

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

3.1 เครื่องมือวิเคราะห์ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เครื่องมือวิเคราะห์

No.	Equipment List	Brand	Model
1	Vortex Mixer	Scientific Industries	G560E
2	Biosafety Cabinet Class II	Faster	Safe Fast Classic 209
3	Biosafety Cabinet Class II	Scanlaf	MARS 1200
4	Incubator with Humidity Control	Binder	KMF 240
5	Autoclave Fume Hood	PROLAB	-
6	Sterilization Autoclave	Systec	VE-55
7	Decontamination Autoclave	Systec	VE-55
8	Weighing Balance 3 decimal place	Sartorius	ED323S-CW
9	Bag Sealer	Hawo	HD 260 MS
10	Hot Air Oven	Binder	FD 240
11	Water Bath	DIGITAL HEAT	DH-45-110
12	Multiparameter Meter	SCHOTT	Prolab 2000
13	Refrigerator 4 and -20 degree C	EVERMED	LCRF 625S PRO
14	Purify Water Generator Type I&II	TKA	UPW20, GENPURE UF/UV
15	Adjustable Autopipette (20-200 μ L)	BioHit	PROLINE
16	Adjustable Autopipette(100-1000 μ L)	BioHit	PROLINE
17	Media Dispenser	AES Laboratoire	PM05

3.1.2 เครื่องแก้ว / วัสดุอุปกรณ์ / วัสดุสิ้นเปลือง

No.	Name	Size
1	Spatula or Spoon	-
2	Stirring Rod	-
3	Autopipette Tip and Tip Box	200 μ L
4	Autopipette Tip and Tip Box	1000 μ L
5	Glass/Plastic Petri Dish and Stainless Steel Cans	$\varnothing$ 90 X 15 mm
6	Glass Tube and Test Tube Rack Stainless	10 mL
7	Glass Tube and Test Tube Rack Stainless	15 mL

No.	Name	Size
8	Glass Measuring Pipettes and Pipette Stainless Cans	10 mL
9	Duran Bottle	250 mL
10	Duran Bottle	500 mL
11	Duran Bottle	1000 mL
12	Glass Beaker	250 mL
13	Glass Beaker	500 mL
14	Plastic Beaker	5 L
15	Plastic Cylinder	1 L
16	Suction flask	1 L
17	3-place Filter funnel manifold	-
18	Silicone rubber tube and rubber stopper	-
19	Foggy bottle	500 mL
20	Vacuum pump	-
21	Vent filter	0.2 μ m
22	0.45- μ m Microfunnel Filter	100 mL
23	Forceps	-
24	Foggy Spray Bottle	500 mL
25	Autoclave Tape	0.5 inch
26	ถุงฟิล์ม (Autoclave Bag)	310 x 660 mm
27	Biohazard Bag	305 x 610 mm
28	ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Burner)	-
29	ถุงขยะพลาสติกใส่พร้อมยางรัด	24 x 36 inch
30	ปากกา Marker	-
31	ถุงมือปราศจากเชื้อ	ขึ้นอยู่กับผู้ปฏิบัติงาน
32	ฟอยล์	-
33	Spread rod	-
34	ไฟแช็ค	-

3.1.3 สารเคมี / รีเอเจนต์

3.1.3.1 เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน (Microbiological standard)

No.	Standard Name	Grade
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 6538	Master Stock Cell Culture

3.1.3.2 สารเคมีที่ใช้ (Chemical, Reagent, Media and Biological Indicator)

No.	Name	Manufacture/Country	Grade
1	Trypticase Soy Broth (TSB)	Merck KGaA / Germany	Microbiology Grade

No.	Name	Manufacture/Country	Grade
2	Plate Count Agar (PCA)	Merck KGaA / Germany	Microbiology Grade
3	Peptone	Merck KGaA / Germany	Microbiology Grade
4	95% Isopropyl Alcohol	P.P.M. Chemical / N/A	Commercial Grade
5	95% w/v Ethanol	ALCOH-A / N/A	Commercial Grade
6	12.5% w/v Sodium Hypochlorite	Ajax Finechem Pty Ltd. / Australia	Commercial Grade
7	7X Cleaning Solution	MP BIOMEDICALS / France	Laboratory Grade
8	DI Water Type II	N/A	N/A

3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method

3.3.6 การจัดเตรียม

3.3.1.6 จัดทำโปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method โดยประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้คือ วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ เครื่องมือที่ใช้ วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ เกณฑ์การยอมรับ เอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม ดังแสดงในภาคผนวก ค.

3.3.1.7 จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีให้พร้อมใช้งาน คือต้องไม่หมดอายุ และจัดเตรียมเครื่องมือให้พร้อมใช้งานคือ เครื่องมือที่ใช้งานต้องผ่านการบำรุงรักษาและสอบเทียบก่อน ดังแสดงในภาคผนวก ค.

