปฏิบัติการ
4. ดูแลเรื่องรับเบิกจ่ายแอลกอฮอล์ภายในภาควิชาฯ บันทึกและรายงานจำนวนยอดคงเหลือแอลกอฮอล์ต่อทางคณะฯ สำหรับการใช้ภายในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกเดือน

2.4.3 หน้าที่งานอื่น ๆ ที่ได้รับมอบหมาย

1. เป็นกรรมการคุมสอบกลางภาค สอบปลายภาค คุมสอบย่อย และคุมสอบนอกตาราง
2. กรรมการอื่น ๆ ที่ได้รับมอบหมาย

- เป็นคณะกรรมการเก็บรักษาเงินและตรวจนับเงินสดคงเหลือประจำวันของคณะวิทยาศาสตร์
- เป็นคณะกรรมการตรวจสอบพัสดุของคณะวิทยาศาสตร์

3. เป็นตัวแทนภาควิชาฯ นำนักศึกษาเข้าร่วมแข่งขันกีฬา - วิชาการ จุลชีววิทยาสัมพันธ์แห่งประเทศไทย

2.4.4 งานพัฒนา

1. จัดทำคู่มือวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท
2. การจัดการความรู้ (KM : Knowledge Management)
3. ปรับปรุงห้องปฏิบัติการตามแผนยกระดับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ESPReL (ESPReL No: 2-0280-0047-3)
4. เข้าร่วมโครงการอบรมต่าง ๆ เพื่อพัฒนาตนเองและเพิ่มทักษะในการทำงาน

จากภาระหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายดังกล่าวข้างต้น ผู้เขียนจึงได้จัดทำคู่มือการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยมีเนื้อหาครอบคลุมถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ต้องผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขกำหนด ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภคถูกส่งมาตรวจวิเคราะห์เป็นจำนวนเกินกว่า 80% ของงานด้านบริการวิชาการ โดยเป็นตัวอย่างที่ส่งมาจากผู้ผลิต ผู้ประกอบการห้าง ร้านค้า บริษัทต่าง ๆ ทั้งทางภาครัฐและเอกชนเพื่อขอใบอนุญาตองค์การอาหารและยา (อย.) และเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์เป็นประจำปี

บทที่ 3
หลักเกณฑ์และข้อควรระวังในการทำปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

คู่มือการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรเล่มนี้ มีหลักเกณฑ์และข้อควรระวังในการทำปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องดังนี้

3.1 กฎระเบียบที่เกี่ยวข้อง

3.2 จรรยาบรรณวิชาชีพ

3.3 หลักการปฏิบัติงาน PDCA

3.1 กฎระเบียบที่เกี่ยวข้อง

การปฏิบัติงานตามคู่มือเล่มนี้ มีลักษณะงานที่เป็นการให้บริการและต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบ ข้อบังคับของมหาวิทยาลัย ประกาศ และแนวปฏิบัติต่าง ๆ ซึ่งต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด สำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาที่ดี (ม.เกษตรฯ, 2547) จะต้องออกแบบให้เหมาะสมต่อลักษณะงานที่จะทำการศึกษาหรือตรวจวิเคราะห์ และควรแยกบริเวณที่จะทำการทดลองเพื่อการวิเคราะห์ออกจากส่วนอื่น ๆ โดยเฉพาะแยกออกจากบริเวณที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำความสะอาดเครื่องมือและพื้นที่เก็บตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการหรือห้องวิเคราะห์หรือห้องทดลองควรเป็นห้องปรับอากาศ ซึ่งจะป้องกันและลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากกระแสลมของอากาศได้ สำหรับบริเวณที่ต้องการป้องกันการปนเปื้อนอย่างมาก เช่น บริเวณที่จะถ่ายเชื้อ ปลูกเชื้อหรือเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อ ควรเป็นส่วนที่มีประตูสองชั้น ภายในติดหลอดแสงอัลตราไวโอเลต (UV) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ขณะที่ไม่มีการปฏิบัติงาน หรืออาจปฏิบัติงานดังกล่าวในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้ลมจากภายนอกเข้าไปในตู้ได้

3.1.1 หลักการปฏิบัติงาน

คู่มือการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทเล่มนี้เป็นการเขียนเพื่ออำนวยความสะดวกให้กับคณาจารย์ นักศึกษา นักวิจัย และผู้ที่เกี่ยวข้อง สามารถปฏิบัติงานให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยเฉพาะเทคนิคการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ และยังใช้ประกอบกับการเรียนการสอนหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยผู้จัดทำได้ยึดหลักการปฏิบัติงานดังต่อไปนี้

1. ปฏิบัติงานตามกฎ ระเบียบและข้อบังคับที่เกี่ยวข้อง มีความโปร่งใสในการปฏิบัติงาน สามารถตรวจสอบได้และหลีกเลี่ยงการกระทำใด ๆ ที่อาจทำให้เกิดความเสื่อมเสียแก่องค์กร

2. ให้คำปรึกษา คำแนะนำและให้ข้อมูลข่าวสารแก่ผู้รับบริการได้อย่างถูกต้อง ครบถ้วน

3. ไม่ปกปิดข้อเท็จจริงหรือบิดเบือนความจริงอันเป็นสาระสำคัญ ซึ่งสามารถติดตามและตรวจสอบได้ตามกฎหมายเกี่ยวกับข้อมูลข่าวสารของราชการ

4. เป็นผู้มีศีลธรรมอันดี มีความซื่อสัตย์ สุจริต ประพฤติตนสอดคล้องตามจรรยาบรรณของบุคลากรที่มหาวิทยาลัยกำหนด

5. การปฏิบัติงานต้องมีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน ถูกต้องและรวดเร็ว มีความสอดคล้องกับแผนการดำเนินงานของคณะวิชาและมหาวิทยาลัย

6. ให้บริการด้วยความเต็มใจ เต็มกำลังความสามารถ มีความเสมอภาค ไม่เลือกปฏิบัติอย่างไม่เป็นธรรม ปราศจากอคติ ยิ้มแย้มแจ่มใส ส่งเสริมความพึงพอใจต่อผู้รับบริการ

7. ในการปฏิบัติงานต้องคำนึงถึงผลประโยชน์ของมหาวิทยาลัยและการประหยัดทรัพยากรเป็นหลัก

3.1.2 แนวทางการปฏิบัติงาน

นอกจากหลักการทำงานแล้ว ยังได้ใช้สมรรถนะในการปฏิบัติงานและประสบการณ์ในการทำงานมากำหนดแนวทางปฏิบัติงานของบุคลากร โดยหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายให้รับผิดชอบงานบริการวิชาการ จึงต้องมีการประสานงานกับผู้รับบริการซึ่งเป็นบุคคลทั่วไป ร้านค้า บริษัท หรือหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย และเพื่อให้การปฏิบัติงานมีมาตรฐาน จึงมีการยึดแนวทางการปฏิบัติงาน ดังนี้

ตารางที่ 3.1.2 แสดงสมรรถนะในการปฏิบัติงานและมาตรฐานการปฏิบัติงาน

สมรรถนะในการปฏิบัติงาน	**มาตรฐานการปฏิบัติงาน**
การมุ่งผลสัมฤทธิ์	1. มีความรู้ ความสามารถในหน้าที่ความรับผิดชอบอย่างสูง และให้บริการอย่างเต็มใจ มีแหล่งข้อมูลใช้อ้างอิงได้ ส่งผลต่อความพึงพอใจของผู้รับบริการ 2. มีความตั้งใจ มีความขยันหมั่นเพียร และมุ่งมั่นในการปฏิบัติหน้าที่ตามที่ได้รับมอบหมายให้สำเร็จตามเป้าหมาย และมีผลสัมฤทธิ์ที่ดีในงานที่ปฏิบัติ 3. เป็นผู้เรียนรู้ สั่งสมประสบการณ์ มีความชำนาญในวิชาชีพ มุ่งสร้างและพัฒนาผลงานให้มีคุณภาพอย่างต่อเนื่อง
ความเข้าใจองค์กรและระบบงาน	1. มีความเข้าใจองค์กร คน ระบบงาน และวัฒนธรรมองค์กรในภาพรวม และมีความสามารถในการนำเทคโนโลยีเข้ามาใช้ร่วมกับการทำงาน และเรียนรู้วิธีการปฏิบัติงานและสามารถแก้ปัญหาข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น 2. มีมาตรฐานในการปฏิบัติงานสอดคล้องปรัชญา ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ ค่านิยมหลักและเป้าหมายขององค์กร 3. มีการยอมรับในการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นในองค์กร เช่น การเปลี่ยนโครงสร้างองค์กร ระบบงาน และการปรับเปลี่ยนกระบวนการทำงาน

สมรรถนะในการปฏิบัติงาน	มาตรฐานการปฏิบัติงาน
การทำงานเป็นทีม	1. มีความสามารถในการทำงานเป็นทีมได้ (Team work) 2. มีความพึงพอใจในหน้าที่ของตนที่ได้รับมอบหมายจากทีมได้อย่างมีความสุข 3. สร้างและประสานงานระหว่างทีมโดยทำภารกิจให้บรรลุเป้าหมายและมีประสิทธิภาพ 4. เป็นผู้รับฟังความคิดเห็นของผู้ร่วมงาน ให้ความช่วยเหลือเกื้อกูลกันในทางชอบธรรม ปฏิบัติต่อกันด้วยความสุภาพ อ่อนน้อมและส่งเสริม สนับสนุนให้เกิดความสามัคคี ร่วมแรงร่วมใจในการปฏิบัติงาน
การมีคุณธรรม จริยธรรมและจรรยาบรรณ	1. ปฏิบัติหน้าที่ความรับผิดชอบด้วยความโปร่งใส ปฏิบัติงานด้วยความชอบธรรม ยึดมั่นในความถูกต้อง มีความซื่อสัตย์ สุจริต ใช้ความรู้ความสามารถได้อย่างเหมาะสม 2. มีการอุทิศเวลาแก่ราชการ มีความภาคภูมิใจในสถาบันของตนเอง 3. มุ่งส่งเสริมการปฏิบัติงานในหน่วยงานและมหาวิทยาลัยให้บรรลุตามวัตถุประสงค์และเป้าหมาย

3.1.3 ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน

การป้องกันการปนเปื้อนและแพร่กระจายของเชื้อห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ไม่ว่าจะเพื่อการเรียนการสอนหรือการตรวจวิเคราะห์ สิ่งสำคัญที่พึงตระหนักอยู่ตลอดเวลา ได้แก่

1. ไม่ดื่มหรือรับประทานอาหาร ของคบเคี้ยว ในห้องปฏิบัติการ
2. ผู้ปฏิบัติงานควรล้างมือด้วยสบู่ให้สะอาด และฉีดน้ำยาฆ่าเชื้อ (70% (v/v) ethanol) ทุกครั้งทั้งก่อนและหลังจากทำปฏิบัติการเสร็จสิ้นแล้ว
3. เช็ดบริเวณพื้นที่ที่จะทำปฏิบัติการด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (70% (v/v) ethanol) ทุกครั้งก่อนและหลังทำปฏิบัติการ
4. ผู้ปฏิบัติงานจะต้องเรียนรู้และฝึกเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จนสามารถปฏิบัติงานได้อย่างคล่องแคล่ว
5. ผู้ปฏิบัติงานอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกลงในหลอดทดลอง ฟลาสก์ หรือจานเพาะเชื้อที่กำลังทดลอง

6. ผู้ปฏิบัติงานอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่กำลังศึกษาออกไปปนเปื้อนหรือแพร่กระจายสู่ภายนอก ไม่ว่าจุลินทรีย์นั้นจะเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่ก็ตาม

7. หมั่นดูแลรักษาทำความสะอาดห้องปฏิบัติการไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อ ไม่นำสิ่งที่ไม่จำเป็นเข้ามาในห้องปฏิบัติการและมีการจัดการขยะอยู่สม่ำเสมอเป็นประจำ

8. ถ้ากรณีห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องปรับอากาศในขณะทำปฏิบัติการ เช่น ถ่ายเชื้อหรือเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานเพาะเชื้อจะต้องปิดพัดลม ปิดประตู ปิดหน้าต่าง เพื่อป้องกันกระแสลมจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

9. จานเพาะเชื้อจะต้องมีฝาครอบ หลอดหรือขวดเชื้อจะต้องมีฝาปิดตลอดเวลา ถึงแม้ว่าการทดลองนั้นจะสิ้นสุดลงแล้ว

10. ก่อนล้างทำความสะอาดภาชนะที่ใส่เชื้อไม่ว่าจะเป็นจานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง หรือขวดใส่สาร จะต้องทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ก่อนทุกครั้งที่มีการทำปฏิบัติการ

11. ผู้ปฏิบัติงานจะต้องสวมเสื้อกาวน์ในการทำปฏิบัติการทุกครั้ง และถ้าผมยาวจะต้องรวบผมให้เรียบร้อย

12. ผู้ปฏิบัติงานไม่ควรสวมใส่เครื่องประดับบริเวณมือและข้อมือในระหว่างการทำปฏิบัติการ เช่น นาฬิกาข้อมือ แหวน กำไลข้อมือ เป็นต้น เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่ ไม่พึงประสงค์และจะทำให้การตรวจวิเคราะห์เกิดความผิดพลาด

13. ผู้ปฏิบัติงานควรสวมรองเท้าหุ้มส้น กางเกงขายาว เพื่อลดการบาดเจ็บหากเกิดอุบัติเหตุที่ไม่คาดคิดขึ้น เช่น สารเคมีที่เป็นกรดกระเด็น หรือมีเศษแก้วแตกบนพื้นห้องปฏิบัติการ

14. ปฏิบัติตามกฎระเบียบของห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด

15. ต้องมีสติและสมาธิทุกครั้งในการทำปฏิบัติการ

ทั้งนี้การทำปฏิบัติการงานตรวจวิเคราะห์ทางภาควิชาจุลชีววิทยา ได้ทำในพื้นที่ห้องปฏิบัติการงานด้านบริการวิชาการ 4510 เป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว ผ่านเกณฑ์การประเมินมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการตามระบบการสำรวจสภาพความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ หรือ ESPReL Checklist ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ได้รับเลขที่ (ESPReL No.) 2-0280-0047-3 ซึ่งทางผู้จัดทำ นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร เป็นผู้ดูแลรับผิดชอบห้องปฏิบัติการนี้

3.2 จรรยาบรรณวิชาชีพ

ผู้ปฏิบัติงานตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ได้ยึดหลักการมาตรฐานจรรยาบรรณในวิชาชีพนักวิทยาศาสตร์เป็นหลักการพื้นฐานในการปฏิบัติงานดังนี้

3.2.1 เป็นผู้มีศีลธรรม และคุณธรรม ในการดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพ

3.2.2 ประกอบอาชีพด้วยความซื่อสัตย์สุจริต ไม่รับทรัพย์สินหรือผลประโยชน์อย่างใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่นโดยมิชอบ

3.2.3 ต้องมีวินัยในตนเอง พัฒนาตนเองด้านวิชาชีพ บุคลิกภาพ และวิสัยทัศน์ ให้ทันต่อการพัฒนาทางวิชาการ เศรษฐกิจ และสังคม

3.2.4 ต้องไม่ทำงานทางวิทยาศาสตร์ที่ขัดต่อความสงบเรียบร้อย ศีลธรรมอันดีของประชาชน และความมั่นคงของชาติ

3.2.5 ประพฤติตนเป็นผู้ตรงต่อเวลา ปฏิบัติหน้าที่อย่างถูกต้องและเต็มกำลังความสามารถ ดำรงตนเป็นที่น่าเชื่อถือของบุคคลอื่น รอบคอบ ขยันหมั่นเพียร สมเหตุสมผล โดยคำนึงถึงประโยชน์ต่อองค์กรเป็นสำคัญ

3.2.6 พึงช่วยเหลือเกื้อกูลซึ่งกันและกันอย่างสร้างสรรค์ โดยยึดมั่นในระบบคุณธรรม สร้างความสามัคคีในหมู่คณะ

3.2.7 ประพฤติปฏิบัติตนเป็นผู้นำในการอนุรักษ์วัฒนธรรม ภูมิปัญญา สิ่งแวดล้อม รักษาผลประโยชน์ของส่วนรวม และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตย

3.2.8 มีจรรยาบรรณของนักวิจัยตามที่สภาวิจัยกำหนด

สรุปจรรยาบรรณในวิชาชีพผู้ปฏิบัติงานตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ในครั้งนี้ ผู้จัดทำคู่มือได้นำหลักการพื้นฐานของจรรยาบรรณวิชาชีพมาใช้ในการปฏิบัติงานภายใต้กฎระเบียบ ข้อบังคับของมหาวิทยาลัย เช่น ประกอบอาชีพด้วยความซื่อสัตย์สุจริต ไม่รับทรัพย์สินหรือผลประโยชน์อย่างใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่นโดยมิชอบ ไม่ทำงานทางวิทยาศาสตร์ที่ขัดต่อความสงบเรียบร้อย ศีลธรรมอันดีของประชาชนและความมั่นคงของชาติและเป็นผู้ตรงต่อเวลา ปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มกำลังความสามารถ ดำรงตนเป็นที่น่าเชื่อถือของบุคคลอื่น มีความรอบคอบ ขยันหมั่นเพียร สมเหตุสมผล มีมนุษยสัมพันธ์ที่ดีต่อทุกคนทั้งคำนึงถึงประโยชน์ต่อองค์กรเป็นสำคัญ

3.3 หลักการปฏิบัติงาน PDCA

คู่มือวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ต้องดำเนินการตามหลักการปฏิบัติงาน PDCA ดังนี้

ตารางที่ 3.3 แสดงหลักการปฏิบัติงาน PDCA

หลักการปฏิบัติงาน PDCA	**รายละเอียดในการปฏิบัติงานตามหลักการ PDCA**
P = Plan (การวางแผน)	1. ศึกษาคุณลักษณะเกี่ยวกับจุลินทรีย์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท เพื่อให้ทราบถึงชนิดจุลิทรีย์และเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนด 2. ศึกษาชนิดจุลินทรีย์ เพื่อให้ทราบถึงลักษณะเฉพาะตัวของจุลินทรีย์ชนิดนั้น 3. หาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ 4. คำนวณปริมาณหรือจำนวนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ รวมถึงสารเคมีที่ต้องใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ 5. จัดทำขั้นตอนการปฏิบัติงานวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่เกี่ยวกับขั้นตอน กระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การอ่านผลวิเคราะห์ และการแปลผล
D = Do (การปฏิบัติตามแผน)	1. เตรียมความพร้อมของเครื่องมือให้พร้อมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 2. ดำเนินงานตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด 3. อ่านผลวิเคราะห์ พร้อมทั้งแปลผล และรายงานผลการวิเคราะห์
C = Check (ตรวจสอบการปฏิบัติตามแผน)	1. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน 2. ตรวจสอบความถูกต้องของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ให้ตรงกับชนิดของจุลินทรีย์ 3. ตรวจสอบการอ่านผลวิเคราะห์ พร้อมทั้งแปลผล และรายงานผลการวิเคราะห์ให้ตรงกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด
A = Act (ปรับปรุงแก้ไข)	ประเมินความสำเร็จของการตรวจวิเคราะห์และจัดทำแบบสอบถามความพึงพอใจของผู้รับบริการงานตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ถ้ามีข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต้องมีการดำเนินการแก้ไขทันที เพื่อเป็นการพัฒนาตนเองและเพิ่มความมั่นใจให้แก่ผู้ปฏิบัติงานและผู้ใช้บริการวิชาการ

