

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล (Results and Discussion)

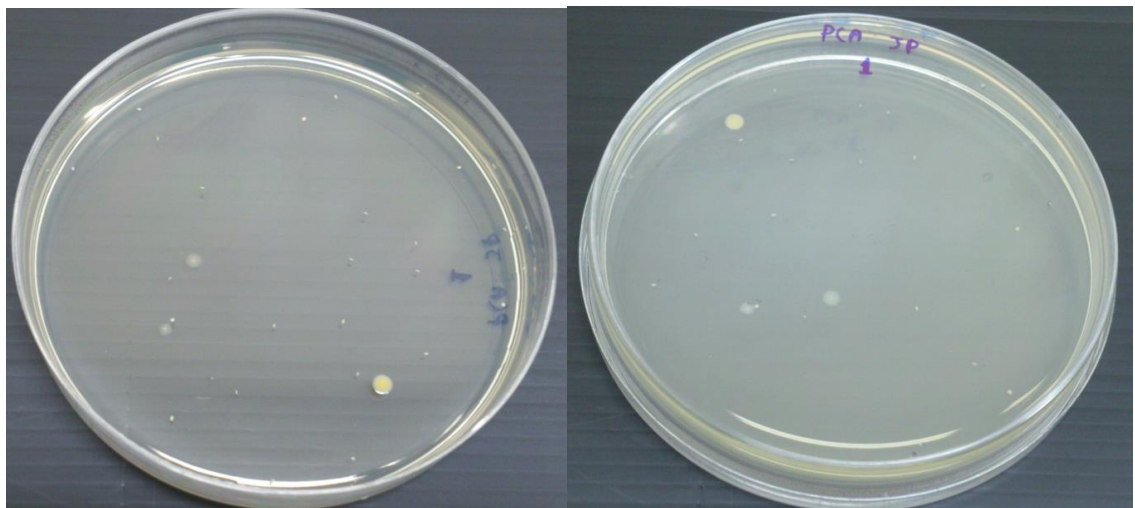
4.1 ผลการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method

Pour Plate Method เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง และตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ทดสอบ ก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบจริง จึงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method ก่อนจะใช้วิธีการตรวจสอบนั้น โดยการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method ต้องมีการจัดทำโปรโตคอลประกอบด้วย วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ เครื่องมือที่ใช้ วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ เกณฑ์การยอมรับ เอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม ดังแสดงในภาคผนวก ค. และมีจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยผลการตรวจสอบใบ certificate พบว่าวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อคือ Plate count agar, เชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 ที่จะใช้งานไม่หมดอายุ และมีการจัดเตรียมเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยผลการตรวจสอบพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีผ่านการสอบเทียบ จากนั้นจึงเริ่มการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour plate method

4.1.1 ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability)

การศึกษาความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยทำการ spike microbiological suspension ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่างน้ำ และนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ขึ้นจริง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า percentage recovery ในหน่วยของ CFU พบว่า negative control ทั้งหมดไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วน positive control ทั้งหมดพบว่ามี การเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น ดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 6 ส่วน water sample ทั้งหมดไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL และช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีการเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 6 และพบว่าค่า % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าอยู่ในช่วง 98.86 ถึง 105.25 % ดังแสดงในตารางที่ 6 และค่า % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าอยู่ในช่วง 81.23 ถึง 100.56 % ดังแสดงในตารางที่ 6

การศึกษาการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยตัวอย่างทดสอบเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือตัวเดียวกัน ทำการวิเคราะห์วันเดียวกันบันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU พบว่าค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 175 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 14.03 และมีค่า %CV เท่ากับ 8.01 ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.47 และมีค่า %CV เท่ากับ 12.53 ดังแสดงในตารางที่ 6 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 6 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 30-300 CFU/plate อยู่ในช่วง 6.26 ถึง 14.48 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate คือ 20.69 % ดังแสดงในตารางที่ 6 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 6 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate อยู่ในช่วง 1.89 ถึง 4.86 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 0.74 ถึง 1.93 % ดังแสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 7 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 โดยใช้เทคนิค Pour Plate Method

