



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจัดสร้างระบบตรวจจับ E. coli และ
ชุดทดสอบในน้ำขนาดพกพาด้วยการประมวลผลความเร็วสูง

Development of a portable, rapid, and high-throughput detection
system and a test assay for Escherichia coli in water

ดร.วิบูลย์ ปิยวัฒน์เมธา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
งบประมาณ พ.ศ. 2558

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การจัดสร้างระบบตรวจจับ E.coli และ ชุดทดสอบในน้ำขนาดพกพาด้วยการประมวลผล
ความเร็วสูง

แหล่งเงิน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 1,000,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 24 เดือน ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2561

ดร.วิบูลย์ ปิยวัฒน์เมธา (หัวหน้าโครงการ)

ภาควิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยเราได้ทำการพัฒนาเครื่องตรวจเชื้อ Escherichia coli (E.coli) ในน้ำ โดยระบบนี้ได้ใช้หลักการของ Fluorescence detection ในการระบุ enzyme β -D-glucuronidase (GUD) ซึ่งเป็น enzyme ที่เกิดจากการ E.coli โดยยังมี enzyme นี้มาก จำนวน E.coli ก็มีมากเช่นกัน ซึ่งจากการทดลองเราพบว่าระบบสามารถตรวจจับสัญญาณ Fluorescence จาก 4-MU จากการทำ ปฏิกิริยาของ GUD assay จากความเข้มข้น 0.01- 98 $\mu\text{g/ml}$ และทำการระบุ จำนวน E.coli ได้ในช่วง $10^5 - 10^7$ CFU/ml. โดยทำการควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 20 -240 นาที นอกจากนี้ เรายังยังสามารถประมาณจำนวนมากของเวลาในการควบคุมอุณหภูมิ ในการวัดจำนวนที่น้อยที่สุดของ E.coli 1 CFU/ml จากสมการได้คือ 576 นาที และ ในการศึกษาเบื้องต้นในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการระบุจำนวนของ E.coli ในน้ำใช้เวลาที่น้อยกว่า วิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปในการตรวจจับเชื้อ E.coli

คำสำคัญ เชื้อ E.coli, น้ำดื่ม, β -D-glucuronidase (GUD), เครื่องตรวจสอบสารเรืองแสง (fluorescence) แบบพกพา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Real-time E.coli detection based on fluorescence technology

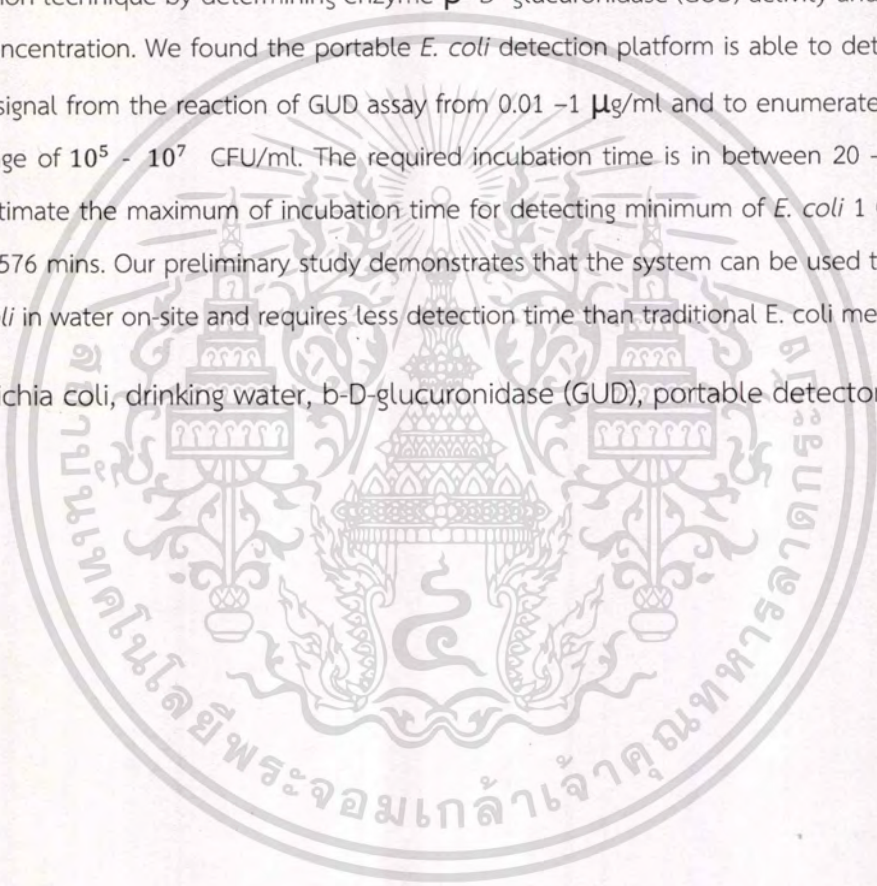
Researcher: Dr.Wibool Piyawattanametha

Faculty: Engineering **Department:** Biomedical Engineering

Abstract

We demonstrated a fast detection platform for *Escherichia coli* (*E. coli*) in water. The system is based on a fluorescence detection technique by determining enzyme β -D- glucuronidase (GUD) activity and relating that activity to *E. coli* concentration. We found the portable *E. coli* detection platform is able to detect both the fluorescence 4-MU signal from the reaction of GUD assay from 0.01 –1 μ g/ml and to enumerate the number of *E. coli* in the range of 10^5 - 10^7 CFU/ml. The required incubation time is in between 20 – 240 min. In addition, we can estimate the maximum of incubation time for detecting minimum of *E. coli* 1 CFU/ml from the equation to be 576 mins. Our preliminary study demonstrates that the system can be used to enumerate the number of *E. coli* in water on-site and requires less detection time than traditional *E. coli* methods.

Keywords: *Escherichia coli*, drinking water, b-D-glucuronidase (GUD), portable detector, fluorescence.



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์ ที่เป็นผู้สนับสนุน
ทุนวิจัย และคณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นผู้ดูแล
สถานที่รวมถึงสาธารณูปโภคต่างๆในการทำวิจัยจนโครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ นักวิจัยขอจึงขอกราบพระคุณ
เป็นอย่างสูง

ดร.วิบูลย์ ปิยวัฒน์เมธา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก หรือ I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข หรือ II
กิตติกรรมประกาศ.....	ค หรือ III
สารบัญ.....	ง หรือ I
สารบัญตาราง.....	จ หรือ I
สารบัญภาพ.....	ฉ หรือ I
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน.....	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาและแนวคิดในการทำวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์.....	7
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	7
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	8
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	11
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	12
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	57
3.1 การออกแบบระบบตรวจหาเชื้อ E.coli.....	57
3.2 การเตรียมสารทางเคมี.....	57
3.3 ขั้นตอนการทดสอบในการตรวจหาเชื้อ E.coli.....	58
บทที่ 4 ผลการวิจัย	60
4.1 การทำงานของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E.coli.....	60
4.2 เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาและผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ ขนาดพกพา.....	61
4.3 การทำงานของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E.coli.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	66
ภาคผนวก.....	
ภาคผนวก สำเนาใบขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร.....	67
ภาคผนวก สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย.....	68
ประวัตินักวิจัย.....	69



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 มาตรฐานคุณภาพน้ำในด้านคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลก ปี 2011.....	13
2 ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ E. coli (Forbes et al., 2002).....	21
3 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 5 หลอด.....	26
4 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 7 หลอด.....	27
3 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 10 หลอด.....	28
3 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 5 หลอด.....	26



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แหล่งน้ำผิวดิน ประเภทแม่น้ำ.....	4
1.2 ตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ.....	6
1.3 แสดงส่วนประกอบและหลักการทำงานของระบบ.....	8
1.4 แสดงการออกแบบ prototype.....	9
2.1 การแบ่งประเภทของของ โคลิฟอร์ม.....	14
2.2 ภาพ E. coli จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน(3a) และภาพการย้อม E. coli จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (3b).....	15
2.3 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Pour plate.....	17
2.4 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate.....	18
2.5 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Drop plate.....	18
2.6 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Membrane filtration method.....	19
2.7 ผลการเพาะเชื้อ E. coli จากน้ำบ่อน้ำอาหารเพาะเชื้อชนิด HiCrome™ M-TEC Agar ด้วยเทคนิค membrane filtration.....	20
2.8 สรุปการวิเคราะห์ปริมาณ Fecal coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำ โดยวิธี MPN(I).....	24
2.9 สรุปการวิเคราะห์ปริมาณ Fecal coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำ โดยวิธี MPN(II).....	25
2.10 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ β -glucuronidases; GUD และ 4-methylumbelliferyl-p-glucuronide (4-MUG).....	27
2.11 ตัวอย่างการเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone (4MU).....	29
2.12 การอ่านและแปลผลโดยใช้แผ่นเทียบสี 11.....	30
2.13 แสดงวิธีการทดสอบโคลิฟอร์มจากคู่มือชุดทดสอบโคลิฟอร์มในน้ำและน้ำแข็ง.....	31
2.14 ชุดทดสอบและตัวอย่างผลการทดสอบ 3M Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate.....	31
2.15 ภาพแสดงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้นและช่วงการเรืองแสง.....	33
2.16 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นกับความเข้มของพลังงานของสัญญาณกระตุ้นและสัญญาณที่ปล่อยออกมา.....	33
2.17 ทางเดินของแสงในเรื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ชนิดลำแสงเดี่ยว(ก) และชนิดลำแสงแยก(ข).....	35
2.18 ลักษณะของโฟโตไดโอดและสัญลักษณ์ที่ใช้ในวงจร.....	37
2.19 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย.....	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

2.20 โครงสร้างคอนดักโทเมตริกไบโอเซนเซอร์.....	31
2.21 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อที่สูงขึ้นต่อสัญญาณที่วัดได้.....	31
4.1 ระบบการตรวจเชื้อ E.coli ในห้องปฏิบัติการ.....	61
4.2 (a) ลำแสง Fluorescent หลังจากการกระตุ้นสาร 4MU จากเชื้อ E.coli (b) ระบบการทำความร้อนโดยใช้แผ่น Pealtier สำหรับการทำความร้อนให้กับสารละลาย.....	62
4.3 Final version ของเครื่องตรวจวัด E-coli.....	62
4.5 แสดงความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ GUD ของ E. coli ที่ความเข้มข้นระดับ $1-10^7$ CFU/ml ที่ย่อยสลายซับสเตรทชนิด MUG ทำให้เกิดสารเรืองแสงชนิด 4-MU และทำให้เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาสามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้.....	65



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1 บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ในประเทศจีนพบสัทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับสิ่งประดิษฐ์ระบบการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิดเอสเชอริเชีย คอไล (Escherichia coli) โดยสัทธิบัตรประเทศจีน เลขที่ 1141344 ได้เปิดเผยการตรวจหาเชื้อ E. coli โดยสิ่งประดิษฐ์นี้ใช้เทคนิคเมมเบรนร่วมกับซับสเตรท MUGAL ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ เบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ใน อี. คอไล (E.coli) และคอลลีฟอร์ม (Coliform) และสามารถตรวจหาเชื้อ อี. คอไล (E.coli) ได้ภายใน 12-15 ชั่วโมง ซึ่งลดเวลาจากที่ใช้การตรวจหาด้วยวิธีมาตรฐาน 48 ชั่วโมง แต่สิ่งประดิษฐ์นี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้เมมเบรน ซึ่งต้องมีขนาดรู (pore size) ขนาดที่เหมาะสมและมีราคาสูง รวมถึงระยะเวลาการตรวจหาเชื้อ อี. คอไล (E.coli) ที่ใช้นานกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกลิ่นเสียพื้นที่การจัดเก็บสินค้าระหว่างรอผลการวิเคราะห์ของผู้ผลิตที่เกี่ยวข้องกับน้ำ ส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นได้ และอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

ใบขอรับสัทธิบัตรประเทศแคนาดา หมายเลข CA 2204121 ได้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจหาแบคทีเรียชนิด อี. คอไล (E.coli) และใช้ซับสเตรทชนิดเมทิลลัมเบลลิเฟอร์ริล-6-ดี-กลูคูโรไซด์ (methylumbelliferyl-6-D-glucuronide) โดยมีการเติมสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น วิตามิน กรดอะมิโน สารอาหาร และเกลือ เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตและมีการใช้สารต้านจุลชีพชนิดแวนโคมัยซินและแอนซิโอมัยซินที่ความเข้มข้น 0.0001 – 0.01% เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ โดยสามารถตรวจหาเชื้อ อี. คอไล (E.coli) ได้ภายในระยะเวลา 18 ชั่วโมง

สัทธิบัตรกลุ่มประเทศยุโรป หมายเลข EP0530322 ได้ทำการปรับปรุงวิธีการตรวจหา อี. คอไล (E.coli) ในน้ำ โดยใช้ซับสเตรทชนิดอินโดลโปรดิวซิงทริปโตฟานเนส (indole-producing tryptophanase) และใช้โปรตีนหรือ เปปไทด์ไฮโดรไลเสท (peptide hydrolysate) ในการช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ อี. คอไล (E.coli) จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาเชื้อ อี. คอไล (E.coli)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกา หมายเลข 5861270 ได้เปิดเผยการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ อี. คอลิ (E.coli) โดยใช้เอนไซม์ วิธีการตรวจหาทำโดยการกรองตัวอย่างส่งตรวจผ่านกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองนั้นวางในอาหารที่สารเร่งการเจริญเติบโต ซับสเตรทเบต้ากลูคูโรไซด์ (β -D-glucuronide) และซับสเตรทเบต้า-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ (β -D-galactopyranoside) โดยซับสเตรทมีการใส่สารเรืองแสงชนิด 4 เมทิลลัมเบลลิเฟอร์โรน (4-methylumbelliferone) ซึ่งทำให้เกิดการเรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์เมื่อพบเชื้อ อี. คอลิ (E.coli) จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โดยสามารถตรวจหาเชื้อ อี. คอลิ (E.coli) ได้ภายในเวลา 7.5 ชั่วโมง

สิทธิบัตรประเทศญี่ปุ่น หมายเลข JP 20030121018 ได้เปิดเผยสิ่งประดิษฐ์เพื่อยืนยันการพบเชื้อ อี. คอลิ (E.coli) โดยการนำตัวอย่างน้ำบรรจุภายในสิ่งประดิษฐ์นี้ ซึ่งภายในสิ่งประดิษฐ์มีอุปกรณ์เติมสาร ซับสเตรทที่เชื่อมกับสารเรืองแสง โดยซับสเตรทนี้มีคุณสมบัติจำเพาะกับเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ของแบคทีเรีย อี. คอลิ (E.coli) และมีการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม หากมีการพบเชื้อแบคทีเรีย อี. คอลิ (E.coli) จะพบการเรืองแสงภายใต้หลอดยูวี ซึ่งบรรจุอยู่ในสิ่งประดิษฐ์นี้ โดยรายงานผลการพบเชื้อแบคทีเรีย อี. คอลิ (E.coli) แบบพบหรือไม่พบเท่านั้น

สิทธิบัตรประเทศแคนาดา หมายเลข WO2016CA00208 ได้เปิดเผยสิ่งประดิษฐ์ในการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ อี. คอลิ (E.coli) ที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ โดยทำการเก็บตัวอย่างใส่ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างที่อยู่ในสิ่งประดิษฐ์ และใส่ไฮโดรเจล (hydrogel) ซึ่งภายในบรรจุซับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ 6-คลอโร-3-อินโดลิล-ดี-กาแลคโตไซด์ (6-Chloro-3-indolyl-D-galactoside) , 4-เมทิลลัมเบลลิเฟอร์ิล-พี-ดี-กลูโคโรไซด์ ไตรไฮเดรต (4-Methylumbelliferyl P-D-glucoronide trihydrate) และ 5-โบรมอ-6-คลอโร-3-อินโดลิล-พี-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ (5-bromo-6-chloro-3-indolyl-P-D-galactopyranoside) รวมถึงซับสเตรทที่มีการใส่สารเรืองแสง ได้แก่ 4 เมทิลลัมเบลลิเฟอร์ิล-พี-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ (4-methylumbelliferyl-p-D-galactopyranoside) และนำไปตรวจหาแบคทีเรีย อี. คอลิ (E.coli) ภายใต้หลอดยูวีที่ประกอบอยู่ในสิ่งประดิษฐ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

น้ำ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ สัตว์ และ พืช ทั้งในส่วนของ การอุปโภค และบริโภค โดยเฉพาะน้ำผิวดิน ได้แก่ แม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ทะเลสาบ และแหล่งน้ำสาธารณะอื่นๆ น้ำผิวดินเป็นทรัพยากรน้ำที่สามารถหมุนเวียนจากการปรับสมดุลของธรรมชาติ จึงสามารถฟื้นฟูตัวเองได้ระดับหนึ่ง แต่ในปัจจุบันมีการเจริญเติบโตของสังคมมากขึ้น เนื่องจากการพัฒนาด้านอุตสาหกรรม พาณิชยกรรม และเกษตรกรรม ส่งผลให้ธรรมชาติไม่สามารถปรับสมดุลได้ทันตามการพัฒนาของเทคโนโลยี ทำให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสียจากการทิ้งน้ำเสีย ทิ้งขยะ ทิ้งสารเคมีทางการเกษตร หรือแม้กระทั่งพบคราบน้ำมันปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตในลุ่มน้ำ รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำนั้นๆ ดังนั้น พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 ตามมาตรา 32 บัญญัติให้คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน เพื่อควบคุมและรักษาคุณภาพน้ำแหล่งน้ำให้เหมาะสมกับการใช้ประโยชน์ มีความปลอดภัยต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน และเพื่อเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากร และสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

ดังนั้น การติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำเพื่อให้ทราบถึงสภาพแหล่งน้ำในปัจจุบัน เพื่อประเมินแนวโน้มของปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต และนำสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อวางแผนจัดการคุณภาพน้ำ ให้สามารถแก้ไขและป้องกันผลกระทบจากมลพิษในแหล่งน้ำได้อย่างทันท่วงที

ดัชนีคุณภาพแหล่งน้ำผิวดิน (Water Quality Index: WQI) แสดงสถานการณ์คุณภาพน้ำในภาพรวม โดยพิจารณาคุณภาพน้ำ 5 พารามิเตอร์ ได้แก่

1. ออกซิเจนละลาย (Dissolve Oxygen : DO)
2. ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand : BOD)
3. แบคทีเรียกลุ่ม E. coli ทั้งหมด (Total E. coli Bacteria)
4. แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลลีฟอร์ม (Fecal coliform Bacteria)
5. แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH₃-N)

โดยประเมินคะแนน เพื่อจัดเกณฑ์คุณภาพน้ำ ดังนี้

91 – 100 คะแนน	คุณภาพน้ำดีมาก
71 – 90 คะแนน	คุณภาพน้ำดี
61 – 70 คะแนน	คุณภาพน้ำพอใช้
31 – 60 คะแนน	คุณภาพน้ำเสื่อมโทรม
0 – 30 คะแนน	คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมมาก



รูปที่ 1.1 แหล่งน้ำผิวดิน ประเภทแม่น้ำ

สำหรับแผนการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำประจำปี กรมควบคุมมลพิษร่วมกับสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค ได้กำหนดแผนการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำตามแหล่งน้ำสำคัญทั่วประเทศ และทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำ ปีละ 4 ครั้ง (3 เดือนต่อครั้ง) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 1,464 ตัวอย่าง จากจุดเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 366 จุดเก็บตัวอย่าง ของแหล่งน้ำสำคัญ 52 แหล่งน้ำ (แม่น้ำสายสำคัญ 48 สาย และแหล่งน้ำนิ่ง 4 แหล่ง) เพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 พ.ศ. 2555 – 2559 ที่ได้กำหนดคุณภาพน้ำ แหล่งน้ำผิวดินให้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์พอใช้ขึ้นไป ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 แต่จากรายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย ปี 2557 พบว่า แหล่งน้ำสายสำคัญและแหล่งน้ำหลักมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ตั้งแต่พอใช้ขึ้นไป เพียงร้อยละ 78 จึงกล่าวได้ว่าการรักษาคุณภาพน้ำของแหล่งน้ำผิวดินยังไม่บรรลุเป้าหมายที่กำหนด ซึ่งในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา คุณภาพน้ำในภาพรวมของประเทศไทย มีแนวโน้มเสื่อมโทรมลง โดยมีสาเหตุสำคัญมาจากการระบายน้ำเสียจากชุมชน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชะหน้าดินที่มีปุ๋ยตกค้างจากการเกษตร การปศุสัตว์ การประกอบกิจการในชุมชนและอุตสาหกรรม บริเวณริมน้ำและระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง

การตรวจปริมาณแบคทีเรีย E. coli ทั้งหมด (Total E. coli) เป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดคุณภาพแหล่งน้ำผิวดิน เนื่องจาก E. coli มักพบในลำไส้ของสัตว์เลื้อยคืบ และบางชนิดพบได้ในดิน ดังนั้นการพบ E. coli ปริมาณมากในแหล่งน้ำจึงบ่งชี้ถึงความไม่สะอาด และมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำ ซึ่งตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 16 ลงวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2537 ได้กำหนดเกณฑ์การตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม E. coli ทั้งหมด (Total E. coli Bacteria) ด้วยวิธี MPN เอ็ม.พี.เอ็น หรือ Most Probable Number ซึ่งวิธีการตรวจสอบเป็นไปตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ซึ่ง APHA : American Public Health Association, AWWA : American Water Works Association และ WPCF : Water Pollution Control Federation ของสหรัฐอเมริกา ร่วมกันกำหนด

ดังนั้นการตรวจติดตามคุณภาพน้ำให้ได้มาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะการตรวจคุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยา ซึ่งมาตรฐานกำหนดว่าในน้ำประปารวมถึงน้ำที่ใช้สำหรับดื่ม ไม่ควรพบแบคทีเรียชนิด E. coli (WHO 2011) แต่เนื่องจากการตรวจสอบคุณภาพน้ำทางด้านจุลชีววิทยา มีข้อจำกัดเรื่องความยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (300-500 บาทต่อตัวอย่าง) และที่สำคัญใช้ระยะเวลาการทดสอบนานอย่างน้อย 2 - 7 วัน ถึงจะทราบผล

ปัจจุบันนอกจากใช้น้ำประปาซึ่งเป็นแหล่งน้ำหลักในการอุปโภคและบริโภคแล้ว ตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ ก็ยังเป็นแหล่งน้ำดื่มที่พบได้มากในประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตกรุงเทพและปริมณฑล โดยพบว่าตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญในประเทศไทย มีมากกว่า 60,000 ตู้ (> 50,000 ในกรุงเทพฯ และ > 10,000 ในจังหวัดอื่นๆ) (รูปที่ 1.1) มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานของน้ำดื่ม ซึ่งเป็นปัญหาเรื้อรัง เนื่องจากไม่ได้ปฏิบัติตามมาตรฐานการตรวจสอบคุณภาพน้ำ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาปี 2556 รายงานว่า ตัวอย่างน้ำ 790 ตัวอย่าง จาก 2,025 ตัวอย่าง (39%) จากตู้น้ำหยอดเหรียญทั่วกรุงเทพฯ มีคุณภาพน้ำดื่มต่ำกว่ามาตรฐาน สิ่งสำคัญที่สุด พบว่าประมาณ 1 ใน 10 ของตู้น้ำหยอดเหรียญ มีการปนเปื้อนจากเชื้อ E. coli ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการตรวจสอบคุณภาพน้ำตามแหล่งตู้น้ำหยอดเหรียญด้วยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบที่มีความไวและความถูกต้องอย่างเร่งด่วน ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบคุณภาพได้ประมาณ 200 ล้านบาทต่อปี



รูปที่ 1.2 ตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการตรวจหาแบคทีเรียชนิด E. coli ในน้ำ มีปัญหาหลักคือการใช้ระยะเวลาการทดสอบค่อนข้างนาน, ต้องใช้บุคลากรผู้เชี่ยวชาญ และเป็นข้อมูลการรายงานผลย้อนหลัง ทำให้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อปนเปื้อนจากน้ำได้อย่างทันท่วงที วิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการโดยมาก ใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ในการรายงานผลตรวจวิเคราะห์หลังได้รับตัวอย่างน้ำจึงมีความจำเป็นในการจัดหาวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรียในน้ำอย่างเร่งด่วนเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ E. coli เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ผู้บริโภค รวมถึงหน่วยงานต่างๆทั้งในภาคเอกชนและรัฐบาล

การประเมินคุณภาพน้ำโดยการตรวจหาเชื้อ E. coli ด้วยตัวเอง ควรทำเป็นประจำ เนื่องจากผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้ที่ดี ในตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยรวม ดังนั้นที่มหาวิทยาลัยการแพทย์และวิศวกรรมสาขา) กับพันธมิตรอุตสาหกรรม บริษัท Waternet PLC จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาการตรวจคัดกรองคุณภาพน้ำโดยการหาแบคทีเรีย E. coli ในน้ำ ด้วยเครื่องมือขนาดพกพาที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถรายงานผลการตรวจหา E. coli ได้ภายใน 2 ชั่วโมงโดยเครื่องมือและวิธีการตรวจหาเชื้อวิธีนี้จะมียุทธศาสตร์ขนาดเล็ก พกพาสะดวก มีวิธีการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก สามารถรายงานผลได้เร็ว (<2 ชั่วโมง) มีความไวสูง ความจำเพาะสูง และสามารถใช้งานได้ในสถานที่ซึ่งความแปลกใหม่ของเทคโนโลยีนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจนำมาซึ่งการปฏิวัติวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยการตรวจหาแบคทีเรียและเป็นความท้าทายของนวัตกรรมการทดสอบคุณภาพน้ำที่ได้มาตรฐาน

1.3 วัตถุประสงค์(Objective)

1.3.1 เพื่อพัฒนาต้นแบบ (Prototype) เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดพกพาสำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม E. coli ทั้งหมด (Total E. coli) ที่สามารถใช้งานง่าย ได้ผลการตรวจหาเชื้อฯ รวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมง และสามารถใช้งานได้จริงในภาคสนาม (On-field)

1.3.2 เพื่อพัฒนาระบบการตรวจหา Total E. coli ในน้ำแบบรวดเร็วด้วยเครื่องมือขนาดพกพา ให้สามารถเป็นวิธีทางเลือก ให้แก่หน่วยงานราชการหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในงานด้านการตรวจคุณภาพน้ำ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการจัดส่งตัวอย่างน้ำไปตรวจยังห้องปฏิบัติการภายนอก ช่วยลดระยะเวลาการรอผล จนกระทั่งทราบผล ภายในเวลา 2 ชม. และช่วยลดต้นทุนการตรวจหา Total E. coli

1.3.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องมือต้นแบบและวิธีการตรวจหา Total E. coli และใช้แนวทางในการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E. coli หรือเชื้อชนิดอื่นๆ ที่กำหนดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการตรวจคุณภาพน้ำ ต่อไป

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียชนิด Escherichia coli (E. coli) ในน้ำ ด้วยเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) ขนาดพกพา ให้สามารถลดระยะเวลาตรวจหา E. coli ในน้ำ โดยใช้คุณลักษณะของ E. coli ซึ่งมีเอนไซม์ β -d-Glucuronidase (GUD) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น 4-Methylumbelliferyl- β -d-glucuronide (MUG) และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น 4-methylumbelliferone (4-MU) ที่มีความเรืองแสง จึงสามารถนำเอาระดับความเข้มของสารเรืองแสง มาใช้เป็นตัวตรวจจับ E. coli โดยสามารถนำมาใช้คำนวณเป็นปริมาณ E. coli ที่อยู่ในแหล่งน้ำได้ ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และสามารถวัดปริมาณ E. coli ขั้นต่ำ ได้น้อยกว่า 7 CFU/mL ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบตรวจจับ E. coli ให้มีความสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