บทที่ 4
ขั้นตอนการปฏิบัติงานและการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยามีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับผู้ปฏิบัติงานเป็นนักวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา เนื่องจากเทคนิคเบื้องต้นเป็นความรู้พื้นฐานและความชำนาญในงานการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์จะป้องกันการเกิดความผิดพลาดจากการตรวจวิเคราะห์ที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ วิธี การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่เป็นที่ยอมรับและนิยมกันอย่างแพร่หลายทั่วโลกคือ วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้วยวิธีมาตรฐานจากเอกสารคู่มือ Standard method for the examination of water and wastewater. 23rd ed. Washington DC; 2017 ของ American public health association (APHA) ร่วมกับ American water works association (AWWA) และ Water environmental fund (WEF) สำหรับประเทศไทยนั้นโดยคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติได้กำหนดให้การเก็บตัวอย่างน้ำและการตรวจสอบคุณภาพน้ำต้องเป็นไปตามมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย ซึ่งหากผู้ปฏิบัติงานมีเทคนิคพื้นฐานที่ชำนาญแล้ว จะทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้องมากขึ้น มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนดคุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ได้กำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียประเภท coliform โดยวิธี MPN ต้องมีค่าน้อยกว่า 2.2 MPN/100 มิลลิลตร และต้องไม่พบ *E. coli* ทั้งต้องไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคที่ห้ามพบในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 416 (พ.ศ. 2563) เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ไม่เกิน 100 ใน 100 มิลลิลิตร (CFU/ml) และไม่พบ *Salmonella* spp. ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก 1) เพื่อให้การปฏิบัติงานเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เป็นไปตามมาตรฐานและราบรื่น มีเทคนิคและขั้นตอนปฏิบัติงาน ดังนี้

4.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

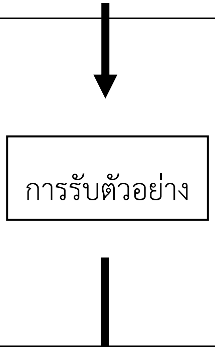
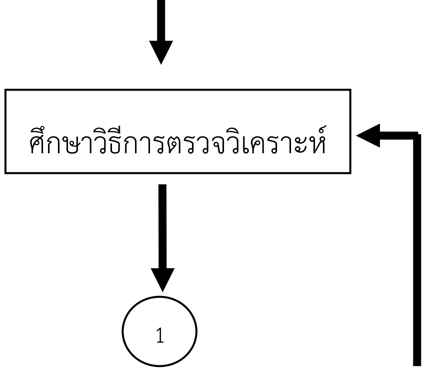
4.2 วิธีการและรายละเอียดการปฏิบัติงาน

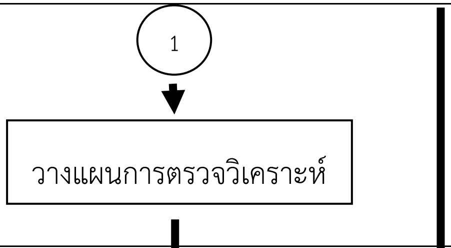
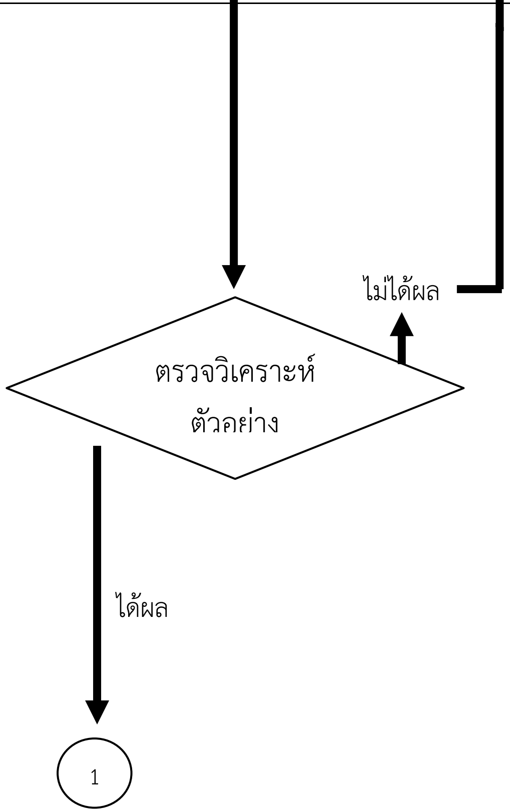
4.3 การติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

4.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ผู้จัดทำได้นำเสนอขั้นตอนในการปฏิบัติงานเป็นรูปแบบแผนผังขั้นตอนในการปฏิบัติงาน (Flowchart) เพื่อแสดงให้เห็นกระบวนการทั้งหมดตั้งแต่การรับตัวอย่างจนถึงการออกรายงานผลการวิเคราะห์ พร้อมรายละเอียดพอสังเขป ดังนี้

ตารางที่ 4.1 ขั้นตอนการปฏิบัติงานและรายละเอียดการปฏิบัติงาน

ขั้นตอนที่	กิจกรรม	ผู้เกี่ยวข้อง	ขั้นตอน/วิธีปฏิบัติ	เอกสารที่เกี่ยวข้อง	ระยะเวลาดำเนินการ
1		- นักวิทยาศาสตร์ - หัวหน้าภาควิชาฯ - ผู้รับบริการ	- ผู้รับบริการนำส่งตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์แก่นักวิทยาศาสาตร์หรือหัวหน้าภาควิชาฯ	- ใบนำส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์	1 – 3 ชั่วโมง
2		- นักวิทยาศาสตร์	- ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สำหรับตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท	- คู่มือการปฏิบัติงาน	1 – 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่	กิจกรรม	ผู้เกี่ยวข้อง	ขั้นตอน/วิธีปฏิบัติ	เอกสารที่เกี่ยวข้อง	ระยะเวลาดำเนินการ
3		- นักวิทยาศาสตร์ - พนักงานประจำห้องทดลอง	- จัดเตรียมความพร้อมของวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือเครื่องใช้ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องใช้ในการตรวจวิเคราะห์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด	- คู่มือการปฏิบัติงาน - รายการวัสดุอุปกรณ์ - รายการอาหารเลี้ยงเชื้อ - รายการสารเคมี	1 วันทำการ
4		- นักวิทยาศาสตร์ - อาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์	- ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการตรวจของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดตามนี้ 1. การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี Most Probable Number (MPN) 2. การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) 3. การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration) สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทหรือแล้วแต่ความต้องการของผู้รับบริการ - หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามขั้นตอนการตรวจให้ย้อนกลับไปขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์อีกครั้งหรือปรึกษาอาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาทางแก้ไขร่วมกัน	- คู่มือการปฏิบัติงาน	7 – 12 วันทำการ

ขั้นตอนที่	กิจกรรม	ผู้เกี่ยวข้อง	ขั้นตอน/วิธีปฏิบัติ	เอกสารที่เกี่ยวข้อง	ระยะเวลาดำเนินการ
5	1 การออกรายงานผลการวิเคราะห์ (ระยะเวลาไม่เกิน 14 วัน นับจากวันที่ได้รับตัวอย่าง)	- นักวิทยาศาสตร์ - อาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์ - หัวหน้าภาควิชาฯ - คณบดี - ผู้รับบริการ	- เมื่อผลการตรวจวิเคราะห์เป็นไปตามคู่มือการปฏิบัติงานและผ่านความเห็นชอบจากอาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์แล้ว นักวิทยาศาสตร์จะออกใบรายงานผลการวิเคราะห์พร้อมผู้ที่เกี่ยวข้องลงนามเรียบร้อยและส่งมอบใบรายงานให้แก่ผู้รับบริการ - ผู้รับบริการทำแบบสอบถามความพึงพอใจเพื่อนำผลการประเมินมาพิจารณาวางแผนการปฏิบัติงาน และประกอบการพัฒนางานจะได้ผลการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพ หากพบข้อบกพร่องจะได้ปรับปรุงแก้ไขให้ดียิ่งขึ้นต่อไป	- คู่มือการปฏิบัติงาน - ใบรายงานผลการวิเคราะห์ - แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้รับบริการงานตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์	1 วันทำการ
6	สิ้นสุด				

หมายเหตุ 1. ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้ปรึกษากับอาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์และผ่านความเห็นชอบจากภาควิชาฯ แล้ว

2. รูปภาพต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบการตรวจวิเคราะห์ในเล่มนี้ ผู้จัดทำเป็นผู้ถ่ายรูปเองจากห้องปฏิบัติการและนำมาประกอบ จึงไม่ได้มีการใส่ที่มา แต่ถ้ารูปภาพใดที่นำมา จะระบุที่มาพร้อมไว้ใต้รูปนั้น ๆ

4.2 วิธีการและรายละเอียดการปฏิบัติงาน

ตามเกณฑ์ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขมีข้อกำหนดเกี่ยวกับคุณสมบัติของจุลินทรีย์เกี่ยวกับน้ำบริโภค (ภาคผนวก 1) นั้น ผู้จัดทำได้มีวิธีการตรวจวิเคราะห์และมีรายละเอียด ตามนี้

4.2.1 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

4.2.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

4.2.1 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

1). วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 180*18 มิลลิเมตร, 150*16 มิลลิเมตร และ 100*13 มิลลิเมตร
2. หลอดดักก๊าซ (Durham tube) ใส่ทุกหลอดทดลอง
3. ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)
4. ไมโครปิเปต (micropipette) และปิเปตทิป ขนาด 5 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร และ 0.2 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. ไฟแช็คหรือไม้ขีดไฟ
8. ห่วงถ่ายเชื้อและเข็ม (loop and needle)
9. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
10. ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
11. เครื่องชั่ง (balance machine)
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
13. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส
14. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส

2). อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lauryl Sulfate Lactose Broth (LST) ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ที่มีหลอดดักก๊าซ

วิธีการเตรียม

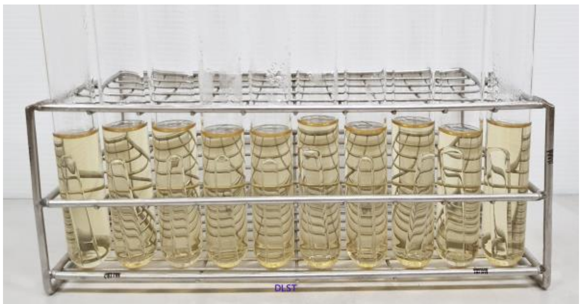
1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LST สำเร็จรูป จำนวน 71.2กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

1.2 นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซอยู่แล้วภายใน ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร

1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ

- ในช่วงหลังการนึ่งฆ่าเชื้อครบเวลาแล้ว ควรรอจนกว่าอุณหภูมิจะเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงเปิดเครื่อง เพื่อกันแรงกดอากาศในหลอดอาหารอาจทำให้หลอดดักก๊าซคลายอากาศออกไม่หมด



รูปที่ 1 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ความเข้มข้น 2 เท่า ในหลอดทดลอง

2. Brilliant Green Lactose Bile broth 2% (BGLB) ที่มีหลอดดักก๊าซ

วิธีการเตรียม

2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB สำเร็จรูป จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

2.2 นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซอยู่แล้วภายใน ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร

2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ

- ในช่วงหลังการนึ่งฆ่าเชื้อครบเวลาแล้ว ควรรอจนกว่าอุณหภูมิจะเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเปิดเครื่อง เพื่อกันแรงกดอากาศในหลอดอาหารอาจทำให้หลอดดักก๊าซคลายอากาศออกไม่หมด

รูปที่ 2 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB ในหลอดทดลอง

3. EC medium ที่มีหลอดดักก๊าซ

วิธีการเตรียม

3.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium สำเร็จรูป จำนวน 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

3.2 นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซอยู่แล้วภายใน ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร

3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ

- ในช่วงหลังการนึ่งฆ่าเชื้อครบเวลาแล้ว ควรรอจนกว่าอุณหภูมิจะเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเปิดเครื่อง เพื่อกันแรงกดอากาศในหลอดอาหารอาจทำให้หลอดดักก๊าซคลายอากาศออกไม่หมด

รูปที่ 3 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium ในหลอดทดลอง

4. Eosin Methylene Blue (EMB) agar

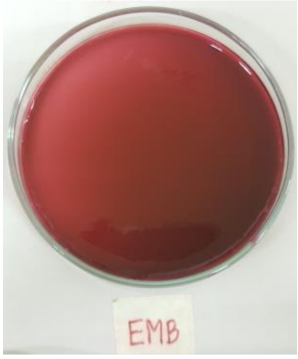
วิธีการเตรียม

4.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar สำเร็จรูป จำนวน 37.46 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

4.2 นำไปต้มให้วุ้นละลายดี แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

4.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.4 เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อปริมาตรจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร



รูปที่ 4 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar ในจานเพาะเชื้อ

5. Tryptone Soya Agar (TSA)

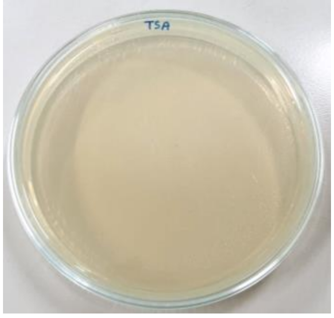
วิธีการเตรียม

5.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำเร็จรูป จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

5.2 นำไปต้มให้วุ้นละลายดี แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

5.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5.4 เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อปริมาตรจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร



รูปที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ในจานเพาะเชื้อ

6. อาหารชุดทดสอบ IMViC test (Tryptophan broth, MR-VP medium and Simmons citrate agar slant)

- Tryptophan Broth (Tryptone Water)

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหาร Tryptone Broth สำเร็จรูป จำนวน 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. นำไปอุ่นให้อาหารละลายได้ดี แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tryptone broth

รูปที่ 6 แสดงอาหาร Tryptone broth ในหลอดทดลอง

- MR-VP Medium

วิธีการเตรียม

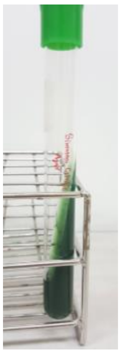
1. ชั่งอาหาร MR-VP Medium สำเร็จรูป จำนวน 17.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. นำไปอุ่นให้อาหารละลายได้ดี แบ่งใส่หลอดทดลองมาตรฐาน ปริมาตรหลอดละ 5 – 7 มิลลิลิตร
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

รูปที่ 7 แสดงอาหาร MR-VP broth ในหลอดทดลอง

- Simmons citrate agar

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหาร Simmons citrate agar สำเร็จรูป จำนวน 24.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. นำไปต้มให้วุ้นละลายได้ดี แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เสร็จแล้วนำหลอดอาหารมาวางเอียงให้เป็น slant



รูปที่ 8 แสดงอาหาร Simmons citrate agar slant ในหลอดทดลอง

3). สารเคมี

1. Kovacs indole reagent
2. Methyl red reagent
3. 40% (w/v) KOH
4. 1–Naphthol

Kovac indole reagent
methyl red reagent
40% KOH
1 - Napthol
1
2
3
4

รูปที่ 9 แสดงชุดน้ำยาทดสอบ IMViC test

4). เชื้อมาตรฐาน (Reference culture)

1. *Escherichia coli* TISTR 073
2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium TISTR 2519
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

5). เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. ปรับมาจากเล่มคู่มือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3 หน้า 89 – 103. Standard Methods for Food Analysis Volume III. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

2. American public health association (APHA). Standard method for the examination of water and wastewater. 23rd ed. Washington DC; 2017 (9221 A – C, E, G, 9225 C – D)

เพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

6). ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และการอ่านผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท จะต้องทำการเขย่าตัวอย่างให้เข้าด้วยกัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

2. การตรวจสอบเบื้องต้น (Presumptive test)

2.1 ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติการ

2.2 เขย่าขวดตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วปิเปตน้ำตัวอย่างเริ่มต้นปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอด Lauryl Sulfate Lactose Broth (LST) ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า และมีหลอดดักก๊าซอยู่ จำนวน 10 หลอด

2.3 นำหลอด LST broth ทุกหลอดมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง ถ้าไม่มีก๊าซเกิดขึ้น ให้บ่มต่อจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ให้บันทึกผลเป็นบวก

3. การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed test)

3.1 เขย่าหลอด LST broth ที่เป็นผลบวกให้เข้ากัน แล้วถ่ายเชื้อแต่ละหลอด 1 loop ลงใน Brilliant Green Lactose Bile broth 2% (BGLB) นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง (สำหรับ coliforms) สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ ให้บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก รายงานผล MPN coliforms โดยนำไปอ่านค่าจาก ตาราง MPN (ภาคผนวก 2) จะได้ค่า MPN coliforms น้อยกว่า 1.1 ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

3.2 และนำหลอด LST broth ที่เป็นผลบวกเขย่าให้เข้ากัน แล้วถ่ายเชื้อแต่ละหลอด 1 loop ลงใน EC medium นำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง (สำหรับ fecal coliforms) สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ ให้บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก รายงานผล MPN fecal coliforms โดยนำไปอ่านค่าจาก ตาราง MPN (ภาคผนวก 2) จะได้ค่า MPN fecal coliforms น้อยกว่า 1.1 ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

4. การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (Completed test) ของ *E. coli*

นำหลอด BGLB หรือ EC medium ที่ให้ผลเป็นบวก มาทำการ streak plate ลงบน Eosin Methylene Blue (EMB) agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะที่เกิดขึ้น ซึ่งลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *E. coli* มีสีเขียวสะท้อนเงาโลหะ (metallic sheen) (ในบางสายพันธุ์อาจไม่เกิดลักษณะเฉพาะนี้ได้) นำโคโลนีที่เกิดขึ้นมาเพิ่มจำนวนโดยทำการ streak plate ลงบนอาหาร TSA แล้วจึงทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไป ยืนยันผลทดสอบโดยใช้ IMViC test ทำได้โดย

4.1 การทดสอบ Indole production test (I)

- เลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryptone broth และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- หยดด้วย Kovacs indole reagent 5 – 10 หยด เขย่าแรงๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ amylalcohol แยกชั้นและเกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที

การอ่านและแปลผล

A. ถ้าเกิดสารประกอบสีม่วงแดงในชั้น amylalcohol ให้บันทึก indole +

B. แต่ถ้าเกิดสีเหลืองของน้ำยา ให้บันทึก indole –

4.2 การทดสอบ MR test (M)

- เลี้ยงเชื้อในอาหาร MR – VP broth และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แบ่งอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- แล้วหยดด้วย methyl red reagent 1-2 หยด โดยให้น้ำยาค่อย ๆ ไหลไปตามข้างหลอดโดยไม่ต้องเขย่า

การอ่านและแปลผล

A. ถ้า methyl red เปลี่ยนเป็นสีแดง ให้บันทึก MR +

B. แต่ถ้า methyl red เป็นสีเหลืองหรือสีส้ม ให้บันทึก MR –

4.3 การทดสอบ VP test (Vi)

- จากหลอดอาหาร MR – VP broth ที่แบ่งไว้ในการทดสอบ MR test เมื่อบ่มครบ 2 วันแล้ว
- แบ่งอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- หยดด้วย 40% (w/v) KOH และ 1–Naphthol อย่างละ 5 – 10 หยด เขย่าแรง ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที

การอ่านและแปลผล

A. ถ้าเกิดสารประกอบสีชมพูแดง ให้บันทึก VP +

B. แต่ถ้าไม่เกิดสารประกอบสีชมพูแดง ให้บันทึก VP -

หมายเหตุ : ถ้าผลการทดสอบ VP 2 วัน ได้ค่าเป็น – ให้บ่มต่อจนครบ 5 วัน แล้วนำมาทดสอบซ้ำ

4.4 การทดสอบ Citrate utilization test (C)