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และการทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method

Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		150-300 CFU	20-50 CFU		
1	<1	174	38	<1	
2	<1	186	31	<1	
3	<1	156	30	<1	
4	<1	166	41	<1	
5	<1	160	42	<1	
6	<1	168	32	<1	
7	<1	174	39	<1	
8	<1	191	31	<1	
9	<1	176	38	<1	
10	<1	201	35	<1	
Mean	<1	175	36	<1	
SD	0.00	14.03	4.47	0.00	
%CV	0.00	8.01	12.53	0.00	
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	24	50	93	121	165
2	16	33	83	124	151
3	22	46	74	124	197
4	24	42	100	124	184
5	15	50	81	124	170
6	19	52	91	131	174
7	17	41	94	133	170
8	18	53	92	140	186
9	13	41	92	146	187
10	16	53	74	132	190
Mean	17	46	87	130	177
SD	4.81	6.67	8.87	8.13	13.84
%CV	20.69	14.48	10.15	6.26	7.80
Spiked standard (CFU)	18	44	88	131	175
% Recovery	105.02	105.25	99.77	98.86	101.26

Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	3	9	16	25	30
2	4	9	19	26	39
3	4	8	16	28	41
4	3	10	15	20	38
5	3	5	17	22	31
6	2	7	18	29	41
7	2	7	21	28	35
8	2	6	17	27	42
9	3	11	16	22	30
10	3	10	15	23	32
Mean	3	8	17	25	36
SD	0.74	1.93	1.89	3.09	4.86
%CV	25.44	23.56	11.09	12.36	13.55
Spiked standard (CFU)	4	9	18	27	36
% Recovery	81.23	91.88	95.24	93.37	100.56

4.1.2 ผลการศึกษา Intermediate precision

เพื่อศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) เพื่อให้สามารถครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU พบว่า Analyst 1 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 175 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 14.03 และมีค่า %CV เท่ากับ 8.01 ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.47 และมีค่า %CV เท่ากับ 12.53 ดังแสดงในตารางที่ 7 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 7 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 30-300 CFU/plate อยู่ในช่วง 6.26 ถึง 14.48 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate คือ 20.69 % ดังแสดงในตารางที่ 7 และ spiked sample

plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และ มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate อยู่ในช่วง 1.89 ถึง 4.86 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 0.74 ถึง 1.93 % ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน Analyst 2 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 195 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 7.61 และมีค่า %CV เท่ากับ 3.91 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.47 และมีค่า %CV เท่ากับ 12.48 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 30-300 CFU/plate อยู่ในช่วง 5.03 ถึง 14.65 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate คือ 22.39 % ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และ มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate อยู่ในช่วง 8.72 ถึง 14.95 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 28.95 ถึง 32.82 % ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน Analyst 3 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 181 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 10.92 และมีค่า %CV เท่ากับ 6.02 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 5.31 และมีค่า %CV เท่ากับ 15.18 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 30-300 CFU/plate อยู่ในช่วง 5.49 ถึง 12.67 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate คือ 21.01 % ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** และ มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate อยู่ในช่วง 11.14 ถึง 19.32 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 19.57 ถึง 32.43 % ดังแสดงใน**ตารางที่ 7**

ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method ของนักวิเคราะห์แต่ละคน

Analyst 1					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		150-300 CFU	20-50 CFU		
1	<1	174	38	<1	
2	<1	186	31	<1	
3	<1	156	30	<1	
4	<1	166	41	<1	
5	<1	160	42	<1	
6	<1	168	32	<1	
7	<1	174	39	<1	
8	<1	191	31	<1	
9	<1	176	38	<1	
10	<1	201	35	<1	
Mean	<1	175	36	<1	
SD	0.00	14.03	4.47	0.00	
%CV	0.00	8.01	12.53	0.00	
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	24	50	93	121	165
2	16	33	83	124	151
3	22	46	74	124	197
4	24	42	100	124	184
5	15	50	81	124	170
6	19	52	91	131	174
7	17	41	94	133	170
8	18	53	92	140	186
9	13	41	92	146	187
10	16	53	74	132	190
Mean	17	46	87	130	177
SD	4.81	6.67	8.87	8.13	13.84
%CV	20.69	14.48	10.15	6.26	7.80