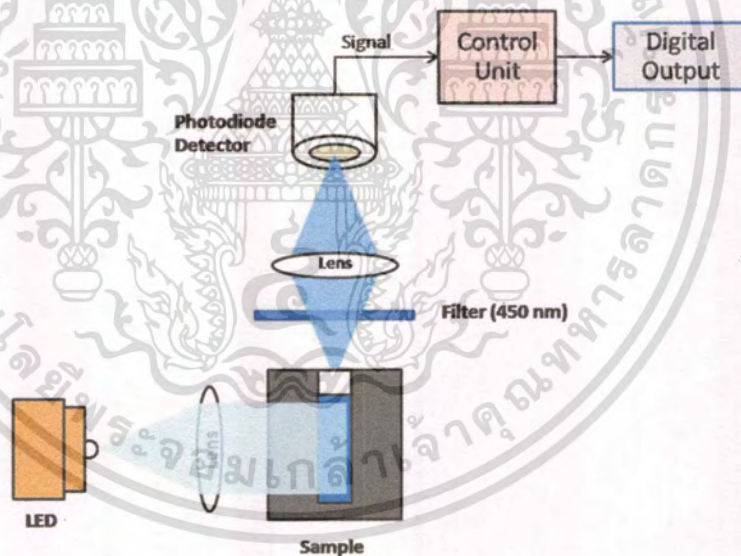
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

แผนงานวิจัยของโครงการพัฒนาวิธีการตรวจหา E. coli ในน้ำ เพื่อเป็นการคัดกรองคุณภาพน้ำเบื้องต้นนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนหลัก

1.5.1 การออกแบบเครื่องมือตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา

1.5.1.1 การออกแบบระบบเครื่องมือตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา

อุปกรณ์ตรวจวัดแสงในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย หลอดไฟกำเนิดแสง (Light Source) ใช้หลอด LED (Light Emitting Diode) เนื่องจากมีราคาไม่สูงมาก และให้ความสว่างสูง แสงจาก LED จะผ่านตัวแยกแสงตกกระทบ (Excitation Filter) ที่ความยาวคลื่น 360 nm ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นของสเปกตรัมที่ไปกระตุ้น 4MU ที่ใช้ในการทดลองนี้ ตัวกรองแสงปล่อยออก (Emission Filter) ความยาวคลื่น 450 nm จะถูกติดตั้งเพื่อกรองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่าง (Sample) ในหลอด Cuvette ผ่านเลนส์รวมแสง จากนั้นฟลูออเรสเซนซ์จะถูกวัดด้วย Photo detector ที่ถูกติดตั้งที่มุม 90 องศากับแนวของแสงกระตุ้น เพื่อลดสัญญาณรบกวนจาก background signal Photo detector จะเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่งไปยังระบบ software เพื่อประมวลผล และแสดงค่าผ่านทางจอแสดงผล



รูปที่ 1.3 แสดงส่วนประกอบและหลักการทำงานของระบบ

1.5.1.2 การทดสอบประเมินประสิทธิภาพเครื่องมือในการตรวจวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับเครื่อง Fluorometer มาตรฐาน

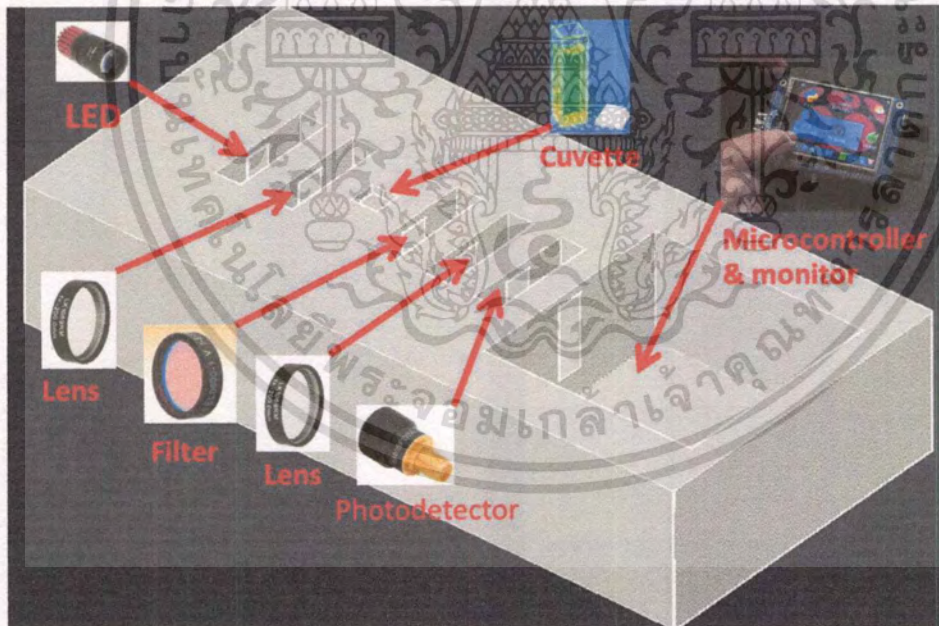
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดสอบคุณภาพการตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยเตรียมสารเรืองแสง 4MU ละลายในเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับตั้งแต่ 0.1 nM ถึง 100,000 nM จากนั้นนำตัวอย่างมาวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องมือที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับเครื่อง Fluorometerมาตรฐาน เพื่อระดับความสัมพันธ์ด้วยค่า Correlation

1.5.1.3 ระบบ Control Unite & Digital Output

เนื่องจากจำนวน E-coli ในน้ำมีจำนวนน้อยเกินไปทำให้เป็นข้อจำกัดในการวัดดังนั้นเราจึงเทคนิคการเพิ่มจำนวน E-coli ในอุณหภูมิที่คงที่และปริมาณอาหารที่เท่ากัน โดยจะคำนวณอัตราการเจริญโตของ E-coli ใน condition ที่เท่ากัน โดยใช้สมการ Polynomial Curve Fitting ดังสมการ (1) สมการนี้ช่วยให้เราสามารถประมาณจำนวนเชื้อ E-coli ที่เวลา t_0 ได้ถึงแม้จะมีปริมาณน้อยก็ตาม

$$f(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + \dots + a_jx^j = a_0 + \sum_{k=1}^j a_kx^k \quad (1)$$



รูปที่ 1.4 แสดงการออกแบบ prototype

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.1.4 การตรวจหาเชื้อ E. coli ในน้ำ

ทำการตรวจหาเชื้อ E. coli โดยใช้เครื่องมือขนาดพกพาที่ผลิตขึ้นเอง เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อทดสอบความไว ความจำเพาะ และช่วงที่สามารถตรวจวัดเชื้อ E. coli ได้

1.5.1.5 การตรวจหาเชื้อ E. coli ในน้ำ ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ

ทุกครั้งก่อนและหลังการทดสอบ ให้ทำการเพาะเชื้อ E. coli ด้วยเทคนิค Membrane Filtration (MF) โดยใช้แผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครลิตร (Millipore SAS, Billerica, MA) และนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด HiCrome™ M-TEC Agar (Sigma-Aldrich) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อบันทึกจำนวน colony ของตัวอย่าง เพื่อยืนยันจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบ

1.5.2 การตรวจหาเชื้อ E. coli โดยการใช้เครื่องมือขนาดพกพาที่ผลิตขึ้นเอง

เพื่อทำการทดสอบคุณภาพเครื่องมือที่ผลิตขึ้นเอง จึงให้มีการทดสอบความไว ความสามารถของเครื่องมือและการตรวจสอบความจำเพาะของการตรวจเชื้อ E. coli ดังนี้

1.5.2.1 การทดสอบความไวและช่วงที่สามารถตรวจวัดเชื้อ E. coli (sensitivity and measuring range)

ทำการเจือจางเชื้อ E. coli ให้เป็น serial dilution ตั้งแต่ 1-1000 CFU/mL จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ในแต่ละ dilution จำนวน 1 mL มาทำปฏิกิริยากับ 0.1 M N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] buffer (HEPES) จำนวน 0.9 mL ที่ pH 8.0 และ 0.08 mM MUG จำนวน 0.1 mL และนำไปวัดระดับการเรืองแสงด้วยเครื่องมือที่ผลิตเอง โดยทุกตัวอย่างต้องแบ่งไปเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 1.5.2.1 ด้วย

1.5.2.2 การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ E. coli

ทำการทดสอบความจำเพาะของ MUG ด้วยเครื่องมือที่ผลิตขึ้น โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ E. coli ทั้งแบบบริสุทธิ์ (pure culture) และแบบผสม (mixed culture) จาก ATCC โดยทำการเพาะเชื้อ Enterobacter (ATCC 13048), Bacillus (ATCC 14579), Klebsiella (BAA-1705), และ Salmonella

(ATCC 19585) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยดูดเชื้อแต่ละชนิดมาจำนวน 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) 9.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่อง shaker incubator (New Brunswick Scientific C24, Edison, NJ), (150 rpm ที่ 37°C) เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ในระยะ log phase โดยทิ้งไว้ 3 – 8 ชม. ขึ้นอยู่กับชนิดแบคทีเรีย

1.5.2.3 การตรวจหา E. coli จากแหล่งน้ำต่างๆ

นำเครื่องมือไปตรวจหาปริมาณเชื้อ E. coli ในสถานที่จริง โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาการตรวจหาแบคทีเรียชนิด E. coli ในน้ำ โดยใช้เครื่องมือที่ผลิตเองและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ซึ่งมีประโยชน์ต่อประชาชนทั่วไป ในด้านการลดอัตราการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อจากการปนเปื้อน E. coli ในน้ำ และเป็นประโยชน์ต่อระบบสาธารณสุขในการลดค่าใช้จ่ายของยาสำหรับการรักษาผู้ป่วย นอกจากนี้ยังสามารถยกระดับคุณภาพน้ำดื่มที่ให้บริการตามสถานที่ทั่วไปเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในคุณภาพน้ำในแก่ผู้บริโภคหรือผู้ใช้บริการได้ โดยคาดว่าจะได้รับประโยชน์ดังนี้

1.6.1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่ม E. coli ในน้ำ ที่มีขั้นตอนที่ง่าย และรวดเร็ว โดยใช้เครื่องมือต้นแบบขนาดพกพา

1.6.2 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่ม E. coli ในน้ำ ให้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน MPN

1.6.3 สามารถนำวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย กลุ่ม E. coli ในน้ำ ด้วยเครื่องมือต้นแบบขนาดพกพา ไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการติดตามคุณภาพน้ำในประเทศไทย โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่อยู่ถิ่นทุรกันดารและยากต่อการเข้าถึงกระบวนการตรวจสอบคุณภาพน้ำได้อย่างสม่ำเสมอ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำ

การติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำนั้นจำเป็นต้องมีการกำหนด ดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำหรือตัวชี้วัด หรือ พารามิเตอร์ (Parameter) เพื่ออธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงสภาพหรือสถานการณ์คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ โดยควรเลือกตัวชี้วัดที่มีความสำคัญๆ เช่น ออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen : DO) ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand : BOD) ความเป็นกรดและด่าง (pH) แบคทีเรียกลุ่ม โคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria : TCB) แบคทีเรียกลุ่มฟิคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria : FCB) แอมโมเนีย (Ammonia : NH₃-N) และ โลหะหนัก (Heavy Metal) เป็นต้น

การตรวจสอบคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย เป็นดัชนีที่จะบ่งชี้ถึงความสกปรกของน้ำ เนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น ไทฟอยด์ บิด และอหิวาห์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในอุจจาระ เมื่อถูกขับถ่ายปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำจะถูกแพร่กระจายไปโดยมีน้ำเป็นสื่อ และจะมีผลกระทบต่อสุขภาพของคนที่ใช้ในแหล่งน้ำนั้น ดังนั้นในการตรวจสอบคุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย จึงต้องวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เป็นอันตราย (Pathogens) ต่างๆ ในน้ำ การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่เป็นอันตราย (Pathogens) ต่างๆ ในตัวอย่างน้ำโดยตรงอาจต้องใช้ เวลานาน ยุ่งยาก และสิ้นเปลืองมาก ซึ่งในปัจจุบันมักนิยมใช้การตรวจหาแบคทีเรียชี้แนะแทน (Bacteriological indicator) โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เพื่อเป็นดัชนีชี้แนะว่าแหล่งน้ำนั้นน่าจะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายมากน้อยเพียงใด

การควบคุมและป้องกันการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในอาหาร

- หุงต้ม อาหาร ให้ร้อนระดับการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) หากเป็นอาหารปรุงสุกแล้วนำมารับประทาน ต้องอุ่นให้เดือด

- เก็บอาหารที่ทำให้สุกแล้วที่อุณหภูมิต่ำ หลีกเลี่ยงการเก็บอาหารช่วงอุณหภูมิที่เป็นอันตราย คือ 4-55 องศาเซลเซียส
- ควบคุมให้พนักงาน หรือบุคคล ที่สัมผัสกับอาหาร มีสุขอนามัยที่ดี (personal hygiene)
- ป้องกันการเกิดปนเปื้อนข้าม (cross contamination) โดยเฉพาะอาหารที่ปรุงสุก อาหารพร้อมรับประทานกับอาหารดิบ
- ผลิตอาหารให้ถูกสุขลักษณะ ตามหลัก GMP (Good Manufacturing Practise)

องค์การอนามัยโลก ปี 2011 ได้กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในด้านคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาว่าในแหล่งน้ำที่นำมาผลิตน้ำดื่ม หรือน้ำประปา ไม่ควรพบเชื้อ E.coli หรือ เชื้อกลุ่ม Fecal coliform (Thermotolerant coliform bacteria) ในน้ำ 100 ml [ตารางที่ 1]

Organisms	Guideline value
All water directly intended for drinking	
<i>E. coli</i> or thermotolerant coliform bacteria ^{b,c}	Must not be detectable in any 100 ml sample
Treated water entering the distribution system	
<i>E. coli</i> or thermotolerant coliform bacteria ^b	Must not be detectable in any 100 ml sample
Treated water in the distribution system	
<i>E. coli</i> or thermotolerant coliform bacteria ^b	Must not be detectable in any 100 ml sample

ตารางที่ 1 มาตรฐานคุณภาพน้ำในด้านคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลก ปี 2011

2.1.2 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม

แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) คือกลุ่มของแบคทีเรีย แกรมลบ (gram negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศ (aerobic) และพวกที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobic) สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (lactose) ให้เกิดกรดและแก๊ส ได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายใน 48 ชั่วโมง ไม่ทนร้อน

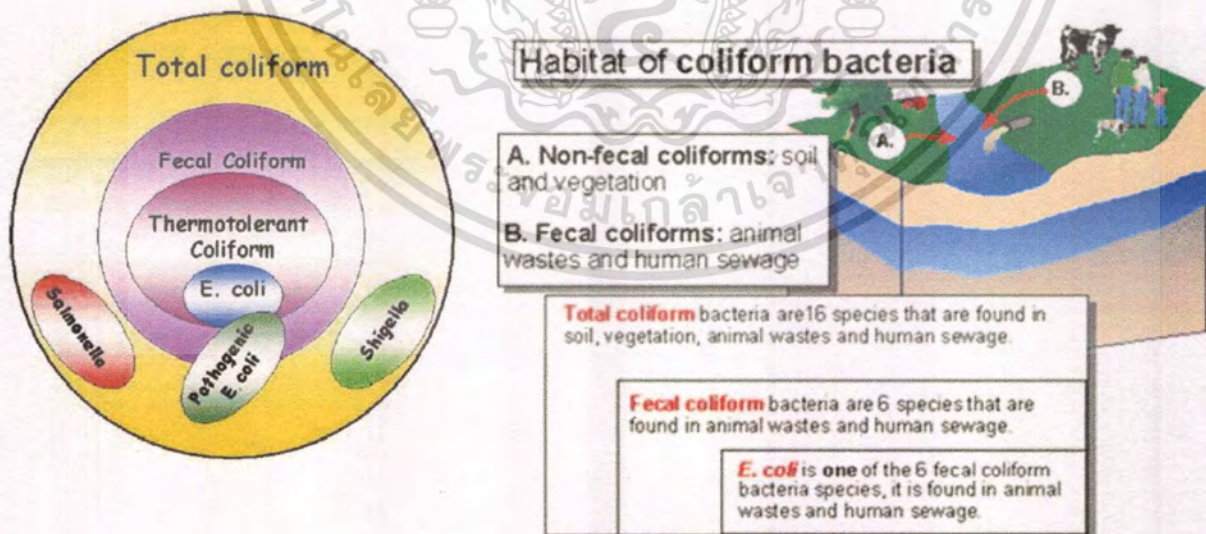
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) ไม่ผลิต เอนไซม์ออกซิเดส (oxidase negative) ส่วนพวกฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria) จะถูกจำแนกออกจาก กลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั่วไป เนื่องจากพวกฟีคัลโคลิฟอร์ม จะสามารถสลายสารอาหาร EC ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

คำว่า coliform มาจาก colon เนื่องจาก แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น แต่โคลิฟอร์มอีก หลายชนิดก็มีแหล่งที่พบในดิน แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (non-pathogen) แต่ ปริมาณของ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria count) ใช้เป็นดัชนีชี้สุขภาพอาหาร (food sanitation) และน้ำ การพบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในอาหารและน้ำปริมาณมากบ่งชี้ถึงความไม่สะอาด ไม่ถูกสุขลักษณะ อาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระของคน หรือ สัตว์เลือดอุ่น แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Hafnia, Klebsiella, Serratia

ประเภทของโคลิฟอร์ม แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) Non-fecal coliform เป็นโคลิฟอร์ม ที่พบในดิน ในพืช แต่ไม่พบในอุจจาระ ได้แก่ Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter, Serratia, Hafnia
- 2) Fecal coliform เป็นโคลิฟอร์ม ที่พบใน อุจจาระ ของคน และสัตว์เลือดอุ่น เพราะ อาศัยอยู่ในลำไส้ ใหญ่ ได้แก่ Salmonella, Shigellae, Escherichia แต่ที่สำคัญและพบมากในน้ำและอาหาร คือ Escherichia coli



รูปที่ 2.1 การแบ่งประเภทของของ โคลิฟอร์ม

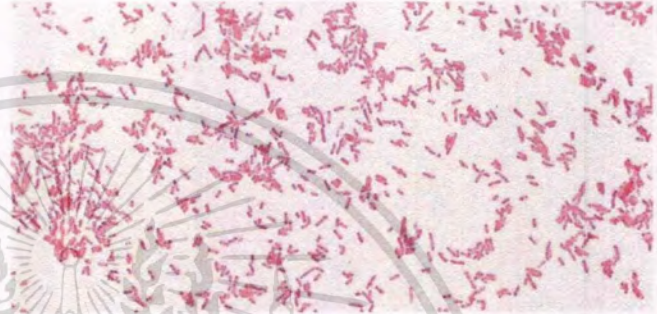
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 เชื้อแบคทีเรีย ชนิด Escherichia coli

Escherichia coli (E. coli) หรือ เชื้ออีโคไล เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อน (Gram negative rod) อยู่ในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซี (Family Enterobacteriaceae) ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้ E. coli มีความสำคัญในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ที่บ่งบอกว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปนเปื้อนหรือไม่



2a



2b

รูปที่ 2.2 ภาพ E. coli จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน(2a) และภาพการย้อม E. coli จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง(2b)

ที่มา: <http://www.bbc.com/news/health-13639241>,

<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=13348>

ในภาวะร่างกายปกติ เชื้อ E. coli ไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะก่อให้เกิดโรคได้ในกรณีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ เรียกว่า เชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Secondary infection) เชื้อ E. coli ทำให้เกิดการติดเชื้อโดยเกาะกับผนังเซลล์ของอวัยวะส่วนต่างๆ เช่น ไต กระเพาะ ปัสสาวะ และจะสร้างสารช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่ในบริเวณนั้นได้ และจะสร้างสารต่างๆ ออกมาเพื่อทำลายเซลล์ ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อขึ้น เชื้อ E. coli ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วงปัสสาวะ และจะสร้างสารช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่ในบริเวณนั้นได้ และจะสร้างสารต่างๆ ออกมาเพื่อทำลายเซลล์ ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อขึ้น เชื้ออีโคไลทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTI) เกิดจากเชื้อ E. coli ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ และอุจจาระ โดยเชื้อสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณทางเดินปัสสาวะขึ้นไปยังกระเพาะปัสสาวะหรือไตได้ จากนั้นจะมีการแบ่งตัวของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างรวดเร็วที่อวัยวะดังกล่าว ทำให้เกิดภาวะพบแบคทีเรียในปัสสาวะ (Bacteriuria) โดยสายพันธุ์ของเชื้ออีโคไลที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ จะสร้างสารแอกซ์แอดฮีซินส์ (X adhesins) ช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่บริเวณทางเดินปัสสาวะได้ และเชื้อจะสร้างสารฮีโมไลซิน (hemolysin) เพื่อทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ต่างๆ แตก โดยผู้ที่ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะมีอาการปวดแสบบริเวณถ่ายปัสสาวะ มีอาการปวดท้อง เสียดท้องขณะปัสสาวะ ปัสสาวะบ่อย และรู้สึก เหมือนปัสสาวะไม่สุด การรักษาการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะโดยการให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) อย่างน้อย 7 วัน ร่วมกับการพยายามปรับสภาพปัสสาวะให้ เป็นกรด โดยการดื่มน้ำผลไม้ที่มีกรดมากๆ หรือทานน้ำเปล่ามากๆ เพื่อช่วยในการกำจัดเชื้อที่ทอ้งร่วง มักเกิดกับทารก ผู้ที่เดินทางไปที่ต่างถิ่น หรือผู้ที่รับประทานอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของ เชื้อ E. coli หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเชื้อจะเกาะติดกับผนังลำไส้ จากนั้นจะสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ เชื้ออีโคไลบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษ (Toxin) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มีความรุนแรงมาก 2 ชนิด คือ ชิگا์ท็อกซิน (Shiga toxin) และเอ็นเทอร์โรท็อกซิน (Enterotoxin) โดยShiga toxin สามารถทำให้เกิดท้องร่วงอย่างรุนแรง

ในการเกิดโรคเชื้อจะเข้าสู่เซลล์และทำลายเซลล์ ทำให้เกิดโรคท้องร่วงที่มีเลือดออกและมีไข้ร่วมด้วย ส่วนสารพิษเอ็นเทอร์โรท็อกซิน ทำให้เกิดการท้องร่วง เป็นน้ำขาวขุ่นคล้ายยอหิวาห์ โดยการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำเข้าสู่ช่องท้อง ปกติแล้วการรักษาอาการท้องร่วงจากเชื้อ E. coli มักไม่นิยมใช้ยา แต่จะให้ผงน้ำตาลเกลือแร่เพื่อทดแทนการสูญเสียน้ำของร่างกาย อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงจากเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรง ควรพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) อย่างน้อย 3 วัน ร่วมกับการให้ผงน้ำตาลเกลือ แร่เพื่อทดแทนการสูญเสียน้ำของร่างกาย การป้องกันการติดเชื้อ E. coli ทำได้โดยอาศัยหลัก “ถูกสุขลักษณะ” ได้แก่ การดื่มน้ำที่สะอาด ล้าง มือให้สะอาด หลังเข้าห้องน้ำ ก่อนและหลังรับประทานอาหารทุกครั้ง กินอาหารที่ทำให้สุกแล้ว และควรกินอาหารทันที หากยังไม่รับประทานทันที ควรเก็บไว้ในตู้เย็น ควรล้างผักผลไม้ให้สะอาดก่อนรับประทาน เป็นต้น

2.1.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียชนิด E. coli จากแหล่งน้ำต่างๆ ในปัจจุบัน

2.1.4.1 วิธีการเพาะเชื้อ

การเพาะเชื้อแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการอาศัยการวัดการเจริญของแบคทีเรียมีหลายวิธี แต่โดยทั่วไปการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำหรืออาหาร มักรายงานผลเป็น colony forming unit (CFU) จากการนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่

2.1.4.1.1. Pour plate

เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ 10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มล. หรือ 0.1 มล. หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 C ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์กับให้เข้าอาหารโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมล. หรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้

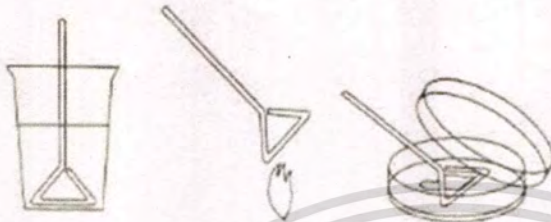


รูปที่ 2.3 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Pour plate

2.1.4.1.2. Spread plate

เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มล. หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนี

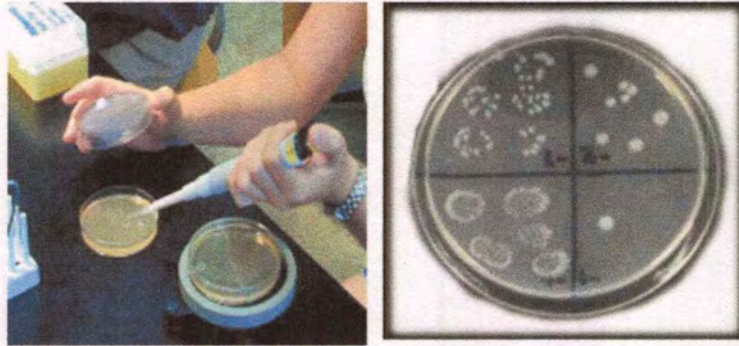
ของจุลินทรีย์ได้ง่าย ในบางครั้งวิธี spread plate อาจนับปริมาณเซลล์ได้มากกว่าวิธี pour plate เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้เจอกับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลว เหมือนวิธี pour plate ในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์ จุลินทรีย์อยู่น้อย การใช้วิธีนี้อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อย (0.1 มล.) ในการ plating



รูปที่ 2.4 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate

2.1.4.1.3. Drop plate

วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.02 มล. ตัวอย่าง จะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหารซึ่งโดยปกติจะมีความยาว เส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.5 ถึง 3 ซม. การนับและคำนวณจำนวนโคโลนี ขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อมล. และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้ว ให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือ มีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อมล.หรือต่อกรัมตัวอย่าง



รูปที่ 2.5 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Drop plate

2.1.4.1.4. Membrane filtration method

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่น้อยและจำเป็นต้องใช้ปริมาตรของตัวอย่างมากเพื่อความแม่นยำในการตรวจหาจุลินทรีย์แบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analyses) ตัวอย่าง 100 มล. หรือมากกว่าจะถูกกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมครอน (แบคทีเรียไม่สามารถผ่านได้) ดังนั้นจุลินทรีย์จะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง จากนั้นนำกระดาษกรองวางในจานอาหารที่มีกระดาษซึ่งชุ่มด้วยอาหารเหลว (liquid nutrient medium) อยู่แล้ว โคลิฟอร์มของจุลินทรีย์จะเจริญบนกระดาษกรอง วิธีนี้มักใช้กับการตรวจวิเคราะห์ coliform bacteria ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) การปนเปื้อนจากอุจจาระในอาหาร หรือน้ำ

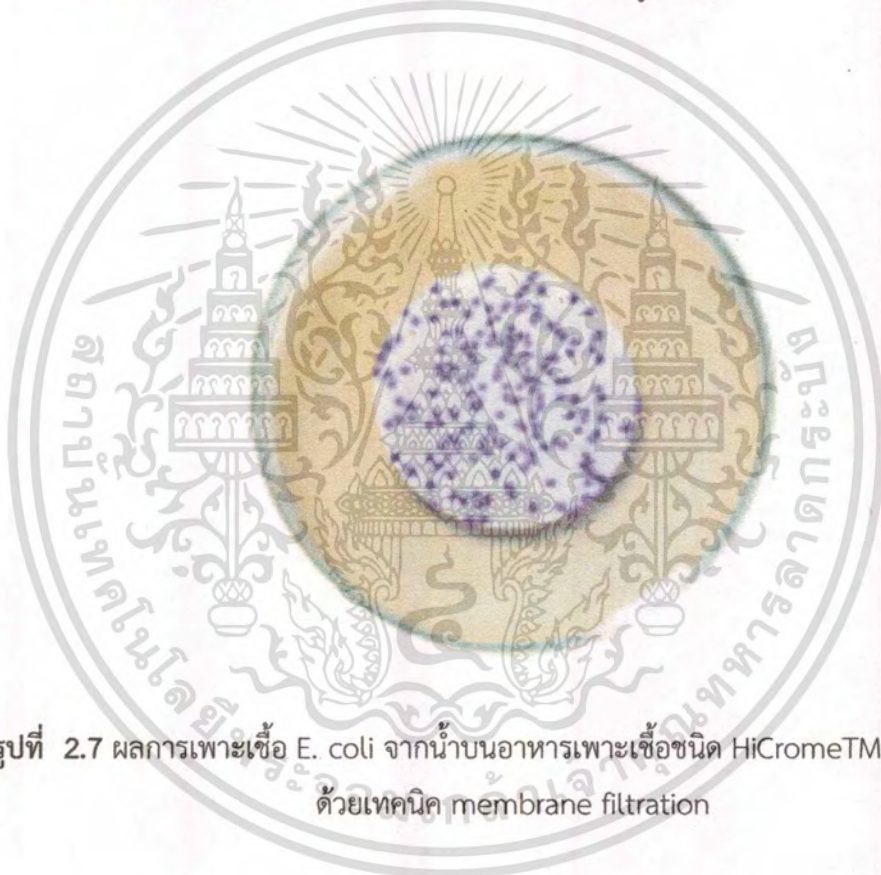


รูปที่ 2.6 การนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Membrane filtration method