- ใช้ loop แตะเชื้อด้วยวิธี aseptic technique ลากบนอาหาร Simmons citrate agar slant
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกผลการทดลอง

การอ่านและแปลผล

A. ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ให้บันทึก citrate +

B. แต่ถ้าอาหารยังคงเป็นสีเขียว ให้บันทึก citrate -

ตารางสรุปปฏิกิริยาทางชีวเคมี (IMViC test) ของ *E. coli*

Biochemical test	***E. coli***
Indole	Positive (Negative : biotype 2)
Methyl red	Positive
Voges-Proskauer	Negative
Citrate	Negative

ถ้าผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *E. coli* ได้เป็น + + - - หรือในบางสายพันธุ์อาจได้ผลเป็น - + - - จะบันทึกได้ว่า พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร แต่ถ้าผลการทดสอบไม่เป็นตามนี้ จะบันทึกได้ว่า ไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

7). การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

7.1 Coliforms MPN/ 100 มิลลิลิตร หรือ Total coliforms MPN/ 100 มิลลิลิตร

7.2 Fecal coliforms MPN/ 100 มิลลิลิตร

7.3 *E. coli* ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร พบ หรือ ไม่พบ

8). ระยะเวลาดำเนินการ

ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์รวมการจัดเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น 7 – 14 วัน

9). รายละเอียดเพิ่มเติม: ภาคผนวก 2 หน้า 66 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

1). วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั้มระบบสุญญากาศ (vacuum pump)
2. ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)
3. แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm pore size 0.22 µm
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส และ 35 – 37 องศาเซลเซียส
5. ปากคีบ (forceps) ปากแบน
6. ไมโครปิเปต (micropipette) และปิเปตทิป ขนาด 1 มิลลิลิตร
7. ห่วงถ่ายเชื้อและเข็ม (loop and needle)
8. แผ่นกระจกสไลด์ (slide)
9. กล้องจุลทรรศน์ oil immersion objective
10. 95% (v/v) ethanol
11. กระดาษเช็ดเลนส์
12. 70% (v/v) ethanol
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. ไฟแช็ค หรือ ไม้ขีดไฟ
15. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 100*13 มิลลิเมตร
16. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
17. ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
18. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
19. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
20. ตู้ปลอดเชื้อ Laminar air flow

2). อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker (BP) agar

วิธีการเตรียม

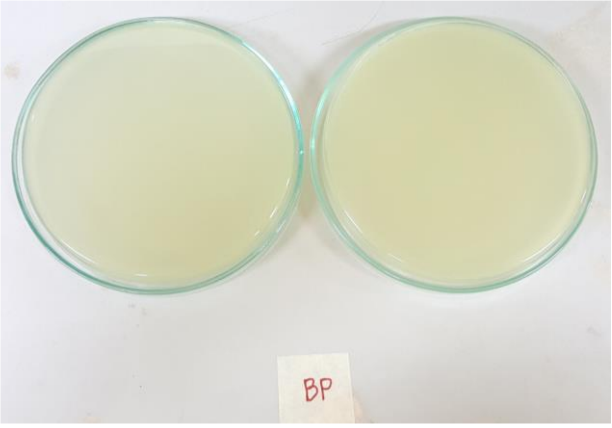
1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BP agar base สำเร็จรูป จำนวน 63.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร

1.2 ต้มให้วุ้นละลายดี แบ่งใส่ flask หรือขวดดูแรน

1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียส เติม Egg yolk Tellurite Emulsion ลงไปผสมในอาหาร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยวิธี aseptic technique

1.5 เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร จะได้อาหารที่มีสีเหลืองขุ่น



รูปที่ 10 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar ในจานเพาะเชื้อ

HIMEDIA
FD046
Egg Yolk Tellurite Emulsion

รูปที่ 11 แสดงลักษณะ Egg yolk Tellurite Emulsion

2. Brain heart infusion (BHI) broth

   วิธีการเตรียม

   2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ (BHI) broth สำเร็จรูป จำนวน 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 1 ลิตร

   2.2 นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร

   2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

รูปที่ 12 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ในหลอดทดลอง

3). สารเคมี (ภาคผนวก 3)

1. Coagulase plasma, rabbit with EDTA
2. ชุดสีย้อมแกรม (Gram stain reagent)
3. 3% hydrogen peroxide solution

4). เชื้อมาตรฐาน (Reference culture)

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Escherichia coli* TISTR 073

5). เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. ปรับมาจากเล่มคู่มือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5 หน้า 119 – 125. Standard Methods for Food Analysis Volume V. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

2. American public health association (APHA). Standard method for the examination of water and wastewater. 23rd ed. Washington DC; 2017 (9213 B)

3. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. (2016). *BAM Chapter 12: Staphylococcus aureus*. [Online]. Available: http://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus. [2020, April 30].

เพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

6). ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และการอ่านผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท จะต้องทำการเขย่าตัวอย่างให้เข้าด้วยกัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

2. การตรวจหา (detection)

2.1 ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติการในตู้ปลอดเชื้อ Laminar air flow

2.2 เตรียมชุดกรองเมมเบรนให้ปราศจากเชื้อ

2.3 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อที่มีรู (pore size) ขนาด 0.22 µm 1 แผ่นมาวางบนส่วนของฐานรองรับกระดาษ วางกรวยรับน้ำครอบบนฐานรับกระดาษให้สนิท

2.4 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อแล้วปิดฝาครอบ

2.5 เปิดเครื่องปั๊มระบบสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด และล้างด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร กรองจนหมด แล้วปิดเครื่อง

2.6 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองในข้อ 2.3 มาวางบนอาหาร BP agar ระวังไม่ให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7 คว่ำจานเพาะเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 4 ชั่วโมง

2.8 บันทึกลักษณะที่เกิดขึ้น (ถ้าพบลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* คือ กลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงดำ หรือโคโลนีอื่นเนื่องด้วย *S. aureus* สามารถย่อยไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารวุ้นใสบริเวณที่เจริญ สังเกตได้โดยยกแผ่นเมมเบรนขึ้น) ให้ทำการ streak เชื้อลงบนอาหารอาหาร BP agar 1 loop เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ยืนยันลักษณะที่ต้องสงสัย

3. ทำการตรวจยืนยัน (confirmatory test)

3.1 การทดสอบ Coagulase test (ภาคผนวก 3)

- เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะลงใน BHI broth 0.2 – 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง
- เติม coagulase plasma (rabbit) with EDTA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส สังเกตจากจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอดเป็นระยะ ๆ ภายใน 6 ชั่วโมง (ถ้าลักษณะการจับตัวกันเป็นลิ่มที่เกิดขึ้นได้ positive ให้สรุปผลการวิเคราะห์ว่าพบ *S. aureus* แต่ถ้ายังไม่เกิดการจับตัวกันเป็นลิ่มให้รายงานว่า ไม่พบ *S. aureus*)

3.2 การทดสอบเพิ่มเติม

- การย้อมแกรม *S. aureus* เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก (ม่วง/น้ำเงิน) รูปร่างกลม เรียงตัวเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น
- การทดสอบ catalase โดยการเขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะแตะบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

ผลบวก : มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที
ผลลบ : ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

S. aureus ให้ผลบวก เพราะสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้

7). การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

รายงานการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ว่า พบหรือไม่พบ ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

8). ระยะเวลาดำเนินการ

ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์รวมการจัดเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น 8 – 14 วัน

9). รายละเอียดเพิ่มเติม: ภาคผนวก 3 หน้า 74 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำบริโภคด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

4.2.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella spp.* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

1). วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั้มระบบสุญญากาศ (vacuum pump)
2. ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)
3. แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm pore size 0.45 µm
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 36 ± 2 และ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส
5. ปากคีบ (forceps) ปากแบน
6. ห่วงถ่ายเชื้อและเข็ม (loop and needle)
7. ไมโครปิเปต (micropipette) และปิเปตทิป ขนาด 1 มิลลิลิตร
8. 70% (v/v) ethanol
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. ไฟแช็ค หรือ ไม้ขีดไฟ
11. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 150*16 มิลลิเมตร
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
13. ไมโครเวฟ (microwave)
14. ขวดดูแรน ขนาด 100 มิลลิลิตร
15. ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
16. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
17. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
18. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2). อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Buffered Peptone Water (BPW)

   วิธีการเตรียม

   1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW สำเร็จรูป จำนวน 20.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 1 ลิตร

   1.2 นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี ใส่ขวดดูแรน ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร

   1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

รูปที่ 13 แสดงอาหารเหลว Buffered Peptone Water ในขวดดูแรน

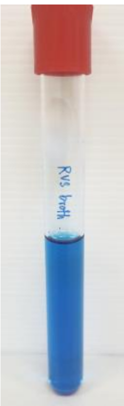
2. Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS Broth)

   วิธีการเตรียม

   2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ RVS Broth สำเร็จรูป จำนวน 27.11 กรัม

   2.2 ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 1 ลิตร นำไปอุ่นให้อาหารละลายดี แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดดละ 10 มิลลิลิตร

   2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



รูปที่ 14 แสดงอาหารเหลว RVS Broth ในหลอดทดลอง

3. Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn)

   วิธีการเตรียม

   3.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MKTTn broth สำเร็จรูป จำนวน 89.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

   3.2 ต้มให้อาหารเดือดละลายดี รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส

   3.3 เติม Novobiocin solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน

   3.4 จากนั้นเติม Iodine – iodide solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงมาผสมให้เข้ากันอีกครั้ง

   3.5 แบ่งใส่หลอดทดลองที่ปลอดเชื้อปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร จะได้อาหารเหลวที่มีสีเขียว

รูปที่ 15 แสดงอาหารเหลว MKTTn Broth ในหลอดทดลอง

4. Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) agar

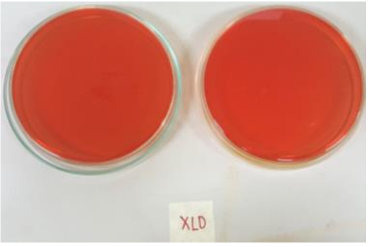
วิธีการเตรียม

1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar สำเร็จรูป จำนวน 57.00 กรัม

1.2 ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 ต้มด้วยไมโครเวฟให้วุ้นละลายดี แล้วอุ่นไว้ที่ water bath อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อแล้วปริมาตรจานละประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร จะได้อาหารที่มีสีแดง

หมายเหตุ : อาหารนี้ไม่ต้อง autoclave และควรเตรียมใช้ในปริมาณที่เพียงพอ เพราะถ้าเตรียมอาหารชนิดนี้ในปริมาณที่มากอาจทำให้ใช้ความร้อนเป็นเวลานาน จะทำให้อาหารเกิดการตกตะกอนได้ ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลการทดสอบผิดพลาด



รูปที่ 16 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar ในจานเพาะเชื้อ

5. Triple sugar iron (TSI) agar slant

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหาร TSI agar สำเร็จรูป จำนวน 64.52 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. นำไปต้มให้วุ้นละลายได้ดี แบ่งใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5-7 มิลลิลิตร
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เสร็จแล้วนำหลอดมาวางเอียงให้เป็น slant โดยให้อาหารมีก้นหลอดสูงประมาณ 1 เซนติเมตร อาหารที่ได้จะมีสีแดง

รูปที่ 17 แสดงอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar slant

3). สารเคมี

-

4). เชื้อมาตรฐาน (Reference culture)

1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 10708
2. *Escherichia coli* TISTR 073
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

5). เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. ปรับมาจากเล่มคู่มือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1 หน้า 177 – 183. Standard Methods for Food Analysis Volume I. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

2. ISO 19250:2010. Water quality-Detection of *Salmonella* spp.
เพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

6). ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์และการอ่านผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท จะต้องทำการเขย่าตัวอย่างให้เข้าด้วยกัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

2. การตรวจหา (detection)

2.1 ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติการในตู้ปลอดเชื้อ Laminar air flow

2.2 เตรียมชุดกรองเมมเบรนให้ปราศจากเชื้อ

2.3 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 µm 1 แผ่นมาวางบนส่วนของฐานรองรับกระดาษ วางกรวยรับน้ำครอบบนฐานรับกระดาษให้สนิท

- การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Pre – enrichment)

2.4 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อแล้วปิดฝาครอบ

2.5 เปิดเครื่องปั้มระบบสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด และล้างด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร กรองจนหมด แล้วปิดเครื่อง

2.6 ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองในข้อ 2.3 ใส่ใน BPW 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง

- การเพิ่มปริมาณเชื้อ (Selective enrichment)

2.7 ปิเปต BPW ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.6 ใส่ใน RSV broth 10 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง (หากต้องการตรวจหา *Salmonella* spp. ที่เจริญเติมโตช้า ให้บ่ม ใน RSV broth ต่อที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 48 ± 4 ชั่วโมง

2.8 ปิเปต BPW ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.6 ใส่ใน MKTTn broth 10 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง

- การแยกเชื้อ (Isolation)

2.9 นำเชื้อจากข้อ 2.7 และ 2.8 มาทำการ streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

2.10 คว่ำจานเพาะเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง

2.11 บันทึกลักษณะที่เกิดขึ้น (ถ้าพบลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* spp. คือ กลม นูน ผิวเรียบ สีใสชมพูแดง มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางโคโลนี) ให้ทำการตรวจยืนยันทางชีวเคมี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar slant โดยการทำ stab & streak ด้วยวิธี aseptic technique เพื่อยืนยันลักษณะที่ต้องสงสัย

3. ทำการตรวจยืนยัน (confirmatory test)

3.1 การตรวจผลยืนยันด้วยอาหาร TSI agar slant ทำได้โดยใช้เข็มถ่ายเชื้อด้วยวิธีการ Stab และ Streak เชื้อบริสุทธิ์ลงบน TSI (การ stab ควรลึกประมาณ 2/3 ของหลอด) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง สังเกตจากฟองอากาศที่แทรกในอาหารหรือรอยแตกของวุ้น และอาจพบสีดำของ FeS ที่บริเวณรอย stab ซึ่งสามารถแพร่กระจายทั่วหลอด (ลักษณะโดยทั่วไปของ *Salmonella* spp. คือ ผิวหน้าอาหารเป็นสีแดงและก้นหลอดสีเหลือง สร้างแก๊ส และประมาณ 90% สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (วุ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ) เขียนสัญลักษณ์ได้เป็น K/A, G, H_2S)

3.2 ถ้าพบลักษณะดังที่กล่าวตาม ข้อ 3.1 ให้สรุปผลการวิเคราะห์ว่าพบ *Salmonella* spp. แต่ถ้าไม่พบลักษณะดังกล่าวให้รายงานว่า ไม่พบ *Salmonella* spp.

7). การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

รายงานการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ว่า พบหรือไม่พบ ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

8). ระยะเวลาดำเนินการ

ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์รวมการจัดเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น 9 – 14 วัน

9). รายละเอียดเพิ่มเติม: ภาคผนวก 4 หน้า 83 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)

ตัวอย่างขั้นตอนและวิธีการแปลผลการตรวจวิเคราะห์

ผู้ปฏิบัติงานได้ยกขึ้นมาประกอบการฝึกปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ที่มีการเขียนผลการวิเคราะห์ การอ่านและแปลผลการวิเคราะห์ เพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถฝึกปฏิบัติจนเกิดความชำนาญได้ดูเป็นแนวทางในการปฏิบัติตาม ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภคนี้ ผู้ปฏิบัติงานได้นำตัวอย่างน้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท ทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อเป็นการยืนยันลักษณะของน้ำว่าเหมาะสมแก่การบริโภค และมีคุณลักษณะเป็นไปตามข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุขหรือไม่ เพื่อสุขอนามัยที่ดีของนักศึกษา บุคลากร เจ้าหน้าที่ รวมทั้งบุคคลทั่วไปด้วย

การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคทางจุลชีววิทยา จะตรวจมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง “น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท”และตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 416 (พ.ศ. 2563) เรื่อง “มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

1. วิธีการตรวจวิเคราะห์ Coliform และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี MPN

2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)

3. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)

ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์

1. ตัวอย่างน้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร

- ผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำบริโภคภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	รายการ	ผลการวิเคราะห์	ค่าที่มาตรฐาน
ตัวอย่างน้ำบริโภคภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร	Adjust from	**คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา**		
	APHA (9221 A-C)	- Coliforms MPN/100 ml	น้อยกว่า 2.2	น้อยกว่า 2.2
	APHA (9221 A-C, E, G, 9225 C-D)	- *E. coli*/100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ
		เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ		
	ISO 19250: 2010	- *Salmonella* spp./100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ
	APHA (9213 B) และ BAM 2016, chapter 12	- *S. aureus*/100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ : ตามมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง “น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท” และประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 416 (พ.ศ. 2563) เรื่อง “มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค”

- การตรวจวิเคราะห์ Coliform และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี MPN

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า พบ Coliform น้อยกว่า 2.2 เนื่องจากในอาหาร BGLB ไม่พบหลอดใดเลยที่ขุ่นและก๊าซ เมื่อนำผลหลอดบวกที่ได้มาเปิดตารางที่ ผ.2.1 (ภาคผนวก 2) ทำให้ได้ค่า MPN/100 ml เท่ากับ 0 และเมื่อนำหลอดอาหารมาเลี้ยงต่อใน EC medium ก็ไม่พบว่าหลอดใดขุ่นหรือมีก๊าซเกิดขึ้นเลย จึงรายงานได้ว่า ไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

- การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า ไม่พบ *S. aureus* เกิดจากการกรองตัวอย่างน้ำด้วยแผ่นกรองแล้วนำมาวางบนอาหาร BP agar พบว่าไม่มีลักษณะใดเลยเกิดขึ้น

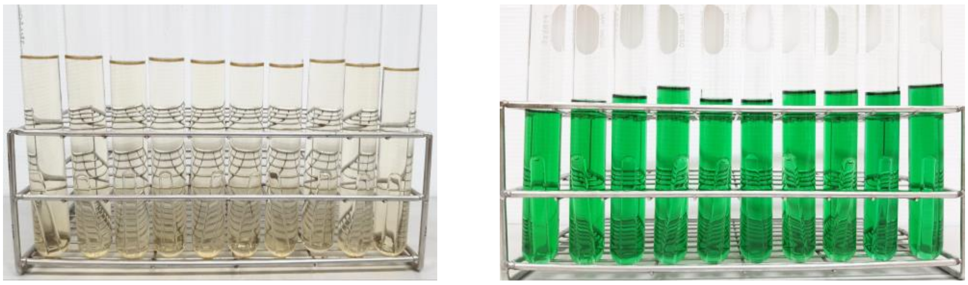
- การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า ไม่พบ *Salmonella* spp. เพราะจากการกรองตัวอย่างน้ำด้วยแผ่นกรองแล้วเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงลง BPW และนำมาเลี้ยงในอาหาร RVS broth และ MKTTn เพื่อคัดเลือกเชื้อโดยเฉพาะ จึงนำมาเลี้ยงต่อลงในอาหาร XLD agar พบว่าไม่มีลักษณะใดเลยเกิดขึ้น

ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำบริโภคภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร จึงผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนด ภาพผลการวิเคราะห์ เป็นไปตามนี้

ภาพตัวอย่างน้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาพผลการวิเคราะห์



DLST และ BGLB ไม่พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ แสดงว่า Coliform น้อยกว่า 1.1 MPN/100 ml

EC medium ไม่พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ และ EMB agar ไม่พบการเจริญ