Analyst 1					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	3	9	16	25	30
2	4	9	19	26	39
3	4	8	16	28	41
4	3	10	15	20	38
5	3	5	17	22	31
6	2	7	18	29	41
7	2	7	21	28	35
8	2	6	17	27	42
9	3	11	16	22	30
10	3	10	15	23	32
Mean	3	8	17	25	36
SD	0.74	1.93	1.89	3.09	4.86
%CV	25.44	23.56	11.09	12.36	13.55
Analyst 2					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				Water sample
	Negative control	Positive control			
		150-300 CFU	20-50 CFU		
1	<1	207	41	<1	
2	<1	184	42	<1	
3	<1	196	36	<1	
4	<1	199	32	<1	
5	<1	201	33	<1	
6	<1	186	34	<1	
7	<1	198	31	<1	
8	<1	200	30	<1	
9	<1	190	38	<1	
10	<1	187	41	<1	
Mean	<1	195	36	<1	
SD	0.00	7.61	4.47	0.00	
%CV	0.00	3.91	12.48	0.00	

Analyst 2					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	13	41	93	119	205
2	15	41	91	120	208
3	15	48	91	136	180
4	22	41	82	136	191
5	18	48	85	132	194
6	12	51	92	151	199
7	13	42	73	123	211
8	19	32	65	149	198
9	20	33	76	122	208
10	22	41	85	116	211
Mean	16	42	83	130	201
SD	3.78	6.12	9.37	12.50	10.08
%CV	22.39	14.65	11.25	9.59	5.03
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	2	12	20	23	44
2	3	8	20	28	32
3	3	6	14	23	33
4	4	8	18	25	42
5	2	9	15	24	32
6	2	12	15	27	32
7	4	7	17	23	39
8	4	11	13	26	31
9	2	7	16	29	38
10	2	5	19	27	35
Mean	3	9	17	26	36
SD	0.92	2.46	2.50	2.22	4.66
%CV	32.82	28.95	14.95	8.72	13.02

Analyst 3					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		150-300 CFU	20-50 CFU		
1	<1	182	29	<1	
2	<1	192	31	<1	
3	<1	169	38	<1	
4	<1	175	30	<1	
5	<1	178	39	<1	
6	<1	186	44	<1	
7	<1	187	32	<1	
8	<1	174	33	<1	
9	<1	203	42	<1	
10	<1	168	32	<1	
Mean	<1	181	35	<1	
SD	0.00	10.92	5.31	0.00	
%CV	0.00	6.02	15.18	0.00	
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	28	47	90	140	186
2	21	54	94	150	181
3	15	57	95	114	181
4	20	40	108	125	198
5	15	41	91	131	207
6	20	44	87	126	170
7	28	51	94	136	180
8	20	44	84	146	188
9	21	48	85	137	186
10	23	56	82	129	183
Mean	20	48	91	133	186
SD	4.43	6.11	7.50	10.67	10.22
%CV	21.01	12.67	8.24	8.00	5.49

Analyst 3					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	2	7	16	25	30
2	2	10	12	24	38
3	3	6	15	28	28
4	2	10	21	26	41
5	2	9	15	26	42
6	2	12	21	21	36
7	4	8	12	29	32
8	4	8	16	21	33
9	3	8	18	25	34
10	2	9	18	22	31
Mean	3	9	16	25	35
SD	0.84	1.70	3.17	2.75	4.67
%CV	32.43	19.57	19.32	11.14	13.54

การศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU ของผู้วิเคราะห์ทั้ง 3 คน เมื่อนำผลของ Analyst ทั้ง 3 คน มาคำนวณพบว่า มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 184 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 13.52 และมีค่า %CV เท่ากับ 7.35 ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.65 และมีค่า %CV เท่ากับ 13.09 ดังแสดงในตารางที่ 8 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 8 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 30-300 CFU/plate อยู่ในช่วง 7.97 ถึง 14.25 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate คือ 22.67 % ดังแสดงในตารางที่ 8 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 8 และมีค่า % CV ของ