ซึ่งการนับจำนวนด้วย plat count เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียทุกชนิดที่อยู่ในตัวอย่างทดสอบ หากต้องการพิสูจน์ชนิดเชื้อเพิ่มเติม จำเป็นอาศัยการทดสอบชีวเคมี

ของเชื้อเพิ่มเติม เช่น การทดสอบชีวเคมีของเชื้อ E. coli จะให้ผลการทดสอบชีวเคมี ดังตารางที่ 2

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ๆ ที่สามารถเลือก (Selective) ชนิดเชื้อให้สามารถเจริญเติบโตได้ หรือ เจริญเติบโตแล้วมีสี colony ที่จำเพาะ ทำให้สามารถรายงานชนิดเชื้อแบคทีเรียได้โดยไม่ต้องอาศัยการตรวจทางชีวเคมีอื่นๆเพิ่มเติม เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด HiCrome™ M-TEC Agar สำหรับการแยกชนิดเชื้อและนับจำนวนเชื้อ E. coli ในน้ำ โดยหากในตัวอย่างมีเชื้อ E. coli เชื้อจะสามารถเจริญเติบโต และเห็นเป็น colony สีม่วง [รูปที่ 8]



รูปที่ 2.7 ผลการเพาะเชื้อ E. coli จากน้ำบ่อน้ำอาหารเพาะเชื้อชนิด HiCrome™ M-TEC Agar ด้วยเทคนิค membrane filtration

การทดสอบ	ผล
Lactose fermentation	+
Indole production	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Motility test	+
Lysine decarboxylase test	+
TSI	A/A, G ⁻
H ₂ S	-
Urea hydrolysis	-
Acetate utilization	+
Cetrimide	-
ONPG test	+
Phenylalanine deaminase	-
Sucrose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
Glucose fermentation	+
Dextrose fermentation	+, G ⁻
NO ₃ reduction	+, G ⁻

G⁻ = เกิด gas, G⁺ = ไม่เกิด gas

A/A = acid butt / acid slant

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ E. coli (Forbes et al., 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.2. วิธี Most probable number of coliform organisms

(MPN) หรือ Multiple tubes fermentation technique โดยอาศัยความสามารถในการย่อยสารอาหารให้เกิดก๊าซในหลอดทดลอง จากจำนวนของหลอดที่ให้ผล positive ของแต่ละการเจือจาง 3 ระดับ แล้วนำไปอ่านค่าในตารางดัชนี MPN (MPN index) ซึ่งจะบอกจำนวนของโคลิฟอร์มที่มีอยู่ในน้ำ 100 ml. โดยค่าในตารางดัชนี MPN นี้เป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งจะเป็นการประมาณทางสถิติถึงปริมาณของโคลิฟอร์มที่น่าจะตรวจพบได้ในน้ำ (Most Probable Number per 100 ml. of sample) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างน้ำที่ขุ่น หรือน้ำเสียต่างๆ

วิธีการทดสอบแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

2.1.4.2.1 การตรวจสอบขั้นประมาณการณ์ (Presumptive test)

การตรวจสอบขั้นนี้ ทำโดย

1. นำน้ำที่ต้องการตรวจสอบ ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร
2. นำน้ำที่ต้องการตรวจสอบ ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร
3. นำน้ำที่ต้องการตรวจสอบ ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 0.10 มิลลิลิตร
4. นำหลอดอาหารทั้งหมด ไปบ่มเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดมาตรวจผล สังเกตก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ ให้รายงานผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดรายงานผลเป็นลบ
5. นำหลอดที่ให้ผลบวก ไปทำการตรวจยืนยันต่อไป

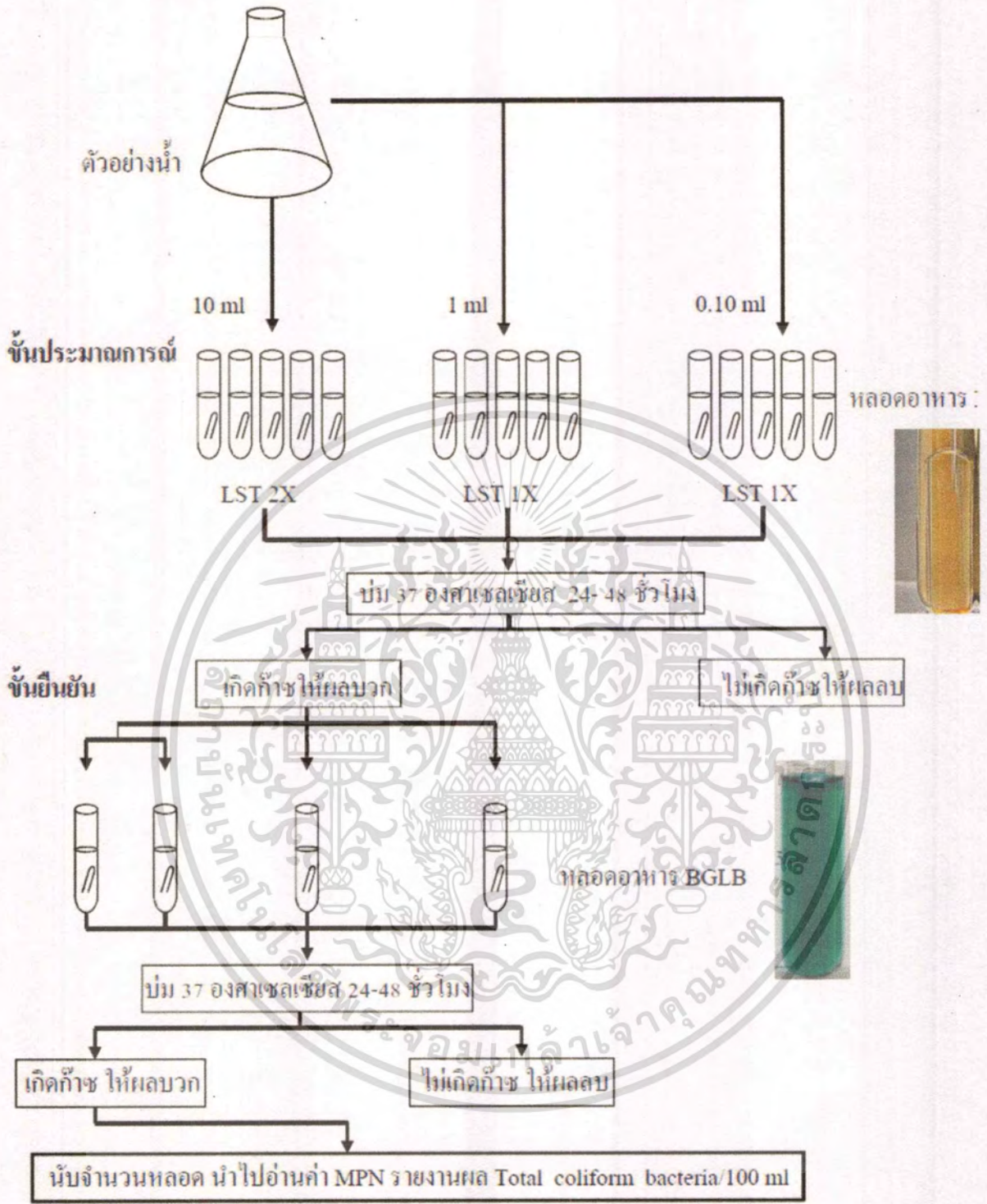
ในการหาว่าคุณภาพของน้ำมีมากน้อยเพียงใด อาจดูได้จากปริมาณของ Coliform ที่มีอยู่ในน้ำนั้นโดยเอาผลจากการตรวจสอบขั้นประมาณการณ์ไปเทียบกับตารางเทียบปริมาณโคลิฟอร์มที่น่าจะเป็นจริง (Most probable number table) ก็จะทราบจำนวนแบคทีเรีย น้ำสะอาดจะต้องมีจำนวน Coliform ไม่เกิน 2.2 (MPN/100 ml.)

2.1.4.2.2 การตรวจสอบยืนยัน (Confirmed test) ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

- ใช้ห้วงถ่ายเชื้อ ลนไฟฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร LST ที่เกิดก๊าซในชั้นประมาณการณณ์ แต่ละหลอดลงในอาหาร Brilliant green lactose bile broth (BGLB) 2 % หลอดต่อหลอดจำนวน 2-3 Loop
- บ่มหลอดอาหาร BGLB ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำหลอดทั้งหมดมาตรวจผล สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้าเกิดก๊าซมากกว่า 1 ใน 10 ของหลอดดักก๊าซ แสดงว่าผลในชั้นยืนยันเป็นบวก ยืนยันว่าเป็น Coliform bacteria
- นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของแต่ละความเจือจาง นำผลที่ได้ไปเทียบตาราง MPN เพื่ออ่านค่า MPN ค่าที่ได้ คือ ปริมาณของ Coliform bacteria / มิลลิลิตร

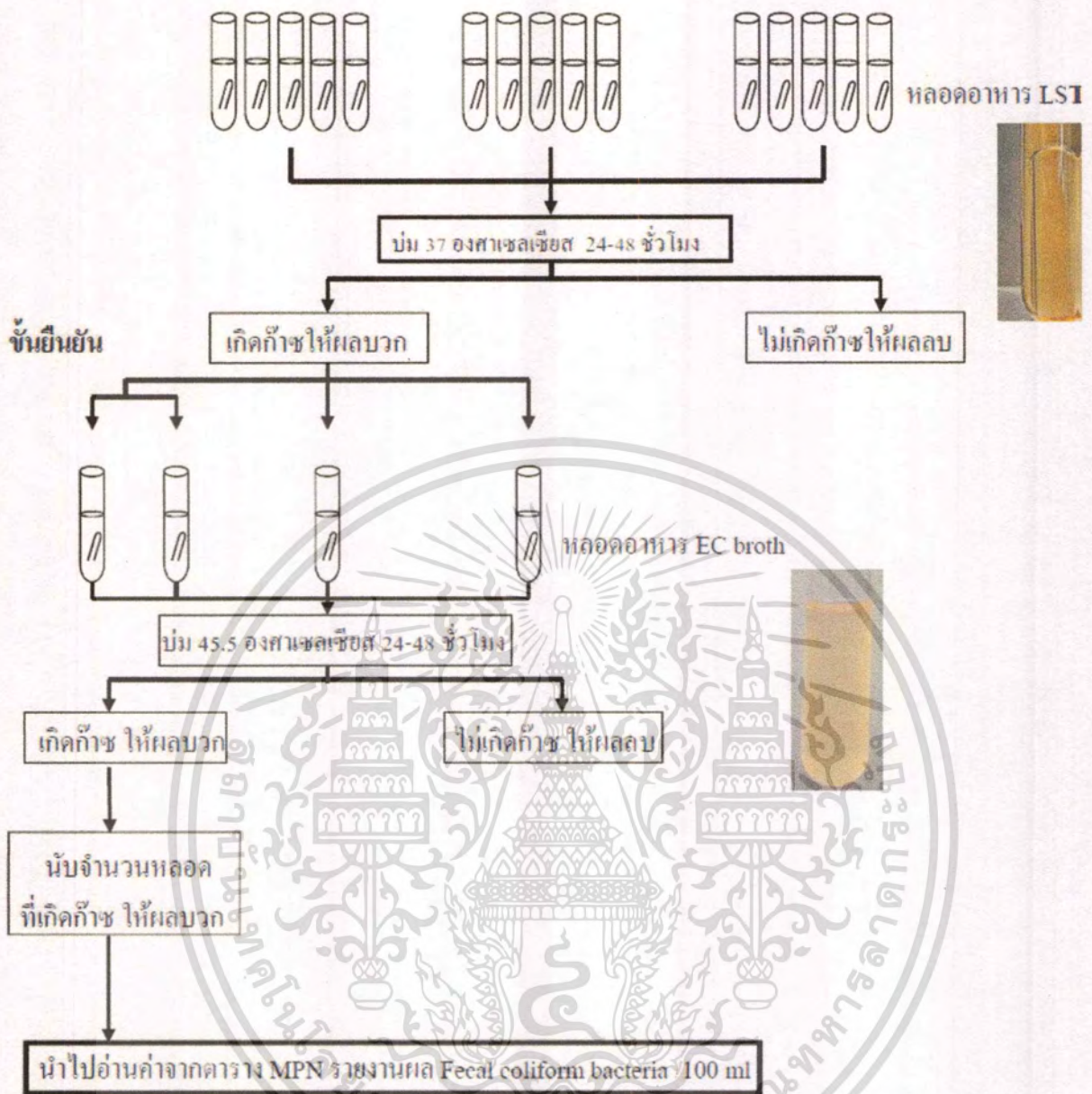
ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

- ใช้ห้วงถ่ายเชื้อ ลนไฟฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร LST ที่เกิดก๊าซ ในชั้นประมาณการณณ์ แต่ละหลอดลงในอาหาร EC broth หลอดต่อหลอด จำนวน 2-3 Loop
- นำไปบ่ม ในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เมื่อครบชั่วโมง นำหลอดทั้งหมดมาตรวจผลโดยสังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ
- ถ้าเกิดก๊าซมากกว่าใน ของหลอดดักก๊าซ แสดงว่าผลในชั้นยืนยันเป็นบวก
- นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของแต่ละความเจือจาง นำไปเทียบตาราง MPN เพื่ออ่านค่า MPN ค่าที่ได้ คือ ปริมาณของ Fecal coliform bacteria / 100 ml



รูปที่ 2.8 สรุปการวิเคราะห์ปริมาณ Coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำ โดยวิธี MPN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 สรุปการวิเคราะห์ปริมาณ Fecal coliform bacteria ในตัวอย่างน้ำ โดยวิธี MPN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

No. of tubes giving positive reaction out of			MPN index per 100 ml	95% confidence limits		No. of tubes giving positive reaction out of			MPN index per 100 ml	95% confidence limits	
5 of 10 ml each	5 of 1 ml each	5 of 0.1 ml each		Lower	Upper	5 of 10 ml each	5 of 1 ml each	5 of 0.1 ml each		Lower	Upper
0	0	0	<2			4	2	1	26	9	78
0	0	1	2	<0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	1	0	2	<0.5	7	4	3	1	33	77	93
0	2	0	4	<0.5	11	4	4	0	34	12	93
1	0	0	2	<0.5	7	5	0	0	23	7	70
1	0	1	4	<0.5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	0	4	<0.5	11	5	0	2	43	15	110
1	1	1	6	<0.5	15	5	1	0	33	11	93
1	2	0	6	<0.5	15	5	1	1	46	16	120
2	0	0	5	<0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	0	7	1	17	5	2	1	70	23	170
2	1	1	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	2	0	9	2	21	5	3	0	79	25	190
2	3	0	12	3	28	5	3	1	110	31	250
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	340
3	0	1	11	2	25	5	3	3	180	44	500
3	1	0	11	2	25	5	4	0	130	35	300
3	1	1	14	4	34	5	4	1	170	43	490
3	2	0	14	4	34	5	4	2	220	57	700
3	2	1	17	5	46	5	4	3	280	90	850
3	3	0	17	5	46	5	4	4	350	120	1,000
4	0	0	13	3	31	5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46	5	5	1	350	120	1,000
4	1	0	17	5	46	5	5	2	540	180	1,400
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3,200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1600	640	5,800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	=>2400		

ตารางที่ 3 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 5 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 ml. 5 หลอด	1 ml. 1 หลอด	0.1 ml. 1 หลอด	MPN /100 ml.
0	0	0	0
0	1	0	2
1	0	0	2.2
1	1	0	4.4
2	0	0	5
2	1	0	7.6
3	0	0	8.8
3	1	0	12
4	0	1	15
4	0	0	20
4	1	0	21
5	0	0	38
5	0	1	96
5	1	0	240
5	1	1	240+

ตารางที่ 4 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 7 หลอด

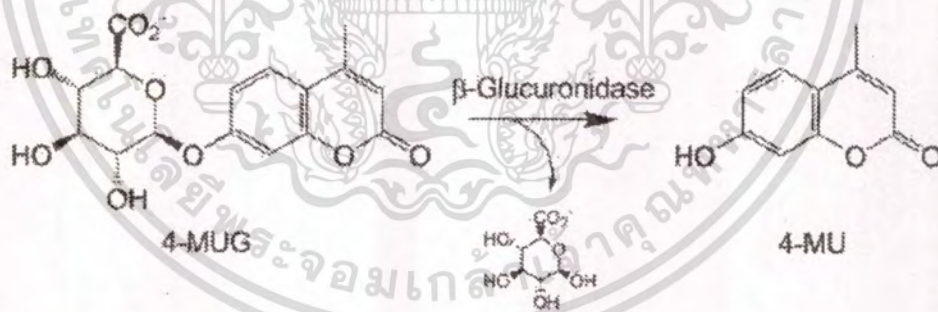
Pos. tubes	MPN/100ml	Conf. Lim.	
		Low	High
0	<1.1	0.3	3.3
1	1.1	0.5	5.9
2	2.2	3.7	8.1
3	3.6	9.7	9.7
4	5.1	1.0	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

ตารางที่ 5 MPN ต่อ 100 ml เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 ml ปริมาตรละ 10 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 การตรวจหาเชื้อ E. coli ด้วยการตรวจจับการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β -glucuronidases; GUD)

เชื้อ E. coli มีโครโมโซมที่มียีน uid ที่สร้างเอนไซม์ β -glucuronidase เป็นเอนไซม์ในตระกูล hydrolase ที่มีสภาพเป็นกรด เร่งการสลายตัวของ glucuronides เป็นเอนไซม์ที่คงทน มีความไว ละลายน้ำได้ และง่ายต่อการตรวจสอบด้วย substrate ที่จำหน่ายเป็นการค้า Kilian และ Bulow ได้มีการศึกษาและอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่าง เอนไซม์ β -glucuronidases; GUD และแบคทีเรียในกลุ่ม Escherichia-Shigella group เป็นครั้งแรก โดยพบว่าเอนไซม์ GUD สามารถพบได้เฉพาะกลุ่ม E. coli, Shigella และ Salmonella ในกลุ่ม Enterobacteriaceae และจากการศึกษาดังกล่าว ทำให้เริ่มมีการนำ เอนไซม์ GUD มาใช้เป็นตัวชี้วัด E. coli ในตัวอย่างตามแหล่งต่างๆ เช่นตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างจากอาหาร, ตัวอย่างน้ำทะเล และตัวอย่างทางคลินิก โดยพบว่าความไว (sensitivities) ของเอนไซม์ GUD ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันตามวิธีการตรวจวัด โดยพบความไวตั้งแต่ 87 - 97% ต่อจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อ E. coli และถ้าในขั้นตอนการตรวจวัดเพิ่มกระบวนการกระตุ้นเอนไซม์ (inducible procedures) จะพบว่ามีค่าความไวตั้งแต่ 91 - 100% การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ GUD นั้น อาศัยปฏิกิริยาโดยใช้สาร ชนิด 4-methylumbelliferyl-p-glucuronide (4-MUG) มาใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ให้เอนไซม์ GUD ย่อย และเกิดผลิตภัณฑ์ชนิด 4-ethylumbelliferone (4MU) ซึ่งมีลักษณะเรืองแสง



รูปที่ 2.10 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ β -glucuronidases; GUD และ 4-methylumbelliferyl-p-glucuronide (4-MUG)

สารเรืองแสง 4-methylumbelliferone (4MU) เป็นสารที่สามารถเรืองแสงได้สูงสุดในสารละลายที่มีความเป็นด่างสูง เนื่องจากกลุ่ม hydroxyl จะมีการแตกตัวเป็นอออน จึงมีการเติมสารละลาย sodium carbonate เพื่อหยุดปฏิกิริยาพร้อมกับปรับ pH และวัดระดับความเข้มของแสง โดยค่าความเข้มของ MUG substrate ที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้เร็วเป็นครึ่งหนึ่งของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วสูงสุด (Km) คือ 0.6 - 0.7 mM ซึ่งสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของ 4-MU ได้ต่ำสุดที่ 2 pmol



รูปที่ 2.11 ตัวอย่างการเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone (4MU)

2.1.5 ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจหาโคลิฟอร์มในปัจจุบัน

ปัจจุบันมีชุดทดสอบหาโคลิฟอร์มและ E. coli ต่างๆ มากมาย เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการใช้งาน และสามารถทำได้เอง เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำและอาหารขั้นต้น

2.1.5.1 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย อ 11 ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคโดยชุมชน

ชุดการตรวจเชื้อแบคทีเรีย อ 11 เป็นชุดทดสอบที่คิดค้นโดยกรมอนามัยและสามารถดำเนินการตรวจสอบโดยประชาชนทั่วไปเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำบริโภคด้วยวิธีการที่เหมาะสมก่อนนำมาบริโภค โดยใช้หลักการเพาะเชื้อลงในอาหารตรวจเชื้อแบคทีเรีย อ 11 โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารตรวจเชื้อ อ 11 จากสีแดงเป็นสีต่าง ๆ เช่น สีน้ำตาล สีส้ม สีเหลือง และมีความขุ่นและฟองแก๊สผุดขึ้นเมื่อเขย่าเบา ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 การอ่านและแปลผลโดยใช้แผ่นเทียบสี อ 11

การแปลผล

ขวดที่ 1 อาหารเหลวตรวจเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียภาคสนาม (อ 11) สีแดงใสปราศจากเชื้อ

ขวดที่ 2 อาหารเหลว (อ 11) หลัง เติมน้ำตัวอย่าง (ถึงขีดที่ 4 ของขวด)

ขวดที่ 3 อาหารเหลว (อ 11) หลังเติมน้ำตัวอย่าง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ให้ผลลบ (-) อาหารยังคงเป็นสีแดงใสไม่เปลี่ยนแปลง สามารถใช้บริโภครได้

ขวดที่ 4 อาหารเหลว (อ 11) หลังเติมน้ำตัวอย่าง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ให้ผลบวก (+) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมส้ม มีความขุ่นและแก๊สปุดขึ้น เมื่อเขย่าเบา ๆ ไม่ควรใช้บริโภค

ขวดที่ 5 อาหารเหลว (อ 11) หลังเติมน้ำตัวอย่าง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ให้ผลบวก (++) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้ม หรือสีเหลืองอมส้ม มีความขุ่นและแก๊สปุดขึ้น

ขวดที่ 6 อาหารเหลว (อ 11) หลังเติมน้ำตัวอย่าง แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ผลบวก(+++)อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง มีความขุ่นและแก๊สปุดขึ้นเมื่อเขย่าเบาๆ

โดยการตรวจสอบคุณภาพน้ำบริโภคทางแบคทีเรีย ด้วยอาหารตรวจเชื้อ อ 11 พบว่ามีความน่าเชื่อถือ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple-Tube Fermentation Technique ไม่น้อยกว่า 84.5%

2.1.5.2 ชุดทดสอบโคลิฟอร์มในน้ำและน้ำแข็ง

ชุดทดสอบโคลิฟอร์มในน้ำและน้ำแข็ง เป็นชุดทดสอบจากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อใช้ในการตรวจสอบน้ำและน้ำแข็งมีการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานหรือไม่ เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ใช้เวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง จำนวนเชื้อโคลิฟอร์มต่ำสุดที่ตรวจได้ 1 โคโลนี หรือ 1 ตัว ต่อน้ำ 1 ซีซี โดยอาศัยหลักการการเพาะเชื้อ โดยใช้กระดาษทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 ซีซี (1 mL) โดยป้อนน้ำลงบนกระดาษทดสอบ จากนั้นนำไปเพาะเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

การประเมินผล หากพบจุดแดงบนกระดาษทดสอบ แสดงว่าน้ำหรือน้ำแข็งมีการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มเกินมาตรฐาน (จำนวนจุดแดงบนกระดาษจะเท่ากับจำนวนโคลิฟอร์มในน้ำหรือน้ำแข็ง 1 ซีซี)



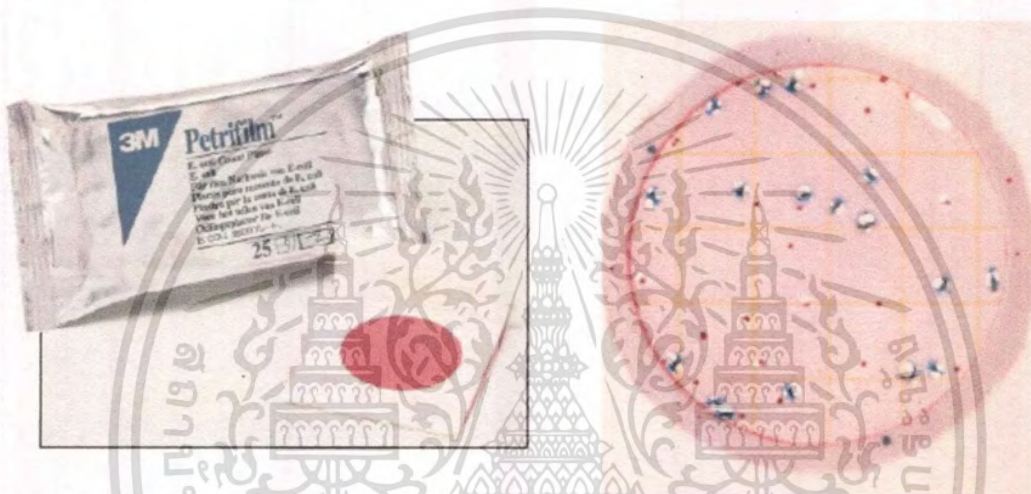
รูปที่ 2.13 แสดงวิธีการทดสอบโคลิฟอร์มจากคู่มือชุดทดสอบโคลิฟอร์มในน้ำและน้ำแข็ง

2.1.5.3 ชุดทดสอบ 3M Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate

ชุดทดสอบ 3M Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ E. coli และ Coliform อื่นๆ โดยให้ผลยืนยันภายในเพียง 24-48 ชั่วโมง มีขั้นตอนการทดสอบ 3 ขั้นตอนคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1) การหยดตัวอย่าง (Inoculate) - เปิดแผ่นฟิล์มด้านบนขึ้นเพื่อหยดตัวอย่าง
- 2) การบ่มตัวอย่าง (Incubate) - เนื่องจากแผ่นมีขนาดเล็ก ทำให้ประหยัดพื้นที่ในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) สามารถใช้ตู้บ่มขนาดเล็กได้
- 3) การนับจำนวน (Enumerate) - นับโคโลนีสีแดงและน้ำเงินที่มีฟองแก๊สเป็น Coliform และนับโคโลนีสีน้ำเงินที่มีฟองแก๊สเป็น E. coli ซึ่งในขณะเดียวกันก็สามารถนำไปอ่านได้ด้วยเครื่องอ่าน 3M Petrifilm™ Plate Reader ซึ่งสามารถอ่านได้ภายใน 4 วินาทีต่อแผ่น



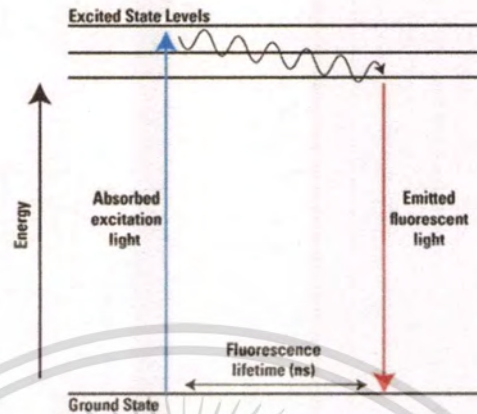
รูปที่ 2.14 ชุดทดสอบและตัวอย่างผลการทดสอบ 3M Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate

2.1.6 เทคโนโลยีสารเรืองแสงทางการแพทย์

2.1.6.1 หลักการของสารเรืองแสง (Fluorescence)