Baird Parker agar= ไม่พบการเจริญ

XLD agarจาก RSV broth & MKTTn = ไม่พบการเจริญ

2. ตัวอย่างน้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร

- ผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำบริโภคภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	รายการ	ผลการวิเคราะห์	ค่าที่มาตรฐาน
ตัวอย่างน้ำบริโภคภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร	Adjust from	**คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา**		
	APHA (9221 A-C)	- Coliforms MPN/100 ml	น้อยกว่า 2.2	น้อยกว่า 2.2
	APHA (9221 A-C, E, G, 9225 C-D)	- *E. coli*/100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ
		เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ		
	ISO 19250: 2010	- *Salmonella* spp./100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ
	APHA (9213 B) และ BAM 2016, chapter 12	- *S. aureus*/100 ml	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ : ตามมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง “น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท” และประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 416 (พ.ศ. 2563) เรื่อง “มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค”

- การตรวจวิเคราะห์ Coliform และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี MPN

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า พบ Coliform น้อยกว่า 2.2 เนื่องจากในอาหาร BGLB ไม่พบหลอดใดเลยที่ขุ่นและเกิดก๊าซ เมื่อนำผลหลอดบวกที่ได้มาเปิดตารางที่ ผ.2.1 (ภาคผนวก 2) ทำให้ได้ค่า MPN/100 ml เท่ากับ 0 และเมื่อนำหลอดอาหารมาเลี้ยงต่อใน EC medium ก็ไม่พบว่าหลอดใดขุ่นหรือมีก๊าซเกิดขึ้นเลย จึงรายงานได้ว่า ไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

- การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า ไม่พบ *S. aureus* เกิดจากการกรองตัวอย่างน้ำด้วยแผ่นกรองแล้วนำมาวางบนอาหาร BP agar พบว่าไม่มีลักษณะใดเลยเกิดขึ้น

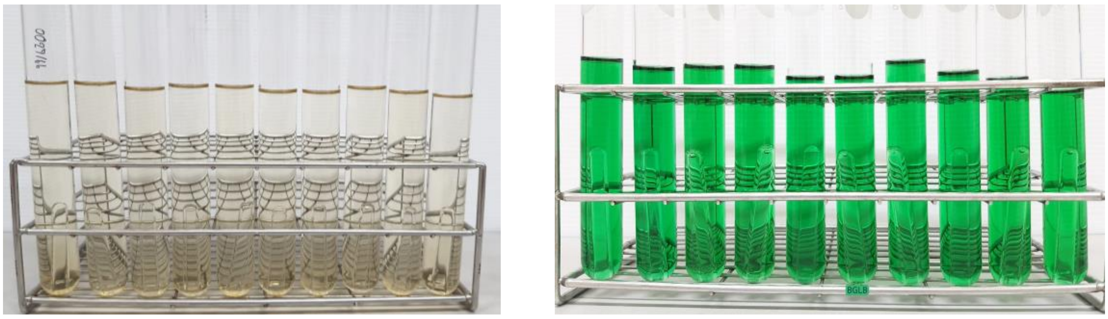
- การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค

จากตารางผลการวิเคราะห์ด้านบน รายงานว่า ไม่พบ *Salmonella* spp. เพราะจากการกรองตัวอย่างน้ำด้วยแผ่นกรองแล้วเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงลง BPW และนำมาเลี้ยงในอาหาร RVS broth และ MKTTn เพื่อคัดเลือกเชื้อโดยเฉพาะ จึงนำมาเลี้ยงต่อลงในอาหาร XLD agar พบว่าไม่มีลักษณะใดเลยเกิดขึ้น

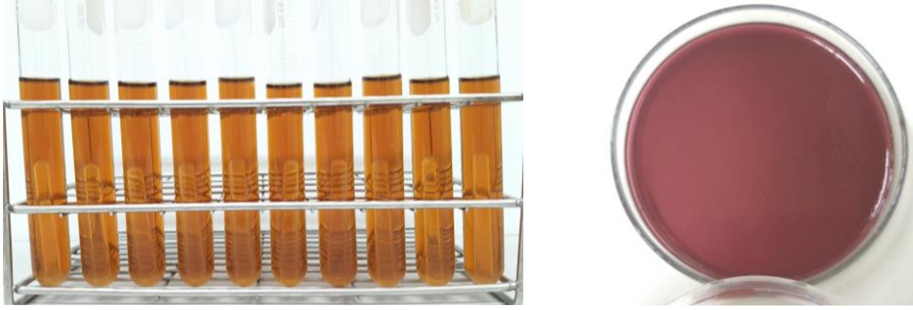
ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำบริโภคภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร จึงผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนด ภาพผลการวิเคราะห์ เป็นไปตามนี้

ภาพตัวอย่างน้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากร

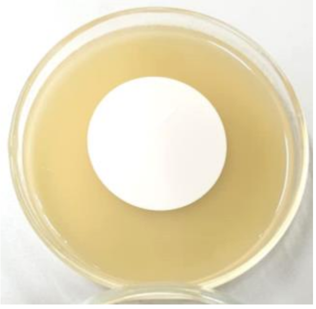
ภาพผลการวิเคราะห์



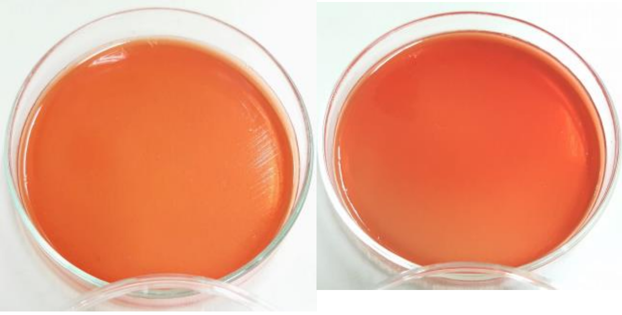
DLST และ BGLB ไม่พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ แสดงว่า Coliform น้อยกว่า 1.1 MPN/100 ml



EC medium ไม่พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ และ EMB agar ไม่พบการเจริญ



Baird Parker agar= ไม่พบการเจริญ

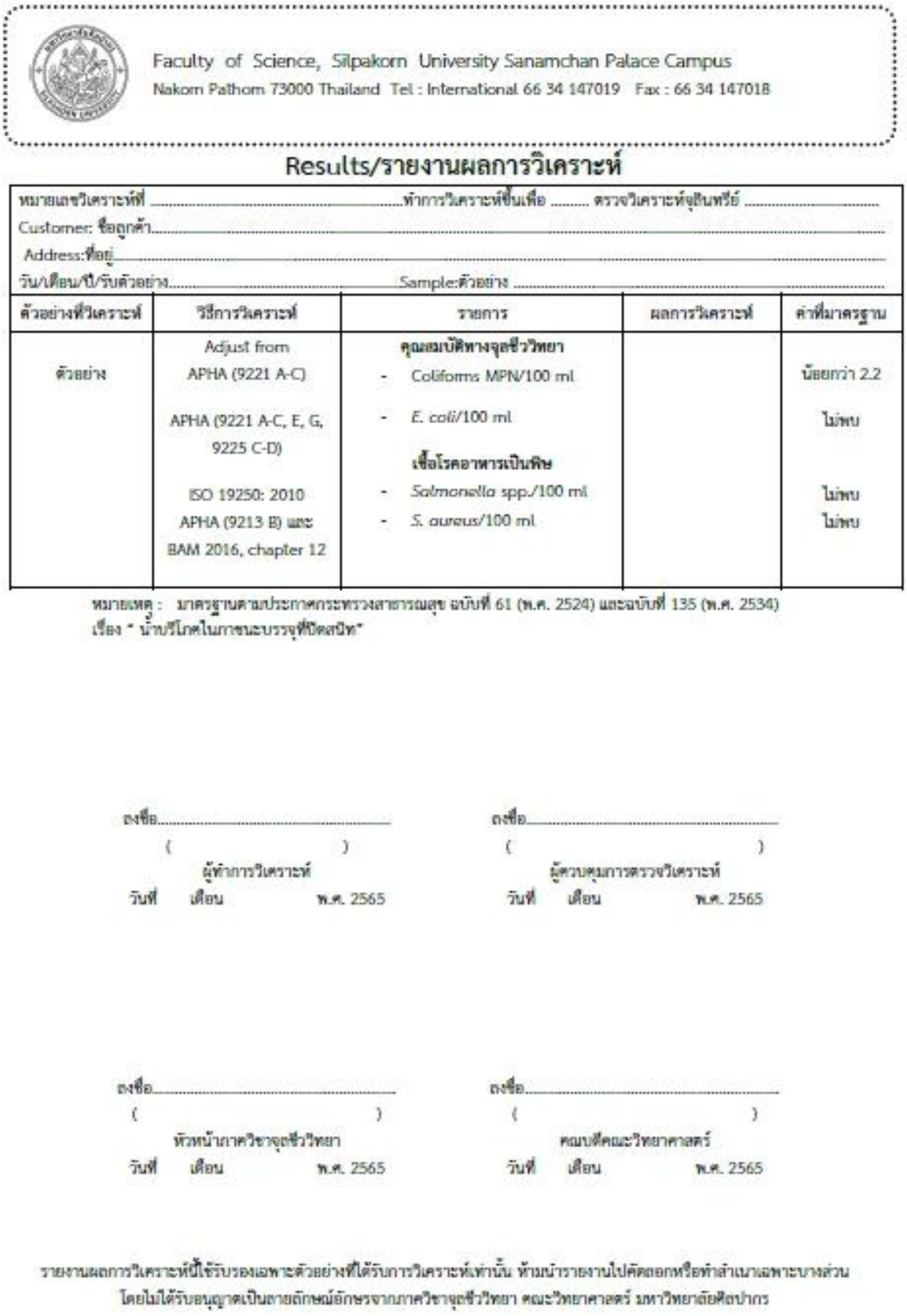


XLD agarจาก RSV broth & MKTTn = ไม่พบการเจริญ

สรุปผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างน้ำบริโภค

น้ำบริโภคที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิททั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยศิลปากรที่นำมาเป็นตัวอย่างนี้ เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์แล้ว พบว่า ผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนด ซึ่งได้ค่า coliforms ที่น้อยกว่า 2.2 ไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร และไม่พบเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *Salmonella* spp. จึงมั่นใจได้ว่าน้ำดื่มที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทนี้ ปลอดภัย และเหมาะสมต่อการบริโภค

ตัวอย่าง ใบรายงานผลการวิเคราะห์



Faculty of Science, Silpakorn University Sanamchan Palace Campus
Nakorn Pathom 73000 Thailand Tel : International 66 34 147019 Fax : 66 34 147018

Results/รายงานผลการวิเคราะห์

หมายเลขวิเคราะห์ที่ ....ทำการวิเคราะห์ขึ้นเพื่อ .... ตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ....
Customer: ชื่อลูกค้า..
Address:ที่อยู่..
วัน/เดือน/ปี/รับตัวอย่าง..Sample:ตัวอย่าง ....

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์	รายการ	ผลการวิเคราะห์	ค่าที่มาตรฐาน
ตัวอย่าง	Adjust from APHA (9221 A-C)	คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา - Coliforms MPN/100 ml		น้อยกว่า 2.2
	APHA (9221 A-C, E, G, 9225 C-D)	- *E. coli*/100 ml		ไม่พบ
		เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ		
	ISO 19250: 2010	- *Salmonella* spp./100 ml		ไม่พบ
	APHA (9213 B) และ BAM 2016, chapter 12	- *S. aureus*/100 ml		ไม่พบ

หมายเหตุ : มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534)
เรื่อง " น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท"

ลงชื่อ..
( )
ผู้ทำการวิเคราะห์
วันที่ เดือน พ.ศ. 2565

ลงชื่อ..
( )
ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์
วันที่ เดือน พ.ศ. 2565

ลงชื่อ..
( )
หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
วันที่ เดือน พ.ศ. 2565

ลงชื่อ..
( )
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ เดือน พ.ศ. 2565

รายงานผลการวิเคราะห์นี้ใช้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้รับการวิเคราะห์เท่านั้น ห้ามนำรายงานไปคัดลอกหรือทำสำเนาเฉพาะบางส่วน
โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทวนสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

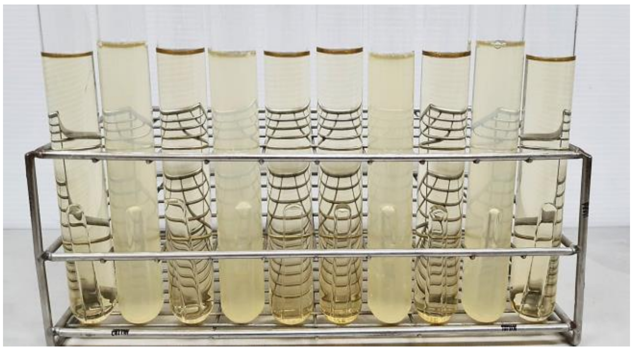
เป็นการยืนยันถึงขั้นตอนกระบวนการการตรวจวิเคราะห์โดยการใช้เชื้อมาตรฐานเป็นตัวแทนตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ด้วยการเตรียมเชื้อให้มีปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 CFU และหมั่นทำการทวนสอบวิธีอย่างน้อยทุก 6 เดือน สามารถตรวจสอบเพื่อทราบได้ถึงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ ประสิทธิภาพเครื่องมือที่ใช้ทดสอบ ทั้งเป็นการยืนยันลักษณะของเชื้อที่ใช้เป็นมาตรฐานอีกด้วย ซึ่งเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทวนสอบวิธี ได้แก่

1. *Escherichia coli* TISTR 073
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium TISTR 2519

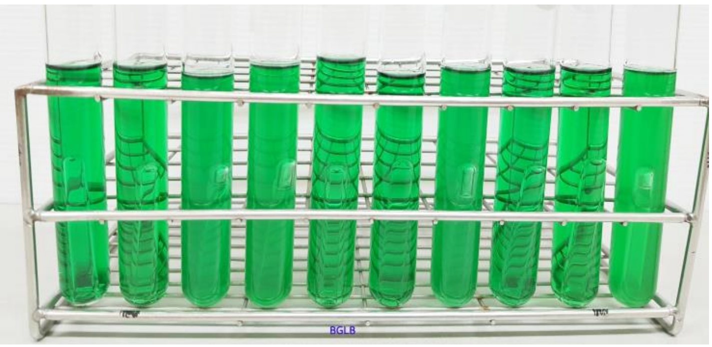
ภาพตัวอย่างน้ำบริโภคที่ใส่เชื้อมาตรฐานลงบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท

ภาพผลการทวนสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

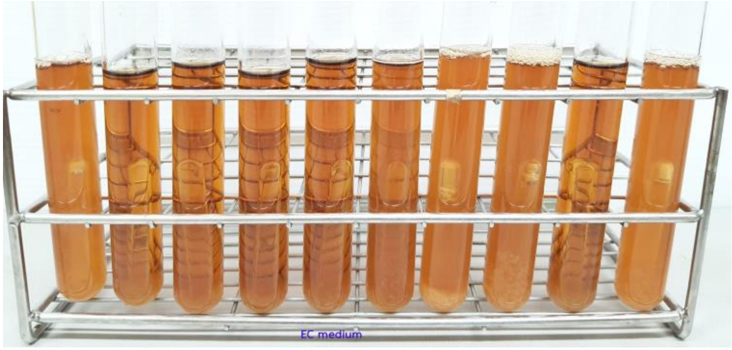
1. วิธีการตรวจวิเคราะห์ Coliform และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี MPN



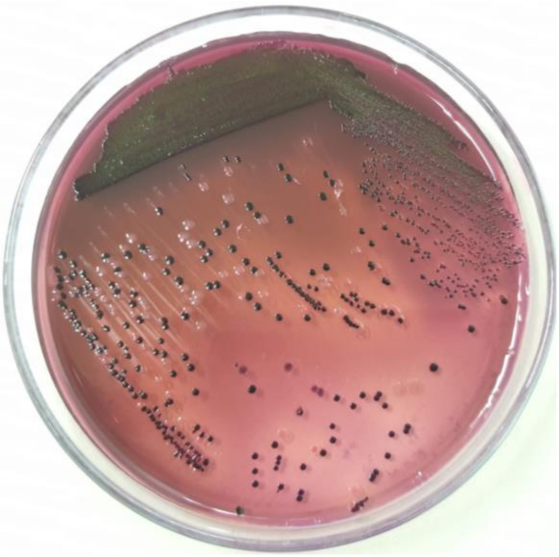
อาหาร DLST พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ จำนวน 4 หลอด นำมายืนยันผลต่อด้วยอาหาร BGLB



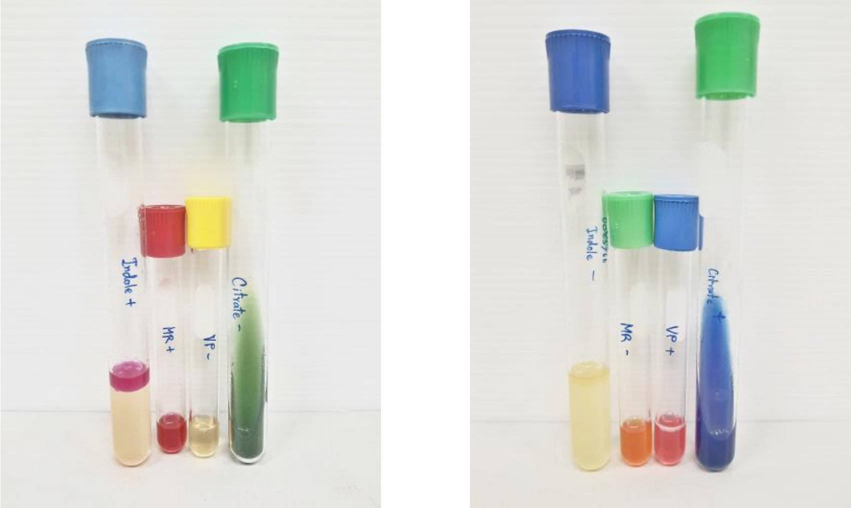
อาหาร BGLB พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ จำนวน 4 หลอด แสดงว่า Coliform มีค่าเท่ากับ 5.1 MPN/100 มิลลิลิตร



EC medium พบหลอดขุ่นหรือเกิดก๊าซ นำมา streak ลงบนอาหาร EMB agar



ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร EMB agar ในลักษณะต่าง ๆ ทั้งมีลักษณะที่เป็น metallic sheen โคโลนีมีสีเข้มและสีอ่อน นำลักษณะที่เกิดขึ้นมาทดสอบยืนยันทางชีวเคมี


Indole +
MR +
VP -
Citrate -
Indole -
MR -
VP +
Citrate +

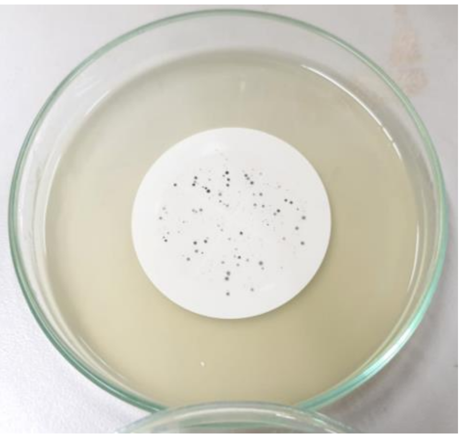
(ก). (ข).