จุลินทรีย์ 10-30 CFU/plate อยู่ในช่วง 10.45 ถึง 15.12 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 23.95 ถึง 29.58 % ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงสรุปผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method ของนักวิเคราะห์ 3 คน

Summary (3 Analysts)					
Parameters	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		150-300 CFU	20-50 CFU		
Replicate Number	30	30	30	30	30
Mean	<1	184	36	<1	<1
SD	0.00	13.52	4.65	0.00	0.00
%CV	0.00	7.35	13.09	0.00	0.00
Parameters	Spiked microbiological suspension (150 – 300 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
Replicate Number	30	30	30	30	30
Mean	18	45	87	131	188
SD	4.26	6.46	9.01	10.51	14.98
%CV	22.67	14.25	10.33	8.01	7.97
Parameters	Spiked microbiological suspension (20 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
Replicate Number	30	30	30	30	30
Mean	3	8	17	25	35
SD	0.82	2.03	2.53	2.62	4.62
%CV	29.58	23.95	15.12	10.45	13.05

4.2 ผลการศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method

Membrane Filtration Method เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง และตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ทดสอบ ก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบจริง จึงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method ก่อนจะใช้วิธีการทดสอบนั้น โดยการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration method ต้องมีการจัดทำโปรโตคอลประกอบด้วย วัตถุประสงค์ ขอบเขต ผู้รับผิดชอบ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ เครื่องมือที่ใช้ วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ เกณฑ์การยอมรับ เอกสารอ้างอิง ผู้จัดทำ ผู้มีอำนาจลงนาม ดังแสดงในภาคผนวก ง. และมีจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ

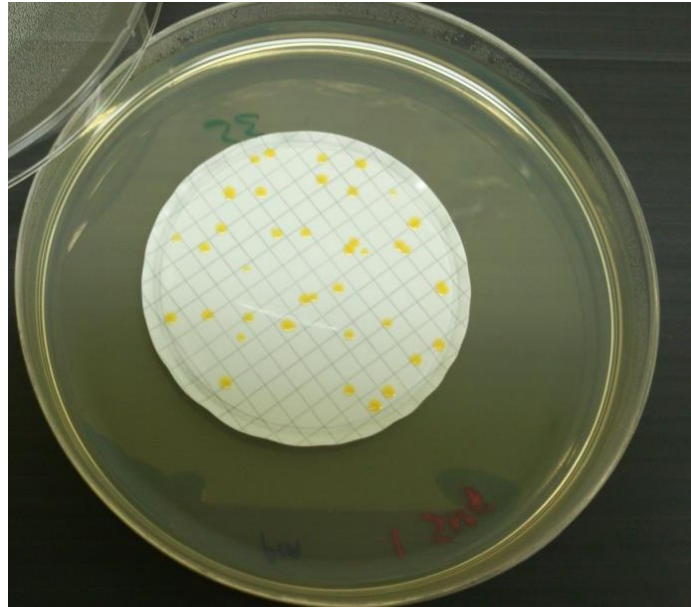
เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยผลการตรวจสอบใบ certificate พบว่าวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อคือ Plate count agar, เชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 ที่จะใช้งานไม่หมดอายุ และมีการจัดเตรียมเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยผลการตรวจสอบพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีผ่านการสอบเทียบ จากนั้นจึงเริ่มการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration method

4.2.1 ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และ การทวนซ้ำได้ (Repeatability)

การศึกษความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยทำการ spike microbiological suspension ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่างน้ำ และนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ขึ้นจริง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า percentage recovery ในหน่วยของ CFU พบว่า negative control ทั้งหมดไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 9 ส่วน positive control ทั้งหมดพบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 9 ส่วน water sample ทั้งหมดไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 9 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL และช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL มีการเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น ดังแสดงในตารางที่ 9 และพบว่าค่า % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าอยู่ในช่วง 101.30 ถึง 118.23 % ดังแสดงในตารางที่ 9 และค่า % recovery ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL มีค่าอยู่ในช่วง 89.89 ถึง 102.53 % ดังแสดงในตารางที่ 9