โมเลกุลฟลูออเรสเซนต์มีลักษณะการตอบสนองต่างจากโมเลกุลประเภทอื่นๆ ดังที่แสดงในรูปที่ 16 โฟตอนของแสงกระตุ้นจะถูกดูดซับโดย อิเล็กตรอนของอนุภาคฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งจะเพิ่มระดับพลังงานของ อิเล็กตรอนไปยังระดับถูกกระตุ้น โดยในขณะที่ถูกกระตุ้น พลังงานจะสูญเสียไปในการชนกันของโมเลกุลหรือมีการถ่ายโอนพลังงานไปยังโมเลกุลข้างเคียง หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะปล่อยพลังงานที่ถูกกระตุ้นและกลับมาอยู่ในระดับพลังงานปกติ เนื่องจากพลังงานที่ลดลงของการปล่อยพลังงานของอิเล็กตรอนทำให้ได้โฟตอนที่มีความยาวคลื่นที่สูงขึ้น ซึ่งทำให้สามารถแยกแยะระหว่างคลื่นแสงที่ใช้กระตุ้นกับคลื่นแสงที่ปล่อยออกมาได้ ลักษณะของการ

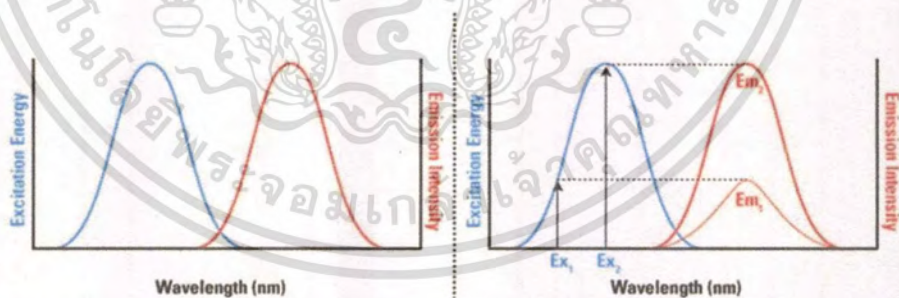
ปล่อยโฟตอนจากโมเลกุลของสารเรืองแสงจะมีลักษณะเป็นคาบ จนกว่าโมเลกุลสารเรืองแสงจะไม่สามารถถูกกระตุ้นได้อีก (Photobleaching)



รูปที่ 2.15 ภาพแสดงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้นและช่วงการเรืองแสง

2.1.6.2 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม (Fluorescence Spectra)

แสงที่ใช้กระตุ้นและแสงที่ปล่อยออกมาของโมเลกุลของสารเรืองแสงจะมีความยาวคลื่นที่เฉพาะตัว โดยจะสามารถแสดงเป็นกราฟระหว่างความยาวคลื่นกับความเข้มของสัญญาณที่ใช้กระตุ้นและสัญญาณที่ปล่อยออกมา ดังที่แสดงในรูปที่ 17 จากรูปจะเห็นได้ว่าคลื่นที่ถูกปล่อยออกมาจะมีความยาวคลื่นที่สูงกว่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นเนื่องจากการสูญเสียพลังงานขณะมีการกระตุ้นจากเหตุผลที่กล่าวในส่วนหลักการของสารเรืองแสง



รูปที่ 2.16 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นกับความเข้มของพลังงานของสัญญาณกระตุ้นและสัญญาณที่ปล่อยออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6.3 Fluorophore

ฟลูออโรฟออร์ (Fluorophore) คือ ส่วนที่แสดงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

2.1.7 เทคโนโลยีการตรวจจับสัญญาณ

2.1.7.1 เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorometer)

เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์มีองค์ประกอบและคุณสมบัติดังนี้

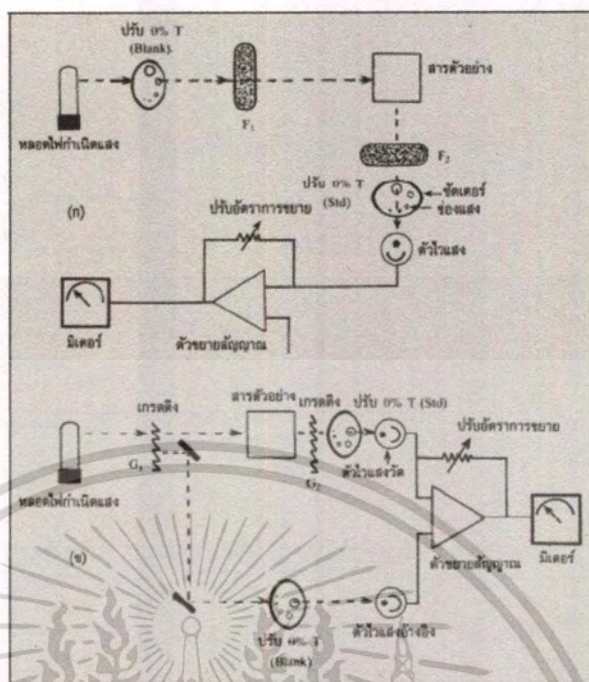
2.1.7.1.1 หลอดไฟกำเนิดแสง (light source)

ใช้หลอดเมอคิวรีความดันสูง (high pressure mercury lamp) ซึ่งสามารถปล่อยแสงที่มีความเข้มมากที่ความยาวคลื่น 253.6, 280.4, 334.1, 435.8, 546, 577 และ 1,014 นาโนเมตร หรือใช้หลอดเมอคิวรีความดันต่ำ (low pressure mercury lamp) ซึ่งสามารถปล่อยแสงที่เข้มมากที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรแต่นิยมใช้หลอดซีนอน (xenon lamp) มากที่สุดเพราะสามารถปล่อยคลื่นแสงออกมาในช่วงกว้างพอเพียงสำหรับการวิเคราะห์สารต่างๆ ในช่วง 190-1,200 นาโนเมตรแต่อย่างไรก็ตามในระยะหลังได้นิยมใช้หลอดเลเซอร์มากขึ้นเนื่องจากลำแสงเลเซอร์มีความยาวคลื่นจำเพาะมีขนาดเล็กทำให้สามารถประยุกต์ใช้งานเฉพาะอย่างตัวอย่างเช่น ใช้อาร์กอนเลเซอร์ในเครื่องโฟลวไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) ใช้ฮีเลียม-นีออนเลเซอร์สำหรับเครื่องวัดขนาดของอนุภาคเป็นต้นและยังมีการนำเอาไดโอดเปล่งแสง (light emitting diode) มาเป็นแหล่งกำเนิดแสงเนื่องจากมีขนาดเล็กสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในเครื่องมือขนาดเล็กได้ดี

2.1.7.2 ตัวแยกแสงตกกระทบ (excitation filter)

มีทั้งชนิดที่เป็นตัวกรองแสง (light filter) และเกรตติงมีหน้าที่กรองแสงหรือแยกความยาวคลื่นแสงที่ไม่ต้องการให้ตกกระทบสารตัวอย่างออกในกรณีที่เป็นเกรตติงมักจะไม่ค่อยมีปัญหาในการใช้งานเพราะสามารถจำแนกแสงตกกระทบได้ดีและให้แถบแสงที่แคบแต่ในกรณีที่ใช้ตัวกรองแสงจำเป็นต้องเลือกใช้งานให้ถูกต้องเหมาะสมเพราะให้แถบแสง (band width) ที่ผ่านออกมามากกว้างประมาณ 15 นาโนเมตรการเลือกใช้งานจึงไม่ควรให้ความกว้างของแถบแสงไปซ้อนทับตัวกรองแสงปล่อยออก (emission filter, F2) (รูปที่ 18) เพราะแสงตกกระทบที่ผ่านออกมาจากตัวกรองแสงตกกระทบ (F1) อาจจะผ่านตัวกรองแสงปล่อยออก (F2) ไปสู่ตัวไวแสงด้วย ทำให้วัดความเข้มของแสงได้สูงกว่าค่าจริงและเพื่อให้การวัดมีความไวมากที่สุดตัวแยกแสงตกกระทบ (F1, G1) ควรให้ลำแสงตกกระทบที่มีความเข้มสูงและควรมีความยาวคลื่นแสงใกล้เคียงกับความยาวคลื่นแสงที่เข้มมากของหลอดไฟกำเนิดแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 ทางเดินของแสงในเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ชนิดลำแสงเดี่ยว(ก) และชนิดลำแสงแยก(ข)

2.1.7.2.1 คิวเวทท์ (cuvette)

คิวเวทท์ที่ใช้มีทั้งชนิดทรงกระบอกและชนิดสี่เหลี่ยมคิวเวทท์ชนิดสี่เหลี่ยมมีความเหมาะสมในการใช้งานมากกว่าเนื่องจากลดการกระเจิงของแสงตกกระทบ (light scattering) ได้มากกว่าคิวเวทท์ชนิดกลมคิวเวทท์ที่ทำจากควอทซ์สามารถใช้งานได้ในช่วงความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 190 นาโนเมตรขึ้นไปจนถึง 2,700 นาโนเมตรคิวเวทท์ที่ทำจากแก้วชนิดบอโรซิลิเคท (borosilicate glass) สามารถใช้งานได้เมื่อแสงตกกระทบมีความยาวคลื่นมากกว่า 320 นาโนเมตรขึ้นไปจนถึง 2,500 นาโนเมตรคิวเวทท์พลาสติกสามารถใช้งานได้ในช่วงคลื่นแต่ต้องระวังการมีสารขาวแสงที่เจือปนอยู่ซึ่งอาจทำให้เกิดการรบกวนในช่วงคลื่นของการวัดแสง

2.1.7.2.2 ตัวแยกแสงปล่อยออก (emission filter)

มีทั้งชนิดที่เป็นตัวกรองแสง (light filter) และเกรตติงมีหน้าที่ตัดแสงรบกวนต่างๆ เช่น Rayleigh scattering และ Raman scattering ออกแต่ปล่อยให้เฉพาะความยาวคลื่นที่ต้องการวัดผ่านไปสู่อุปกรณ์วัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.7.2.3 ตัวกรองแสง (optical filter)

ในเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์บางแบบใช้ตัวกรองแสงเพื่อทำหน้าที่กรองคลื่นแสงที่ปล่อยออกมาจากตัวแยกแสงปล่อยออกเพื่อเลือกช่วงความยาวคลื่นบางช่วงให้ตกกระทบตัวไวแสงทั้งนี้เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการวัดให้มากขึ้น

2.1.7.2.4 ตัวไวแสง (light detector)

นิยมใช้โฟโตมัลติพลายเออทิวบ์เพราะมีช่วงการวัดกว้างตั้งแต่ 300-1,000 นาโนเมตร และสามารถขยายจำนวนโฟตอนได้เป็นจำนวนมากทำให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมา (emission light) ซึ่งส่วนมากมีความเข้มน้อยมากถูกขยายจำนวนโฟตอนให้มากขึ้นจนวงจรอิเล็กทรอนิกส์สามารถวัดได้อย่างถูกต้องแต่อย่างไรก็ตามในเครื่องมือขนาดเล็กที่ใช้ในภาคสนามนิยมใช้โฟโตไดโอดที่ทำจากสารกึ่งตัวนำเป็นตัวไวแสงเนื่องจากมีขนาดเล็กใช้กระแสไฟฟ้าน้อยแต่มีข้อจำกัดในการใช้งานบ้างเพราะสามารถวัดความเข้มของแสงได้ดีเมื่อมีความเข้มของแสงน้อยถึงระดับปานกลาง

2.1.7.2.5 ภาคแสดงผล

สามารถวัดความเข้มของแสงออกมาในหน่วย % T (transmittance) หรือวัดออกมาในหน่วยความเข้มขึ้นในเครื่องมือที่มีระบบคำนวณผลอัตโนมัติ

2.1.7.2.6 แผงควบคุมอาจประกอบด้วยปุ่มควบคุมดังนี้

1. สวิตช์ปิดเปิดไฟฟ้า (ON/OFF switch) ใช้เพื่ออุ่นเครื่องและหลอดไฟกำเนิดแสงก่อนใช้งาน
2. ปุ่มจ่ายกระแสไฟฟ้าให้หลอดไฟกำเนิดแสง (lamp start knob) ควรเปิดหลังจากเปิดสวิตช์ไฟฟ้า
3. ปุ่มปรับศูนย์ (zero knob, blank adjust knob) ใช้ปรับ 0% T เมื่อใส่รีเอเจนต์อ้างอิง (reagent blank) ลงในช่องใส่สารตัวอย่างโดยการปรับความกว้างของช่องแสง (aperture) ที่อยู่บนชัตเตอร์ (shutter) เพื่อปรับปริมาณแสงที่ตกกระทบสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปุ่มเลือกความยาวคลื่นแสงตกกระทบ(Ex. knob) ใช้เลือกความยาวคลื่นแสงตกกระทบโดยการเลือกตัวกรองแสงหรือการควบคุมการเคลื่อนที่ของเกรตติง
5. ปุ่มเลือกความยาวคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Em. knob) ทำงานเช่นเดียวกับปุ่มควบคุม
6. ปุ่ม Std ใช้สำหรับปรับความกว้างของช่องแสงบนชุดเตอร์ที่อยู่หลังสารตัวอย่างเพื่อกำหนดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตกกระทบตัวไอแสง
7. ปุ่มเลือกช่วงการวัด (range selector knob) ใช้สำหรับเพิ่มความไวในการวัดโดยการเปลี่ยนอัตราขยายสัญญาณไฟฟ้าจากตัวไอแสง

2.1.7.2 โฟโตไดโอด (Photodiode)

โฟโตไดโอด คือ สิ่งประดิษฐ์รับแสงที่ทำ จากสารกึ่งตัวนำ จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เมื่อแสงตกกระทบอิเล็กตรอนที่ ยึดติดอยู่กับอะตอมในขั้วผลึกจะแตกหลุด เกิดเป็นอิเล็กตรอนอิสระ และโฮลอิสระขึ้น อิเล็กตรอน และโฮลเหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้าไปในเขตปลอดพาหะ เกิดเป็นกระแสไฟฟ้าย้อนด้วยปริมาณที่แปรเปลี่ยน ตามความเข้มแสง เรียกว่า กระแสโฟโต ในการนำโฟโตไดโอดไปใช้งานต้องต่อในลักษณะไบแอสกลับ คือ ต่อแอโนดเข้ากับขั้วไฟลบ, แคโทดเข้ากับขั้วไฟบวก จนเมื่อมีแสงมาตกกระทบจึงจะสามารถนำกระแสได้



รูปที่ 2.18 ลักษณะของโฟโตไดโอดและสัญลักษณ์ที่ใช้ในวงจร

โฟโตไดโอดเป็นอุปกรณ์ที่มีกำลังไฟฟ้าต่ำ อิมพีแดนซ์สูง และเมื่อนำมาใช้จำเป็นต้องมีการออกแบบวงจรที่ซับซ้อนกว่าแอลดีอาร์ แต่ว่าการตอบสนองในการทำงานของโฟโตไดโอดเป็นเชิงเส้นและมีความไวในการทำงานสูงกว่า แอลดีอาร์มาก เพราะใช้เวลาในการตอบสนองการ

ทำงานเพียง 200 นาโนวินาทีเท่านั้น โฟโตไดโอดมักถูกนำไปใช้ในตัวอ่านแท็บความเร็วสูง และในออปโตไอโซเลเตอร์

2.1.8. เกณฑ์และมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่ม

2.1.8.1 ดัชนีคุณภาพน้ำทางชีววิทยา

คุณลักษณะทางชีววิทยา (Biological Characteristics) เป็นคุณลักษณะที่แสดงถึงคุณภาพน้ำที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่เจือปนในน้ำ โดย จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดโรคในคน เช่น แบคทีเรียชนิดดิบริโอ ซัลโมเนลลา ชิกเจลลลา และจุลินทรีย์บางชนิดทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนไป เช่น ซัลเฟอร์แบคทีเรีย จะสร้างสารประกอบซัลเฟอร์ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนจะได้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นเหตุทำให้น้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนไข่เน่าซึ่งเป็นกลิ่นเฉพาะตัวของก๊าซนี้ และถ้าซัลไฟด์นี้ออกมาจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์รวมตัวกับโลหะบางชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ เช่น เหล็ก เป็นต้น จะทำให้เกิดเป็นสารประกอบของโลหะซัลไฟด์ซึ่งมีสีดำ ตัวอย่างการตรวจคุณลักษณะทางชีววิทยา เช่น การตรวจหาชนิดและปริมาณของสาหร่าย การตรวจหาเชื้อราต่างๆ การตรวจหาไวรัส การตรวจหาแบคทีเรียชนิดต่างๆ การตรวจหาโคไลฟอร์ม (Total Coliform) และการตรวจหาจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic Organisms) เป็นต้น (อาจารย์ดี, chemistry and environmental, 2011)

2.1.8.2 เกณฑ์คุณภาพน้ำดื่ม

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ข้อ 3 (น้ำดื่มที่ไม่ได้บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น น้ำผ่านเครื่องกรอง) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

โคไลฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total Coliform bacteria) /100ml	ไม่พบ
อีโคไล (Escherichia coli) /100ml	ไม่พบ
สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) /100ml	ไม่พบ
แซลโมเนลลา (Salmonella spp.) /100ml	ไม่พบ
คลอสทริเดียมเพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens) /100ml	ไม่พบ

มาตรฐานทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำบริโภค ข้อ 5 (สุขลักษณะ) สำนักงานมาตรฐานทางผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 257-2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MPN Coliform bacteria /100ml	น้อยกว่า 1.1
อีโคไล (Escherichia coli) /100ml	ไม่พบ
สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) /100ml	ไม่พบ
แซลโมเนลลา (Salmonella spp.) /100ml	ไม่พบ
คลอสทริเดียมเพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens) /100ml	ไม่พบ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1. การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้ คือ มีรูปร่างท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์เจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มี ออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในที่มีออกซิเจนจะใช้พลังงานจากน้ำตาลแลคโตส แล้วผลิตกรดและแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงที่ 35 องศาเซลเซียส สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามแหล่งที่มา คือ

2.2.1.1. ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์เลื้อยคืบ ถูกขับถ่ายออกมาที่อุจจาระ ได้แก่ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร ใช้เป็นตัวชี้แนะ (bacteriological indicator) ถึงความสะอาดของน้ำ

2.2.1.2. นอนฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal coliforms) กลุ่มนี้อาศัยอยู่ในดิน และพืช มีอันตรายน้อยกว่ากลุ่มแรก ใช้เป็นแบคทีเรียชี้แนะถึงความไม่สะอาดของน้ำได้เช่นกัน เช่น *Enterobacter aerogenes*

ดังนั้นถ้าตรวจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำ แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระ ซึ่งเป็นที่มาของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคอีกหลายชนิดตามมาตรฐานของน้ำซึ่งกำหนดโดย American Public Health Association ระบุว่าในน้ำที่มีคุณภาพดีโดยเฉพาะน้ำดื่มต้องมีค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์มน้อยกว่า 2 MPN ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรหรือน้อยกว่า 1 colony-forming unit ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร การตรวจแบคทีเรียโคลิฟอร์มสามารถตรวจโดยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน หรือ standard plate count (SPC) หรือวิธีเยื่อกรอง (Membrane-filter (MF) technique) เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางชีววิทยา วิธีนี้เหมาะสมสำหรับการตรวจหาและตรวจนับทั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliform bacteria) และฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) ได้โดยตรง แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีเยื่อกรองไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้กับตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นมากได้ส่วนอีกหนึ่งคือวิธีหลายหลอด (Multiple tubes fermentation technique) หรือวิธี Most probable number (MPN) วิธีนี้เหมาะกับกรณีตัวอย่างน้ำมีจำนวนเชื้ออยู่น้อย

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliform Bacteria) และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal Coliform Bacteria) โดยวิธีหลายหลอด (Multiple tubes fermentation technique)

หลักการ (Principle)

การตรวจปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยวิธีหลายหลอด (Multiple tubes method) นี้อาศัยหลักการความสามารถในการย่อยสลายอาหารให้เกิดแก๊สในหลอดทดลอง จากจำนวนของหลอดที่ให้ผลเป็นทางบวก (Positive: +) ของแต่ละการเจือจาง แล้วนำไปอ่านหาค่าในตารางดัชนีMPN (Most Probable Number index) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่คาดคะเนว่าจะมีได้มากที่สุดในตัวอย่งที่ตรวจ โดยค่าในตารางดัชนีMPN นี้เป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งจะเป็นการประมาณทางสถิติถึงปริมาณของโคลิฟอร์มที่น่าจะตรวจพบได้ในน้ำ (Most Probable Number per 100 ml of sample) วิธีนี้เหมาะสำหรับหาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียได้ในตัวอย่างที่มีจำนวนเชื่อน้อย เช่น น้ำดื่ม น้ำผิวดิน และน้ำทะเลรวมถึงน้ำเสียจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม ปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำตัวอย่างจะต้องมีค่าไม่เกิน 1,600 MPN/100 มิลลิลิตร ซึ่งถ้ามีปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียสูงมากกว่านี้ จะต้องทำการเจือจางน้ำตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

วิธีหลายหลอดที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มตามวิธีMPN โดยทั่วไปนิยมใช้ 2 ระบบ คือ

1. ระบบ 3 หลอด ใช้อาหารน้อย ประหยัดเวลา ให้ค่าที่หยาบ และโอกาสผิดพลาดมาก
 2. ระบบ 5 หลอด ใช้อาหารเหลวมาก เปลืองเวลา ให้ค่าละเอียด และโอกาสผิดพลาดน้อย
- การเก็บตัวอย่างน้ำ

- ภาชนะ ขวดเก็บตัวอย่างน้ำต้องล้างให้สะอาดและผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

- การทำลายคลอรีน (dechlorination) คลอรีนที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำจะไปทำลายแบคทีเรียในระหว่างการนำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงต้องเติม $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (โซเดียมไดอ็อกซัลเฟต) เพื่อไปทำลายคลอรีนที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำเสียก่อน $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ จะถูกเติมลงในขวดสำหรับเก็บตัวอย่างที่สะอาดก่อนนำไปฆ่าเชื้อ (sterile) โดยให้มีความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

ประมาณ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยปกติมักจะเติม 0.1 มิลลิลิตร ของ 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ลงในขวดตัวอย่างขนาด 120 มิลลิลิตร

· การลดความเป็นพิษของโลหะหนัก ตัวอย่างน้ำที่มีโลหะหนัก เช่น ทองแดง และสังกะสีสูง จะต้องเติมสาร chelating agent เช่น Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) ลงไปด้วย เพื่อลดความเป็นพิษของโลหะหนักต่อแบคทีเรีย ซึ่งสำคัญมากสำหรับตัวอย่างน้ำที่ต้องเก็บไว้นานกว่า 24 ชั่วโมง EDTA จะถูกเติมลงไปในช่วงสำหรับเก็บตัวอย่างที่สะอาดก่อนนำไปฆ่าเชื้อ (sterile) โดยให้ความเข้มข้นของ EDTA ประมาณ 372 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปกติมักจะเติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 15% EDTA ลงในขวดตัวอย่างขนาด 120 มิลลิลิตร

· วิธีเก็บตัวอย่างน้ำจืดเก็บตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ค่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มและฟิคอลโคลิฟอร์มในน้ำ ให้เก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตร โดยเปิดฝาขวดเก็บตัวอย่างคว่ำขวดลงไปใต้น้ำแล้วค่อยหงายปากขวดขึ้น ในทิศทางทวนกระแสน้ำ ให้น้ำตัวอย่างไหลเข้าขวดเก็บตัวอย่าง

· ปริมาตรของตัวอย่าง ปริมาณของตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อทำการตรวจสอบทางแบคทีเรียไม่ควรน้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และไม่ควรถือเก็บตัวอย่างน้ำจนเต็มขวดเก็บตัวอย่าง แต่ให้เหลือที่ว่างไว้ประมาณ 2.5 เซนติเมตร เพื่อความสะดวกในการเขย่าตัวอย่างน้ำก่อนทำการวิเคราะห์การ

รักษาตัวอย่างน้ำ

การวิเคราะห์ทางแบคทีเรีย ควรกระทำ ทันทีภายหลังการเก็บตัวอย่าง เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเกิดขึ้น ถ้าไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังการเก็บควรแช่ตัวอย่างน้ำในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระหว่างการขนส่ง ซึ่งควรใช้เวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการให้แช่ในตู้เย็นทันที และควรทำการวิเคราะห์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนและวิธีทดสอบ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth (Single strength)

ชั่ง Lauryl tryptose broth 35.6 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก หลังจากนั้นนำหลอดแก้ว (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีหลอดดักอากาศเดอร์แรมวางคว่ำอยู่ภายในมาบรรจุอาหารเหลว Lauryl tryptose broth ให้ท่วมหลอดเดอร์แรมประมาณ 10 มิลลิลิตร และปิดด้วยฝาครอบ แล้ว

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi หลังจากนั้นนำหลอดอาหารออกจากเครื่องนึ่งอัตโนมัติ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth (Double strength)

ชั่ง Lauryl tryptose broth 71.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก หลังจากนั้นนำหลอดแก้ว (test tube) ขนาด 35 มิลลิลิตร ซึ่งมีหลอดดักอากาศเดอร์แรมวางคว่ำอยู่ภายในมาบรรจุอาหารเหลว Lauryl tryptose broth ให้ท่วมหลอดเดอร์แรมประมาณ 10 มิลลิลิตร และปิดด้วยฝาครอบ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi หลังจากนั้นนำหลอดอาหารออกจากเครื่องนึ่งอัตโนมัติ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth (BGLB)

ชั่ง Brilliant-Green Lactose bile broth 40 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก หลังจากนั้นนำหลอดแก้ว (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีหลอดดักอากาศเดอร์แรมวางคว่ำอยู่ภายในมาบรรจุอาหารเหลว Brilliant-Green Lactose bile broth ให้ท่วมหลอดเดอร์แรมประมาณ 10 มิลลิลิตร และปิดด้วยฝาครอบ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi หลังจากนั้นนำหลอดอาหารออกจากเครื่องนึ่งอัตโนมัติ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium

ชั่ง EC medium 37 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก หลังจากนั้นนำหลอดแก้ว (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีหลอดดักอากาศเดอร์แรมวางคว่ำอยู่ภายในมาบรรจุอาหารเหลว EC medium ให้ท่วมหลอดเดอร์แรมประมาณ 10 มิลลิลิตร และปิดด้วยฝาครอบ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 psi หลังจากนั้นนำหลอดอาหารออกจากเครื่องนึ่งอัตโนมัติ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.5 Eosin Methylene Blue agar

ชั่ง Eosin Methylene Blue agar 36 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด แล้วเทใส่ขวดขนาด 5,000 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว) จำนวน 3 ขวด ต่อมานำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีที่ความดัน 15 psi หลังจากนั้นเทลงจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 1-2 วัน จึงค่อยเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

ชั่ง Nutrient agar 23 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด แล้วเทใส่ขวดขนาด 500 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว) จำนวน 3 ขวด ต่อมานำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีที่ความดัน 15 psi หลังจากนั้นเทลงจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง 1-2 วัน จึงค่อยเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ

- สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำทะเล ให้เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด
- ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้งาน ควรตรวจฟองอากาศในหลอดดักแก๊สก่อน หากพบว่ามีฟองอากาศเกิดขึ้นให้คัดทิ้ง

2. การเจือจางตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ อาจจะต้องทำการเจือจาง เพื่อให้ความหนาแน่นของโคลิฟอร์มแบคทีเรียอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือไม่เกิน 1,600 MPN/100 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ช่วงของค่าความเจือจางที่จะไปอ่านเทียบกับตาราง MPN ได้ ซึ่งจะใช้ชุดอนุกรมของการเจือจางเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับความสกปรกของอย่างหมู เช่น น้ำดื่มใช้ชุดเจือจาง 10, 1 และ 0.1 มิลลิลิตร, น้ำจากแม่น้ำใช้ชุดเจือจาง 1, 0.1 และ 0.01 มิลลิลิตร, น้ำจากระบบบำบัดใช้ชุดเจือจาง 0.1, 0.01 และ 0.001 มิลลิลิตร เป็นต้น สำหรับการเจือจางตัวอย่างน้ำสามารถทำได้ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1) เตรียมหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่น หรือ buffer water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile) แล้ว จำนวน 3 หลอด
- 2) เขย่าตัวอย่างน้ำที่เก็บมาอย่างแรงประมาณ 20 ครั้ง
- 3) ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile pipette) ดูดตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นของหลอดที่ 1 (อัตราการเจือจาง 1:10 หรือ 10-1 หรือ 0.1)
- 4) เขย่าตัวอย่างน้ำในหลอดที่ 1 อย่างแรงประมาณ 20 ครั้ง
- 5) ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดตัวอย่างน้ำจากหลอดแก้วที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นของหลอดที่ 2 (อัตราการเจือจาง 1:100 หรือ 10-2 หรือ 0.01)
- 6) เขย่าตัวอย่างน้ำในหลอดที่ 2 อย่างแรงประมาณ 20 ครั้ง
- 7) ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดตัวอย่างน้ำจากหลอดแก้วที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นของหลอดที่ 3 (อัตราการเจือจาง 1:1,000 หรือ 10-3 หรือ 0.001) อัตราส่วนเจือจาง 1:10 1: 100 1:1,000 หรือ 0.1 0.01 0.001 หรือ 10-1 10-2 10-3 ได้ชุดอนุกรมของการเจือจางตัวอย่างน้ำเป็น 0.1 0.01 และ 0.001 นำตัวอย่างน้ำในแต่ละระดับการเจือจางมาวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่อไป

หมายเหตุ

การวิเคราะห์ไม่ว่าระบบ 3 หรือ 5 หลอด จะต้องทำการเจือจางตัวอย่างที่จะตรวจวิเคราะห์ 3 เจือจางติดต่อกัน ซึ่งตัวอย่างแต่ละความเจือจางจะถูกดูดใส่ลงในหลอดอาหารในปริมาตรที่เท่ากัน คือ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เนื่องจากมีการเจือจางตัวอย่างมาแล้ว ทั้งนี้ความเข้มข้นของอาหารทุกหลอดที่ใช้ในการทดสอบจะมีความเข้มข้นเดียวกัน แต่ในกรณีที่ไม่มีการเจือจางตัวอย่างน้ำที่ต้องการทดสอบ ให้ใช้วิธีการดูดตัวอย่างใส่หลอดอาหารในปริมาตรที่ไม่เท่ากัน ได้แก่ 10, 1 และ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียและฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบขั้นแรก (Presumptive test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบขั้นนี้เป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้น เพื่อจะแยกโคลิฟอร์มแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ในการทดสอบอาจใช้ระบบเลี้ยงเชื้อแบบ 3 หลอด หรือ 5 หลอด กับอนุกรม 3 การเจือจาง คือ จำนวนมิลลิลิตรของตัวอย่างที่ต่างกันเป็นชุด ๆ ดังนี้ 10-1-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 1-0.1-0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.1-0.01-0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสกปรกของตัวอย่างน้ำโดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1 นำ Lauryl tryptose broth ที่เตรียมไว้ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (overnight) ก่อนการทดสอบ

3.1.2 นำตัวอย่างน้ำที่แช่เย็นออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.3 จัดเรียง Lauryl tryptose broth เป็น 3 ชุด (ระบบ 3 หลอด) ชุดที่ 1 Lauryl tryptose broth (Double strength) 3 หลอด สำหรับใส่น้ำตัวอย่างหลอดละ 10 มล.

