

# คู่มือปฏิบัติงาน

## การตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียและไวรัส



โดย

นางสาวกรรณิการ์ ป้อมบุบผา

นักวิทยาศาสตร์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

# คู่มือปฏิบัติงาน

การตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียและไวรัส



นางสาวกรรณิการ์ ป้อมบุบผา

## คำนำ

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตและการพัฒนาประเทศ ปัจจุบันมีการใช้น้ำในกิจกรรมต่างๆ ทั้งการอุปโภคและบริโภค ภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และชุมชน น้ำที่นำมาใช้ในแต่ละกิจกรรมนั้นควรเป็นน้ำที่สะอาดและปลอดภัย ปราศจากเชื้อที่อาจทำให้เกิดโรคโดยมีน้ำเป็นสื่อ เพราะการนำน้ำที่มีการปนเปื้อนไปใช้ในการอุปโภคหรือบริโภคอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ รวมทั้งการปลดปล่อยน้ำสู่สิ่งแวดล้อมหลังมีการใช้งานแล้วควรเป็นน้ำที่ปลอดภัยต่อประชาชนเช่นกัน แต่การที่จะระบุน้ำแบบใดปลอดภัยเหมาะสมที่จะนำไปบริโภค อุปโภค หรือเป็นน้ำที่ผ่านการบำบัดอย่างเหมาะสมแล้ว ควรมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันความสะอาดและปลอดภัย

การตรวจคุณภาพน้ำทางด้านจุลชีววิทยาเป็นหนึ่งใน การตรวจคุณภาพน้ำที่มีความสำคัญทางสาธารณสุข ในการนี้ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เล็งเห็นความสำคัญของผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับประชาชนผู้ใช้น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำน้ำไปบริโภค ดังนั้นภาควิชาจุลชีววิทยาจึงให้บริการตรวจตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วย การตรวจเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในน้ำ โดยผู้จัดทำเป็นหนึ่งในทีมงานให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจึงรวบรวมวิธีการตรวจคุณภาพน้ำทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อจัดทำเป็นคู่มือปฏิบัติงาน ใช้ประกอบการทำงานบริการตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยรวบรวมงานด้านการตรวจวิเคราะห์ตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียและการตรวจไวรัสโรตาในน้ำ ซึ่งประกอบด้วยเนื้อหา 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 เป็นเนื้อหาการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียที่เป็นวิธีมาตรฐาน และส่วนที่ 2 การตรวจไวรัสโรตาในน้ำโดยใช้วิธีทางโมเลกุล ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ในงานตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสาธารณสุขให้แก่ผู้ที่สนใจงานตรวจคุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยา หรือหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

กรรณิการ์ ป้อมบุบผา

## สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญแผนภูมิ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตของคู่มือ	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
<b>บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ</b>	
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์	5
ลักษณะงานที่สอดคล้องกับคู่มือปฏิบัติงาน	9
โครงสร้างการบริหารจัดการ	9
<b>บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงาน</b>	
วิธีการปฏิบัติงาน	11
หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	
- ข้อปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพและความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ	12
- การปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาด้วยเทคนิคเบื้องต้น	14
<b>บทที่ 4 เทคนิคการปฏิบัติงานการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย</b>	
การวิเคราะห์ตัวบ่งชี้คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	19
วิธีการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	19
ขั้นตอนการปฏิบัติงานการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	34
- เครื่องมือ อุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	37

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ นํ้ายา และสารเคมี	41
- วิธีการปฏิบัติงานตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	
• การเก็บตัวอย่าง/ รับตัวอย่าง	48
• การตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำโดยวิธี Pour plate	50
• การตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำโดยวิธี Membrane filtration	54
• การตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียในน้ำโดยวิธี MPN Coliforms/ MPN Fecal coliforms/ MPN <i>E. coli</i>	60
<b>บทที่ 5 เทคนิคการปฏิบัติงานการตรวจหาไวรัสโรตาในน้ำ</b>	
การตรวจไวรัสโรตาในน้ำ	77
ขั้นตอนการปฏิบัติงานการตรวจไวรัสโรตาในน้ำ	81
- เครื่องมือ อุปกรณ์ นํ้ายา และสารเคมี	83
- การเตรียมนํ้ายา และสารเคมี	89
- วิธีการปฏิบัติงานตรวจไวรัสโรตาในน้ำ	
• การเก็บตัวอย่าง/ รับตัวอย่าง	92
• การเตรียมไวรัสให้เข้มข้นจากตัวอย่างน้ำ	95
• การสกัดอาร์เอ็นเอ และการตรวจไวรัสโรตา	103
<b>บทที่ 6 ปัญหาอุปสรรค และแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน</b>	107
<b>บรรณานุกรม</b>	113
<b>ภาคผนวก</b>	
ภาคผนวกที่ 1 มาตรฐานคุณภาพน้ำประปา	118
ภาคผนวกที่ 2 มาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อการบริโภค	119
ภาคผนวกที่ 3 มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน	122
ภาคผนวกที่ 4 มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล	123

## สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 2.1 โครงสร้างการบริหารจัดการงานบริการทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	9
แผนภูมิที่ 4.1 ขั้นตอนการดำเนินงานในงานบริการทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อ ตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	35
แผนภูมิที่ 4.2 ขั้นตอนการตรวจหา MPN Coliforms/ Fecal coliforms/ <i>E. coli</i> ในน้ำ โดยวิธี Multiple tube fermentation ระบบ 5 1 1 หลอด	65
แผนภูมิที่ 4.3 ขั้นตอนการตรวจหา MPN Coliforms/ Fecal coliforms/ <i>E. coli</i> ในน้ำ โดยวิธี Multiple tube fermentation ระบบ 5 หลอด	66
แผนภูมิที่ 5.1 ขั้นตอนการดำเนินงานในงานบริการทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อ การตรวจไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำ	81