3.2.2 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability)

เพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยทำการ spike microbiological suspension ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่างน้ำ และนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ขึ้นจริง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า percentage recovery ในหน่วยของ CFU

เพื่อศึกษาการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยตัวอย่างทดสอบเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือตัวเดียวกัน ทำการวิเคราะห์วันเดียวกันบันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU

ขั้นตอนการศึกษาความแม่นยำและการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method มีดังนี้

1. เตรียม microbiological suspension ช่วงความเข้มข้นสูง 150-300 CFU/mL และช่วงความเข้มข้นต่ำ 20-50 CFU/mL ดังแสดงในภาคผนวก ข.4
2. เตรียม sterile peptone water และ sterile PCA ดังแสดงในภาคผนวก ข.5

3. เตรียม water sample ที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ข.6
4. เตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates โดยทำการปิเปต peptone water, microbiological suspension และ water sample โดยใช้ 100 – 1000 μL adjustable autopipette ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates ของ Pour Plate Method

Plate name	Number of plates	Volume of negative, positive control and water sample in each plate (mL)		
		Peptone water	Microbiological suspension	Water sample
Negative control (peptone water)	10	1	-	-
Positive control (microbiological suspension)	10	-	1	-
Water sample (PW)	10	-	-	1
Spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
0.1 mL	10	0.9	0.1	1.0
0.25 mL	10	0.75	0.25	1.0
0.5 mL	10	0.5	0.5	1.0
0.75 mL	10	0.25	0.75	1.0
1.0 mL	10	0	1.0	1.0
Spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
0.1 mL	10	0.9	0.1	1.0
0.25 mL	10	0.75	0.25	1.0
0.5 mL	10	0.5	0.5	1.0
0.75 mL	10	0.25	0.75	1.0
1.0 mL	10	0	1.0	1.0

5. เท sterile PCA ในจานเพาะเชื้อจานละ 15-20 มิลลิลิตร โดยอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะเท ต้องอยู่ที่ 45 ± 1 องศาเซลเซียส ปิดฝาจานเพาะเชื้อทันที ผสมตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน โดยหมุนจานเลี้ยงเชื้อวนไปในทิศตามเข็มนาฬิกาและทวนเข็มนาฬิกากลับไปกลับมาอย่างช้าๆ บนพื้นเรียบ รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
6. นำไปบ่มแบบคว่ำจานเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 33 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 12 ชั่วโมง
7. หลังการบ่มให้นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่ตรวจไม่พบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ให้รายงานเป็น <1 CFU
8. คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่า SD และ ค่า %CV ของ negative control, positive control, water sample และ spiked sample plates ดังแสดงในภาคผนวก ก.1, ก.2 และ ก.3
9. คำนวณหาค่า % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ ดังแสดงในภาคผนวก ก.

10. การประเมินผลและเกณฑ์การยอมรับ มีรายละเอียดดังนี้

- 10.1 Negative control ต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.2 Positive control ต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.3 Negative control และ Positive control ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.4 ค่า %Recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำต้องอยู่ในช่วง 70 – 130%
- 10.5 ค่า %CV ที่วัดได้ต้องมีค่าดังนี้

CFU per plate	Expected %CV
30-300	< 15%
10-30	< 25%
<10	< 35%

3.2.3 การศึกษา Intermediate precision

เพื่อศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) เพื่อให้สามารถครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU

ขั้นตอนการศึกษความแม่นยำและการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method มีดังนี้

1. เตรียม microbiological suspension ช่วงความเข้มข้นสูง 150-300 CFU/mL และช่วงความเข้มข้นต่ำ 20-50 CFU/mL ดังแสดงในภาคผนวก ข.4
2. เตรียม sterile peptone water และ sterile PCA ดังแสดงในภาคผนวก ข.5
3. เตรียม water sample ที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ข.6
4. เตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates โดยทำการปิเปต peptone water, microbiological suspension และ water sample โดยใช้ 100 – 1000 μ L adjustable autopipette ดังแสดงในตารางที่ 4
5. เท sterile PCA ในจานเพาะเชื้อจานละ 15-20 มิลลิลิตร โดยอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะเทต้องอยู่ที่ 45 ± 1 องศาเซลเซียส ปิดฝาจานเพาะเชื้อทันที ผสมตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน โดยหมุนจานเลี้ยงเชื้อวนไปในทิศทางเข็มนาฬิกาและทวนเข็มนาฬิกากลับไปกลับมาอย่างช้าๆ บนพื้นเรียบ รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
6. นำไปบ่มแบบคว่ำจานเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 33 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 12 ชั่วโมง
7. หลังการบ่มให้นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่ตรวจไม่พบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ให้รายงานเป็น <1 CFU
8. คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่า SD และ ค่า %CV ของ negative control, positive control และ spiked sample plates ดังแสดงในภาคผนวก ก.1, ก.2 และ ก.3
9. คำนวณหาค่า % recovery of microbiological examination in water samples ดังแสดงในภาคผนวก ก.4