3.1.4 เขียนรหัสตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่างน้ำข้างหลอดให้ชัดเจน

3.1.5 นำหลอดทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.1.6 อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นและแก๊สที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดแก๊สจะดูได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดเดอร์แฮม หรือมีฟองปุดเมื่อเขย่าเบา ๆ แสดงว่า หลอดนั้นให้ผลบวก (positive: +) ถ้าหลอดใดไม่เกิดแก๊สแสดงว่าหลอดนั้นให้ผลลบให้นำกลับไปอบเพาะเชื้อในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก นำหลอดที่เกิดแก๊สไปทดสอบขั้นยืนยันต่อไป

3.2 การทดสอบขั้นยืนยัน (Confirm test)

เนื่องจากการเกิดแก๊สในการทดสอบขั้นแรกยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างน้ำเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย หรือฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องทดสอบยืนยันโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ EC medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบ หาฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth ที่เตรียมไว้เท่ากับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก และเรียงให้ตรงกับหลอด Lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก

2) เขียนรหัสตัวอย่างที่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth

3) เขย่าหลอด Lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก และปิเปต Lauryl tryptose broth 30 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth หลอดต่อหลอดโดยวิธีปลอดเชื้อ

4) เข้าตูบ่มอุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

5) อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นและแก๊สที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดแก๊สจะดูได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดเดอร์แฮม หรือมีกลับไปบ่มเชื้อในตูบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

6) นำค่าจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละการเจือจาง ไปเปิดเทียบตาราง MPN ค่าที่ได้จะเป็นค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด (Total Coliform bacteria)

3.2.2 การทดสอบฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium ที่เตรียมไว้เท่ากับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก และเรียงให้ตรงกับหลอด Lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก

2) เขียนรหัสตัวอย่างที่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium

3) เขย่าหลอด Lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก และปิเปต Lauryl tryptose broth 30 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium หลอดต่อหลอดโดยวิธีปลอดเชื้อ

4) เข้าตูบ่มอุณหภูมิ 44 ± 0.2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

5) อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นและแก๊สที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดแก๊สจะดูได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดเดอร์แฮม หรือมีฟองปุดเมื่อเขย่าเบา ๆ แสดงว่า หลอดนั้นให้ผลบวก ถ้าหลอดใดไม่เกิดแก๊ส แสดงว่าหลอดนั้นให้ผลลบ ให้นำกลับไปอบเพาะเชื้อในตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 ± 0.2 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

6) นำหลอดที่ให้ผลทางบวกจากแต่ละการเจือจางเปิดเทียบตาราง MPN ค่าที่ได้เป็นค่าพีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

3.3 การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (Completed test)

นำเชื้อจากหลอดที่เกิดฟองอากาศในชั้นยืนยันมาเชื้อเชื้อลงบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง Eosin Methylene Blue agar (BMB) แล้วนำเข้าตูบ่มเชื้อที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงซึ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้เป็นโคโลนีโคโลนีจะมีลักษณะสีเขียวคล้ำ หรืออาจเรียกว่าสีโลหะตะกั่ว (metallic sheen) จากนั้นให้ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) จุ่มเอาโคโลนีที่แยกเดี่ยว ๆ เห็นชัดในแต่ละจานเพาะเชื้อประมาณ 2-3 โคโลนีใส่ลงในอาหารต่อไปนี้

1) หลอดอาหาร Lauryp tryptose broth แล้วนำเข้าตูบ่มเชื้อที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเป็นเชื้อโคลิฟอร์มจะให้แก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักอากาศเดอร์แมน

2) จานอาหาร Nutrient agar โดยนำเชื้อเข้าตูบ่มเชื้อที่ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงนำเชื้อไปทำการย้อมสีแกรม (gram stained) ซึ่งจะติดสีแกรมลบ (gram negative) แล้วส่งดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ้ามีรูปร่างท่อน แสดงว่าเป็นเชื้อพีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

4. การคำนวณ

4.1 การคำนวณหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose bile broth มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN index (แบบ 3 หลอด) ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียจะมีหน่วยเป็น MPN/100 มิลลิลิตร ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่างต้องเท่ากับ 10 1.0 0.1 มิลลิลิตร

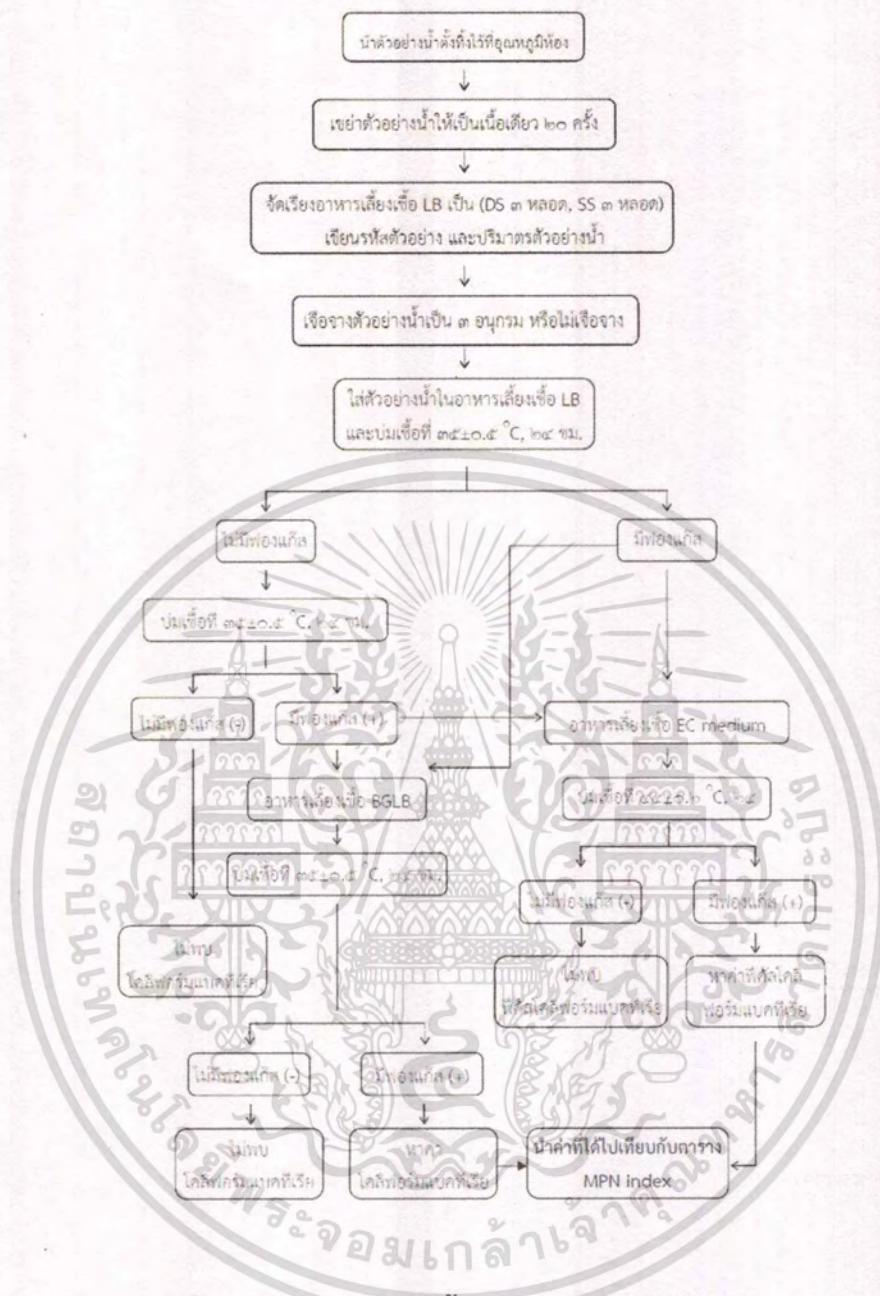
4.2 การคำนวณหาปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium มาเทียบค่า MPN จากตาราง MPN index ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียจะมีหน่วยเป็น MPN/100 มิลลิลิตร ทั้งนี้อนุกรมของตัวอย่างต้องเท่ากับ 10 1.0 0.1 มิลลิลิตรกรณีที่ใช้อนุกรมของตัวอย่างเท่ากับ 1 0.1 0.01 มิลลิลิตร ค่า MPN ที่ได้จะมีค่าเป็น 10 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง (x10) หรือถ้าใช้อนุกรมของตัวอย่างเท่ากับ 0.1 0.01 0.001 มิลลิลิตร ค่า MPN ที่ได้จะมีค่าเป็น 100 เท่าของค่าที่อ่านได้จากตาราง (x100) เป็นต้น

4.3 กรณีวิเคราะห์แบบ 5 หลอด สามารถคำนวณค่า MPN ได้เช่นเดียวกัน เพียงแต่เพิ่มหลอดตัวอย่างจาก 3 หลอด เป็น 5 หลอด เช่น อนุกรมการเจือจางตัวอย่างน้ำแบบ 10 1.0 0.1 พบว่า หลอด 10 มล. ให้ผลบวก 4 หลอด, หลอด 1 มล. มีหลอดให้ผลบวก 3 หลอด จาก 5 หลอด และหลอด 0.1 มล. มีหลอดที่ให้ผลบวก 1 หลอด ดังนั้น ตารางดัชนี MPN จากเลขรวมของหลอดที่ให้ผลบวก คือ 4-3-1 ซึ่งจะให้ค่าดัชนี MPN ของตัวอย่างน้ำเป็น 33 MPN/100 มล. ของตัวอย่าง

บางครั้งจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไม่มีอยู่ในตาราง MPN Index จะต้องหาค่า MPN/100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$\text{MPN/100 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก} \times 100}{\text{รากที่ 2 ของ (ผลรวมปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดสอบที่ให้ผลลบ) \times (ผลรวมปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ใช้ทุกหลอด)}}$$

แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย



รูปที่ 2.19 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

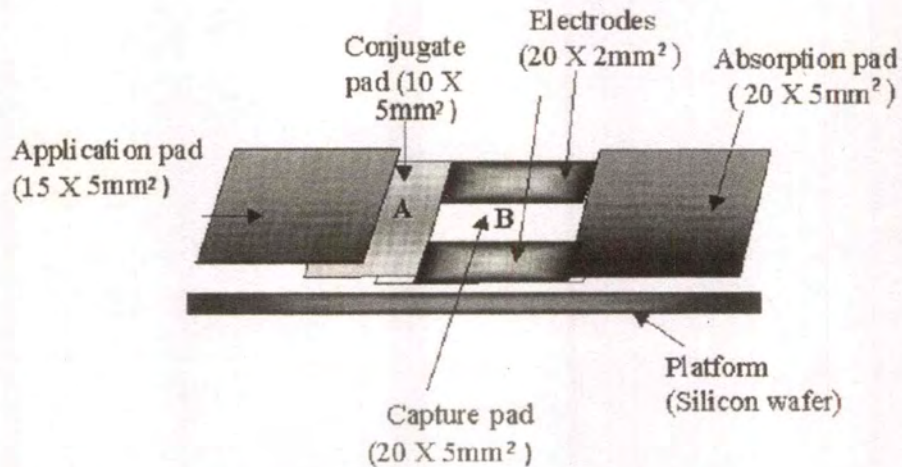
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2. A conductometric biosensor for biosecurity

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องตรวจวัดชีวภาพโดยใช้เทคนิคคอนดักโตเมตริกเพื่อตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ซึ่งไบโอเซนเซอร์มีองค์ประกอบหลักอยู่ 2 อย่างคือ อิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) ซึ่งมีแอนติบอดีเป็นสารชีวภาพในการตรวจวัด และมีตัวตรวจวัดสัญญาณ (transducer) โดยได้ออกแบบให้อิมมูโนเซนเซอร์เป็นระบบ flow เพื่อให้ของเหลวตัวอย่างไหลผ่านและการตรวจวัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น ไบโอเซนเซอร์ที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะสูง การตอบสนองดี ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย และการตรวจวัดกลไกใกล้เคียงกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาจริงของสาร (near real-time detection mechanism) ซึ่งไบโอเซนเซอร์นี้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดจุลินทรีย์ *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp ซึ่งปริมาณต่ำสุดที่ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถตรวจวัดได้มีค่าประมาณ 7.9×10^1 หน่วย colony ต่อ มิลลิลิตร ใช้เวลาในการวัดแต่ละครั้งประมาณ 10 นาที

หลักการทางเคมี

ไบโอเซนเซอร์ ประกอบด้วยไบโอรีเซพเตอร์ (bioreceptor/ Biological sensing elements) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ไบโอรีเซพเตอร์เป็นโมเลกุลชีวภาพในที่นี้ใช้ polyaniline แอนติบอดี ซึ่งความสามารถในการจดจำตัวถูกวิเคราะห์ (target analyte) ได้อย่างเฉพาะเจาะจง ได้แก่ จุลินทรีย์ *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp โดยไบโอรีเซพเตอร์ถูกตรึงด้วยวิธีทางกายภาพหรือวิธีการทางเคมีกับตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ดังรูป องค์ประกอบของอิมมูโนเซนเซอร์ ประกอบด้วย cellulose membrane มีหน้าที่เป็น absorption pads และให้ตัวอย่างผ่าน ซึ่ง conjugate pad ทำมาจาก fiber glass membrane และ capture pad ทำมาจาก nitrocellulose (NC) membrane



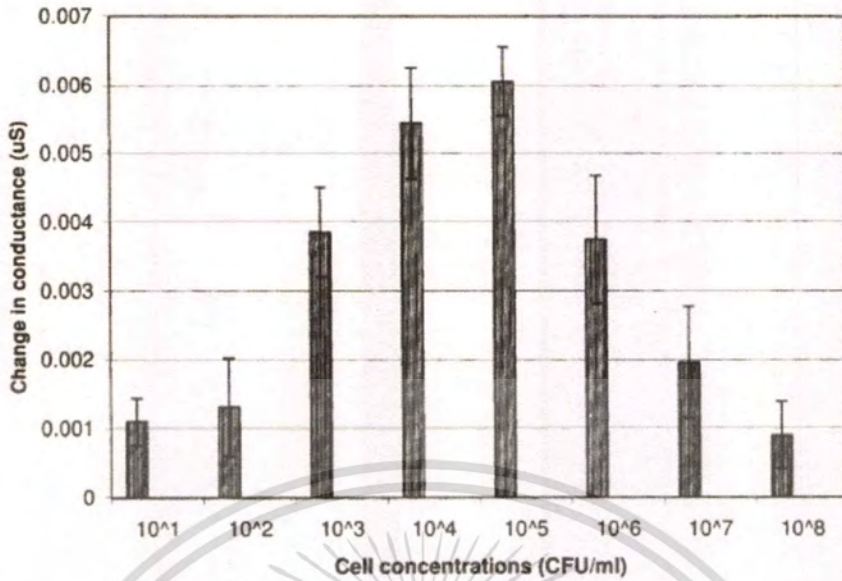
รูปที่ 2.20 โครงสร้างคอนดักโทเมตริกไบโอเซนเซอร์

จากรูป คอนดักโทเมตริกไบโอเซนเซอร์ได้ใช้วิธีการไหลของเหลวตัวอย่างผ่านช่องเล็กๆ โดยเคลื่อนที่จากเยื่อเลือกผ่านอันหนึ่งไปสู่อีกอันหนึ่ง ซึ่งสามารถวัดสัญญาณไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าที่อยู่ระหว่างช่องว่างดังรูป โดยก่อนที่จะให้สารไหลผ่านช่องว่างระหว่างขั้วไฟฟ้าหรือช่อง capture gap จะไม่มีสัญญาณเกิดขึ้นดังรูป A แต่หลังจากผ่านสารเข้าไป แอนติบอดี polyaniline (Ab-P) จะเข้าจับกับ antigen เกิดเป็นสารเชิงซ้อนขึ้นดังรูป B แล้วสารเชิงซ้อนนี้จะถูกพาเข้าไปในช่อง capture pad ซึ่ง antibody-antigen เกิดปฏิกิริยากันแล้วก่อตัวเป็น sandwich แล้วมีสัญญาณเกิดขึ้น

Sensor response

สัญญาณที่ตอบสนองเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของ *E. coli* ในช่วง 10^1 - 10^5 CFU/mL แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสัญญาณที่วัดได้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.21 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อที่สูงขึ้นต่อสัญญาณที่วัดได้

- สามารถทำการวิเคราะห์ได้เร็ว
- ให้ sensitivity สูง
- การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก
- เหมาะสำหรับการ screening

2.2.3. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธี Standard Conventional อรุณ บ้างตระกูลสนนัทและคณะ

ผลการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งสำหรับแช่อาหารในเขตดุสิต และเขตพระนครทำการศึกษาค้นหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ในน้ำแข็งที่มีจำหน่ายในเขตดุสิตและเขตพระนคร เพื่อเป็น ข้อมูลให้กับประชาชน สสจ. สสอ. และหน่วยงานต่างๆที่รับผิดชอบ เพื่อหาแนวทางป้องกันและควบคุมโรงงานผลิตน้ำแข็งเก็บตัวอย่างน้ำแข็งแช่อาหารในตลาดสดเขตดุสิต และตลาดสดเขตพระนคร แหล่งละ 50 ตัวอย่าง รวม 100 ตัวอย่าง โดยทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Total Viable Count, Coliform bacteria และ Escherichia coli โดยวิธี Most probable Number (MPN) รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ (Salmonella, Shigella,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vibrio cholerae, Vibriopara haemolyticus และ Staphylococcus) ด้วยวิธี Standard Conventional Method

หลักการ Total plate count, หลักการ The most probable number of coliform organisms (MPN)

หลักการ Total plate count

standard plate count หรือ วิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน เรียกว่า SPC อาจเรียกว่า Aerobic plate count (APC) หรือ Total viable count (TVA) หรือปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด Standard plate count วิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ที่นิยมใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ (microbial population count) ที่มีชีวิต อยู่ในวัตถุคิบเช่น การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบผลิตภัณฑ์อาหาร สิ่งแวดล้อม บริเวณผลิตอาหาร พื้นผิวสัมผัสอาหาร (food contact surface) น้ำ อากาศ

ค่าที่ได้จากการตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน การตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน เป็นการนับปริมาณโคโลนี (colony) ที่มีขนาดใหญ่พอที่จะมองเห็นด้วยตาเปล่า หรือมองเห็นด้วยแว่นขยาย ซึ่งมาจาก เซลล์ของจุลินทรีย์จะถูกตรึงอยู่กับที่เจริญเติบโต และแบ่งตัวจากเซลล์เดียว เป็นหลายๆ เซลล์อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อค่าที่ได้จากการตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐานคือ colony forming unit (cfu)

วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์

- 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) ในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบฟิล์มแห้ง (compact dry plate)

การเจือจางตัวอย่างโดยทั่วไปการนับจำนวนจุลินทรีย์ จะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหาร อยู่ในช่วงดังกล่าว ไม่มากหรือน้อยเกินไปจึงต้อง นำตัวอย่างมาเจือจาง เป็นลำดับ ด้วยวิธี serial Dilution การทำ serial dilution คือ เจือจางตัวอย่าง เชื้อเริ่มต้นโดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า

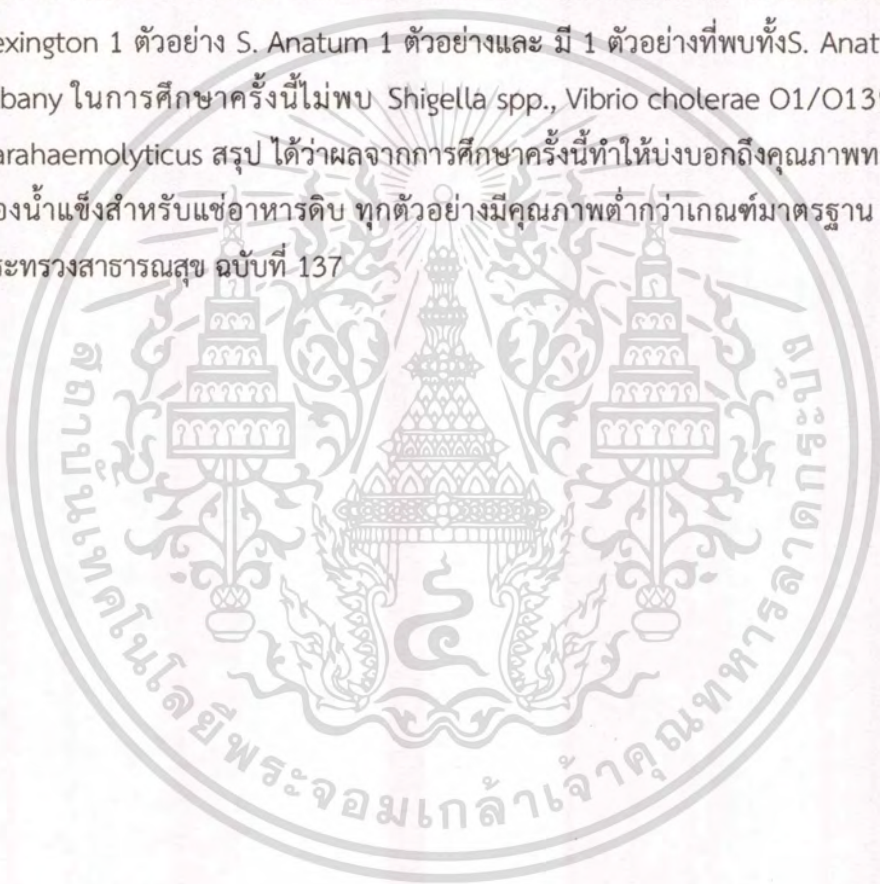
ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละ Dilution 1 ml. ใส่ในจานเพาะเชื้ออาหารร่วน (nutrient agar) ลงในจาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้วันแข็งกว่าจานลง บ่ม (incubate) 48 ชั่วโมง

□□นับโคโลนี (colony) โดยใช้แว่นขยาย นำมาหาค่าเฉลี่ย ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu)

ผลการศึกษา พบว่าน้ำแข็งมีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์ มาตรฐานโดยพบว่า MPN มีค่ามากกว่า 2.2(100%) พบเชื้อE.coli 21 ตัวอย่าง (21%) พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ จำนวน 47 ตัวอย่าง(47%) ได้แก่ Salmonella spp. 13 ตัวอย่าง (13%) Vibrio cholerae non O1/non O139 11 ตัวอย่าง และ Staphylococcus aureus 23 ตัวอย่าง (23%)สำหรับ Salmonella spp. ได้ทำการศึกษาในระดับ serovars จำแนกได้ 4 serovars ได้แก่ S. Hadar 10 ตัวอย่าง S. Lexington 1 ตัวอย่าง S. Anatum 1 ตัวอย่าง และ มี 1 ตัวอย่างที่พบทั้ง S. Anatum ร่วมกับ S. Albany ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ Shigella spp., Vibrio cholerae O1/O139 และ Vibrio parahaemolyticus สรุป ได้ว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้บ่งบอกถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งสำหรับแช่อาหารดิบ ทุกตัวอย่างมีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 137



2.2.4. UCLA engineers create cell phone-based sensor for detection of E. coli

นักวิจัยจากสถาบันวิศวกรรมและวิทยาศาสตร์ประยุกต์เฮนรี ซามูเอลี (Henry Samueli School of Engineering and Applied Science) ของมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนียในลอสแอนเจลิส (UCLA) ได้พัฒนาเครื่องมือที่ตรวจจับเชื้อ E. coli ที่มีแพลตฟอร์มการตรวจจับในโทรศัพท์มือถือ ในการตรวจจับและการสร้างภาพด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถตรวจจับการมีอยู่ของแบคทีเรียเชื้อ Escherichia coli ในอาหารและน้ำ นักวิจัยได้ใช้ แท่งหลอดแก้วcapillary ที่มีแอนติบอดีเฉพาะร่วมกับการใช้ควอนตัม ดอท (เซมิคอนดักเตอร์ที่มักใช้สำหรับการถ่ายภาพทางการแพทย์) เป็นสัญญาณในการที่ระบุและตรวจจับเชื้อ E. coli ที่มีอนุภาคขนาดเล็กเป็นพิเศษในตัวอย่างของเหลวที่เก็บมาส่งตรวจ ซึ่งอุปกรณ์นี้มีน้ำหนักน้อย พกพาง่าย และยังสามารถใช้งานร่วมกับกล้องของโทรศัพท์มือถือได้

โดยการใช้พลังงานจากแบตเตอรี่และไดโอดเปล่งแสง(LED) ที่มีราคาไม่แพง นักวิจัยสามารถสร้างเครื่องมือที่ตรวจจับเชื้อ E. coli ได้ โดยนักวิจัยจะกระตุ้นเชื้ออีโคไลให้ถูกตรวจจับได้บนหลอดแก้วคาพิลลารี (capillary) ซึ่งเสริมสารแอนติบอดีเพื่อช่วยในการหาเชื้อ โดย PhysOrg.com ระบุว่า นักวิจัยได้รวมหลอดแก้วคาพิลลารีดังกล่าวเข้ากับจุดระดับควอนตัมหรือควอนตัมดอท (quantum dot) ทำให้สามารถจับภาพของแบคทีเรียอีโคไลจากการเปล่งแสงของควอนตัมดอท และบันทึกภาพได้ด้วยกล้องของโทรศัพท์มือถือ ทั้งนี้ เลนส์เสริมจะถูกใส่เข้าไประหว่างหลอดแก้วคาพิลลารีและมือถือ