การศึกษการทวนซ้ำได้ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยตัวอย่างทดสอบเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือตัวเดียวกัน ทำการวิเคราะห์วันเดียวกันบันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU พบว่าค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 193 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 8.50 และมีค่า %CV เท่ากับ 4.42 ดังแสดงในตารางที่ 9 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.14 และมีค่า %CV เท่ากับ 11.63 ดังแสดงในตารางที่ 9 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 9 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 9 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate อยู่ในช่วง 4.59 ถึง 12.19 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate คือ 14.67 % ดังแสดงในตารางที่ 9 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological

suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 9 และมีค่า % CV ของ จุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate คือ 8.88 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate อยู่ใน ช่วง 8.31 ถึง 12.64 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ใน ช่วง 27.64 ถึง 28.72 % ดังแสดงในตารางที่ 9



รูปที่ 8 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538 โดยใช้ เทคนิค Membrane Filtration Method

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และการทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของ วิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Pour Plate Method

Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates			
	Negative control	Positive control		Water sample
		100-200 CFU	10-50 CFU	
1	<1	198	40	<1
2	<1	196	32	<1
3	<1	199	30	<1
4	<1	190	41	<1
5	<1	200	32	<1
6	<1	190	35	<1
7	<1	196	32	<1
8	<1	180	35	<1
9	<1	176	38	<1
10	<1	200	41	<1
Mean	<1	193	36	<1
SD	0.00	8.50	4.14	0.00
%CV	0.00	4.42	11.63	0.00

Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	25	63	111	161	197
2	19	64	96	142	199
3	27	55	103	153	198
4	24	56	96	141	196
5	23	62	111	174	199
6	19	61	92	148	190
7	19	53	100	165	200
8	23	62	86	153	200
9	23	42	85	163	171
10	17	51	103	169	200
Mean	22	57	98	157	195
SD	3.21	6.94	9.12	11.27	8.96
%CV	14.67	12.19	9.27	7.18	4.59
Spiked standard (CFU)	19	48	96	144	193
% Recovery	113.77	118.23	102.13	108.68	101.30
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	2	6	19	27	38
2	5	8	20	25	31
3	2	10	15	29	35
4	3	13	15	25	38
5	3	6	18	26	41
6	3	6	15	26	39
7	4	7	16	26	33
8	3	7	19	28	36
9	3	9	16	27	34
10	4	8	14	21	40
Mean	3	8	17	26	37
SD	0.92	2.21	2.11	2.16	3.24
%CV	28.72	27.64	12.64	8.31	8.88
Spiked standard (CFU)	4	9	18	27	36
% Recovery	89.89	89.89	93.82	97.38	102.53

4.2.2 ผลการศึกษา Intermediate precision

เพื่อศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) เพื่อให้สามารถครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานจริง บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU พบว่า Analyst 1 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 150-300 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 193 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 8.50 และมีค่า %CV เท่ากับ 4.42 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 20-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.14 และมีค่า %CV เท่ากับ 11.63 ดังแสดงในตารางที่ 10 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate อยู่ในช่วง 4.59 ถึง 12.19 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate คือ 14.67 % ดังแสดงในตารางที่ 10 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate คือ 8.88 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate อยู่ในช่วง 8.31 ถึง 12.64 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 27.64 ถึง 28.72 % ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน Analyst 2 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 185 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 10.31 และมีค่า %CV เท่ากับ 5.56 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.48 และมีค่า %CV เท่ากับ 12.08 ดังแสดงในตารางที่ 10 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate อยู่ในช่วง 7.16 ถึง 13.91 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate คือ 15.29 % ดังแสดงในตารางที่ 10 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate คือ 11.46 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate อยู่ในช่วง 9.21 ถึง 12.22 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 26.68 ถึง 32.08 % ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน Analyst 3 มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน

positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 185 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 10.77 และมีค่า %CV เท่ากับ 5.82 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 3.54 และมีค่า %CV เท่ากับ 9.55 ดังแสดงในตารางที่ 10 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate อยู่ในช่วง 4.32 ถึง 14.73 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate คือ 18.79 % ดังแสดงในตารางที่ 10 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 10 มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate คือ 13.67 % และ มีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate อยู่ในช่วง 14.84 ถึง 15.75 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 26.03 ถึง 33.67 % ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method ของนักวิเคราะห์แต่ละคน

Analyst 1				
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates			
	Negative control	Positive control		Water sample
		100-200 CFU	10-50 CFU	
1	<1	198	40	<1
2	<1	196	32	<1
3	<1	199	30	<1
4	<1	190	41	<1
5	<1	200	32	<1
6	<1	190	35	<1
7	<1	196	32	<1
8	<1	180	35	<1
9	<1	176	38	<1
10	<1	200	41	<1
Mean	<1	193	36	<1
SD	0.00	8.50	4.14	0.00
%CV	0.00	4.42	11.63	0.00

Analyst 1					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	25	63	111	161	197
2	19	64	96	142	199
3	27	55	103	153	198
4	24	56	96	141	196
5	23	62	111	174	199
6	19	61	92	148	190
7	19	53	100	165	200
8	23	62	86	153	200
9	23	42	85	163	171
10	17	51	103	169	200
Mean	22	57	98	157	195
SD	3.21	6.94	9.12	11.27	8.96
%CV	14.67	12.19	9.27	7.18	4.59
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	2	6	19	27	38
2	5	8	20	25	31
3	2	10	15	29	35
4	3	13	15	25	38
5	3	6	18	26	41
6	3	6	15	26	39
7	4	7	16	26	33
8	3	7	19	28	36
9	3	9	16	27	34
10	4	8	14	21	40
Mean	3	8	17	26	37
SD	0.92	2.21	2.11	2.16	3.24
%CV	28.72	27.64	12.64	8.31	8.88

Analyst 2					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		100-200 CFU	10-50 CFU		
1	<1	199	37	<1	
2	<1	197	41	<1	
3	<1	189	39	<1	
4	<1	170	33	<1	
5	<1	189	42	<1	
6	<1	175	36	<1	
7	<1	190	30	<1	
8	<1	188	42	<1	
9	<1	186	40	<1	
10	<1	170	31	<1	
Mean	<1	185	37	<1	
SD	0.00	10.31	4.48	0.00	
%CV	0.00	5.56	12.08	0.00	
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	20	47	75	119	190
2	19	44	68	112	150
3	22	50	94	127	182
4	19	63	75	117	168
5	23	54	77	119	182
6	15	46	83	119	196
7	16	39	81	107	180
8	22	48	89	138	177
9	19	42	86	122	176
10	15	48	80	128	170
Mean	19	48	81	121	177
SD	2.91	6.69	7.60	8.69	12.69
%CV	15.29	13.91	9.40	7.19	7.16

Analyst 2					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	3	11	16	22	31
2	2	8	16	23	41
3	3	6	20	21	44
4	2	11	20	24	35
5	3	8	19	24	34
6	4	5	18	26	32
7	5	7	20	29	35
8	4	10	18	29	38
9	3	10	18	29	41
10	2	12	21	23	38
Mean	3	9	19	25	37
SD	0.99	2.35	1.71	3.06	4.23
%CV	32.08	26.68	9.21	12.22	11.46
Analyst 3					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates				Water sample
	Negative control	Positive control			
		100-200 CFU	10-50 CFU		
1	<1	180	35	<1	
2	<1	177	34	<1	
3	<1	176	32	<1	
4	<1	200	35	<1	
5	<1	199	42	<1	
6	<1	190	34	<1	
7	<1	182	41	<1	
8	<1	168	41	<1	
9	<1	182	38	<1	
10	<1	196	39	<1	
Mean	<1	185	37	<1	
SD	0.00	10.77	3.54	0.00	
%CV	0.00	5.82	9.55	0.00	