ผลการทดสอบ IMViC test ระหว่าง (ก). *E. coli* และ (ข). Coliform

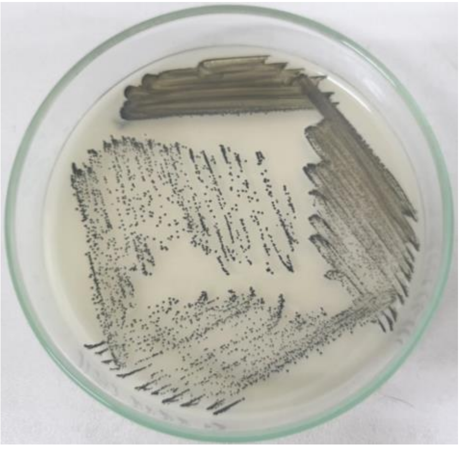
สรุปผลการทวนสอบด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ Coliform และ *E. coli* ในน้ำบริโภค โดยวิธี MPN สามารถรายงานได้ว่า

- จำนวน Coliforms มีค่าเท่ากับ 5.1 MPN/ 100 มิลลิลิตร
- พบ *E. coli* ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

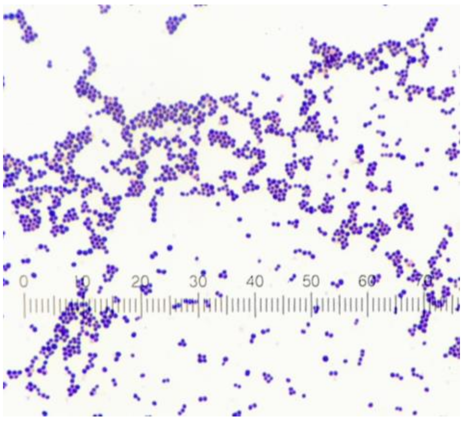
2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)



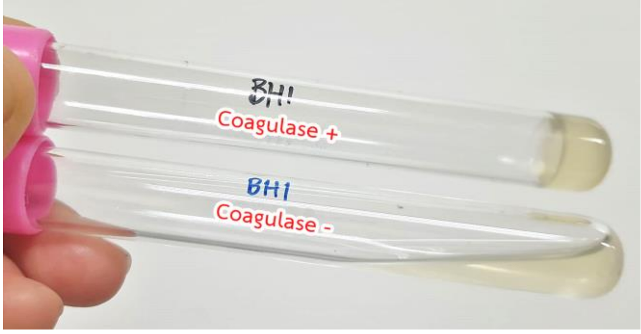
ลักษณะโคโลนีมีสีดำที่เกิดขึ้นบนแผ่นกรองอยู่บนอาหาร BP agar



นำโคโลนีมีสีดำที่เกิดขึ้นมา streak บนอาหาร BP agar (เพื่อเพิ่มจำนวน)



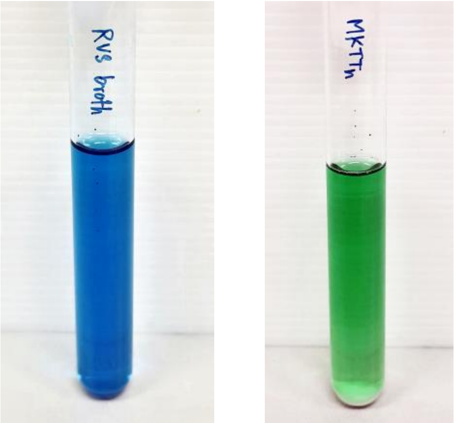
แบคทีเรียติดสีแกรมบวก (ม่วง/น้ำเงิน) รูปร่างกลม เรียงตัวเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น



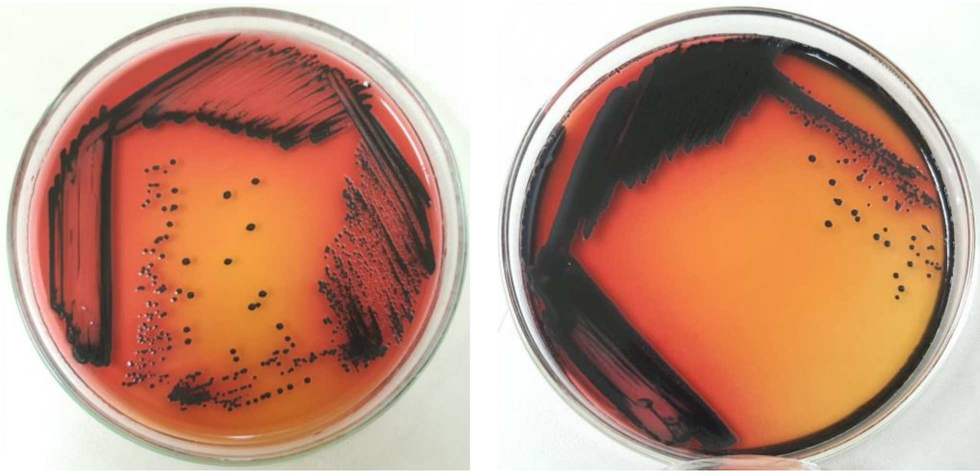
เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวจากอาหาร BP agar มาเลี้ยงด้วยอาหาร BHI broth แล้วนำมาทดสอบ Coagulase test
(ถ้าเกิดลักษณะการจับตัวกันเป็นลิ่มได้ เรียกว่า Coagulase + รายงานว่าพบ *S. aureus*
แต่ถ้าไม่พบการจับตัวกันเป็นลิ่มเรียกว่า Coagulase - ให้รายงานว่า ไม่พบ *S. aureus*)

3. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)

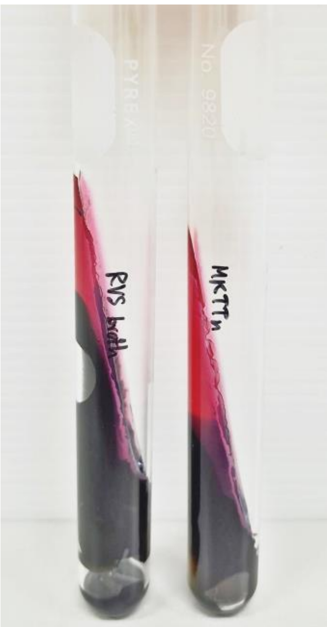
แผ่นกรองตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW (pre – enrichment)



จาก BPW ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร ใส่ RVS broth และปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ MKTTn (selective enrichment)



ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นจากการนำหลอด RVS broth และ MKTTn มา streak ลงบนอาหาร XLD agar (isolation)



ยืนยันผลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI agar slant เกิดลักษณะที่ผิวหน้าอาหารเป็นสีแดงและก้นหลอดสีเหลือง สร้างแก๊ส และประมาณ 90% สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (วุ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ) เขียนสัญลักษณ์ได้เป็น K/A, G, H_2S
ถ้าพบลักษณะดังนี้สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ว่าพบ *Salmonella* spp.
แต่ถ้าไม่พบลักษณะดังกล่าวให้รายงานว่า ไม่พบ *Salmonella* spp.

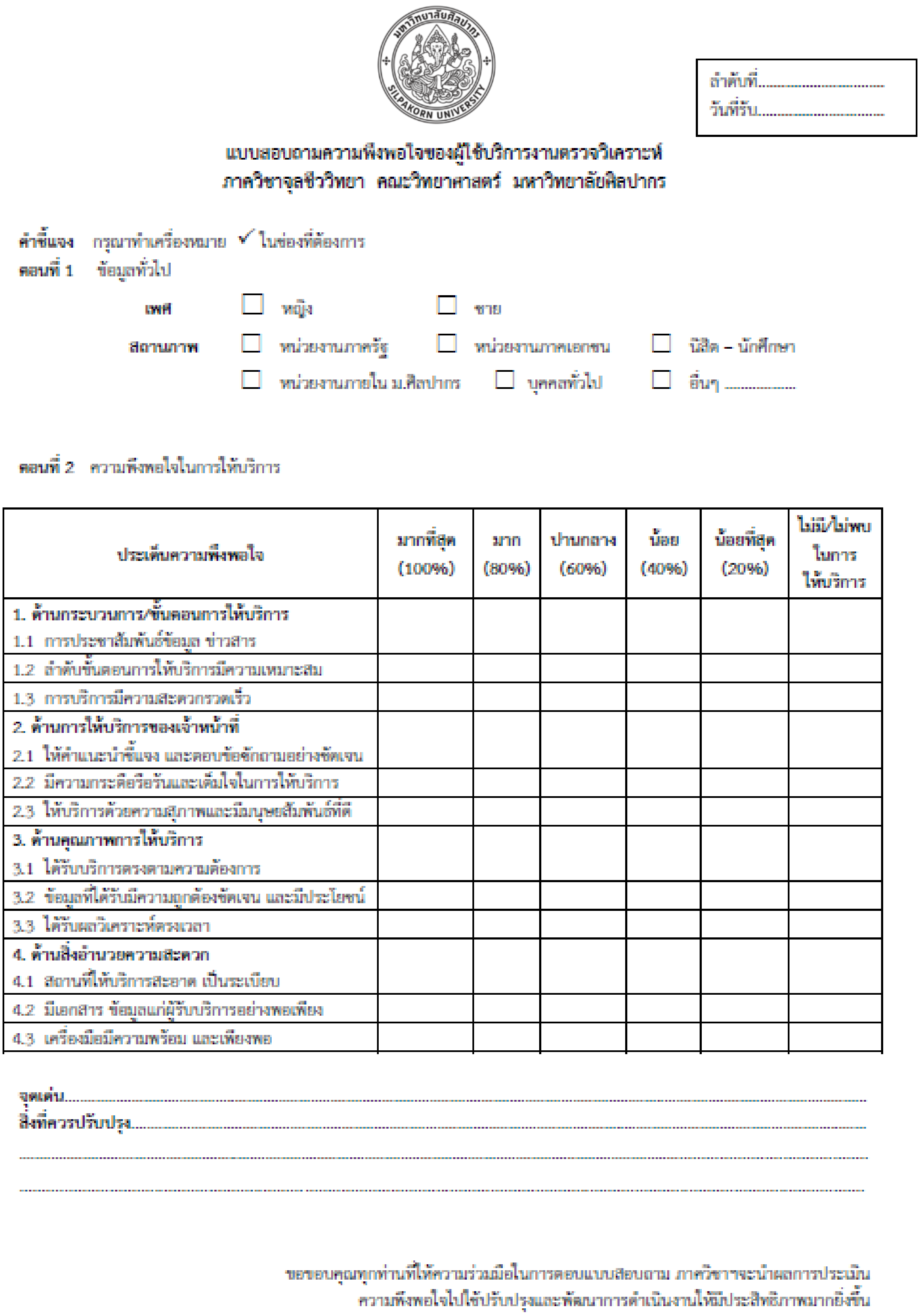
4.3 การติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

การติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน เป็นขั้นตอนในการตรวจสอบผลจากการปฏิบัติงานจริง โดยนำข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการปฏิบัติงาน เพื่อนำผลการประเมินมาพิจารณาวางแผนการปฏิบัติงาน และสอบถามความพึงพอใจของผู้รับบริการมาใช้ประกอบการพัฒนางาน จะได้ผลการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพ หากพบข้อบกพร่องควรปรับปรุงแก้ไขให้สอดคล้องหลักการปฏิบัติงาน PDCA เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพได้มาตรฐานที่ดีในครั้งต่อไป ผู้จัดทำจะทำการประเมินตนเองทุก 6 เดือน โดยตั้งเป้าหมายที่คาดหวังไว้ว่าควรประสบความสำเร็จมากกว่า 80% และความพึงพอใจของผู้รับบริการมากกว่า 60%

ตารางที่ 4.3 ตารางการติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน

เป้าหมาย	คะแนน				
	5	4	3	2	1
	สำเร็จตามเป้าหมาย 100%	สำเร็จตามเป้าหมาย 80%	สำเร็จตามเป้าหมาย 60%	สำเร็จตามเป้าหมาย 40%	สำเร็จตามเป้าหมาย 20%
1. ทำการตรวจวิเคราะห์ได้ตามวันและเวลาที่กำหนดไว้					
2. จัดเตรียมขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องตามเล่มคู่มือปฏิบัติงาน					
3. จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีได้อย่างถูกต้องและเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้ง					
4. ทุกขั้นตอนของการตรวจวิเคราะห์จะคำนึงถึงเทคนิคปลอดเชื้อเป็นหลักสำคัญ					
5. สามารถทวนสอบขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เชื้อมาตรฐานได้อย่างมีประสิทธิภาพ					
6. สามารถแก้ไขปัญหาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี					

ตัวอย่าง แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้รับบริการงานตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์



ลำดับที่..............................
วันที่รับ..............................

แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้ใช้บริการงานตรวจวิเคราะห์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำชี้แจง กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องที่ต้องการ

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

เพศ ☐ หญิง ☐ ชาย

สถานภาพ ☐ หน่วยงานภาครัฐ ☐ หน่วยงานภาคเอกชน ☐ นิสิต – นักศึกษา
☐ หน่วยงานภายใน ม.ศิลปากร ☐ บุคคลทั่วไป ☐ อื่นๆ ....

ตอนที่ 2 ความพึงพอใจในการให้บริการ

ประเด็นความพึงพอใจ	มากที่สุด (100%)	มาก (80%)	ปานกลาง (60%)	น้อย (40%)	น้อยที่สุด (20%)	ไม่มี/ไม่พบในการให้บริการ
1. ด้านกระบวนการ/ขั้นตอนการให้บริการ 1.1 การประชาสัมพันธ์ข้อมูล ข่าวสาร						
1.2 ลำดับขั้นตอนการให้บริการมีความเหมาะสม						
1.3 การบริการมีความสะดวกรวดเร็ว						
2. ด้านการให้บริการของเจ้าหน้าที่ 2.1 ให้คำแนะนำชี้แจง และตอบข้อซักถามอย่างชัดเจน						
2.2 มีความกระตือรือร้นและเต็มใจในการให้บริการ						
2.3 ให้บริการด้วยความสุภาพและมีมนุษยสัมพันธ์ที่ดี						
3. ด้านคุณภาพการให้บริการ 3.1 ได้รับบริการตรงตามความต้องการ						
3.2 ข้อมูลที่ได้รับมีความถูกต้องชัดเจน และมีประโยชน์						
3.3 ได้รับผลวิเคราะห์ตรงเวลา						
4. ด้านสิ่งอำนวยความสะดวก 4.1 สถานที่ให้บริการสะอาด เป็นระเบียบ						
4.2 มีเอกสาร ข้อมูลแก่ผู้รับบริการอย่างพอเพียง						
4.3 เครื่องมือมีความพร้อม และเพียงพอ						

จุดเด่น..
สิ่งที่ควรปรับปรุง..
....
....

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม ภาควิชาจะนำผลการประเมิน
ความพึงพอใจไปใช้ปรับปรุงและพัฒนาการดำเนินงานให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5
ปัญหาอุปสรรค ข้อเสนอแนะ และการพัฒนางาน

ผู้ปฏิบัติงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร มีบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยตัวอย่างหลักคือ น้ำบริโภคที่ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องเป็นไปตามคุณลักษณะที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุข กำหนด เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท การปฏิบัติงานนี้ใช้หลักการปฏิบัติงาน PDCA เป็นมาตรฐาน ในการปฏิบัติงาน ขั้นตอนการปฏิบัติงาน วิธีการติดตามและการประเมินผล การปฏิบัติงาน ต้องมีคุณธรรม จริยธรรม และจรรยาบรรณในการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องมาใช้ในการปฏิบัติงาน

นอกจากนี้ผู้ปฏิบัติงานในตำแหน่งนี้จะต้องมีความรู้ความสามารถ เข้าใจในลักษณะงานและมีพื้นฐาน เทคนิคทางจุลชีววิทยาเป็นอย่างดี วิธีการปฏิบัติงาน การวางแผนการทำงาน การประสานงาน การให้บริการ มี ความเป็นมิตร ยิ้มแย้ม น้อมรับฟังความคิดเห็นจากผู้บังคับบัญชา อาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์ เข้าใจ ผู้มาใช้บริการว่าต้องการสิ่งใด เพื่อตอบรับความต้องการนั้นได้ให้ถูกต้อง ราบรื่น และมีประสิทธิภาพ ลดความ ผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นได้ และผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้บนมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งในการ ปฏิบัติงานนี้พบปัญหาอุปสรรคและแนวทางการแก้ไขปัญหารวมไปถึงข้อเสนอแนะเพื่อการพัฒนางาน ดังนี้

5.1 ปัญหา/อุปสรรค แนวทางการแก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงานและการพัฒนางาน

ตารางที่ 5.1 แสดงปัญหา/อุปสรรค แนวทางแก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงานและการพัฒนางาน

การปฏิบัติงาน	ปัญหา/อุปสรรค	แนวทางแก้ไขและการพัฒนางาน
การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท	- หลายครั้งผู้รับบริการหรือผู้รับตัวอย่างแทนผู้ปฏิบัติงาน (กรณีผู้ปฏิบัติงานติดธุระเร่งด่วนไม่สามารถรับตัวอย่างเองได้) ยังขาดความรู้ความเข้าใจถึงคุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ตามที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้	- ผู้ปฏิบัติงานจะต้องแจ้งข้อกำหนดนั้นให้ผู้รับบริการหรือผู้รับตัวอย่างแทนผู้ปฏิบัติงานทราบ อาจเป็นการบอกกล่าวให้ข้อมูล หรือแจกเป็นเอกสารประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขให้เกิดความเข้าใจในเบื้องต้นถึงคุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเกณฑ์มาตรฐาน
	- การขาดความรู้และความเข้าใจในการเก็บตัวอย่างของผู้รับบริการ ทำให้ตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์	- ต้องชี้แจ้งให้ผู้รับบริการเข้าใจในวิธีการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้อง เพื่อจะได้ลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ซ้ำใหม่ ให้ทราบถึงปริมาณน้ำที่จะต้องนำมาส่งตรวจว่า

การปฏิบัติงาน	ปัญหา/อุปสรรค	แนวทางแก้ไขและการพัฒนางาน
		ควรส่งมาปริมาณอย่างน้อย 500 มิลลิลิตร และต้องบรรจุในภาชนะที่ปลอดเชื้อ เพื่อลดการปนเปื้อนซ้ำจากเชื้อที่ไม่ต้องการ โดยต้องติดต่อก่อนล่วงหน้าอย่างน้อย 3 วันทำการ
	- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เก็บรักษาไว้นานเกินไป	- อาจต้องมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไว้พอดีสำหรับที่จะใช้ในการทดสอบแต่ละเดือน เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด เช่น XLD agar ถ้าเก็บรักษาไว้นานจนเกินไป อาหารนั้นจะเกิดการตกตะกอนได้ ซึ่งจะทำให้การอ่านวิเคราะห์ผลคาดเคลื่อน
	- บางครั้งผู้ปฏิบัติงานอาจเกิดความเร่งรีบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เสร็จทันต่อการตรวจวิเคราะห์ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีคุณภาพ เช่น อาหารเหลวที่ใส่หลอดดักก๊าซ เมื่อครบเวลาของการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รีบเปิดเครื่องเร็วเกินไป หลอดอาหารที่ยังคงอุณหภูมิสูงอยู่ภายในเครื่องเกิดแรงดันอากาศ ทำให้ไม่สามารถไล่อากาศที่มีอยู่ในหลอดดักก๊าซออกได้หมด เมื่อนำอาหารหลอดนั้นมาใช้ จะทำให้การอ่านวิเคราะห์ผลผิดพลาด	- ผู้ปฏิบัติงานจะต้องรู้จักวางแผนการปฏิบัติงานให้เป็นลำดับขั้นตอนของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้คุณภาพ ควรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นใหม่ทันที เพื่อลดข้อผิดพลาดหากนำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาทำการตรวจวิเคราะห์ และทำให้การอ่านผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้อง - หาข้อมูลวิธีการแก้ปัญหาการไล่อากาศออกไม่หมดในหลอดดักก๊าซ
	- ผู้ปฏิบัติงานแทนอาจมีเทคนิคทางจุลชีววิทยาไม่ดีพอ	- ต้องมีการฝึกปฏิบัติและทดสอบความรู้ความสามารถ รวมถึงเทคนิคพื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยา เกี่ยวกับเทคนิคปลอดเชื้อ การถ่ายเชื้อ ความรู้พื้นฐานเฉพาะตัวของเชื้อจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ รวมถึงการอ่านแปลผลการวิเคราะห์ได้ เข้าใจธรรมชาติแหล่งที่สามารถพบเชื้อ ทราบถึงการป้องกันตนเอง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างการตรวจวิเคราะห์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ตามที่ผู้จัดทำได้กล่าวถึงปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไขปัญหาจากการทำคู่มือวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทมาแล้วนั้น เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปอย่างราบรื่น ลดขั้นตอนการปฏิบัติงานและได้ผลการปฏิบัติงานที่มีประสิทธิภาพ ผู้ปฏิบัติงานจึงมีข้อเสนอแนะเพื่อพัฒนาหรือปรับปรุงงาน ดังนี้