อุปกรณ์ที่เสริมเข้าไปนี้จะทำหน้าที่เหมือนกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์และหาปริมาณการเปล่งแสงจากหลอดคาพิลลารีแต่ละหลอดหลังจากจับภาพอนุภาคของอีโคไลที่อยู่ในตัวอย่างได้แล้ว จากการวัดปริมาณการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์แต่ละหลอดจะช่วยให้ประเมินความเข้มข้นของอีโคไลในตัวอย่างได้

ทั้งนี้ เชื้ออีโคไลมีโอกาสปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่มได้ง่าย และส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน ซึ่งแม้กระทั่งในประเทศพัฒนาแล้วก็ยังคงได้รับผลกระทบจากเชื้อดังกล่าว ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีผู้ป่วยต้องเข้าโรงพยาบาลจำนวนมาก และมีผู้เสียชีวิตทุกปี จำนวนเชื้ออีโคไลเพียงเล็กน้อยประมาณ 10-100 อนุภาคก็สามารถทำลายเยื่อของลำไส้ ทำลายไตและเป็นสาเหตุของเลือดจางตัวเป็นลิ่มในสมองได้ อีกทั้งยังจู่โจมร่างกาย ทำให้เป็นอัมพาตและทำให้ระบบการหายใจล้มเหลวได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สำหรับสิ่งประดิษฐ์ครั้งนี้ เป็นการออกแบบเครื่องมือวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา พร้อมบริเวณที่ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* โดยอาศัยหลักการวัดการทำงานของเอนไซม์ β -D-glucuronidase ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* และวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้น ระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่พบในตัวอย่างตรวจ ซึ่งเครื่องมือวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา พร้อมบริเวณที่ควบคุมอุณหภูมิ มีคุณสมบัติดังนี้

- 1) มีบริเวณควบคุมอุณหภูมิ ที่สามารถบรรจุควิวเวตต์ เพื่อช่วยในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้มีสภาวะที่เหมาะสม
- 2) มีแหล่งกำเนิดแสงชนิด LED ที่ต่อกับฟิลเตอร์ในการแยกช่วงคลื่น 350 นาโนเมตร และต่อไปยังบริเวณควิวเวตต์ ที่บรรจุตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นมีฟิลเตอร์อีกชั้นสำหรับแยกช่วงคลื่น 460 นาโนเมตร ให้ไปที่ตัวรับสัญญาณ
- 3) แหล่งกำเนิดแสงและตัวรับสัญญาณ ต่อกันแบบ 90 องศา
- 4) ตัวรับสัญญาณสามารถรับสัญญาณและประมวลผลระดับฟลูออเรสเซนซ์ออกมาในหน่วย RFU หรือ Relative Fluorescent Unit

สำหรับน้ำยา/อาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย ฟลูออเรสเซนซ์ซับสเตอร์ชนิด 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) สารอาหารช่วยในการเจริญเติบโตได้แก่ N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] Buffer (HEPES) และตัวเร่งการผลิตโปรตีน ได้แก่ Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) ดังนั้นการพัฒนาระบบการตรวจ *E. coli* ในครั้งนี้ จึงเป็นการพัฒนาทั้งในส่วนของปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จำเพาะต่อ *E. coli* และ พัฒนาเครื่องตรวจวัดให้มีประสิทธิภาพในการวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ได้สูงสุด เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในน้ำ ได้รวดเร็ว

3.1 การออกแบบระบบตรวจหาเชื้อ E. coli

3.1.1 ระบบตรวจหาเชื้อ E. coli ด้วยแสงฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาในตัวอย่างแหล่งน้ำที่สนใจ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.1.1.1 วิธีการสร้างเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา มีรายละเอียดดังนี้

1. แหล่งกำเนิดแสง LED 365 nm.
2. ช่องใส่ตัวอย่าง (Cuvette)
3. เลนส์สำหรับรวมแสง
4. Filter 450 nm.
5. Sensor ตรวจวัดแสง ชนิด Photodiode
6. Microcontroller สำหรับประมวลผล
7. จอแสดงผล
8. แหล่งจ่ายไฟ 5 Vdc

3.2 การเตรียมสารทางเคมี

3.2.1. เตรียมสารละลาย สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย E. coli

3.2.1.1. เตรียม ซับสเตรท ชนิด 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) บริษัท Sigma-Aldrich ที่ความเข้มข้น 8.52 mM ปริมาตร 10 ml

3.2.1.2. เตรียม N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] buffer (HEPES) บริษัท Sigma-Aldrich ที่ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 50 ml และปรับความเป็นกรดด่างให้มี pH 10.0 ด้วยสารละลาย NaOH

3.2.1.3. เตรียม Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) บริษัท Sigma-Aldrich ที่ความเข้มข้น 20 mM จำนวน 5 ml

3.2.1.4. เตรียม NaOH ที่ความเข้มข้น 1 M จำนวน 5 ml

3.3 ขั้นตอนการทดสอบในการตรวจหาเชื้อ E. coli

- 3.3.1 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา
- 3.3.1.1 เตรียมสาร 4-methylumbelliferon (4MU) ที่ความเข้มข้น 0.001 μM ถึง 100 μM โดยใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลาย
- 3.3.1.2 นำสารละลายที่เตรียมได้ ไปวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ชนิด 4MU
- 3.3.2 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ E. coli ให้ดำเนินการ ตามขั้นตอนดังนี้
- 3.3.2.1 ผสมสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น ในคิวเวตต์ขนาด 4 มิลลิลิตร โดยสารละลายประกอบด้วย
1. 8.52 mM MUG จำนวน 0.1 มิลลิลิตร
 2. 0.1 M HEPES จำนวน 0.9 มิลลิลิตร
 3. 20 mM IPTG จำนวน 0.1 มิลลิลิตร
- 3.3.2.2 เตรียมตัวอย่างที่มี E. coli ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ $1-10^6$ CFU/ml โดยใช้ E. coli สายพันธุ์ (ATCC 25922) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบน Blood agar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาละลายในสารละลาย normal saline solution (NSS) ให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด
- 3.3.2.3 นำตัวอย่างที่มี E. coli ตามความเข้มข้นระดับต่างๆ มาจำนวน 1 มิลลิลิตร มาใส่ในคิวเวตต์ในข้อ 3.1.4.1 ผสมให้เข้ากัน
- 3.3.2.4 นำ คิวเวตต์ข้อ 3.1.4.3 ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ประกอบอยู่ภายในเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง
- 3.3.2.5 เมื่อครบเวลา 4 ชั่วโมง นำ 1 M NaOH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเติมในคิวเวตต์ ผสมให้เข้ากัน
- 3.3.2.6 นำคิวเวตต์ไปวางในบริเวณที่เตรียมไว้สำหรับการวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ ในเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา

3.3.2.7 บันทึกระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่เครื่องวัดได้ และนำไปสร้างกราฟเพื่อหาสมการความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ E. coli กับ ปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 0-4 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทำงานของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E. coli

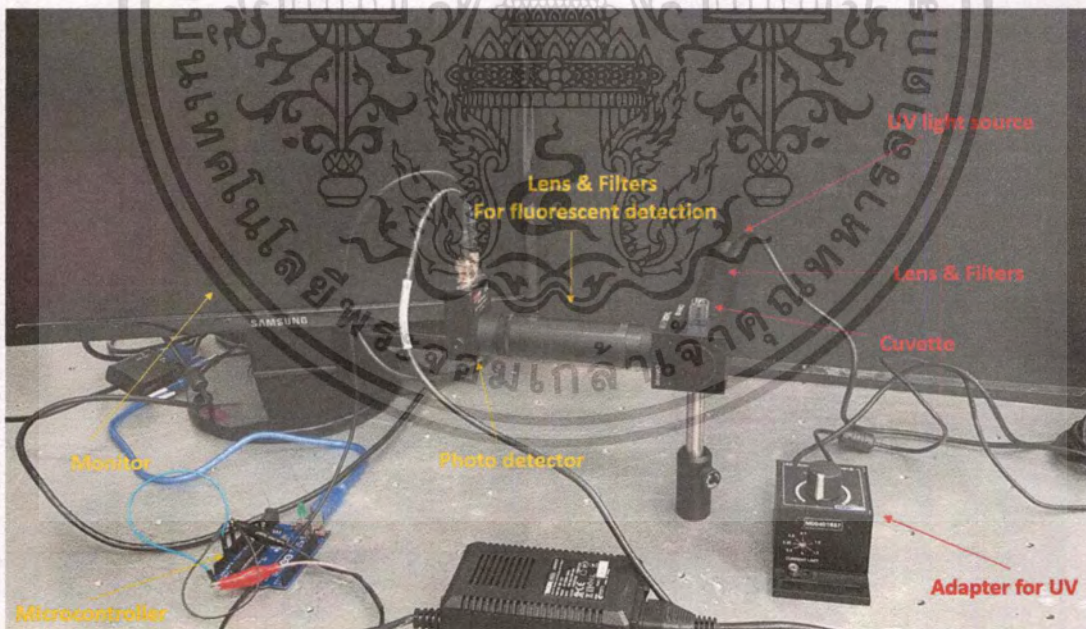
โดยการทำงานของอุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E.coli ด้วยฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา ด้วยหลักการทางแสงถูกแสดงไว้ใน รูปที่ 1 และ 2 โดยรูปที่ 1 เป็นการ configuration ระบบในห้องปฏิบัติการ และ รูปที่ 2 เป็น Final version ของเครื่องตรวจเชื้อ E.coli ที่ทำการออกแบบ packaging เรียบร้อยแล้ว โดยหลักการนั้นเริ่มจากแหล่งกำเนิดแสง LED ผลิตแสงความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร แสงจะถูกกระทบ lens ที่ฝั่ง input capture โฟตรอนและโฟกัสไปยังคิวเวตต์ (Cuvette) ที่บรรจุตัวอย่างไว้ เพื่อทำการกระตุ้นสาร ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของ เอนไซม์จากเชื้อ E. coli กับสารซับสเตรท (Substrate) โดย Cuvette จากนั้นสารฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) จะถูกกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร λ_0 และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร λ_1 โดยแสงที่เกิดจากสารฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ผ่านคิวเวตต์ออกมาแล้วผ่านเลนส์สำหรับรวมแสงเมื่อแสงผ่านออกมาจากเลนส์ผ่านฟิลเตอร์ (Filter) โดยเป็นแสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ผ่านออกมาและตกกระทบบนตัวรับสัญญาณ (Sensor) ที่เลือกได้จากเซ็นเซอร์ชนิดโฟโตไดโอด (Photodiode)

สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด E. coli โดยอาศัยหลักการวัดการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ที่จำเพาะต่อเชื้อ E. coli และวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้น ระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อ E. coli ที่เพิ่มขึ้นด้วย โดย อาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารเร่งการเจริญเติบโตสำหรับเชื้อ E. coli ประกอบด้วย

- 4.1.1 ฟลูออเรสเซนต์ซับสเตรท ที่ซึ่งสามารถเลือกได้จาก 4-เมธิลลัมเบลลิเฟอริล-เบต้า-ดี-กลูคูโรไซด์ (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)
- 4.1.2 สารอาหารช่วยในการเจริญเติบโต ที่ซึ่งสามารถเลือกได้จาก เอ็น-[2-ไฮดร็อกซีเอธิล]ไพเพอราซีน-เอ็น'-[2-เอทานัลฟอนิกแอซิด]บัฟเฟอร์ (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] Buffer) (HEPES)
- 4.1.3 ตัวเร่งการผลิตโปรตีน ที่ซึ่งสามารถเลือกได้จาก ไอโซโพรพิล เบต้า-ดี-1-ไทโอกาลแลกโตไซด์ ไพรานอไซด์ (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside) (IPTG)

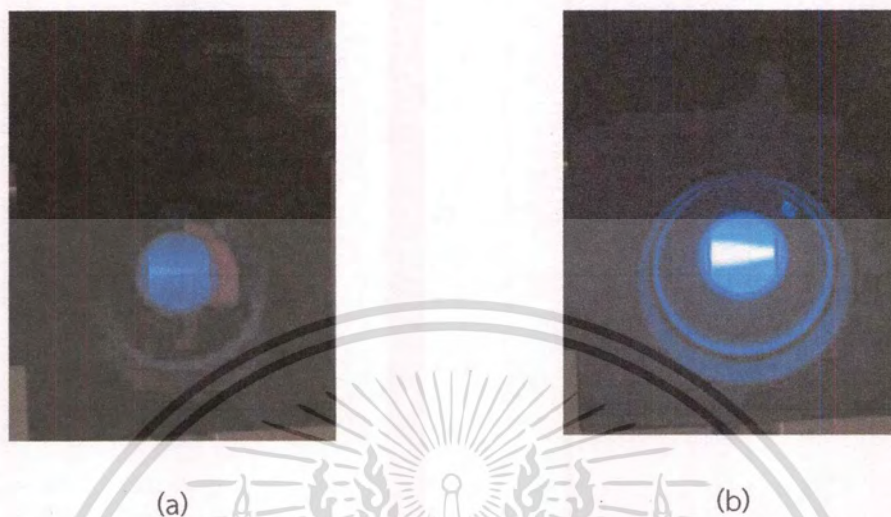
4.2 เครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์ขนาดพกพาและผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์ขนาดพกพา

หลักการการทำงานของเครื่องและองค์ประกอบของเครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์ขนาดพกพา มีลักษณะดังภาพที่ 4.3 ซึ่งผลการตรวจประสิทธิภาพของเครื่องวัดฟลูออเรสเซนต์จากการวัดการเรืองแสงของสาร 4MU ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า สามารถวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ ของ 4MU เขิงเส้นตรง ได้ตั้งแต่ 0.01 – 96 μ M (ภาพที่ 4.4)



รูปที่ 4.1 ระบบการตรวจเชื้อ E.coli ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 (a) ลำแสง Fluorescent หลังจากการกระตุ้นสาร 4MU ที่ความเข้มข้นต่ำ (b) ลำแสง Fluorescent หลังจากการกระตุ้นสาร 4MU ที่ความเข้มข้นสูง

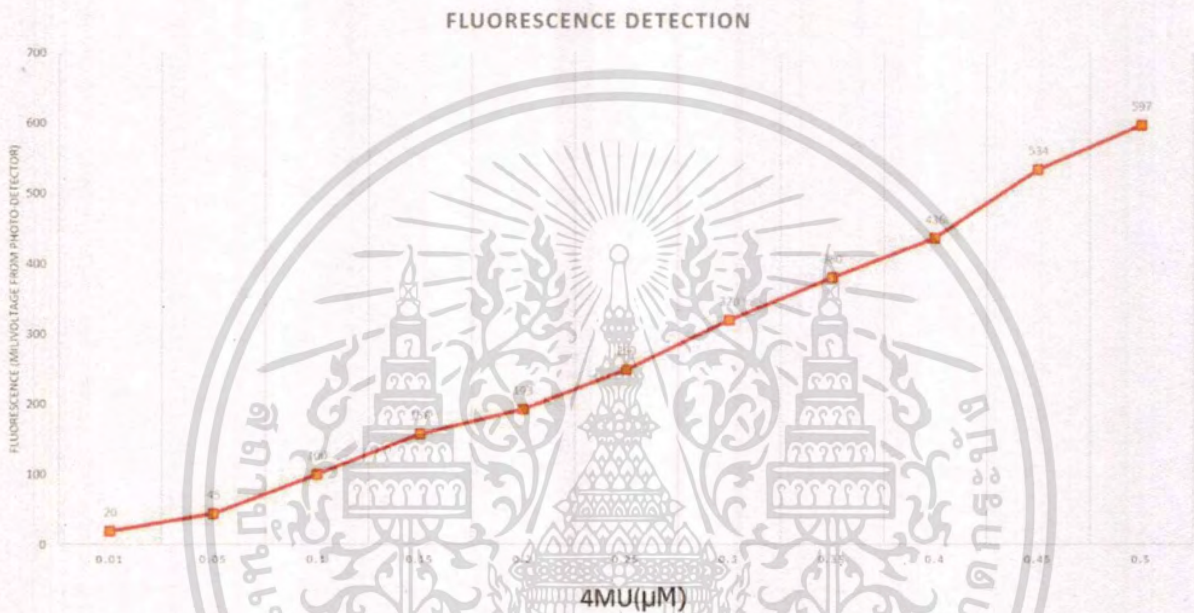
4.3 ผลการตรวจหาเชื้อ E. coli ด้วยเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา

ในการตรวจหาเชื้อ E. coli หลังการเลี้ยงเชื้อ E. coli นาน 4 ชั่วโมง และวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า ในตัวอย่างน้ำที่มี E. coli ที่ระดับความเข้มข้น $10^5 - 10^7$ CFU/ml (ภาพที่ 4.5) มีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา สามารถวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฟลูออเรสเซนซ์ได้ และเมื่อนำผลการทดสอบที่ได้จากการวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ทุกๆ 20 นาที ของตัวอย่าง E. coli แต่ละความเข้มข้น พบว่าสามารถนำมาสร้างสมการ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ E. coli 1 CFU/ml และทำให้เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา สามารถตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ได้ คือ ระยะเวลา 9 ชั่วโมง

โดยใช้สมการ ดังนี้

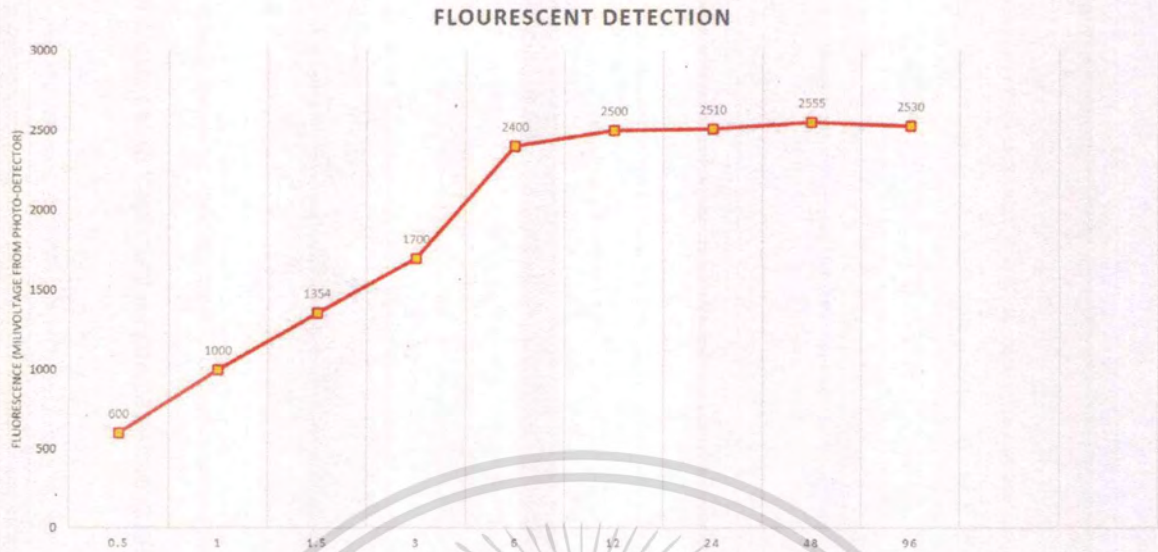
$$T = -80c + 576.67$$

โดยที่ T คือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (นาทื) และ c คือค่า \log ของความเข้มข้นของ *E. coli* ในหน่วย CFU/ml



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเรืองแสง 4-MU ที่ระดับต่างๆ กับระดับการเรืองแสง (nW) ที่เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา สามารถตรวจวัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเรืองแสง 4-MU ที่ระดับต่างๆ กับระดับการเรืองแสง (nW) ที่เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา สามารถตรวจวัดได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การการวิจัยนี้จึงได้ประดิษฐ์เครื่องมือการตรวจหาเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ E. coli ให้สามารถตรวจวัดได้รวดเร็วด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพา พร้อมบริเวณที่ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิด E. coli โดยอาศัยปฏิกิริยาของซัสเตรท MUGal กับ เอนไซม์ที่จำเพาะต่อ E. coli อย่าง beta-D-glucuronidase

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ E. coli จากเดิม ใช้เวลาอย่างน้อย 24 ชม. เป็นการตรวจหาเชื้อ E. coli ภายในเวลา 4 ชั่วโมง อีกทั้งพัฒนาขั้นตอนการทดสอบให้บุคคลทั่วไปสามารถใช้งานได้ง่าย สามารถตรวจหา E. coli ได้เอง โดยไม่ต้องส่งออกไปยังห้องปฏิบัติการ

ส่วนประกอบทั้งหมด ของเครื่องตรวจวัด fluorescent แบบพกพา ประกอบด้วย แหล่งกำเนิดแสงชนิด LED 365 nm, เลนส์รวมแสง, ช่องใส่ควอเตอร์, Filter 450 nm, Photodetector, หน่วยประมวลผล และจอแสดงผล หลังการทำปฏิกิริยากับซัสเตรท ตัวอย่างจะถูกนำมาวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์และประมวลผลในหน่วย Relative fluorescent unit ด้วยเครื่องตรวจวัด fluorescent แบบพกพา

อุปกรณ์ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย E.coli ด้วยฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพานี้ได้ผ่านการศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเรืองแสง 4-MU ที่ระดับต่างๆ กับระดับการเรืองแสง (nW) ที่เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาที่สามารถตรวจวัดได้ และศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ GUD ของ E. coli ที่ความเข้มข้นระดับ $1-10^7$ CFU/ml ที่ย่อยสลายซัสเตรทชนิด MUG ทำให้เกิดสารเรืองแสงชนิด 4-MU และทำให้เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ขนาดพกพาสามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเครื่องมือการตรวจหาเชื้อ E. coli ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ E.coli ในตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตรได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นเครื่องมือการตรวจหาเชื้อที่ได้พัฒนาระบบการตรวจ E. coli ในครั้งนี้ จึงเป็นการพัฒนาทั้งในส่วนของปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จำเพาะต่อ E. coli และ พัฒนาเครื่องตรวจวัดระดับฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ทำให้สามารถตรวจหาเชื้อ E. coli ในตัวอย่างน้ำได้ถูกต้องและรวดเร็ว และในอนาคตทางคณะที่วิจัยมีแผนจะลองทำไปใช้จริงและทดลองร่วมกับ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร : ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	
งบค่าใช้จ่าย	700,000	700,000	-
งบค่าวัสดุ	300,000	300,000	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์			
รวม	1,000,000	1,000,000	-



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wibool Piyawattanametha, PhD

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Group Leader, Advanced Light Microscopy

1 Soi Chalong Krung1, Ladkrabang, Bangkok, 10520 Thailand, T: +66 (0)2-329-8000

Email: wibool@gmail.com and wibool.pi@kmitl.ac.th

Adjunct Professor, Institute for Quantitative Health Science & Engineering, Michigan State University

220 Trowbridge Rd, East Lansing, MI 48824, USA, T: +1 517-355-1855

Email: piyawatt@msu.edu

EDUCATION

University of California, Los Angeles, USA (2000 – 2004)

Doctor of Philosophy in Electrical Engineering

University of California, Los Angeles, USA (1997 – 1999)

Master of Science in Electrical Engineering

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand (1990 – 1994)

Bachelor of Electronics Engineering (Magna cum laude)

ACCOMPLISHMENTS/AWARDS

- Recognized on Times Higher Education Ranking Website as a notable KMITL Alumni (<https://www.timeshighereducation.com/world-university-rankings/king-mongkuts-institute-technology-ladkrabang>)
- Awarded 3rd prize from the International Contest of Applications in Nano-micro Technology (ICAN) 2018, Hong Kong, China
- Awarded Gold Medal Award for Smart Road surface Monitoring System via Cloud Computing from the 46th International Exhibition of Inventions of Geneva 2018, Geneva, Switzerland
- Awarded Bronze Medal Award for smart emergency vehicle notification APP and traffic clearing system via cloud computing from the 46th International Exhibition of Inventions of Geneva 2018, Geneva, Switzerland

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Awarded Special prize for smart emergency vehicle notification APP and traffic clearing system via cloud computing from Korea Invention Promotion Association 2018
- Awarded Recognition Award for Smart Road surface Monitoring System via Cloud Computing from National Research Council of Thailand 2018, Bangkok, Thailand
- Awarded Recognition Award for smart emergency vehicle notification APP and traffic clearing system via cloud computing from National Research Council of Thailand 2018, Bangkok, Thailand
- Awarded 2nd prize from the International Contest of Applications Nano-micro Technology (ICAN) 2017, Beijing, China
- Awarded Silver Prize in Leaders in Innovation Fellowships 2017, the Royal Academy of Engineering, London, United Kingdom
- Awarded 2nd prize from the International Contest of Applications Nano-micro Technology (ICAN) 2016, Paris, France
- Awarded Leaders in Innovation Fellowships 2017 from the Royal Academy of Engineering, London, United Kingdom
- Awarded the Newton Fund Researcher Links in 2015 from the British Council, United Kingdom
- Awarded 3rd prize from the International Contest of Applications Nano-micro Technology (ICAN) 2015, Anchorage, Alaska, USA
- Awarded Fraunhofer-Bessel Research Award in 2014 from the Alexander von Humboldt Foundation, Berlin, Germany
- Awarded Young Scientists Award 2013 from the World Economic Forum (WEF), Geneva, Switzerland– given to top 40 young scientists under the age of 40 who plays transformation role in integrating scientific knowledge and technological innovation to improve the state of the world
- Awarded an excellent paper award from the International Workshop on Image Electronics and Visual Computing (IIEJ) 2014, Bangkok, Thailand
- Awarded 2nd prize from True Innovation, Bangkok, Thailand 2012
- Awarded Erasmus Mundus Grant 2012 from the European Commission
- Awarded 2nd prize from the Global Entrepreneurship Competition (GEC) 2011, Barcelona, Spain
- Outstanding paper award from Transducers 2011, Beijing, China, 2011
- Awarded 1st prize from the Global Social Venture Competition (GSVC) 2011, Bangkok, Thailand
- Achieved over 2600 citations with h-index of 25
- Served as a Director of Advanced Imaging Research Center at the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (2010-14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Contributed to seven book chapters and filed 5 patents in micro- and nano-systems and biomedical imaging technology
- Presented at over 300 professional meetings including invited talks at various world class research institutes
- Served as a principal investigator (PI) in the following funding agencies since 2009 (US\$ 3+ million):
 - National Research Council (NRC)
 - Chulalongkorn University
 - National Science and Technology Development Agency (NSTDA)
 - Office of the Higher Education Commission (OHEC)
 - Thailand Research Fund (TRF)
- Served as a founding member and an executive committee member of the Global Young Academy (GYA) and Thai Young Scientists Academy (TYSA) in 2010
- Elevated to be senior members of The Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) in 2010, The Optical Society of America (OSA) in 2011, and The Society of Photo-Optical Instrumentation Engineering (SPIE) in 2012
- Served as a co-investigator in:
 - National Cancer Institute (NCI), USA-funded Network for Translational Research Award (US\$ 17+ million) to develop an endoscopic confocal microscope, ultrasound transducers, and nanoparticle-based wide-field spectral imaging devices, for molecularly-targeted disease detection in the gastrointestinal tract from 2005 to 2013
 - Howard Hughes Medical Institute (HHMI), USA-funded for Deep Brain Imaging Award (US\$ 5+ million) to develop ultraportable 2-photon microendoscopes for mouse brain imaging from 2006 to 2010
- Served as a technical and program reviewer for:
 - Department of Defense (DOD), USA
 - National Institutes of Health (NIH), USA
 - National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand
 - Thailand Research Fund (TRF)
- Served as a technical program committee member and a technical program chair for:
 - SPIE Photonics West Optical MEMS and Miniaturized Systems Conference from 2007 until present (chair)
 - IEEE NANOMED Conference in 2012 until present (chair)
 - IEEE CYBER Conference in 2012 (chair)
 - International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM) in 2016 (chair)
 - IEEE Optical MEMS and Nanophotonics (OMN) Conference from 2015 until present (committee)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- IEEE Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS) from 2012 until present (committee)
- International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE) from 2008 - 2013
- Served as a co-editor and a technical reviewer for:
 - Journal of Micro/Nanolithography, MEMS and MOEMS (JM3) in 2014 (guest editor)
 - PLOS ONE from 2012 to present (reviewer)
 - International Journal of Cancer (IJC) from 2011 until present (reviewer)
 - Journal of Biomedical Science and Engineering (JBISE) from 2008 until present (reviewer)
 - IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (JSTQE) from 2006 until present (reviewer)
 - IEEE Journal of Microelectromechanical Systems (JMEMS) from 2005 until present (reviewer)
 - IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing from 2012 until present (reviewer)
 - Springer International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery 2012 until present (reviewer)
- Authored and co-authored over 80 manuscripts published in peer-reviewed conference proceedings and journals such as *IEEE*, *OSA*, *SPIE*, Elsevier, and *Nature Publishing Group*
- Taught classes or gave lectures at various institutes (UCLA, Stanford University, HKUST, TECHNION, Peking University, National Taiwan University, National Tsing Hua University, Tokyo University, etc.)