10.การประเมินผลและเกณฑ์การยอมรับ มีรายละเอียดดังนี้

- 10.1 Negative control ต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.2 Positive control ต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.3 Negative control และ Positive control ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์
- 10.4 ค่า %CV ที่วัดได้ต้องมีค่าดังนี้

CFU per plate	Expected %CV
30-300	< 15%
10-30	< 25%
<10	< 35%

3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration method

3.3.1 การจัดเตรียม

3.3.1.1 จัดทำโปรโตคอลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration method โดยประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้คือ วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ เครื่องมือที่ใช้ วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ เกณฑ์การยอมรับ เอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม ดังแสดงในภาคผนวก ง.

3.3.1.2 จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีให้พร้อมใช้งาน คือต้องไม่หมดอายุ และจัดเตรียมเครื่องมือให้พร้อมใช้งานคือ เครื่องมือที่ใช้งานต้องผ่านการบำรุงรักษาและสอบเทียบก่อน ดังแสดงในภาคผนวก ง.

3.3.2 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability)

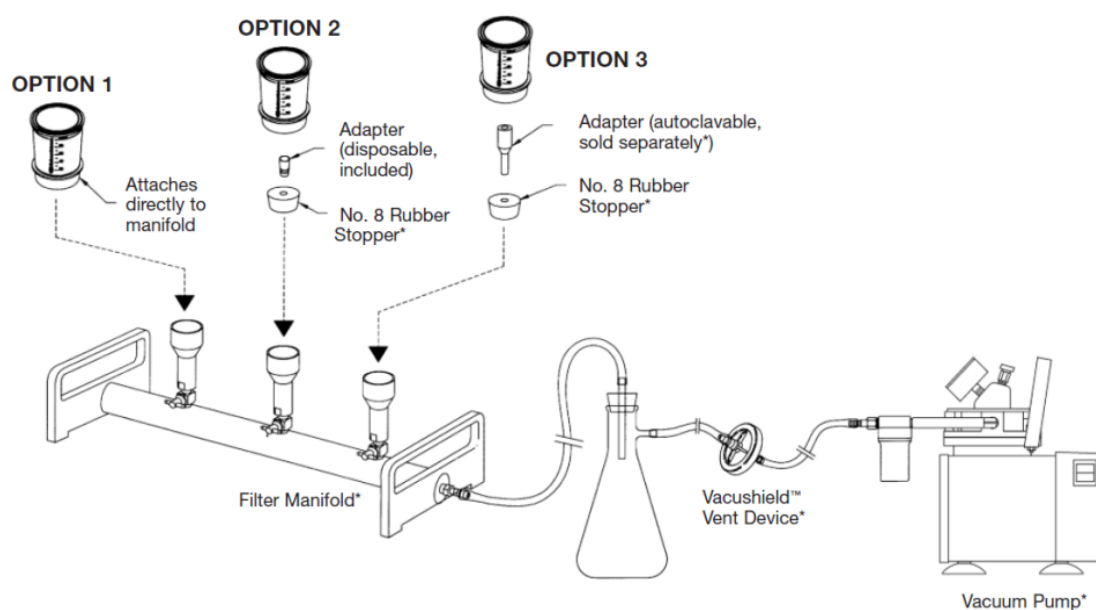
เพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยทำการ spike microbiological suspension ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่งน้ำ และนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ขึ้นจริง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า percentage recovery ในหน่วยของ CFU

เพื่อศึกษาการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยตัวอย่างทดสอบเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือตัวเดียวกัน ทำการวิเคราะห์วันเดียวกันบันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU

ขั้นตอนการศึกษาความแม่นยำและการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method มีดังนี้

1. เตรียม microbiological suspension ช่วงความเข้มข้นสูง 100-200 CFU/mL และช่วงความเข้มข้นต่ำ 10-50 CFU/mL ดังแสดงในภาคผนวก ข.4
2. เตรียม sterile peptone water และ sterile PCA ดังแสดงในภาคผนวก ข.5

3. เตรียม water sample ที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ข.6
4. ประกอบชุดกรองเข้าด้วยกันภายใต้เครื่อง BSC class II ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการประกอบชุดกรองเพื่อทำการทดสอบตัวอย่างน้ำโดยวิธี Membrane Filter Method

5. เตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates โดยทำการปิเปต peptone water, microbiological suspension และ water sample ใส่ใน sterile 0.45- μ m microfunnel filter โดยใช้ 100 – 1000 μ L adjustable autopipette จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 mL ด้วย peptone water ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการเตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates ของ Membrane Filtration Method