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 การรายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำ ในรูปแบบเลขยกกำลัง	24
ตารางที่ 4.2 การรายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด กรณีจำนวนโคโลนีที่พบระหว่าง 25-250 ในสองความเจือจาง	24
ตารางที่ 4.3 การรายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด กรณีจำนวนโคโลนีที่พบน้อยกว่า 25 ทุกความเจือจาง	25
ตารางที่ 4.4 การรายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด กรณีจำนวนโคโลนีที่พบมากกว่า 250 ทุกความเจือจาง	25
ตารางที่ 4.5 การรายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด กรณีไม่มีเชื้อขึ้นในทุกความเจือจาง	25
ตารางที่ 4.6 ตัวอย่างการเลือกตัวเลขจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากความเจือจางที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้อ่านค่า MPN	32
ตารางที่ 4.7 ขั้นตอนปฏิบัติในห้องปฏิบัติการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	36
ตารางที่ 4.8 ตัวอย่างการเลือกใช้ความเจือจางในตัวอย่างน้ำชนิดต่างๆ	49
ตารางที่ 4.9 การอ่านผลการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียโดยวิธี Multiple tube-fermentation	67
ตารางที่ 4.10 การอ่านผลการทดสอบ IMViC test	72
ตารางที่ 4.11 ค่า Most Probable Number (MPN) ของแบคทีเรีย/ 100 มิลลิลิตร ของตัวอย่างน้ำเมื่อใช้วิธีทดสอบแบบ 5 1 1 หลอด	74
ตารางที่ 4.12 ค่า Most Probable Number (MPN) ของแบคทีเรีย/ 100 มิลลิลิตร ของตัวอย่างน้ำเมื่อใช้วิธีทดสอบแบบ 5 หลอด	75
ตารางที่ 5.1 ขั้นตอนปฏิบัติในห้องปฏิบัติการตรวจไวรัสโรตาในน้ำ	82
ตารางที่ 5.2 ไพร์เมอร์จำเพาะต่อไวรัสโรตาสำหรับตรวจโดยวิธีอาร์ที-เนสท์พีซีอาร์	87
ตารางที่ 6.1 ปัญหาอุปสรรค และแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางานในการตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	107

## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 6.2 ปัญหาอุปสรรค และแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางานในการตรวจ ไวรัสโรตาในน้ำ	112
ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ ปี พ.ศ. 2553	118
ตารางที่ 2 มาตรฐานคุณภาพน้ำประปาของการประปานครหลวง	118
ตารางที่ 3 มาตรฐานคุณภาพน้ำประปาของการประปาส่วนภูมิภาค	118
ตารางที่ 4 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค	119
ตารางที่ 5 มาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท	119
ตารางที่ 6 มาตรฐานน้ำบริโภคจากตู้น้ำดื่มอัตโนมัติ	120
ตารางที่ 7 เกณฑ์มาตรฐานกำหนดสุขลักษณะของน้ำดื่มที่ไม่ได้บรรจุในภาชนะปิดสนิท	120
ตารางที่ 8 มาตรฐานคุณภาพน้ำบาดาลที่ใช้บริโภค	121
ตารางที่ 9 มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2	122
ตารางที่ 10 มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 3	122
ตารางที่ 11 การกำหนดประเภทน้ำทะเล	123
ตารางที่ 12 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล	124



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ โดยวิธี Pour plate	52
ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นเมื่อตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำ โดยวิธี Pour plate	53
ภาพที่ 4.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำโดยวิธี Membrane filtration	56
ภาพที่ 4.4 การตรวจแบคทีเรียในตัวอย่างโดยวิธี Membrane filtration หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน	57
ภาพที่ 4.5 การวางกระดาษกรองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA	58
ภาพที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA จากการตรวจคุณภาพน้ำโดยวิธี Membrane filtration	59
ภาพที่ 4.7 การตรวจหาตัวชี้วัดคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียโดยใช้วิธี Multiple tube-fermentation ระบบ 5 หลอด	68
ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของ <i>E. coli</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey	69
ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey	70
ภาพที่ 4.10 การอ่านผลการทดสอบ IMViC test สำหรับตัวอย่าง <i>E. coli</i>	72
ภาพที่ 5.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ	94
ภาพที่ 5.2 ชุดกรองน้ำขนาดเล็ก สำหรับกรองน้ำปริมาตร 1-5 ลิตร	96
ภาพที่ 5.3 ชุดกรองขนาดเล็ก สำหรับการกรองน้ำหลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน	97
ภาพที่ 5.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำให้เข้มข้นสำหรับตัวอย่างน้ำที่ใช้ชุดกรองขนาดเล็ก	98
ภาพที่ 5.5 ชุดกรองน้ำขนาดใหญ่สำหรับปริมาตรน้ำ 20 ลิตร หนึ่งชุด	100
ภาพที่ 5.6 การจัดอุปกรณ์ของชุดกรองน้ำขนาดใหญ่	101
ภาพที่ 5.7 การใช้ชุดกรองน้ำขนาดใหญ่ ในการกรองน้ำปริมาตร 20 ลิตร	102
ภาพที่ 5.8 ผลตรวจไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำโดยวิธีอาร์ที-เนสท์ พีซีอาร์	106