PROFESSIONAL EXPERIENCE

- | | |
|--|------------------|
| <i>Michigan State University</i> | (2018 – Present) |
| <i>Adjunct Professor, Institute for Quantitative Health Science & Engineering</i> | |
| <i>King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)</i> | (2014 – Present) |
| <i>Group Leader of Light Microscopy, Vice Director of the KMITL Research and Innovation Division (2015-16)</i> | |
| <i>Fraunhofer IPMS</i> | (2014 – Present) |
| <i>Technology Consultant</i> | |
| <i>King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)</i> | (2014 – 2016) |
| <i>Vice Director of Research and Innovation</i> | |
| <i>National Electronics and Computer Technology Center (NECTEC)</i> | (2009 – 2014) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Group Leader of Light Microscopy

Chulalongkorn University, Faculty of Medicine

(2009 – Present)

Director of Advanced Imaging Research (AIR) Center

Adjunct Professor, Department of Internal Medicine

Stanford University

(2007 – 2009)

Physical Science Research Associate

Departments of Applied Physics, Biology, Electrical Engineering, and Pediatrics

- Demonstrated the first clinical use of a novel handheld Dual-Axes Confocal microscope (10-mm diameter) in live human patients in skin, with the ultimate goal to examine for monitoring sub-mucosa cancer progression and drug delivery through skin
- Demonstrated the first Dual-Axes Confocal endoscope (< 5 mm diameter) for GI tract imaging
- Demonstrated the first use of MEMS based portable two-photon fluorescence microendoscope (< 3.5 grams) for deep brain imaging in live awaking mice to correlate their behaviors to brain activities

Stanford University

(2005 – 2006)

Post-doctoral research scholar

Departments of Applied Physics, Biology, Electrical Engineering, and Pediatrics

- Led a team of four to develop two novel miniaturized medical microendoscope and endoscope by combining MEMS, micro-optics, and beam scanning microscopy. Those microendoscopes/endoscopes are:
 - Two-photon microendoscope: to be used in small animal imaging
 - Dual-axes confocal endoscope: to be used in human patients
- Co-developed the first compact 2-D MEMS scanners with high speed and large angular rotation for endoscopic imaging applications
- Optimized micro-fabrication process of MEMS scanners to increase production yield, production efficiency, and increase scanner performance
- Lectured in MEMS/Optics classes at Stanford University

University of California, Los Angeles

(1997 – 2004)

Graduate student researcher

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Demonstrated the first 2-D MEMS scanners based for an Ultrahigh Resolution Optical Coherence Tomography (UHR-OCT) imaging endoscope
- Designed, fabricated, and demonstrated the first 2-D MEMS scanners with electrostatic angular vertical comb (AVC) actuators based on surface and bulk micromachined techniques for endoscopic imaging application
- Demonstrated the first MEMS based Non-Interferometric Differential Confocal Scanning Optical Microscope
- Co-developed the first linearization control method for electrostatically actuated surface micromachined 2-D scanner
- Lectured in a MEMS fabrication/design class to undergraduate and graduate students at UCLA

Schlumberger Limited

(1994 – 1997)

Field Engineer (FE)

- Provided oil and gas reservoir evaluation engineering services by using electrical wireline logging technology to localize the hydrocarbon layers of the subsurface reservoir
- Managed and led a team of 4 members to provide these services
- Responsible for engineering services valued at \$300,000 - \$500,000 per month
- Collected and analyzed technical data and coordinated engineering project activities with major clients e.g. Exxon-Mobil, Unocal, and TOTAL

Research

1. Publication refereed

a. Journal

- [1] I. L. Jung, D. Lopez, Z. Qiu, and W. Piyawattanametha, "2-D MEMS Scanner for Handheld Mutispectral Dual-Axis Confocal Microscopes," *IEEE Journal of Micro Electromechanical Systems (JMEMS)*, May 24, 2018, vol. PP, no. 99, pp. 1-8.
- [2] Z. Qiu and W. Piyawattanametha, "New Endoscopic Imaging Technology Based on MEMS Sensors and Actuators," *Micromachines* 2017, 8(7), 210; doi:10.3390/mi8070210.
- [3] Z. Qiu and W. Piyawattanametha, "MEMS-Based Medical Endomicroscopes," *Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (JSTQE)*, Vol.21, No.4, August 16, 2015, DOI 10.1109/JSTQE.2015.2389530.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [4] N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, R. Jolivot, U. Jarujareet, K. Plaimas, P. Bhattarakosol, S. Patumraj, and W. Piyawattanametha, "Novel p16 binding peptide development for p16-overexpressing cancer cell detection using phage display," *Journal of Peptide Science*, Vol. 21, Issue 4, April 2015, pp. 265-273.
- [5] Z. Qiu and W. Piyawattanametha, "MEMS based fiber optical microendoscopes," *Displays*, Vol. 37, April 2015, pp 41-53.
- [6] C. B. Wong, B. Y. Khoo, S. Sasidharan, W. Piyawattanametha, S. Kim, N. Khemthongcharoen, M. Y. Ang, L. O. Chuah, and M. T. Liong, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by crude and fractionated extract from lactic acid bacteria," *Beneficial Microbes*, March 2015, 1;6(1):129-39.
- [7] C. Zhao, Y. K. Lee, R Xu, C. Liang C, D. Y. Liu, W. Ma, W. Piyawattanametha, Y. Zohar, "Isolation of circulating tumor cells under hydrodynamic loading using microfluidic technology," *Advances in Mechanics*, 2014, 44: 201412.
- [8] N. Khemthongcharoen, S. Rattanavarin, R. Jolivot, and W. Piyawattanametha, "Advances in imaging probes and optical microendoscopic imaging techniques for early in vivo cancer assessment (invited paper)," *Journal of Advanced Drug Delivery Reviews*, July 30, 2014, Vol. 74, pp. 53-74.
- [9] K. Kongsmak, P. Pungpit, M. R. Kano, S. Komai, W. Piyawattanametha, and O. Phanraksa, "Perceptions of Research Excellence in Thailand and Japan," *Science Technology and Innovation Policy Review*, ISSN: 2093-3053, October 2013, Vol. 4, No. 2.
- [10] W. Piyawattanametha, H. Ra, Z. Qiu, S. Friedland, J. T. C. Liu, K. Loewke, G. S. Kino, O. Solgaard, T. D. Wang, M. J. Mandella, and C. H. Contag, "*In Vivo* Near-infrared Dual-Axis Confocal Microendoscopy in the Human Lower Gastrointestinal Tract," *Journal of Biomedical Optics* 17(2), February 2012, 021102:1-4.
- [11] C. L. Hoy, O. Ferhanoglu, M. Yildirim, W. Piyawattanametha, H. Ra, O. Solgaard, and A. Ben-Yakar, "Optical design and imaging performance testing of a 9.6-mm diameter femtosecond laser microsurgery probe," *Optics Express* 19, 10536 - 10552 (2011).
- [12] K. Loewke, D. Camarillo, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, C. H. Contag, S. Thurn, and K. Salisbury, "*In Vivo* Micro-Image Mosaicing," *The IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, January 2011, Vol. 58, No. 1, pp. 159-171.
- [13] W. Piyawattanametha, H. Ra, E. Gonzalez, M. J. Mandella, G. S. Kino, O. Solgaard, D. Leake, R. L. Kaspar, A. Oro, and C. H. Contag, "*In vivo* imaging of human and mouse skin with a dual-axis confocal fluorescence microscope," *Journal of Investigative Dermatology*, January 2011, 131, 1061-1066.
- [14] J. T. C. Liu, M. J. Mandella, N. O. Loewke, H. Haerberle, H. Ra, W. Piyawattanametha, O. Solgaard, G. S. Kino, and C. H. Contag, "Micromirror-scanned dual-axis confocal microscope utilizing a gradient-index relay lens for image guidance during brain surgery," *Journal of Biomedical Optics*, Aril 2010, vol. 15, pp. 026029.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [15] W. Piyawattanametha and T. D. Wang, "MEMS-Based Dual Axes Confocal Microendoscopy (Invited Paper)," *The IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (JSTQE)*, July-August 2010, Vol. 16, Issue 4, pp. 804-814.
- [16] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, K. Loewke, T. D. Wang, G. S. Kino, O. Solgaard, and C. H. Contag, "3-D Near Infrared Fluorescence Imaging using a MEMS-based Miniature Dual-Axes Confocal Microscope," *The IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics (JSTQE)*, Sept-Oct 2009, Vol. 15, Issue 5, pp. 1344-1350.
- [17] W. Piyawattanametha, E. D. Cocker, L. D. Burns, R. P. J. Barretto, J. C. Jung, H. Ra, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "*In vivo* brain imaging using a portable 2.9 gram two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror," *Optics Letters*, August 1, 2009, Vol. 34, No. 15, pp. 2309-2311.
- [18] E. Gonzalez, H. Ra, R. P. Hickerson, Q. Wang, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, G. S. Kino, D. Leake, A. A. Avilion, O. Solgaard, T. C. Doyle, C. H. Contag, and R. L. Kaspar, "siRNA silencing of keratinocyte-specific GFP expression in a transgenic mouse skin model," *Gene Therapy* (2009), Vol. 16, May 28, 2009, pp. 963-972.
- [19] E. Gonzalez, H. Ra, R. P. Hickerson, Q. Wang, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, G. S. Kino, D. Leake, A. A. Avilion, O. Solgaard, T. C. Doyle, C. H. Contag, and R. L. Kaspar, "Characterization of a transgenic GFP mouse skin model for development of siRNA delivery technologies," *Journal of Investigative Dermatology*, April 2009, 129, S90.
- [20] C. L. Hoy, N. J. Durr, P. Chen, W. Piyawattanametha, H. Ra, O. Solgaard, and A. Ben-Yakar, "Miniaturized probe for femtosecond laser microsurgery and two-photon imaging," *Optics Express*, Vol. 16 (2008), Issue 13, pp. 9996-10005.
- [21] H. Ra, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, P. L. Hsiung, J. Hardy, T. D. Wang, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "Three-dimensional *in vivo* imaging by a handheld dual-axes confocal microscope," *Optics Express*, Vol. 16 (2008), Issue 10, pp. 7224-7232.
- [22] H. Ra, W. Piyawattanametha, Y. Taguchi, D. Lee, M. J. Mandella, G. S. Kino, C. H. Contag, and O. Solgaard, "Two-dimensional MEMS scanner for dual-axes confocal microscopy," *IEEE Journal of Micro Electromechanical Systems (JMEMS)*, Vol. 16, August 2007, pp. 969-976.
- [23] A. D. Aguirre, P. R. Herz, Y. Chen, J. G. Fujimoto, W. Piyawattanametha, L. Fan, and M. C. Wu, "Two-axis MEMS Scanning Catheter for Ultrahigh Resolution Three-dimensional and *En Face* Imaging," *Optics Express*, Vol. 15 (2007), Issue 5, pp. 2445-2453.
- [24] J. T. C. Liu, M. J. Mandella, H. Ra, L. K. Wong, P. Hsiung, T. D. Wang, G. S. Kino, W. Piyawattanametha, C. H. Contag, and O. Solgaard, "A miniature near-infrared dual-axes confocal microscope utilizing a two-dimensional MEMS scanner," *Optics Letters*: Vol. 32 (2006), Issue 3, pp. 256-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [25] W. Piyawattanametha, R. P. J. Barretto, T. H. Ko, B. A. Flusberg, E. D. Cocker, H. Ra, D. Lee, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "Fast-scanning two-photon fluorescence imaging based on a microelectromechanical systems two-dimensional scanning mirror," *Optics Letters*, Vol. 31, No. 12, July 1, 2006, pp. 2018-2020.
- [26] B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha, J. C. Jung, E. L. M. Cheung, and M. J. Schnitzer, "Fiber-optic Fluorescence Imaging (Invited Paper)," *Nature Methods*: 2, 941 - 950 (2005).
- [27] W. Piyawattanametha, P. Patterson, D. Hah, H. Toshiyoshi, and M. C. Wu, "Surface- and Bulk- Micromachined Two Dimensional Scanner Driven by Angular Vertical Comb Actuators," *IEEE Journal of Micro Electromechanical Systems (JMEMS)*, Vol. 14, Issue 6, December 2005, pp.1329 - 1338.
- [28] M. Fujino, Pamela R. Patterson, H. Nguyen, W. Piyawattanametha, and M. C. Wu, "Monolithically Cascaded Micromirror Pair Driven by Angular Vertical Combs for Two-Axis Scanning," *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, Vol. 10, No. 3, May/June 2004, pp. 492-497.
- [29] H. Nguyen, D. Hah, P. R. Patterson, R. Chao, W. Piyawattanametha, and M. C. Wu, "Angular Vertical Comb Driven Tunable Capacitor with High Tuning Capabilities," *IEEE Journal of Micro Electromechanical Systems (JMEMS)*, June 2004, Vol. 3, No. 3, pp. 406-413.
- [30] H. Toshiyoshi, W. Piyawattanametha, C. -T. Chan, and M. C. Wu, "Linearization of Electrostatically Actuated Surface Micromachined 2-D Optical Scanner," *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems (JMEMS)*, June 2001, Vol. 10, No. 2, pp. 205-214.

b. Conference

- [1] W. Piyawattanametha, "Virtual biopsies with handheld dual-axis confocal microendoscope," *World Congress on Medical Physics & Biomedical Engineering*, Prague, Czech Republic, June 3-8, 2018.
- [2] W. Piyawattanametha, "Fiber-optical microendoscopy based on MEMS scanning technology (invited)," *Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-nano Technology 2018*, Hongkong, China, June 24-27, 2018.
- [3] W. Piyawattanametha, "Multi-spectral MEMS based dual-axis microendoscope (invited)," *IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS)*, Singapore, April 22-26, 2018.
- [4] W. Piyawattanametha, "Multi-spectral MEMS scanner based dual-axis microendoscope (invited)," *Focus on Microscopy*, Singapore, March 25-28, 2018.
- [5] W. Piyawattanametha, "The Global State of Young Scientists in ASEAN: What is the next step? (invited)," *The International Workshop on Asian Young Academies*, The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel, February 11-13, 2018.
- [6] Z. Qiu, N. Loewke, W. Piyawattanametha, I. W. Jung, T. Teraphongphom, R. Ertsey, F. Schonig, S. Rogalla, S. Friedland, M. J. Mandella, D. Lopez, E. Rosenthal, and C. Contag, "MEMS based multi-spectral dual-axis confocal microendoscope for clinical applications (invited)," *Photonics West 2018*, San Francisco, CA, USA,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

January 30 - February 1, 2018.

- [7] T. Marumo, G. Murashova, D. Agnew, F. Schonig, M. J. Mandella, W. Piyawattanametha, Z. Qiu, M. Dantus, and C. H. Contag, "Design of MEMS based handheld multi-photon and second harmonic generation imaging system for early detection and imaging guided surgery of oral cancer (invited)," Photonics West 2018, San Francisco, CA, USA, January 30 - February 1, 2018.
- [8] S. Suwan and W. Piyawattanametha, "A handheld Escherichia coli Detection System," International Workshop on Advanced Image Technology, Chiangmai, Thailand, January 7-10, 2018.
- [9] M. Dumripanachod and W. Piyawattanametha, "Automated Paptest Diagnosis with Artificial Neural Network," The 2017 International Conference on Embedded Systems and Intelligent Technology a Theme on "Smart Embedded Systems for Industry 4.0," Bangkok, Thailand, August 2-4, 2017.
- [10] K. Phasuk, C. Pipitsombat, S. Pattanasak, and W. Piyawattanametha, "A fast Escherichia Coli Detector for Water Inspection," The 16th International Conference on Environment Engineering, Science, and Management, Bangkok, Thailand, May 17-18, 2017.
- [11] K. Phasuk, S. Suwan, and W. Piyawattanametha, "Development of E. coli detection," The 5th Higher Education Research Promotion Congress, Udonthani, Thailand, March 2-4, 2017.
- [12] C. Pipitsombat, K. Phasuk, S. Suwan, and W. Piyawattanametha, "Evaluation of rapid detection system for Escherichia coli in water samples," The 8th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2016), Luang Prabang, Lao People's Democratic Republic, December 6-8, 2016.
- [13] M. Dumripanachod and W. Piyawattanametha, "Wide-field high-resolution fiber bundle based Endomicroscope for Cervical epithelium cells imaging," The 8th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2016), Luangprbang, Lao People's Democratic Republic, December 6-8, 2016.
- [14] M. Dumripanachod and W. Piyawattanametha, "Centralized Pap Test Diagnosis with Artificial Neural Network and Internet of Things," The 10th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NanoMed), Macau, China, October 30 - November 2, 2016.
- [15] S. Pattanasak and W. Piyawattanametha, "Virtual biopsies with a MEMS scanner based confocal microscope," IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS) 2016, Matsushima, Sendai, Japan, April 17-20, 2016.
- [16] W. Piyawattanametha, "A handheld confocal microscope for 3D biopsies," Photonics West 2016, San Francisco, CA, USA, February 13-18, 2016.
- [17] M. Dumripanachod and W. Piyawattanametha, "A Fast Depixelation Method of Fiber Bundle Image for an Embedded System," The 7th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2015), Pattaya, Thailand, November 25-27, 2015.
- [18] C. Pipitsombat and W. Piyawattanametha, "A Portable Escherichia Coli Detection Platform for Water Inspection," The 7th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2015), Pattaya, Thailand, November 25-27, 2015.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [19] S. Pattanasak and W. Piyawattanametha, "Three-dimensional microscopy of biopsies with a handheld confocal microscope," Microscopy Conference 2015, Gottingen, Germany, September 6-11, 2015.
- [20] W. Piyawattanametha, "Three-dimensional microscopy of biopsies with a handheld confocal microscope," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2015, Jerusalem, Israel, August 2-6, 2015.
- [21] S. Pattanasak and W. Piyawattanametha, "Light microendoscopy with MEMS technology (invited)," IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS) 2015, Xian, China, April 7-11, 2015.
- [22] C. Pipitsombat and W. Piyawattanametha, "Fiber-optical endoscopy with MEMS scanner technology," Photonics West 2015, San Francisco, CA, USA, January 31 – February 5, 2015.
- [23] W. Piyawattanametha, "Portable holographic imager for biological samples," The 7th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2014), Fukuoka, Japan, November 26-28, 2014.
- [24] W. Piyawattanametha, "High-resolution Imaging with MEMS based handheld confocal microscope," the International Workshop on Image Electronics and Visual Computing (IIEEJ), Samui, Thailand, October 7-10, 2014.
- [25] W. Piyawattanametha, "Confocal microendoscopy (invited)," International Coastal Biology Congress 2014, Yantai, China, September 26-30, 2014.
- [26] W. Piyawattanametha, "MEMS based fiber-optical microendoscopy," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2014, Glasgow, Scotland, August 17-21, 2014.
- [27] W. Piyawattanametha, "Image Mosaicing Technique and Real-Time Imaging with MEMS based Handheld Confocal Microscope (invited)," The 18th International Computer Science and Engineering Conference (ICSEC 2014), Khon Kaen, Thailand, July 30 – August 1, 2014.
- [28] W. Piyawattanametha, "Light microendoscopy for early cancer detection (invited)," The 1st International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM 2014), Penang, Malaysia, May 27-29, 2014.
- [29] W. Piyawattanametha, "Light microendoscopy (invited)," The 2nd Optical Science of Dynamically Correlated Electrons (DYCE 2013), Kashiwa, Japan, December 17-18, 2013.
- [30] W. Piyawattanametha, "A review: Endoscopic imaging probe based on MEMS technology for nanomedicine (invited)," The 7th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NanoMed) 2013, Phuket, Thailand, November 10-13, 2013.
- [31] W. Piyawattanametha, "Advance in Light Microendoscopy (invited)," The 6th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON 2013), Krabi, Thailand, October 23-25, 2013.
- [32] W. Piyawattanametha, "A review of MEMS scanner based endoscopic optical imaging probe (invited)," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2013, Kanazawa, Japan, August 18-22, 2013.
- [33] S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, N. Khemthongcharoen, U. Jarujareet, R. Jolivot, I. L. Jung, D. Lopez, M. J. Mandella and W. Piyawattanametha, "MEMS multispectral confocal probe," the 16th International conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems (Transducers 2013), Barcelona, Spain, June 16-20, 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [34] P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, N. Khemthongcharoen, U. Jarujareet, R. Jolivot, I. L. Jung, D. Lopez, and W. Piyawattanametha, "Handheld multispectral dual-axis confocal microscope for cervical cancer screening," Photonics West 2013, San Francisco, CA, USA, February 2-7, 2013.
- [35] N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, U. Jarujareet, S. Niruthisard, W. Piyawattanametha, "Phage-displayed p16INK4a binding peptide scanning from phage display library as a HPV-related cancer cells tracer," Molecular Medicine Conference 2012 (MMC), Bangkok, Thailand, December 19-22, 2012.
- [36] P. Sankatumvong, P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, I. L. Jung, and W. Piyawattanametha, "Characteristics of MEMS scanners with different driving bias," IEEE International Conference on Electron Devices and Solid State Circuit (EDSSC), Bangkok, Thailand, December 3-5, 2012.
- [37] N. Khemthongcharoen, A. Ruangphacha, W. Piyawattanametha, "Phage Display Specific p16INK4a Binding Peptide for Ex Vivo Cancer Cells Imaging," The 6th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NanoMed 2012), Bangkok, Thailand, November 4-7, 2012.
- [38] A. Ruangphacha, N. Khemthongcharoen, W. Piyawattanametha, "Homology modeling characterization of CDK4-roscovitine complexes," 11th International Conference on Bioinformatics (InCoB), Bangkok, Thailand, October 3-5, 2012.
- [39] S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, R. Jolivot, I. W. Jung, D. López, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "Handheld Multispectral Confocal Microscope for Cervical Cancer Diagnosis," IEEE International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics, Banff, Alberta, Canada, pp. 42-42, August 6-9, 2012.
- [40] I. W. Jung, S. Rattanavarin, S. Sarapukdee, M. J. Mandella, W. Piyawattanametha, "2-D MEMS scanner for handheld multispectral confocal microscopes," IEEE International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics, Banff, Alberta, Canada, pp. 238-239, August 6-9, 2012.
- [41] S. Rattanavarin, P. Sarapukdee, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "Handheld Cervical Confocal Microscope Based on a MEMS Scanner," The 6th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT 2012), Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- [42] U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, W. Piyawattanametha, "Micro Objects Detection by a Portable Lensless Imaging Platform", The 6th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT), Nanjing, China, July 8-11, 2012.
- [43] P. Sarapukdee, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, N. Khemthongcharoen, A. Ruangpracha, M. J. Mandella, and W. Piyawattanametha, "MEMS-Based Handheld Dual-Axis Confocal Microscope for Cervix Cancer Screening," International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON 2012), Hua Hin, Thailand, May 16-18, 2012.
- [44] W. Piyawattanametha, "Light microendoscopy," Nano-Thailand 2012, Khon Kaen, Thailand, April 9-12,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2012.
- [45] U. Jarujareet and W. Piyawattanametha, "2D Correlation Map Based Object Detection in Digital In-line Holography," Nano-Thailand 2012, Khon Kaen, Thailand, April 9-12, 2012.
- [46] P. Wongsawatwuriya, N. Khemthongcharoen, and W. Piyawattanametha, "Video Mosaicing for Real-time Field of View Enhancement," IEEE Robotics and Biomimetics (ROBIO), Phuket Island, Thailand, December 7-11, 2011.
- [47] W. Piyawattanametha, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "Cortical blood flow imaging with a portable MEMS based 2-photon fluorescence microendoscope," the 15th International conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems (Transducers 2011), Beijing, China, June 10-14, 2011.
- [48] T. Chantakien, P. Raphisak, I. Kumazawa, and W. Piyawattanametha, "MEMS-based handheld single-axis confocal microscope design and experiment," *Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON), 2011 8th International Conference on*, vol., no., pp.38-41, May 17-19, 2011
- [49] W. Piyawattanametha and M. J. Schnitzer, "Cortical blood flow imaging with a portable MEMS based 2-photon fluorescence microendoscope," IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS) 2011, Kaohsiung, Taiwan, February 20-23, 2011.
- [50] T. Chantakien, P. Raphisak, I. Kumazawa, and W. Piyawattanametha, "Design and simulate of MEMS based confocal microscope probes," Information and Communication Technology for Embedded Systems (ICTES)," 2011 2nd International Conference, January 27-29, 2011.
- [51] W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, H. Ra, J. T. C. Liu, S. Friedland, Z. Qiu, G. S. Kino, T. D. Wang, O. Solgaard, and C. H. Contag, "In Vivo Skin Microscopy," SPIE Photonics West 2011, Endoscopic Microscopy V, San Francisco, CA, January 25-29, 2011.
- [52] W. Piyawattanametha, "Smart microsystems for disease diagnostics," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2010, Sapporo, Japan, August 9-13, 2010.
- [53] W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, H. Ra, J. T. C. Liu, S. Friedland, Z. Qiu, G. S. Kino, T. D. Wang, O. Solgaard, and C. H. Contag, "Dual-Axes Confocal Microendoscopy of Gastrointestinal Tract," SPIE Photonics West 2010, Endoscopic Microscopy V, San Francisco, CA, January 23-28, 2010.
- [54] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, C. H. Contag and O. Solgaard, "From Bench to Bedside with Advanced Dual-Axes Confocal Microendoscope," IEEE Microelectromechanical Systems (MEMS), Hong Kong, China, January 24-28, 2010.
- [55] W. Piyawattanametha and M. J. Mandella, "In vivo Imaging with MEMS based Confocal Microscope," IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS), Xiamen, China, January 20-23, 2010, pp. 146.
- [56] W. Piyawattanametha, "Advanced Microendoscopy with Miniaturized Confocal Imaging Systems," IEEE Photonics Society Winter Topicals, Majorca, Spain, January 11-13, 2010.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [57] W. Piyawattanametha, H. Ra, and M. J. Mandella, "In vivo Real Time Imaging by a Micromachined based Dual-axes Confocal Microscope," the 3rd IEEE International NanoElectronics Conference (INEC) 2010, Hong Kong, China, January 3-8, 2010, pp. 32.
- [58] W. Piyawattanametha, "3-D in vivo imaging with a miniature dual-axes confocal fluorescence microscope," The 4th IEEE International Symposium on Biomedical Engineering, Plaza Athenee, Bangkok, December 14-18, 2009.
- [59] "In vivo real time imaging by a micromachined based confocal microscope," the 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MTAS), Jeju, Korea, November 1-5, 2009.
- [60] W. Piyawattanametha, E. D. Cocker, L. D. Burns, R. P. J. Barretto, J. C. Jung, H. Ra, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "A Portable MEMS Based Two-photon Fluorescence Microendoscope for Three-dimensional *in vivo* Imaging," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2009, Clearwater Beach, Florida, August 17-20, 2009.
- [61] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, E. Gonzalez, R. L. Kaspar, G. S. Kino, C. H. Contag, and O. Solgaard, "Dual-Axes Confocal Microscopy for Human Skin Clinical Imaging," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2009, Clearwater Beach, Florida, August 17-20, 2009.
- [62] W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, R. Kaspar, and C. H. Contag, "In vivo microscopy in mouse models of monogenic skin disease," H. Ra, E. Gonzalez, World Molecular Imaging Congress, Montreal, Canada, September 23-26, 2009.
- [63] "Real-time in Vivo Cancer Diagnosis with a Microelectromechanical Systems (MEMS) Based Handheld Dual-Axes Confocal Microscope (*Invited Talk*)," the 4th Medical Biotech Forum 2009, Dalian, China, August 7-11, 2009, pp. 248.
- [64] H. Ra, E. Gonzalez, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, R. Kaspar, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "Sequential *in vivo* Molecular Imaging with a Dual-Axes Confocal Microscope," Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), Baltimore, MD, June 1-6, 2009.
- [65] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, J. T. C. Liu, E. Gonzalez, R. Kaspar, G. S. Kino, O. Solgaard, and C. H. Contag, "In vivo clinical and intravital imaging with MEMS based Dual-Axes Confocal Microscopes," Optical Society of America, The OSA topical meeting in Novel Techniques in Microscopy, Vancouver, BC, Canada, April 27-29, 2009.
- [66] H. Ra, W. Piyawattanametha, E. Gonzalez, R. Kaspar, M. J. Mandella, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "In vivo Intravital Imaging with a Dual-Axes Confocal Microscope in Skin," IEEE Lasers and Electro-Optics Society (LEOS) Annual Meeting, Newport Beach, California, November 9-13, 2008, pp. 35-36.
- [67] W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, H. Ra, J. T. C. Liu, E. Garai, G. S. Kino, O. Solgaard, and C. H. Contag, "MEMS based dual-axes confocal clinical endoscope for real time *in vivo* imaging," IEEE International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics, Freiburg, Germany, August 11-14, 2008, pp. 42-43.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [68] C. L. Hoy, N. J. Durr, P. Chen, D. K. Smith, T. L. Larson, W. Piyawattanametha, H. Ra, B. Korgel, K. Sokolov, O. Solgaard, and A. Ben-Yakar, "Two-photon luminescence imaging using a MEMS-based Miniaturized Probe," Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), San Jose, CA, May 4-9, 2008, CThG5.
- [69] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, C. B. Du, C. H. Contag, G. S. Kino, O. Solgaard, and T. D. Wang, "Three-dimensional in-vivo imaging with a miniature dual-axes confocal fluorescence microscope," SPIE Photonics West 2008, Endoscopic Microscopy III (6851-13), San Jose, CA, January 19-24, 2008.
- [70] K. E. Loewke, D. Camarillo, W. Piyawattanametha, and K. Salisbury, Jr., "Real-time image mosaicing with a dual-axes confocal microscope," SPIE Photonics West 2008, Endoscopic Microscopy III, Vol. 6851, pp. 68510-19, San Jose, CA, January 19-24, 2008.
- [71] C. L. Hoy, N. J. Durr, P. Chen, W. Piyawattanametha, H. Ra, O. Solgaard, and A. Ben-Yakar, "A Miniature microscope for two-photon imaging and femtosecond laser surgery," Frontiers in Optics (FIO), September 16, 2007, San Jose, CA.
- [72] W. Piyawattanametha, E. D. Cocker, R. P. J. Barretto, B. A. Flusberg, J. C. Jung, H. Ra, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "A Portable Two-photon Fluorescence Microendoscope based on a Two-dimensional Scanning Mirror," IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics, Hualien, Taiwan, August 12-16, 2007, pp. 6-7.
- [73] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, J. T. C. Liu, L. K. Wong, C. B. Du, T. D. Wang, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "Three-dimensional *in vivo* Real Time Imaging by a Miniature Dual-axes Confocal Microscope based on a Two-dimensional MEMS Scanner," the 14th International conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems (Transducers 2007 & Eurosensors XXI), Lyon, France, June 10-14, 2007, pp. 439-442.
- [74] H. Ra, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella, J. T. C. Liu, L. K. Wong, T. D. Wang, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "Three-Dimensional *in vivo* Reflectance and Fluorescence Imaging by a Handheld Dual-Axes Confocal Microscope," the Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), Baltimore, MD, May 7-11, 2007, CTuEE1.
- [75] W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella, J. T. C. Liu, L. K. Wong, C. B. Du, T. D. Wang, C. H. Contag, G. S. Kino, and O. Solgaard, "MEMS Based Dual-Axes Confocal Handheld Microscope for *in vivo* Imaging," SPIE Photonics West 2007, Endoscopic Microscopy III (6432), San Jose, CA.
- [76] M. J. Mandella, J. T. C. Liu, W. Piyawattanametha, H. Ra, P. L. Hsiung, L. K. Wong, T. D. Wang, C. H. Contag, and G. S. Kino, "Compact optical design for dual-axes confocal endoscopic microscopes," SPIE Photonics West 2007, Endoscopic Microscopy III (6443), San Jose, CA.
- [77] W. Piyawattanametha, B.A. Flusberg, R.P.J. Baretto, J.C. Jung, T.H. Ko, E.D. Cocker, H. Ra, D. Lee, O. Solgaard, and M.J. Schnitzer, "Toward portable two-photon fluorescence micro-endoscopy using a two-dimensional