1. หาโอกาสเข้าร่วมอบรมเพิ่มพูนความรู้หรือร่วมงานประชุมที่เกี่ยวข้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภค และตัวอย่างอื่น ๆ เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้และเป็นการเพิ่มทักษะการตรวจวิเคราะห์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่ทันสมัย

2. หากผู้ปฏิบัติงานไม่เข้าใจในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ควรรีบปรึกษาอาจารย์ผู้ควบคุมการตรวจวิเคราะห์หรือผู้ที่เชี่ยวชาญทางด้านนั้น

3. หมั่นตรวจสอบการตรวจวิเคราะห์ อย่างน้อยทุก 6 เดือน เพื่อเป็นยืนยันถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์และเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งเป็นการยืนยันลักษณะเฉพาะของเชื้อที่นำมาทดสอบด้วย ซึ่งกระทำได้ตามนี้ เช่น

3.1 การทวนสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนหลาย ๆ ครั้ง และผู้ที่สนใจ อาทิเช่น นักเรียน นักศึกษา ก็สามารถใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ได้ผลที่ออกมาเหมือนกัน หมายรวมถึงสามารถทำซ้ำได้ และเพื่อผลลัพธ์ที่ได้ให้มีประสิทธิภาพควรหมั่นเข้าร่วมอบรมถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง เป็นการแลกเปลี่ยนความรู้เพื่อพัฒนางานให้มีคุณภาพมากขึ้น

3.2 การใช้เชื้อมาตรฐานตรวจสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์แทนตัวอย่างน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ด้วยการเตรียมเชื้อให้มีปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 CFU สำหรับผลบวก และเตรียมเชื้อให้มีปริมาณมากกว่า 1,000 CFU สำหรับผลลบ หากใช้เชื้อมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์แล้ว ไม่เป็นไปตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ ให้รีบดำเนินการหาสาเหตุและแก้ไขทันที อาจปรึกษาผู้ที่เชี่ยวชาญทางด้านนี้

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เช่น การตรวจวัดค่าอุณหภูมิในตู้บ่มเพาะเชื้อ ด้วยการใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้มาตรฐานวัดค่าในเครื่องตู้บ่มเพาะเชื้อ ว่ามีอุณหภูมิ เช่น 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส หรือไม่เพื่อมั่นใจได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตรงตามวิธีมาตรฐานที่นำมาใช้ ลดความผิดพลาดในการอ่านผลการวิเคราะห์ได้

3.4 ตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ด้วยการสังเกตถึงลักษณะทางกายภาพของอาหาร วันหมดอายุ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อมาตรฐานและสังเกตลักษณะเฉพาะของเชื้อที่เกิดขึ้น หากเชื้อมีลักษณะที่เปลี่ยนไป ควรทำการเปลี่ยนกระปุกอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทันที

3.5 ตรวจสอบความปลอดเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว โดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) อีกด้วย

4. ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทันทีหรือเร็วที่สุดหลังจากได้รับตัวอย่างมาแล้ว ทั้งนี้ควรเก็บรักษาตัวอย่างน้ำไว้ในที่มืดและอุณหภูมิต่ำ (4 – 10 องศาเซลเซียส) เพื่อคงลักษณะและลดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพที่อาจเกิดขึ้นก่อนช่วงการตรวจวิเคราะห์และทดสอบในห้องปฏิบัติการได้

5. มีสติและรอบคอบในทุกครั้งที่ทำปฏิบัติการ

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2562). *คู่มือมาตรฐานน้ำดื่มประเทศไทย*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/sdm_downloads/water_handbook/. (วันที่ค้นข้อมูล : 8 กุมภาพันธ์ 2563).

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). *วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1. Standard Methods for Food Analysis Volume I*. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). *วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3. Standard Methods for Food Analysis Volume III*. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). *วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5. Standard Methods for Food Analysis Volume V*. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

การแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการเก็บรักษา. (2563). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://biology.crru.ac.th/biology/images/PDF/LacMicro/LacMicro05.pdf . (วันที่ค้นข้อมูล : 11 เมษายน 2563).

คลังปัญญามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2563). *แบคทีเรียกรัมลบในลำไส้ (Enteric bacteria)*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/3053/8/277537_ch1.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 12 มีนาคม 2563).

คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. (2563). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม, 185 น.

จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. (2563). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, 330 น.

จันทร์หอม สมสงวน. (2553). *คู่มือปฏิบัติงาน กระบวนวิชา Food Microbiology*.สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 63 น.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2550). *จุลชีววิทยาทางอาหาร Food microbiology*. โครงการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา, 451 น.

ปราโมช เชี่ยวชาญ. (2560). *คุณภาพน้ำดื่มในโรงงาน/สถานประกอบกิจการ*. Drink Safe International.

วาสนา คงสุข. (2560). *คู่มือการสุ่มเก็บ การบรรจุและการเก็บรักษาคุณภาพตัวอย่างน้ำบริโภคเพื่อการนำส่งห้องปฏิบัติการ*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.oic.go.th/FILEWEB/CABINFOCENTER17/DRAWER002/GENERAL/DATA0000/00000178.PDF. (วันที่ค้นข้อมูล : 28 กุมภาพันธ์ 2563).

ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร Food Network Solution. (2563). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/. (วันที่ค้นข้อมูล : 2 มีนาคม 2563).

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. (2563). *สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/staphylococcus_aureus2.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 30 มีนาคม 2563).

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร Food microbiology*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ, 470 น.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2535). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. กรุงเทพฯ, 248 น.

สุพรรณี เทพอรุณรัตน์. (2547). *คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำบริโภค*. โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp_8_2547_water_gmp.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล : 12 เมษายน 2563).

สัตถาพร สิโรตมรัตน์. (2549). การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงและสารเคมีปนเปื้อนในอาหาร. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์* 20 (1), 87-101.

American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23rd edition, Washington DC : American Public Health Association.

American Type Culture Collection. (2011). *LAURYL SULFATE LACTOSE BROTH (LST BROTH)*. [Online]. Available: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU9446.pdf. [2022, Nov 20]

Collins, C.H. & Patricia M. Lyne. (1987). *Microbiological Methods*. 5th edition. Butterworth & Co. London, 450 p.

Compendium of method for the microbiological examination of food. 2015. *Staphylococcus aureus and Staphylococcus Enterotoxins*. 5th edition. American public health association, Washington, DC.

da Silva, Neusely., Taniwaki, Marta H., Junqueira, Valeria C.A., Silveira, Neliane F.A., do Nascimento, Maristela S., and Gomes, Renato A.R. (2013). *Microbiological Examination Methods of Food and Water : A Laboratory Manual*. CRC Press/ Balkeman, Taylor & Francis Group, an informa business. UK, 456 p.

HiMedia Laboratories. (2020). *Baird Parker Agar Base*. [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m043.pdf. [2020, April 14].

HiMedia Laboratories. (2020). *BHI Broth*. [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m210.pdf . [2020, April 14].

HiMedia Laboratories. (2020). *Brilliant Green Bile Broth 2%.* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m121.pdf. [2020, April 9].

HiMedia Laboratories. (2023). *Buffered Peptone Water* [Online]. Available : https://www.himedialabs.com/media/TD/M614.pdf. [2023, April 29].

HiMedia Laboratories. (2020). *Egg Yolk Tellurite Emulsion.* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/fd046.pdf. [2020, April 15].

HiMedia Laboratories. (2020). *EMB Agar, Levine.* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m022.pdf. [2020, April 9].

HiMedia Laboratories. (2023). *Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS Broth)*. [Online]. Available : https://www.himedialabs.com/media/TD/M1491.pdf. [2023, April 15].

HiMedia Laboratories. (2020). *Simmons Citrate Agar.* [Online]. Available : http://himedialabs.com/TD/M099.pdf. [2020, April 9].

HiMedia Laboratories. (2020). *Triple Sugar Iron Agar.* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m021.pdf. [2020, April 20].

HiMedia Laboratories. (2020). *Tryptone Broth (Tryptone Water).* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m463.pdf. [2020, April 9].

HiMedia Laboratories. (2023). *Tryptone Soya Agar (TSA).* [Online]. Available : https://drive.google.com/file/d/1lrrJcI6ct1KdhGdJleqa-fdHba0XkZDo/view. [2023, April 28].

HiMedia Laboratories. (2020). *Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar).* [Online]. Available : http://www.himedialabs.com/TD/m031.pdf. [2020, April 16].

International Organization for Standardization. (2010). *ISO 19250. Water quality – Detection of Salmonella spp*. Geneva: ISO; 2010.

MMIZ, ErasmusMC, Rotterdam. (2022). *Triple Sugar Iron (TSI) Agar*. [Online]. Available : https://microbe-canvas.com/tests.php?p=2089. [2022, Nov 14]

Multiple-tube method for thermolerant (faecal) coliforns. (2020). [Online]. Available : https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/small-community-management/2edvol3i.pdf?ua=1. [2020, April 12].

Paniker, C.K.J. (2005). *Textbook of Microbiology*. Orient Longman Private Ltd., 7th edition. [Online]. Available : https://www.moscmm.org/pdf/Ananthanarayan%20microbio.pdf. [2020, April 15]

Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C.and Tompkin, R.B. (1996). *Microorganism in foods*. First edition. Great Britain by Clays Ltd, 513 p.

Robert Blodgett. (2017). *BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions*. [Online]. Available : https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions. [2020, March 4.]

Thermo Fisher Scientific Inc. (2001-2020). *MR VP MEDIUM*. [Online]. Available : http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0043&org=71&c=UK&lang=EN. [2020, April 10]

Thermo Fisher Scientific Inc. (2001-2023). *MULLER-KAUFFMANN TETRATHIONATE-NOVOBIOCIN BROTH (MKTTn).* [Online]. Available : http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1048&c=UK&lang=EN. [2023, April 30]

Todar, Kenneth. (2008-2012). *Structure and Function of Bacterial Cells*. [Online]. Available : www.textbookofbacteriology.net. [2020, April 20].

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. (2002). *BAM 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. [Online]. Available : https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria. [2020, April 8].

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. (2016). *BAM Chapter 12: Staphylococcus aureus*. [Online]. Available : https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus. [2020, April 30].

Valls, J. Sancho, Nacente, R. Baldris, and Coll, M. Sanchez. (1996). *Scharlau culture media for Microbiology*. 3rd edition. Romargraf, S.A., Juventut, 55 – L'Hospitalet de Ll. 346 p.

Welcome to microbugz. (2022). *Triple Sugar Iron Agar*. [Online]. Available : https://www.austincc.edu/microbugz/triple_sugar_iron_agar.php. [2022, Nov 14]

World Health Organization. (2006). *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 1, Recommendations. – 3rd edition. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสาวิณี ปฐมสุริยะพร
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 273 ถนนลำพยา ตำบลลำพยา อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000
อีเมลติดต่อ	PATHOMSURIYA_S@su.ac.th
ระดับการศึกษา	พ.ศ. 2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศิลปากร
สถานที่ทำงาน	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์ ระดับ ปฏิบัติการ

การอบรมและการพัฒนา

1. รับบริการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท
2. เข้าร่วมฟังบรรยาย เรื่อง มาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในนมและผลิตภัณฑ์นม
3. ผ่านการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่อง การจัดการห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025
4. เป็นผู้เข้าร่วมอบรมความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการป้องกันอัคคีภัย
5. เป็นผู้เข้าร่วมอบรมหลักสูตรมาตรฐานด้านความปลอดภัยห้องปฏิบัติการและการสำรวจสถานภาพความปลอดภัยห้องปฏิบัติการโดยใช้ ESPReL Checklist
6. เป็นผู้ดูแลรับผิดชอบห้องปฏิบัติการงานด้านบริการวิชาการ ซึ่งผ่านมาตรฐานด้านความปลอดภัยห้องปฏิบัติการและการสำรวจสถานภาพความปลอดภัยห้องปฏิบัติการโดยใช้ ESPReL Checklist (ESPReL No: 2-0280-0047-3)

ภาคผนวก

(ภาคผนวก 1)

ตารางที่ ผ.1 สรุปประกาศและเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพเกี่ยวกับน้ำบริโภค น้ำบาดาลที่ใช้บริโภค น้ำประปาดื่มได้ และน้ำแข็ง ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1. น้ำบริโภค			
	คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
ประกาศกระทรวงสาธารณสุข - ฉบับที่ 61** (พ.ศ. 2524) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท ลงวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2524 - ฉบับที่ 135** (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534 - ฉบับที่ 220 (พ.ศ. 2544) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2544 - ฉบับที่ 256 (พ.ศ. 2545) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท (ฉบับที่ 4) ลงวันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2545 - ฉบับที่ 284 (พ.ศ. 2547) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่บรรจุปิดสนิท (ฉบับที่ 5) ลงวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547	1. แบคทีเรียประเภท Coliform โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)	MPN / 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 2.2
	2. *E. coli*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	3. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค*		
	- *Salmonella* spp.	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	- *S. aureus*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	*ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 416) พ.ศ. 2563 เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ลงวันที่ 2 กันยายน พ.ศ. 2563 ผลิตภัณฑ์ ข้อที่ 12 **ใช้ตามประกาศนี้**		
ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 362) พ.ศ. 2556 เรื่อง น้ำบริโภคจากตู้น้ำดื่มอัตโนมัติ ลงวันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2556	1. แบคทีเรียประเภท Coliform โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)	MPN / 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 2.2
	2. *E. coli*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	3. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค		
	- *Salmonella* spp.	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	- *S. aureus*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ

	คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
องค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2539 ที่มา : Guidelines for drinking - water quality (WHO, 1996)	1. แบคทีเรียประเภท Coliform	MPN / 100 มิลลิกรัม	ไม่พบ
	2. *E. coli* หรือ เทอร์โมโธเลอแรนท์โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	MPN / 100 มิลลิกรัม	ไม่พบ
ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 3470 (พ.ศ. 2549) เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค มาตรฐานเลขที่ มอก. 257-2549 ลงวันที่ 24 มีนาคม พ.ศ. 2549	1. แบคทีเรียประเภท Coliform โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)	100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 1.1
	2. *E. coli*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	3. *S. aureus*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	4. *Salmonella* spp.	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	5. *Clostridium perfringens*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
2. น้ำบาดาลที่ใช้บริโภค			
	คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกัน ด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ. 2551 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 85ง ลงวันที่ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2552	1. แบคทีเรียที่ตรวจพบโดยวิธี Standard plate count	CFU/ml	ไม่เกินกว่า 500
	2. แบคทีเรียประเภท Coliform โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)	MPN / 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 2.2
	3. *E. coli*	-	ต้องไม่มีเลย

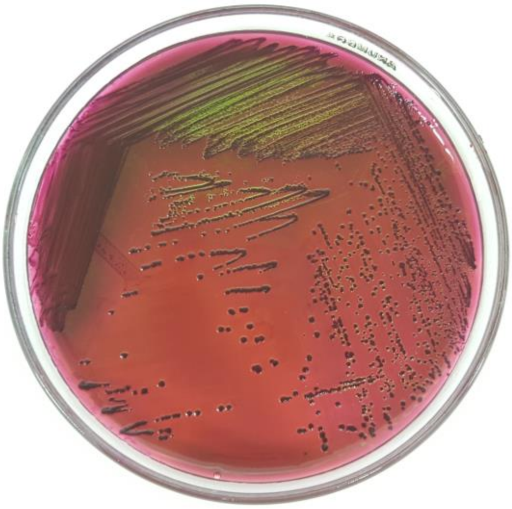
3. น้ำประปาดื่มได้			
	คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
มาตรฐานคุณภาพน้ำประปาของการประปาส่วนภูมิภาค บันทึกข้อความของ กคน. ที่ มท 55702-2/258 ลงวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ. 2550	1. แบคทีเรียประเภท Coliform (Total Coliform Bacteria)	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	2. *E. coli*	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	3. *S. aureus*	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	4. *Salmonella* spp.	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	5. *Clostridium perfringens*	ต่อ 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
ประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ ประกาศ ณ วันที่ 13 กรกฎาคม พ.ศ. 2563	1. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total coliform bacteria)	100 มิลลิลิตร หรือ MPN / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ หรือ น้อยกว่า 1.1
	2. *E. coli*	100 มิลลิลิตร หรือ MPN / 100 มิลลิลิตร	ไม่พบ หรือ น้อยกว่า 1.1
4. น้ำแข็ง			
	คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์	**หน่วย**	**ค่ามาตรฐาน**
ประกาศกระทรวงสาธารณสุข - ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) เรื่อง น้ำแข็ง ลงวันที่ 16 มกราคม พ.ศ. 2527 - ฉบับที่ 137 (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำแข็ง (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 23 เมษายน พ.ศ. 2534 - ฉบับที่ 254 (พ.ศ. 2545) เรื่อง น้ำแข็ง (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2545 - ฉบับที่ 285 (พ.ศ. 2547) เรื่อง น้ำแข็ง (ฉบับที่ 4) ลงวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547	1. แบคทีเรียประเภท Coliform โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)	MPN / 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 2.2
	1. *E. coli*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	2. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค*		
	- *Salmonella* spp.	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	- *S. aureus*	100 มิลลิลิตร	ไม่พบ
	*ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ลงวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2556 ผลิตภัณฑ์ ข้อที่ 19		

(ภาคผนวก 2)

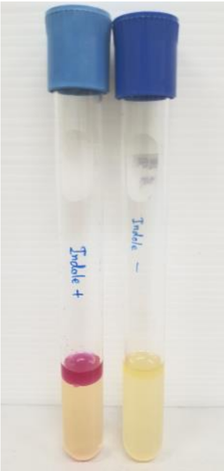
รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *Escherichia coli* ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

ตารางที่ ผ.2.1 แสดงค่า Most Probable Number (MPN) ทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด รายงานผลเป็น หน่วย MPN/100 มิลลิลิตร

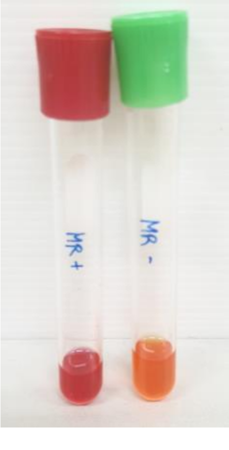
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	**MPN/100 มิลลิลิตร**
0	<1.1
1	1.1
2	2.2
3	3.6
4	5.1
5	6.9
6	9.2
7	12
8	16
9	23
10	>23



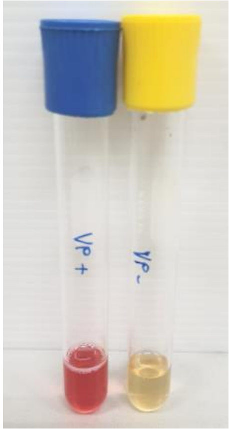
รูปที่ 18 แสดงลักษณะของ *E. coli* บนอาหาร EMB agar


Indole +
Indole −

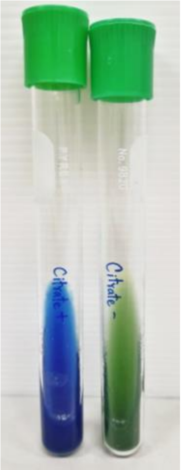
รูปที่ 19 แสดงผลการทดสอบ Indole production test (I) ที่ให้ผลบวกและผลลบ



รูปที่ 20 แสดงผลการทดสอบ MR test (M) ที่ให้ผลบวกและผลลบ



รูปที่ 21 แสดงผลการทดสอบ VP test (Vi) ที่ให้ผลบวกและผลลบ



รูปที่ 22 แสดงผลการทดสอบ Citrate utilization test (C) ที่ให้ผลบวกและผลลบ

ตารางที่ ผ.2.2 แสดงผลการทดสอบ IMViC ของ Coliforms Bacteria

Species	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
Typical *E. coli*	Positive	Positive	Negative	Negative
Atypical *E. coli*	Negative	Positive	Negative	Negative
Shigella spp.	Negative	Positive	Negative	Negative
Salmonella spp.	Negative	Positive	Negative	Positive
Klebsiella spp.	Negative	Negative	Positive	Positive
Proteus vulgaris	Positive	Positive	Negative	Negative
Proteus mirabilis	Negative	Positive	Negative	Positive
Citrobacter freundii	Negative	Positive	Negative	Positive
Enterobacter aerogenes	Negative	Negative	Positive	Positive

ที่มา : Textbook Of Microbiology by Ananthanarayan, Paniker, C.K.J. (2005).