Analyst 3					
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	21	46	106	140	185
2	24	55	106	145	184
3	26	39	97	135	189
4	14	46	97	142	170
5	19	49	107	151	189
6	16	43	102	137	175
7	25	57	96	144	190
8	22	55	100	153	188
9	25	53	100	154	186
10	21	64	104	151	170
Mean	21	51	102	145	183
SD	4.00	7.47	4.12	6.80	7.89
%CV	18.79	14.73	4.06	4.68	4.32
Replicate	Number of colonies (CFU) on PCA plates of spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
1	5	8	15	28	41
2	3	6	16	26	32
3	3	8	15	25	35
4	4	9	22	21	42
5	2	13	24	24	42
6	3	7	18	28	40
7	5	11	20	25	32
8	5	13	18	23	30
9	3	9	20	35	31
10	2	8	19	24	33
Mean	4	9	19	26	36
SD	1.18	2.39	2.95	3.84	4.89
%CV	33.67	26.03	15.75	14.84	13.67

การศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิธีการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน และ/หรือระยะเวลาต่างกัน (ทำคนละวัน) บันทึกผลจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลง (% CV) ในหน่วยของ CFU ของผู้วิเคราะห์ ทั้ง 3 คน เมื่อนำผลของ Analyst ทั้ง 3 คน มาคำนวณพบว่า มีค่าเฉลี่ยของ negative control มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ negative control มีค่าเท่ากับ 0.00 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้นของ microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 188 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 10.24 และมีค่า %CV เท่ากับ 5.46 ดังแสดงในตารางที่ 11 ส่วน positive control ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37 CFU/mL มีค่า SD เท่ากับ 4.04 และมีค่า %CV เท่ากับ 11.04 ดังแสดงในตารางที่ 11 และค่าเฉลี่ยของ water sample มีค่าเท่ากับ < 1 CFU/mL ค่า SD ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 และค่า %CV ของ water sample มีค่าเท่ากับ 0.00 ดังแสดงในตารางที่ 11 ส่วน spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension สูงคือ 100-200 CFU/mL มีค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 11 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate อยู่ในช่วง 6.61 ถึง 14.54 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate คือ 17.29 % ดังแสดงในตารางที่ 11 และ spiked sample plates ช่วงความเข้มข้น microbiological suspension ต่ำคือ 10-50 CFU/mL ค่าเฉลี่ยและค่า SD ดังแสดงในตารางที่ 11 และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 20-200 CFU/plate คือ 11.20 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ 10-20 CFU/plate อยู่ในช่วง 11.94 ถึง 13.65 % และมีค่า % CV ของจุลินทรีย์ < 10 CFU/plate อยู่ในช่วง 23.95 ถึง 29.58 % ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงสรุปผลการศึกษา Intermediate precision ของวิธีการตรวจสอบหาปริมาณ จุลินทรีย์ในน้ำโดยใช้ Membrane Filtration Method ของนักวิเคราะห์ 3 คน

Summary (3 Analysts)					
Parameters	Number of colonies (CFU) on PCA plates				
	Negative control	Positive control		Water sample	
		100-200 CFU	10-50 CFU		
Replicate Number	30	30	30	30	
Mean	<1	188	37	<1	
SD	0.00	10.24	4.04	0.00	
%CV	0.00	5.46	11.04	0.00	
Parameters	Spiked microbiological suspension (100 – 200 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
Replicate Number	30	30	30	30	30
Mean	21	52	94	141	185
SD	3.58	7.55	11.63	17.85	12.22
%CV	17.29	14.54	12.44	12.66	6.61

Parameters	Spiked microbiological suspension (10 – 50 CFU) at the volume of				
	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	0.75 mL	1.0 mL
Replicate Number	30	30	30	30	30
Mean	3	9	18	26	36
SD	1.00	2.33	2.46	3.06	4.08
%CV	30.73	26.90	13.65	11.94	11.20