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- microelectromechanical (MEMS) scanning mirror," 2007 SPIE Photonic West Conference, Multiphoton Microscopy in the Biological Sciences VII, San Jose, CA, January 22, 2007.
- [78] H. Ra, W. Piyawattanametha, Y. Taguchi, and O. Solgaard, "Reflectance and fluorescence imaging with a MEMS dual-axes confocal microscope (*Invited Paper*)," Photonics West 2007, Endoscopic Microscopy III (6466), San Jose, CA.
- [79] W. Piyawattanametha, J. T. C. Liu, M. J. Mandella, H. Ra, L. K. Wong, P. Hsiung, T. D. Wang, G. S. Kino, and O. Solgaard, "MEMS Based Dual-axes Confocal Reflectance Handheld Microscope for *in vivo* Imaging," IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS, Montana, USA, August 21-24, 2006.
- [80] H. Ra, W. Piyawattanametha, Y. Taguchi, and O. Solgaard, "Dual-axes Confocal Fluorescence Microscopy with a Two-dimensional MEMS Scanner," IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS, Montana, USA, August 21-24, 2006.
- [81] H. Ra, Y. Taguchi, D. Lee, W. Piyawattanametha, and O. Solgaard, "Two-dimensional MEMS Scanner for Dual-Axes Confocal *in vivo* Microscopy," IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) 2005, Istanbul, Turkey, January 22-26, 2006.
- [82] W. Piyawattanametha, R. P. J. Barretto, T. H. Ko, B. A. Flusberg, E. D. Cocker, H. Ra, D. Lee, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, "Fast-scanning two-photon fluorescence imaging using a microelectromechanical systems two-dimensional scanning mirror," Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2006, Long Beach, CA.
- [83] A. D. Aguirre, P. R. Herz, Y. Chen, J. G. Fujimoto, W. Piyawattanametha, L. Fan, S. Hsu, M. Fujino, and M. C. Wu, "Ultra-high resolution OCT imaging with a two-dimensional MEMS scanning endoscope," in Photonics West 2005, Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III, Session 11, 5692-49.
- [84] L. S. Fan, W. Piyawattanametha, M. Fujino, and M. C. Wu, "Endoscopic three-dimensional OCT imaging with MEMS scanner (*Invited Paper*)," Univ. of California, Los Angeles; A. D. Aguirre, P. R. Herz, Y. Chen, J. G. Fujimoto, Massachusetts Institute of Technology, SPIE Photonics West 2005, MOEMS and Miniaturized Systems V, Session 5, 5719-20.
- [85] P. R. Patterson, D. Hah, M. Fujino, W. Piyawattanametha, and M. C. Wu, "Scanning micromirrors: an overview (*Invited Paper*)," Optomechatronic Micro/Nano Components, Devices, and Systems, Optics East 2004, Philadelphia, PA, Proceedings of SPIE, vol. #5604.
- [86] W. Piyawattanametha, L. Fan, S. Hsu, M. Fujino, M. C. Wu, P. R. Herz, A. D. Aguirre, Y. Chen, and J. G. Fujimoto, "Two-dimensional Endoscopic MEMS Scanner for High Resolution Optical Coherence Tomography," Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2004, San Francisco, May 2004, CWS 2.
- [87] W. Piyawattanametha, P. Patterson, D. Hah, H. Toshiyoshi, and M. C. Wu, "A 2-D Scanner by Surface and Bulk Micromachined Angular Vertical Comb Actuators," IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS, Waikoloa, HI, August 18-21, 2003, pp. 93-94.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [88] "Cascaded Micromirror Pair Driven by Angular Vertical Combs for Two-Axis Scanning," IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS, Waikoloa, HI, August 18-21, 2003, pp. 99-100.
- [89] W. Piyawattanametha, P. Patterson, D. Hah, H. Toshiyoshi, and M. Wu, "A Surface and Bulk Micromachined Angular Vertical Combdrive for Scanning Micromirrors," Optical Fiber Conference 2003, Atlanta, USA, March 2003, pp. 251-252.
- [90] H. Nguyen, D. Hah, P. R. Patterson, W. Piyawattanametha, and M. C. Wu, "A Novel MEMS Tunable Capacitor based on Angular Vertical Comb Drive Actuators," Solid-State Sensor, Actuator, and Microsystems, Hilton Head Island, South Carolina, June 2-6, 2002, pp. 277-280.
- [91] W. Piyawattanametha, P. Patterson, G. D. Su, H. Toshiyoshi, and M. C. Wu, "A MEMS Non-Interferometric Differential Confocal Scanning Optical Microscope," The 8th International conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems (Transducers 2001 & Eurosensors XV), Munich, Germany, June 10-14, 2001, pp. 590-593.
- [92] H. Toshiyoshi, W. Piyawattanametha, C. T. Chan, and M. C. Wu, "Linearization and Analysis of Electrostatically Actuated MEMS 2-D Optical Scanner," Late News Technical Digest of Solid-State Sensor and Actuator Workshop (Hilton Head 2000), South Carolina, CA, USA, June 4-8, 2000, pp. 7-8.
- [93] W. Piyawattanametha, H. Toshiyoshi, J. LaCosse, and M. C. Wu, "Surface Micromachined Confocal Scanning Optical Microscope," Technical Digest Series of Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2000, San Francisco, CA, USA, May 7-12, 2000, pp. 447-448.
- [94] G. D. Su, W. Piyawattanametha, R. Rollier, L. Fan, and M. C. Wu, "MEMS 2D Scanning Mirror for Dynamic Alignment in Optical Interconnect," Proceedings of Integrated Photonics Research (IPR'99), Santa Barbara, CA, USA, July 1999.
- [95] W. Piyawattanametha, L. Fan, and M. C. Wu, "[MEMS Technology for Optical Crosslink for Micro/Nano Satellites](#)," The International Conference on Integrated Nano/Microtechnology for Space Applications (NanoSpace'98), NASA/Johnson Space Center, Houston, TX, USA, November 1-6, 1998.

2. Invited/keynote talks (selected)

- [1] "Microendoscopy techniques based on MEMS technology," APCOT, Hong Kong, China (Keynote).
- [2] "MEMS technology for light microscopy," International Contest of Applications in Nano-micro Technology (ICAN) 2017, Beijing, China (Keynote).
- [3] "Light microendoscopy with MEMS technology," Imperial College, London, July 2016 (Invited).
- [4] "Innovation State of Thailand," Sci Days, Saint Petersburg, Russia, October 21, 2015 (Invited).
- [5] "Recent updates in optical microendoscopy," Institute of Photonics and Microsystems, Fraunhofer Institute,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dresden, Germany, August 31, 2015.

- [6] "Light microendoscopy with MEMS technology," IEEE Nanoelectromechanical Systems (NEMS) 2015, Xian, China, April 7-11, 2015.
- [7] "Confocal microendoscopy," International Coastal Biology Congress 2014, Yantai, China, September 26-30, 2014.
- [8] "Image Mosaicing Technique and Real-Time Imaging with MEMS based Handheld Confocal Microscope," The 18th International Computer Science and Engineering Conference (ICSEC 2014), Khon Kean, Thailand, July 30 – August 1, 2014.
- [9] "Light microendoscopy for early cancer detection," The International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM) 2014, Penang, Malaysia, May 27-29, 2014.
- [10] "MEMS based medical microendoscope," Institute of Photonics and Microsystems, Fraunhofer Institute, Dresden, Germany, March 19, 2014.
- [11] "Early cancer detection with photonics technology," The 1st Young Scientists Meeting, Tokyo, Japan, February 13-14, 2014.
- [12] "Entrepreneurial Spirits in Thailand," The 1st Workshop for Young Scientists and Engineers, Jerusalem, Israel, November 25-28, 2013.
- [13] "Advance in light microendoscopy," Technion, Haifa, Israel, November 24, 2013.
- [14] "The Global Young Academy Activities," Regional Meeting of the Global Research Council (GRC), Jeju Island, Korea, November 18-19, 2013.
- [15] "MOEMS devices for endoscopic imaging," Samsung Advanced Institute of Technology (SAIT), Seoul, South Korea, August 29, 2013.
- [16] "Advanced light microendoscopy," Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea, August 28, 2013.
- [17] "Early cancer detection with optical imaging," Toyota Technological Institute University, Nagoya, Japan, August 23, 2013.
- [18] "Light microendoscopy for cancer detection," National Chiao Tung University, Taipei, Taiwan, July 18, 2013.
- [19] "Endoscopic imaging," National Taiwan University (NTU), Taipei, Taiwan, July 17, 2013.
- [20] "Advanced confocal imaging," the 2nd Bio-Photonics Workshop, Taipei, Taiwan, July 17-19, 2013.
- [21] "Light microendoscopy," University of Bourgogne, Bourgogne, France, May 7, 2013.
- [22] "Confocal microendoscopy and biomarkers," Conference on nanobiology, Okayama, Japan, March 12-13, 2013.
- [23] "Advance in light microendoscopy," Bio4Apps 2012, Singapore, November 19-20, 2012.
- [24] "Light microscopy," University of Bourgogne, Bourgogne, France, October 16, 2012.
- [25] "Review: Microendoscopic imaging," South Africa's Council for Scientific and Industrial and Research (CSIR), Pretoria, South Africa, May 20, 2012.
- [26] "Biomedical imaging," 4th Khonkaen University (KKU) International Engineering Conference 2012, May 10-11,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2012.

- [27] "Micro- and nano-technology for medical devices," NSTDA Academy Lecture at NSTDA Science Park, January 19, 2012.
- [28] "Biomarkers technology for *in vivo* imaging," Hong Kong University of Science and Technology (HKUST), Kowloon, Hong Kong, November 9, 2011.
- [29] "Micro- and nano-technology R&D research in Thailand," ICMAN 2011, Shenzhen, CN November 4-6, 2011.
- [30] "Revolutionizing Microscope: Imaging, Analysis, and Application," Thai Society of Microcirculation, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University December 22, 2010.
- [31] "Advanced Confocal Microendoscopy," IAP Young Scientists Conference in the World Economic Forum, Tianjin, September 12-16, 2010.
- [32] "Noninvasive dermatologic measurement: from research to clinical," Dermatological Society of Thailand, September 10, 2010.
- [33] "Optical Microscopy 101," King Mongkut Institute of Technology Thonburi (KMUTT), August 30, 2010.
- [34] "Biological imaging with handheld microscope," King Mongkut Institute of Technology Thonburi (KMUTT), June 11, 2010.
- [35] "MEMS based endoscopic imaging," Argonne National Laboratory, Chicago, USA, April 3-7, 2010.
- [36] "Cancer Imaging with optical technique," Khonkean University (KKU), April 23, 2010.
- [37] "Advanced Imaging with molecular- or bio-markers," NAC 2010, Thailand Science Park, Bangkok, March 28-30, 2010.
- [38] "Imaging Systems in Dermatology," Thai Dermatological Society Annual Meeting, Centrara Hotel, March 11-12, Bangkok 2010.
- [39] "Advanced Imaging with Nanotechnology," UK-Thailand Nanomedicine Symposium, Siriraj Hospital, Bangkok, March 23-24, 2010.
- [40] "Advanced Confocal Imaging," The Fifth National Conference on Optics and Applications (NCOA), Jaopraya Park Hotel, Bangkok, February 5, 2010, pp. 3.
- [41] "From Laboratory to Clinic with Endoscopic Imaging," Xiamen University, China, January 20, 2010.
- [42] "Photonics in Medical Imaging Technology," Hong Kong University of Science and Technology (HKUST), Kowloon, Hong Kong, January 5, 2010.
- [43] "3-D *in vivo* imaging with a miniature dual-axes confocal fluorescence microscope," The 4th IEEE International Symposium on Biomedical Engineering (ISBME), Plaza Athenee, Bangkok, December 14-18, 2009.
- [44] "Biosensors for Medical Device Industry," NECTEC ACE 2009, Thailand Science Park, Convention Center (TSPCC), September 23-25, 2009.
- [45] "From lab to hospital with imaging technology," King Mongkut Institute of Technology Thonburi (KMUTT), Thailand, September 2009.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [46] "Dual-Axes Confocal Microscopy for Human Skin Clinical Imaging (*Keynote*)," IEEE Optical MEMS and Nanophotonics 2009, Tampa, Florida, August 17, 2009.
- [47] "From Bench to Bedside with Advanced Microscopy," The 4th International Conference on Sensors 2009 (AsiaSense), The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand, July 29-31, 2009.
- [48] "Advanced Optical Endoscopy and Microendoscopy," Stanford University Photonics Retreat (SUPR), Monterey, CA, April 3-5, 2009.
- [49] "Dual-Axes Confocal Microscope for Advanced Clinical Diagnosis," Medical Technology Symposium, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand, November 12, 2008.
- [50] "Real time *in vivo* cancer diagnosis with a MEMS based Confocal Microscope," the 1st Annual Symposium on Molecular Imaging 2008, Belle Villa Resort Chiangmai, Thailand, November 9-12, 2008.
- [51] "*In vivo* drug monitoring and real-time disease diagnosis with a MEMS based handheld Dual-Axes Confocal Microscope," NanoThailand Symposium 2008, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, November 6-8, 2008.
- [52] "From bench to bedside with Advanced Microscopy and Endoscopy," at BIOTEC, a member of NSTDA, Bangkok, Thailand, November 4, 2008.
- [53] "Advanced Clinical Imaging (*Invited Talk*)," Ramathibodi University Hospital, Bangkok, Thailand, September 16, 2008.
- [54] "Clinical diagnostic with novel medical imaging systems," at Fraunhofer Institute for Photonic Microsystems, Dresden, Germany, August 18, 2008.
- [55] "Novel biomedical imaging and drug monitoring with micro- and nano-technology," Tokyo University, Tokyo, Japan, May 19, 2008.
- [56] "MEMS and MOEMS packaging," Topcon Corporation, Tokyo, Japan, May 19, 2008.
- [57] "Skin imaging technique with a handheld dual-axes confocal microscope," the International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, Japan, May 14, 2008.
- [58] "Real time skin microscopy with confocal microscopy," the International Society of Biophysics and Imaging of Skin (ISBS) 2008, Seoul, Korea, May 7-10, 2008.
- [59] "Advanced Endoscopy," the Hong Kong University of Science and Technology (HKUST), Kowloon, Hong Kong, September 5, 2007.
- [60] "MEMS Applications in Biomedical Imaging," the National Taiwan University (NTU), Taipei, Taiwan, August 17, 2007.
- [61] "MEMS based two-photon microendoscope," Stanford Photonics Research Center Symposium (SPRC), Stanford CA, September 18-20, 2006.
- [62] "Surface and Bulk Micromachined Two-Dimensional Angular Vertical Comb Actuators Scanner for Endoscopic Ultrahigh Resolution Optical Coherence Tomography Imaging," at Optical Sciences Center, the University of Arizona, October 8, 2004.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Media articles and awards (selected)

- [1] Listed on Times Higher Education Ranking Website as a notable KMITL Alumni (<https://www.timeshighereducation.com/world-university-rankings/king-mongkuts-institute-technology-ladkrabang>)
- [2] Served as a guest news editor for the Nation Newspaper on “World Science Forum looks at bitcoin phenomenon,” December 7, 2017. (<http://www.nationmultimedia.com/detail/Economy/30333359>)
- [3] Won the 2nd prize from the International Contest of Applications in Nano-micro Technology (ICAN) 2017, Beijing, China.
- [4] Press coverage on the Nation Newspaper on “KMITL Engineering Students Win Award,” July 19, 2016. (<http://www.nationmultimedia.com/business/KMITL-ENGINEERING-STUDENTS-WIN-AWARD-30290875.html>)
- [5] Won the 3rd prize from the International Contest of Applications in Nano-micro Technology (ICAN) 2016, Paris, France.
- [6] Served as a guest news editor for the Nation Newspaper on “First Science Leadership Programme for ASEAN,” July 19, 2016. (<http://www.nationmultimedia.com/business/First-Science-Leadership-Programme-for-Asean-30290867.html>)
- [7] Served as a guest news editor for the Nation Newspaper on “The Indispensable Intertwined Ties in the Digital Era,” April 15, 2016. (<http://www.nationmultimedia.com/business/The-indispensable-intertwined-ties-in-the-digital--30283845.html>)
- [8] Won the 3rd prize from the International Contest of Applications in Nano-micro Technology (ICAN) 2015, Anchorage, AK USA.
- [9] Won an excellent paper award from the International Workshop on Image Electronics and Visual Computing (IIEEJ), Samui, Thailand, October 7-10, 2014.
- [10] Awarded Fraunhofer-Bessel Research Award in 2014 from the Alexander von Humboldt Foundation, Germany.
- [11] Interviewed by the Nation Newspaper on “A Classy Way to Success,” February 15, 2014. (<https://www.pressreader.com/thailand/bangkok-post/20140215/283781376785057>)
- [12] Selected by the World Economic Forum (WEF), Switzerland in 2013 to be one of the 40 top young scientists under the age of 40 who plays transformation role in integrating scientific knowledge and technological innovation to improve the state of the world, Dalian, China, September 11-13, 2013.
- [13] Awarded Erasmus Mundus Grant in 2012 from the European Commission to conduct research in France.
- [14] Won the 2nd prize from True Innovation Award, Bangkok, Thailand, December 17, 2012.
- [15] Won outstanding paper award from the 16th International Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems Conference 2011 (Transducers 2011), Beijing, China, June 5-9, 2011.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [16] Won the 2nd prize in Global Entrepreneurship Competition (GEC), Barcelona, Spain, June 15-16, 2011.
- [17] "Microendoscope," I-aspire Journal, Thailand, May 1, 2011.
- [18] Won the 1st prize Global Social Venture Competition (GSVC) South East Asia, March 3-4, 2011.
- [19] Elected to serve as an executive member of the Global Young Academy (GYA), Berlin, Germany, July 2012.
- [20] Co-founded the Global Young Academy (GYA), Berlin, Germany, February 14-16, 2010 (www.globalyoungacademy.net)
- [21] Press coverage in the Bangkok Post Newspaper on "New Device Gives Early Diagnosis of Cancers," March 23, 2010. (<https://www.pressreader.com/thailand/bangkok-post/20100323/283467842451622>)
- [22] "MEMS microscope images brains," Research Highlights in Nature Photonics, Volume 3, October 2009.
- [23] "Intelligent microendoscope," Chevit-Cheva Channel 3 Program, Thailand, September 30, 2009.
- [24] "Tiniest two-photon MEMS microscope performs Brain Imaging," an article in Laser Focus World Magazine, USA, August 1, 2009.
- [25] "Cancer Imaging," an interview on the Bangkok Morning Talk, Thailand, Channel 11, June 19, 2009.
- [26] "Light microscopy for cancer diagnosis," Matichon Newspaper, Thailand, May 25, 2009
- [27] Press coverage in the Bangkok Post Newspaper on "Novel approach to cancer," May 20, 2009.
- [28] "Optical microendoscope for cancer detection," Kao-sod Newspaper, Thailand, April 20, 2009. (<https://www.pressreader.com/thailand/bangkok-post/20090520/282003258383144>)
- [29] "Cancer screening with optical microendoscope," Nation Weekend Magazine, Thailand, April 16, 2009.
- [30] "Novel imaging instrument for cancer diagnosis," Matichon Newspaper, Thailand, April 7, 2009.
- [31] "Optical endoscopist," Health Check Up Channel, Thailand, April 2, 2009.
- [32] "Advance optical microscope for cancer detection," Dailynews Newspaper, Thailand, March 30, 2009.
- [33] "Novel microendoscope for cancer detection," Naewna Newspaper, Thailand, March 28, 2009.
- [34] "Cancer diagnosis with endoscopic imaging," Bangkok Business Newspaper, Thailand, March 25, 2009.
- [35] "Detect cancer with optical microendoscope," Manager Newspaper, Thailand, March 25, 2009.
- [36] "Novel microendoscope for early cancer detection," Thairath Newspaper, Thailand, March 25, 2009.
- [37] "Early detection of cancer with optical microendoscope," Matichon Newspaper, Thailand, March 25, 2009.
- [38] "Cancer detection with optical microendoscope," Voice TV, Thailand, March 24, 2009.
- [39] "Innovation that shapes the world," Bangkok Business Newspaper, Thailand, December 30, 2008.
- [40] "Confocal Microscopy for medical imaging," an interview on the Bangkok Morning Talk, Channel 11, December 2008.
- [41] "Novel Medical Imaging Instrument," Bangkok Business Newspaper, Thailand, November 11, 2008.
- [42] "Microtechnology enables endoscopic confocal microscope," SPIE Newsroom 2007.
- [43] "Creating a microscope that reads minds," an interview on the American Broadcasting Company (ABC) News, USA, on October 19, 2007. Weblink: <http://abclocal.go.com/kgo/story?section=local&id=5716715>.
- [44] "Microtechnology enables endoscopic confocal microscopy," in the SPIE Newsroom, USA, October 2006,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [45] "MEMS-based scanning device facilitates microendoscopy," an article in Biophotonics International Magazine, September 2006, pp. 27-28. Weblink: <http://pyramidal.stanford.edu/publications/Biophotonics-Sept2006-MEMS.pdf>.
- [46] "Two-dimensional OCT scanner promises *in-situ* diagnosis," an article in Laser Focus World Magazine, USA, July 2004, pp. 47-48.

4. Patents

- [1] W. Piyawattanametha, "E. coli enumeration with fluorescence technique," Thai Patent Application 1701006685, filed, December 7, 2017, Patent Pending.
- [2] W. Piyawattanametha, "Integrated wide-field and high-resolution catheter," Thai Patent Application 1301005583, filed September 2013, Patent Pending.
- [3] N. Khemthongcharoen, W. Piyawattanametha, A. Ruangphacha, S. Rattanavarin, U. Jarujareet, S. Pathumraj, S. Niruthisard, P. Sarapukdee, and R. Jolivot, "Development of a Fluorescence-labeled p16 peptide for cervical cancer screening," Thai Patent Application 1201003486, filed September 2012, Patent Pending.
- [4] S. Rattanavarin, W. Piyawattanametha N. Khemthongcharoen, U. Jarujareet, A. Ruangphacha, and P. Sarapukdee, "Line-scan based dual-axis confocal imaging probe," Thai Patent Application 1201004887, filed September 2012, Patent Pending.
- [5] W. Piyawattanametha, "Multi-spectral dual-axis confocal imaging probe," Thai Patent Application 1101000602, filed April 2011, Patent Pending.

5. Book chapters (selected)

- [1] "Optical MEMS," Intech Book Chapter 2012, Source: Microelectromechanical Systems and Devices, edited by Nazmul Islam, ISBN 978-953-51-0306-6, Hard cover, 480 pages, Publisher: InTech, Published: March 28, 2012.
- [2] "Advances in Bio-Imaging: From Physics to Signal Understanding Issues State-of-the-Art and Challenges," Series: Advances in Intelligent and Soft Computing, Vol. 120, Loménie, Nicolas; Racoceanu, Daniel; Gouillard, Alexandre (Eds.), 2012, 2012, XXII, 246 p. 129 illus., 84 in color, Softcover, ISBN 978-3-642-25546-5. Weblink: <http://www.springer.com/engineering/computational+intelligence+and+complexity/book/978-3-642-25546-5>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [3] “*In Vivo* Clinical Imaging and Diagnosis,” McGraw-Hill Book Chapter 2011, James W Tunnell, ISBN: 9780071626835 0071626832, Publisher: McGraw-Hill 2011.
- [4] “Miniature Dual Axes Confocal Microscope for *Real Time* in vivo Imaging,” Intech Book Chapter 2010, Source: Advances in Solid State Circuit Technologies, edited by: Paul K Chu, ISBN: 978-953-307-086-5, Publisher: INTECH, April 2010.
- [5] “Optical MEMS and Nano-Photonics,” in *MEMS/NEMS Handbook*, Chinese Science Publishing Company, 2005.

6. Professional membership

- [1] Senior Member of the Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) in 2010.
- [2] Senior Member of the Optical Society of America (OSA) in 2011.
- [3] Senior Member of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineering (SPIE) in 2012.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้