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาที่ใช้ทดสอบ

1. Brilliant Green Bile Broth 2%

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brilliant Green Bile Broth 2% (Brilliant Green Lactose Bile Broth) เป็นอาหารเหมาะกับการเจริญของพวกกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ในอาหาร น้ำ น้ำเสีย และผลิตภัณฑ์นม รวมทั้งวัสดุอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อสุขอนามัย

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร (1,000 มิลลิลิตร)

Peptone	10.00	กรัม
Oxgall	20.00	กรัม
Lactose	10.00	กรัม
Brilliant Green	13.30	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.2 ± 0.2

2. EC medium

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว EC medium เป็นอาหารชนิด selective ใช้สำหรับคัดเลือก *Escherichia coli* โดยเทคนิค MPN จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างอื่น ๆ

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	20.00	กรัม
Lactose	5.00	กรัม
Bile salts mixture	1.50	กรัม
Dipotassium phosphate	4.00	กรัม
Monopotassium phosphate	1.50	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 6.9 ± 0.2

3. Eosin Methylene Blue (EMB) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar (Levine) อาหารวุ้นแข็ง เป็นทั้ง selective และ differential medium ใช้สำหรับคัดเลือก เพิ่มจำนวนเชื้อ และแยกความแตกต่างของเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae และแยก *E. coli* จากเชื้ออื่น ๆ โดยลักษณะโคโลนี จะมีสีเขียวดำเงาวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) บนอาหารชนิดนี้ ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ อาหาร ทางการแพทย์และตัวอย่างอื่น ๆ

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	10.00	กรัม
Dipotassium phosphate	2.00	กรัม
Lactose	10.00	กรัม
Eosin – Y	0.40	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.1 ± 0.2

4. Lauryl Sulfate Lactose Broth (LST)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Sulfate Lactose Broth (LST) ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อโคลิฟอร์มในน้ำ น้ำเสีย ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ และตัวอย่างทางการแพทย์

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Tryptose	20.00	กรัม
Lactose	5.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Dipotassium phosphate	2.75	กรัม
Monopotassium phosphate	2.75	กรัม
Sodium lauryl sulphate	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 6.8 ± 0.2

5. Tryptone Soya Agar (TSA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar (TSA) เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรียทั่วไป และใช้ในการทดสอบ sterility testing ของเชื้อราและแบคทีเรีย

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	15.00	กรัม
Soya peptone	5.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.3 ± 0.2

6. Tryptone Broth (Tryptone Water)

เป็นอาหารที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มว่าสามารถเปลี่ยน Tryptophan เป็น indole ได้หรือไม่ เป็นอาหารหนึ่งในการทดสอบ IMViC test

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	10.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.5 ± 0.2

7. MR-VP Medium

เป็นอาหารเหลวสำหรับแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจาก glucose ว่าสามารถสร้างกรดได้มากหรือไม่ และความสามารถในการผลิต acetoin จาก glucose ด้วย เป็นอาหารสองอย่างในการทดสอบ IMViC test

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	7.00	กรัม
Glucose (dextrose)	5.00	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 6.9

8. Simmons citrate agar

เป็นอาหารชนิดแข็งใช้แยกความแตกต่างของเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้หรือไม่ ถ้าแบคทีเรียที่สามารถใช้ citrate เพียงอย่างเดียวได้จะสามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้และจะให้ผลที่เป็นด่าง ทำให้ bromothymol blue ที่ใช้เป็น pH indicator เปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Magnesium sulphate	0.200	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.000	กรัม
Dipotassium phosphate	1.000	กรัม
Sodium citrate	2.000	กรัม
Sodium chloride	5.000	กรัม
Bromothymol blue	0.080	กรัม
Agar	15.000	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 6.8 ± 0.2

9. Kovacs indole reagent น้ำยาใช้ทดสอบ Indole

ส่วนประกอบ

Pure amyl หรือ isoamyl alcohol	150	มิลลิลิตร
p-Dimethylaminobenzaldehyde	10	กรัม
HCl (conc.)	50	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสาร p-Dimethylaminobenzaldehyde จำนวน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ แล้วใส่ isoamyl alcohol ลงไปคนให้ละลาย

2. ค่อย ๆ รินกรด HCl (conc.) ลงไปคนให้สารผสมเข้ากันโดยทำในตู้ดูดควัน (hood) เพราะสารมีกลิ่นแรง

3. เก็บสารไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

10. Methyl red reagent น้ำยาใช้ทดสอบ MR test

ส่วนประกอบ

Methyl red	0.1	กรัม
95% (v/v) Ethanol	200	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Methyl red จำนวน 0.1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์

2. เติม 95% (v/v) ethanol ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำตั้งบน hot plate stirrer ใส่แท่งเหล็ก magnetic bar ลงไปปั่นให้สารละลายเข้าด้วยกัน

3. เก็บสารไว้ในขวดสีชา

11. 40% (w/v) KOH (potassium hydroxide) น้ำยาใช้ทดสอบ VP test ตัวที่หนึ่ง

ส่วนประกอบ

Potassium hydroxide	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง potassium hydroxide (KOH) จำนวน 40 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์

2. เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงไปคนให้สารละลายเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในขวดดูแรน

12. 1–Naphthol น้ำยาใช้ทดสอบ VP test ตัวที่สอง

ส่วนประกอบ

1- Naphthol	5	กรัม
Absolute ethanol	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง 1- Naphthol จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์
2. เติม Absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไปคนให้ละลาย หรือนำไปปั่นบน Hot plate stirrer
3. เก็บไว้ในขวดสีชา

(ภาคผนวก 3)

รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane Filtration)

การทดสอบ Coagulase test

เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิต Coagulase enzyme ซึ่งสามารถทำให้พลาสมา (plasma) ของคนหรือกระต่ายแข็งตัว เป็นการทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญในการแยก *S. aureus* ออกจาก staphylococci สปีชีส์อื่น ๆ เพราะ *S. aureus* สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้

วิธีทดสอบเริ่มจากการเตรียม Coagulase plasma, rabbit with EDTA ให้พร้อมใช้งาน โดยการเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปผสม จากของแข็งให้กลายเป็นของเหลว หลังจากนั้นนำไปทำการทดสอบได้

BD BBL™ Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA
REF 240827 10
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
BBL™ Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA

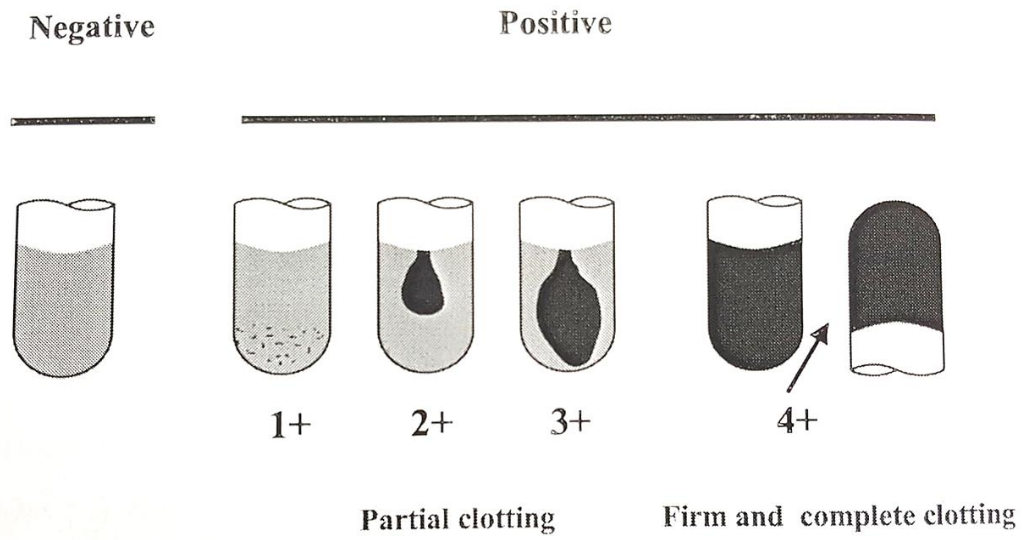
รูปที่ 23 แสดง Coagulase plasma, rabbit with EDTA ที่พร้อมใช้งาน

1. เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะจาก BP agar ลงในอาหารเหลว Brain heart infusion (BHI) 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2. เติม Coagulase plasma, rabbit with EDTA 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส

3. สังเกตการจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอด เป็นระยะ ๆ ภายใน 6 ชั่วโมง หากไม่เกิดการจับตัวภายในระยะเวลาดังกล่าวให้ทำการบ่มต่ออีกจนครบ 24 ชั่วโมง

4. ทำการอ่านผล Coagulase test


Negative
Positive
1+
2+
3+
4+
Partial clotting
Firm and complete clotting

รูปที่ 24 แสดงการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอดของการทดสอบ Coagulase

ที่มา : วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1 หน้า 211

ระดับของการจับตัวกันเป็นลิ่มของเชื้อและ Coagulase plasma

ระดับของการจับตัว	ลักษณะที่ปรากฏ
0	ไม่เกิดการจับตัว
+1	จับตัวกันเป็นก้อนน้อย ไม่รวมกลุ่ม
+2	จับตัวกันเป็นก้อนน้อย รวมกลุ่ม
+3	จับตัวกันเป็นก้อนใหญ่
+4	จับตัวเป็นก้อนหมดทั้งหลอด และไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

การย้อมสีแกรม Gram staining

ชุดสีย้อมแกรม (Gram stain set) ประกอบด้วย

- Gram crystal violet
- Gram iodine (mordant)
- 95% (v/v) ethanol (decolorizing agent)
- Gram safranin (counter stain)

Gram's Crystal violet
Gram's Iodine
95% Ethanol
Gram's safranine

รูปที่ 25 แสดงชุดสีย้อมแกรม (Gram stain set)

การเตรียมแผ่นสไลด์สำหรับย้อมแกรม

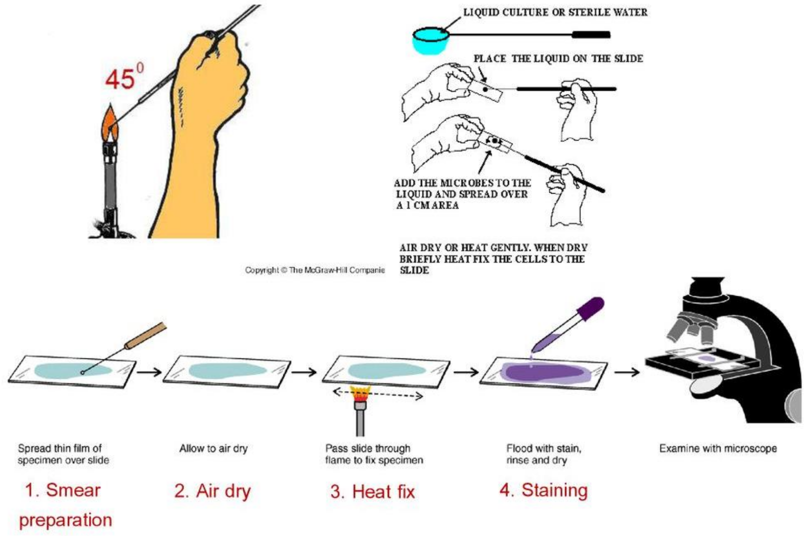
1. นำแผ่นสไลด์มาล้างน้ำด้วยน้ำให้สะอาด
2. ใช้กระดาษทิชชู่เช็ดให้สะอาด จนหมดคราบ
3. หน้าแผ่นสไลด์ต้องไม่มัน สะอาดใส พร้อมใช้งาน

ทดสอบได้โดยหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ น้ำจะแผ่กระจาย ไม่จับกลุ่มเป็นหย่อม ๆ

วิธีการเกลี่ยเชื้อ (preparation of the smear) (ม.เกษตรฯ, 2547) หมายถึง การนำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยให้กระจายออกไปบาง ๆ เป็นบริเวณเล็ก ๆ บนแผ่นสไลด์ เทคนิคที่จะต้องปฏิบัติในเบื้องต้นก่อนการเตรียมสเมียร์เชื้อ ก็คือ เทคนิคของการเขี่ยเชื้อที่ถูกวิธี การจับ loop และถือหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่อาจติดอยู่ที่ปลาย loop และปากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกลี่ยเชื้อมี 2 วิธี คือ

1. การเกลี่ยเชื้อจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง (agar plate หรือ agar slant) ทำโดยใช้ loop จุ่มน้ำ แตะลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 ลูป แล้วนำ loop เผาไฟให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้ออื่น ทิ้งไว้ให้เย็น นำ loop มาเขี่ยเชื้อที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ ทำการกระจายเชื้อให้ทั่วอย่างสม่ำเสมอเป็นวงบาง ๆ เล็ก ๆ แล้วทิ้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้ง

2. การเกลี่ยเชื้อจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว วิธีนี้ไม่ต้องใช้หยดน้ำ เพราะเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเหลวเป็นของเหลวอยู่แล้วทั้งมีปริมาณเชื้อที่ไม่หนาแน่นเหมือนเชื้อที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง ทำโดยนำหลอดอาหารมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้เชื้อกระจายตัวทั่วหลอด แล้วจึงเผา loop ให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาจุ่มเชื้อ 2-3 ลูป มาแตะบนแผ่นสไลด์ ประจายเชื้อให้ทั่วเป็นวงเล็ก ๆ บาง ๆ แล้วทิ้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้ง

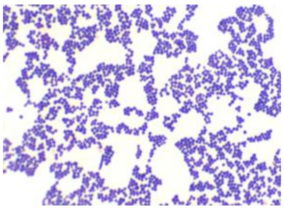

45°
LIQUID CULTURE OR STERILE WATER
PLACE THE LIQUID ON THE SLIDE
ADD THE MICROBES TO THE LIQUID AND SPREAD OVER A 1 CM AREA
AIR DRY OR HEAT GENTLY. WHEN DRY BRIEFLY HEAT FIX THE CELLS TO THE SLIDE
Copyright © The McGraw-Hill Companie
Spread thin film of specimen over slide
Allow to air dry
Pass slide through flame to fix specimen
Flood with stain, rinse and dry
Examine with microscope
1. Smear preparation
2. Air dry
3. Heat fix
4. Staining

รูปที่ 26 แสดงวิธีการเกลี่ยเชื้อ (smear preparation) ที่มา : https://slideplayer.in.th/slide/14863826/90/images/21/%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B8%98%E0%B8%B5%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B8%B5%E0%B8%A2%E0%B8%A1%E0%B8%AA%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%B5%E0%B8%A2%E0%B8%A3%E0%B9%8C%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD+%28smear+preparation%29.jpg

ขั้นตอนการย้อมแกรม

1. หลังจาก smear เชื้อลงบนสไลด์แล้ว ปล่อยให้แห้ง (air dry)
2. แล้วนำมาผ่านเปลวไฟ (heat fix) 3 – 5 ครั้ง เพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์ จากนั้นนำมาย้อมแกรม
3. วางสไลด์ลงบนรางย่อม (ทำที่อ่างน้ำ) แล้วหยด Gram crystal violet จนท่วมแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาที่ไหลอย่างช้า ๆ แล้วย้อมต่อด้วย Gram iodine (mordant stain จะช่วยเพิ่มการยึดเกาะของสี ทำให้เกิดเป็น crystal violet – iodine complex) ทิ้งไว้นาน 1 นาที
5. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาที่ไหลอย่างช้า ๆ แล้วทำการ decolorized เพื่อล้างสีออกด้วยตัวทำละลาย 95% (v/v) ethanol โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 15 – 20 วินาที
6. ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาที่ไหลอย่างช้า ๆ แล้วย้อมซ้ำด้วย Gram safranin (counter stain) ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที
7. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาที่ไหลอย่างช้า ๆ แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่ (ห้ามเช็ด)
8. ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ oil-immersion objective แล้วบันทึกรูปร่างลักษณะการเรียงตัวการติดสีแกรม

การอ่านผล



(กำลังขยาย 1000X)

เซลล์ที่ติดสีม่วงหรือน้ำเงิน crystal violet คือ

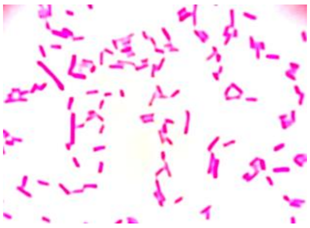
Gram positive bacteria เช่น *Staphylococcus* sp.

Bacillus sp.

เซลล์ที่ติดสีแดงหรือชมพู safranin คือ

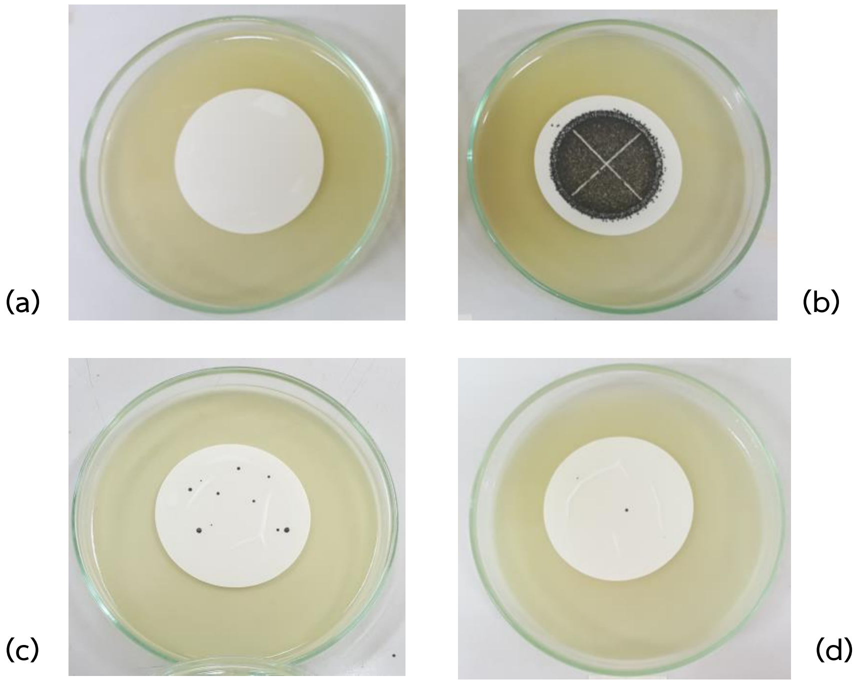
Gram negative bacteria เช่น *E. coli,*

Salmonella spp.