Plate name	Number of replicates	Volume of negative, positive control and water sample in each plate (mL)		
		Peptone water	Microbiological suspension	Water sample
Negative control (peptone water)	10	100	-	-
Positive control (microbiological suspension)	10	99	1	-
Water sample (PW)	10	-	-	100
Spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
0.1 mL	10	0.9	0.1	99
0.25 mL	10	0.75	0.25	99
0.5 mL	10	0.5	0.5	99
0.75 mL	10	0.25	0.75	99
1.0 mL	10	0	1.0	99

Plate name	Number of replicates	Volume of negative, positive control and water sample in each plate (mL)		
		Peptone water	Microbiological suspension	Water sample
Spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
0.1 mL	10	0.9	0.1	99
0.25 mL	10	0.75	0.25	99
0.5 mL	10	0.5	0.5	99
0.75 mL	10	0.25	0.75	99
1.0 mL	10	0	1.0	99

6. เปิด vacuum pump เพื่อกรอง negative control, positive control และ spiked sample plates
7. ทำการ Rinse funnel ด้วย peptone water จำนวน 2 ครั้ง และเปิด vacuum pump เพื่อกรอง peptone water ออก
8. เพล่าวจานเพาะเชื้อ sterile PCA ที่เตรียมไว้ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการใช้ forceps คีบเมมเบรนเปล่าวางบนจานเพาะเชื้อ sterile PCA

9. นำไปบ่มแบบคว่ำจานเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 33 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 12 ชั่วโมง
10. หลังการบ่มให้นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่ตรวจไม่พบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ให้รายงานเป็น <1 CFU
11. คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่า SD และ ค่า %CV ของ negative control, positive control และ spiked sample plates ดังแสดงในภาคผนวก ก.1, ก.2 และ ก.3
12. คำนวณหาค่า % recovery of microbiological examination in water samples ดังแสดงในภาคผนวก ก.4
13. การประเมินผลและเกณฑ์การยอมรับ มีรายละเอียดดังนี้
 - 13.1 Negative control ต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 - 13.2 Positive control ต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 - 13.3 Negative control และ Positive control ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

13.4 ค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 70 – 130%

13.5 ค่า %CV ที่วัดได้ต้องมีค่าดังนี้

CFU per plate	Expected %CV
30-300	< 15%
10-30	< 25%
<10	< 35%

3.2.3 การศึกษา Intermediate precision

เพื่อศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) เพื่อให้สามารถครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU

ขั้นตอนการศึกษาความแม่นยำและการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration มีดังนี้

1. เตรียม microbiological suspension ช่วงความเข้มข้นสูง 100-200 CFU/mL และช่วงความเข้มข้นต่ำ 10-50 CFU/mL ดังแสดงในภาคผนวก ข.4
2. เตรียม sterile peptone water และ sterile PCA ดังแสดงในภาคผนวก ข.5
3. เตรียม water sample ที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ข.6
4. ประกอบชุดกรองเข้าด้วยกันภายใต้เครื่อง BSC class II ดังแสดงในรูปที่ 5
5. เตรียม negative control, positive control และ spiked sample plates โดยทำการปิเปต peptone water, microbiological suspension และ water sample ใส่ใน sterile 0.45- μ m microfunnel filter โดยใช้ 100 – 1000 μ L adjustable autopipette จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 mL ด้วย peptone water ดังแสดงในตารางที่ 5
6. เปิด vacuum pump เพื่อกรอง negative control, positive control และ spiked sample plates
7. ทำการ Rinse funnel ด้วย peptone water จำนวน 2 ครั้ง และเปิด vacuum pump เพื่อกรอง peptone water ออก
8. เหว forceps จากนั้นใช้ forceps คีบเมมเบรนเปล่าวางบนจานเพาะเชื้อ sterile PCA ที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 6
9. นำไปบ่มแบบคว่ำจานเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 33 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ± 12 ชั่วโมง
10. หลังการบ่มให้นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีที่ตรวจไม่พบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ให้รายงานเป็น <1 CFU
11. คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่า SD และ ค่า %CV ของ negative control, positive control และ spiked sample plates ดังแสดงในภาคผนวก ก.1, ก.2 และ ก.3
12. คำนวณหาค่า % recovery of microbiological examination in water samples ดังแสดงในภาคผนวก ก.4

13.การประเมินผลและเกณฑ์การยอมรับ มีรายละเอียดดังนี้

13.1 Negative control ต้องไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

13.2 Positive control ต้องมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

13.3 Negative control และ Positive control ต้องไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

13.4 ค่า %CV ที่วัดได้ต้องมีค่าดังนี้

CFU per plate	Expected %CV
20-200	< 15%
10-20	< 25%
<10	< 35%