(กำลังขยาย 1000X)

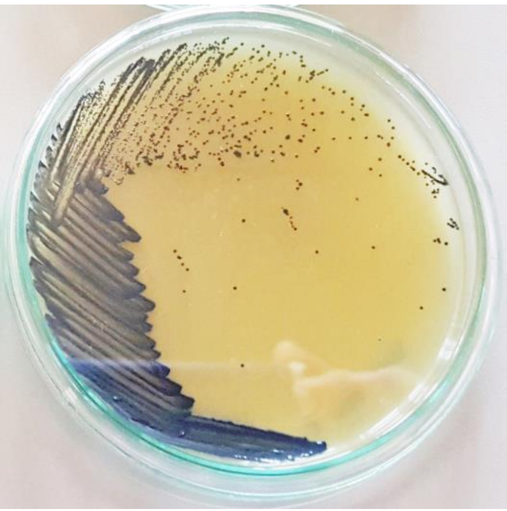
รูปที่ 27 แสดงการเตรียมอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในน้ำบริโภค



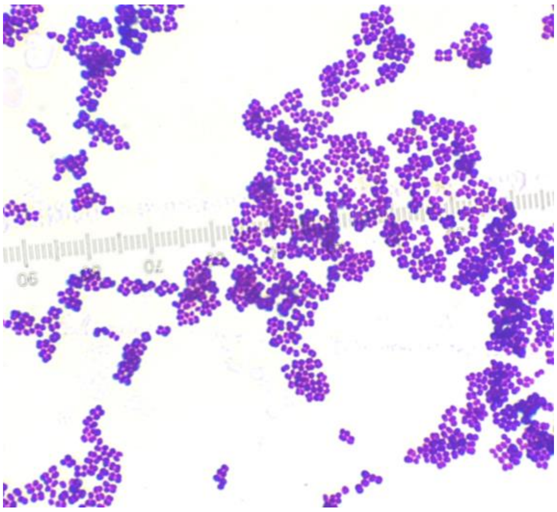
รูปที่ 28 แสดงลักษณะเชื้อบนแผ่นกรองต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นบนอาหาร BP agar

(a) ไม่พบลักษณะใดเลยบนแผ่นกรอง ให้รายงานผลว่า ไม่พบ *S. aureus* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

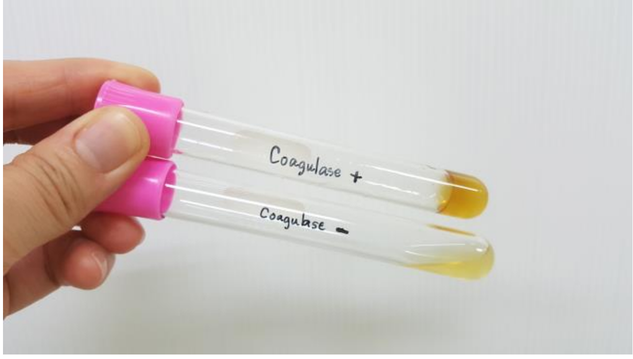
(b) (c) และ (d) พบลักษณะโคโลนีต้องสงสัย นำไปทดสอบต่อโดยการ streak plate ย้อมแกรม และทดสอบ Coagulase test



รูปที่ 29 แสดงลักษณะโคโลนี *S. aureus* บน BP agar



รูปที่ 30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ oil immersion objective ของ *S. aureus* ที่กำลังขยาย 1000X



รูปที่ 31 แสดงผลการทดสอบ Coagulase test

- ถ้าพบลักษณะโคโลนีบนอาหาร BP agar ย้อมแกรมแล้วได้ติดสีแกรมบวก รูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น และทดสอบ Coagulase ได้ผล positive ให้รายงานว่า พบ *S. aureus* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร
- แต่ถ้าไม่พบลักษณะต่าง ๆ ตามผลที่ทดสอบมานี้ ให้รายงานว่า ไม่พบ *S. aureus* ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. Baird-Parker (BP) agar base

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar อาหารวุ้นแข็ง ประเภท selective medium และ differential medium เป็นอาหารเฉพาะ ใช้สำหรับคัดเลือกและเพิ่มจำนวนเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่ให้ผล Coagulase test เป็นบวก จากตัวอย่างน้ำ อาหาร และตัวอย่างทางการแพทย์อื่น ๆ

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	10.00	กรัม
Beef extract	5.00	กรัม
Yeast extract	1.00	กรัม
Glycine	12.00	กรัม
Sodium pyruvate	10.00	กรัม
Lithium chloride.$6H_2O$ ($LiCl_2.6H_2O$)	5.00	กรัม
Agar	20.00	กรัม
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.0 ± 0.2

2. Brain heart infusion (BHI) broth

อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion (BHI) broth เป็นอาหารเหลว เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่เจริญได้ยาก โดยเฉพาะเชื้อพวกที่มีรูปร่างกลมหรือเชื้ออื่น ๆ

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Calf brain infusion from	12.50	กรัม
BHI powder	5.00	กรัม
Proteose peptone	10.00	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.00	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.00	กรัม
Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	2.50	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.4 ± 0.2

สารเคมีสำหรับการเตรียมสีย้อมแกรม

1. Gram crystal violet

ส่วนประกอบ

Solution A :	Crystal violet (90% dye content)	10	กรัม
	95% (v/v) ethanol	100	มิลลิลิตร
Solution B :	Ammonium oxalate	4	กรัม
	น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสม solution A กับ B เข้าด้วยกัน
2. ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำมาใช้งาน และเก็บไว้ในขวดสีชา

2. Gram iodine (mordant)

ส่วนประกอบ

Iodine	2	กรัม
Potassium iodide (KI)	4	กรัม
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ละลาย Potassium iodide ในน้ำกลั่น
2. บด iodine ให้ละเอียด แล้วละลายในสารละลาย Potassium iodide
3. กวนจนสาร ละลายหมดและเก็บไว้ในขวดสีชา

3. 95% (v/v) ethanol (decolorizing agent)

คือ 95% (v/v) ethanol

4. Gram safranin (counter stain)

ส่วนประกอบ

Safranin O	0.25	กรัม
95% (v/v) ethanol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

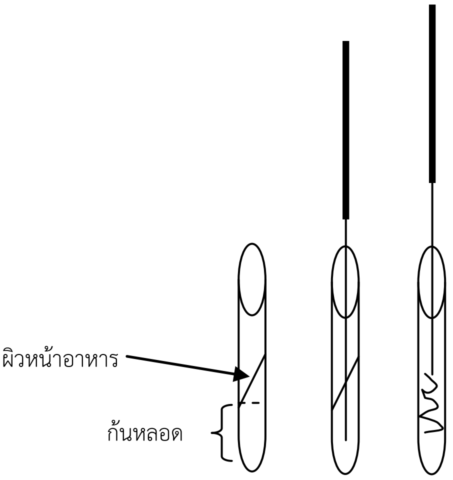
1. ละลาย Safranin O ใน 95% (v/v) ethanol แล้วเติมน้ำกลั่น
2. กวนด้วยแท่งแล้วหรือ magnetic bar บน hot plate stirrer
3. กรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ และเก็บไว้ในขวดสีชา

(ภาคผนวก 4)

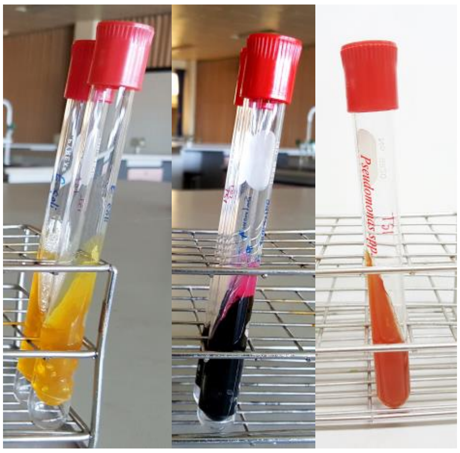
รายละเอียดเพิ่มเติม: การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำบริโภค ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (Membrane Filtration)

การทดสอบทางชีวเคมีโดยอาหาร Triple sugar iron (TSI) agar slant

TSI (ม.ศิลปากร, 2563) เป็น differential medium ที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลของ Gram negative bacteria ในอาหารมี glucose, lactose และ sucrose (อัตราส่วน 1 : 10 : 10) เป็นแหล่งคาร์บอนและมี sodium thiosulfate เป็นแหล่งกำมะถัน นอกจากนี้ยังมี phenol red เป็น pH indicator และมี ferrous sulfate เป็น H_2S indicator ด้วย



รูปที่ 32 แสดงลักษณะของอาหารเอียงที่บรรจุในหลอดทดลอง และการ stab & streak ด้วยวิธี aseptic technique



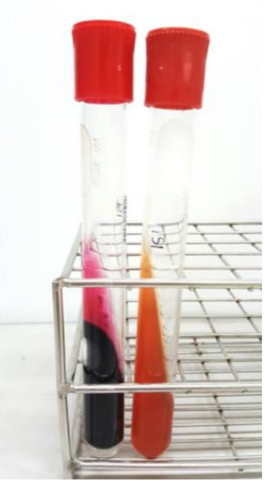
A/A, G　　K/A, G, H_2S　　K/NC

รูปที่ 33 แสดงลักษณะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในอาหาร TSI agar slant

ตารางที่ ผ.4 การอ่านและแปลผลการทดสอบของอาหาร TSI agar slant

Results (slant/butt)	Symbol	Interpretation
Red/yellow	K/A	Glucose fermentation only; Peptone catabolized
Yellow/yellow	A/A	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation
Red/red	K/K	No fermentation; Peptone catabolized
Red/no color change	K/NC	No fermentation; Peptone used aerobically
Yellow/yellow with bubbles	A/A,G	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation; Gas produced
Red/yellow with bubbles	K/A,G	Glucose fermentation only; Gas produced
Red/yellow with bubbles and black precipitate	K/A,G, H_2S	Glucose fermentation only; Gas produced; H_2S produced
Red/yellow with black precipitate	K/A, H_2S	Glucose fermentation only; H_2S produced
Yellow/yellow with black precipitate	A/A, H_2S	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation; H_2S produced
No change/no change	NC/NC	No fermentation
A=acid production; K=alkaline reaction; G=gas production; H_2S =sulfur reduction		

ที่มา : Welcome to microbugz, (2022)



รูปที่ 34 แสดงลักษณะ *Salmonella spp.* จากการทดสอบด้วยอาหาร TSI agar slant

- ถ้าพบลักษณะโดยทั่วไปของ *Salmonella* spp. คือ ผิวหน้าอาหารเป็นสีแดงและก้นหลอดสีเหลือง สร้างแก๊ส และประมาณ 90% สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (วุ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ) ในอาหาร TSI agar slant เขียนสัญลักษณ์ได้เป็น K/A, G, H_2S ให้รายงานว่า พบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

- แต่ถ้าไม่พบลักษณะต่าง ๆ ตามผลที่ทดสอบมานี้ ให้ รายงานว่า ไม่พบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. Buffered Peptone Water (BPW)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water เป็นอาหาร pre-enrichment ที่ใช้เพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* ก่อโรคที่ได้รับบาดเจ็บจากตัวอย่างต่าง ๆ

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Proteose peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	3.5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.2 ± 0.2

2. Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS Broth)

อาหารเลี้ยงเชื้อ RVS broth เป็นอาหารที่แนะนำซึ่งจัดเป็นอาหาร selective medium ที่ใช้สำหรับคัดแยกเชื้อ *salmonella* spp. จากตัวอย่างน้ำ อาหารและอื่น ๆ

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Papaic digest of soyabean meal	4.5	กรัม
Sodium chloride	8.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.6	กรัม
Dipotassium phosphate	0.4	กรัม
Magnesium chloride. hexahydrate	29	กรัม
Malachite green	0.036	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 5.2 ± 0.2

3. Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn)

อาหารเลี้ยงเชื้อ MKTTn broth เป็นอาหาร selective medium ที่ใช้สำหรับคัดแยกเชื้อ *salmonella* spp. จากตัวอย่างน้ำ อาหารและอื่น ๆ

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

3.1 Base medium

Meat extract	4.3	กรัม
Enzymatic digest of casein	8.6	กรัม
Sodium chloride	2.6	กรัม
Calcium carbonate	38.7	กรัม
Sodium thiosulphate (anhydrous)	30.5†	กรัม
Ox bile	4.78	กรัม

Brilliant green	0.0096	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 8.0 ± 0.2

3.2 Iodine-iodide solution

Iodine	20	กรัม
Potassium iodide (KI)	25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลตร

ละลาย KI ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ iodine และเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง

3.3 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	5	มิลลิลตร

ละลาย Novobiocin sodium salt ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 3 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

4. Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar เป็นทั้งอาหาร selective medium และ differential medium สำหรับแยกและนับจำนวนเชื้อ *Salmonella Typhi* และ *Salmonella* spp. อื่น ๆ จากตัวอย่างอาหาร น้ำและผลิตภัณฑ์นม ทั้งกดการเจริญของ coliform ได้ ซึ่งลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. โดยทั่วไปจะเป็น red with black centres สีแดงจนดำตรงกลาง

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	3.00	กรัม
L-Lysine	5.00	กรัม
Lactose	7.50	กรัม
Sucrose	7.50	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Sodium deoxycholate	2.50	กรัม
Sodium thiosulphate	6.80	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.80	กรัม
Phenol red (กรดสีเหลือง, เบสสีแดง)	0.08	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.4 ± 0.2

หมายเหตุ *ห้ามนำอาหารไปเข้า autoclave

2. Triple sugar iron (TSI) agar slant

TSI agar slant เป็นอาหารวุ้นเอียงในหลอดทดลอง ประเภท differential medium ที่ใช้แยกความแตกต่างของ Gram negative bacteria เช่น พวก facultative anaerobic Gram negative bacilli, aerobic Gram negative bacilli และ aerobic Gram negative cocci เป็นต้น โดยอาศัยการตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล glucose, lactose และ sucrose และความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ส่วนประกอบของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	15.00	กรัม
Proteose peptone	5.00	กรัม
Yeast extract	3.00	กรัม
Beef extract	3.00	กรัม
Lactose	10.00	กรัม
Sucrose	10.00	กรัม
Dextrose (Glucose)	1.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Ferrous sulphate	0.20	กรัม
Sodium thiosulphate	0.30	กรัม
Phenol red (กรดสีเหลือง, เบสสีแดง)	0.024	กรัม
Agar	12.00	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Final pH (at 25 องศาเซลเซียส) 7.4 ± 0.2

(ภาคผนวก 5)

เทคนิควิธีในการสุ่มเก็บตัวอย่างและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภคสำหรับการส่งตรวจวิเคราะห์

ในกรณีที่ทางผู้ผลิตต้องการส่งตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภคแต่ไม่มีภาชนะที่บรรจุปิดสนิท ทางผู้จัดทำจึงได้มีวิธีการเก็บน้ำตัวอย่าง (วาสนา, 2560) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ การบรรจุตัวอย่างน้ำและการเก็บรักษาคุณภาพน้ำตัวอย่างก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวิเคราะห์แยกเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบมีความสำคัญอย่างยิ่งและมีผลต่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือของตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนของแหล่งน้ำ ณ จุดและเวลาที่สุ่มเก็บ อุปกรณ์สุ่มเก็บและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภค

1. การเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องใช้ ในการเก็บตัวอย่าง ควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของน้ำ

- ภาชนะบรรจุตัวอย่างต้องสะอาด แห้ง และผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว
- เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการสุ่มตัวอย่าง ได้ ช้อน ส้อม มีด ทัพพี กรรไกร รวมทั้งที่เปิดกระป๋อง ต้องผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำร้อน (autoclave) และตู้อบความร้อน (hot air oven)
- กล่องพลาสติกสำหรับการขนส่งตัวอย่างซึ่งสามารถเก็บความเย็นได้ เพื่อให้ตัวอย่างคงสภาพเดิม ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะก่อนที่จะทำการตรวจวิเคราะห์
- น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น 70% (v/v) ethanol
- ฉลากและปากกาสำหรับจดบันทึกข้อมูลของตัวอย่างที่ถูกเก็บมาตรวจ

2. วิธีการฆ่าเชื้อ ภาชนะและเครื่องมือ เครื่องใช้ทั้งหมดที่สัมผัสน้ำหรืออาหาร ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ การเลือกใช้วิธีการใดขึ้นอยู่กับอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น การใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำร้อน เครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือการใช้ตู้อบความร้อน hot air oven อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส อบนาน 3 ชั่วโมง หรือการใช้แก๊สเอทธีลีนออกไซด์ สำหรับภาชนะที่ไม่ทนความร้อนทำจากพลาสติก

3. ปริมาณในการเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 500 มิลลิลิตร ต่อการส่งตรวจวิเคราะห์

4. ข้อควรคำนึงถึงในการสุ่มตัวอย่าง จะต้องสุ่มตัวอย่างโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากแหล่งอื่น ๆ ลงสู่ตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจ ต้องปิดผนึกให้เรียบร้อยทั้งหมายเลขตัวอย่าง ติดฉลาก ชื่อและสถานที่เก็บ

การเก็บรักษาตัวอย่าง เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา หรือถ้าต้องเป็นการนำส่งตัวอย่าง ต้องนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างให้คงเดิม และถ้าเป็นไปได้ให้ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทันทีที่ตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ แต่ถ้าไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ทันทีควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส แล้วดำเนินการตรวจวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนในการสุ่มเก็บตัวอย่างและบรรจุตัวอย่างน้ำบริโภค

มีข้อควรพิจารณาและปฏิบัติ ดังนี้

1. ใช้วิธีสุ่มเก็บโดยตรงจากหัวก๊อกน้ำ กรณีที่ก๊อกน้ำมีอุปกรณ์ติดไว้ เช่น เครื่องกรองน้ำหรือสายยาง ให้ถอดออกก่อนดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ

2. ตัวก๊อกที่เป็นจุดสุ่มเก็บตัวอย่าง ควรอยู่สูงจากพื้นดินอย่างน้อย 1 เมตรและควรหลีกเลี่ยงก๊อกน้ำที่รั่วหรือเกิดการหยดของตัวอย่างน้ำ

3. เช็ดบริเวณก๊อกให้แห้งและทำการฆ่าเชื้อโรคที่ปลายก๊อกน้ำ โดยใช้ผ้าสะอาดหรือสำลีชุบ 70% (v/v) ethanol เช็ดก๊อกน้ำ เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อโรคก่อนดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ

4. การสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ ต้องเปิดก๊อกน้ำให้ไหลเต็มที่นานประมาณ 1 นาที เพื่อระบายน้ำที่ค้างอยู่ในท่อทิ้ง

5. เปิดน้ำให้ไหลปานกลาง โดยลักษณะการไหลของน้ำควรไหลเป็นลำไม่กระจาย

6. ระวังอย่าให้ปากขวดของภาชนะบรรจุตัวอย่างน้ำสัมผัสกับปลายก๊อกหรือสิ่งอื่น ๆ เพราะจะทำให้ภาชนะได้รับการปนเปื้อนได้

7. บันทึกข้อมูลของตัวอย่าง และนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทันที