ID080

การศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ และการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

The study of bacterial contamination in water from drinking water vending machine and the identification of bacterial using nucleotide sequence of 16S rRNA gene

ชีวนิช นิลรัตน์[1] ชุติกาญจน์ สักขาพรม[2] และ ปรียานุช ใจหาญ[3*]
[1]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[3]โครงการ วมว. คู่ศูนย์โรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[*]E-mail: piyanoot.ja@buu.ac.th

Chewanich Ninrat[1], Chutikarn Sakkharprom[2] and Piyanoot Jaihan[3*]
[1]Faculty of Medicine, Burapha University
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences Huachiew Chalermprakiet University
[3]Science Classrooms in University-Affiliated School Project, Faculty of Science, Burapha University
[*]E-mail: piyanoot.ja@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ และการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญในพื้นที่โดยรอบมหาวิทยาลัยบูรพาในรัศมี 500 เมตร จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำดื่มและทำการ swab test บริเวณหัวจ่ายน้ำจากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ และทางจุลชีววิทยา จากการศึกษาพบว่า ปัจจัยทางกายภาพมีน้ำดื่มไม่ผ่านเกณฑ์ตามเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข จำนวน 2 ตัวอย่างจาก 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.33)และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำดื่มได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต และแยกเชื้อแบคทีเรียจากหัวจ่ายน้ำได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี MPN (Most Probable Number) พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มมากกว่า 3-460 MPN/100 มิลลิลิตร และ ฟีคัลโคลิ-ฟอร์มมากกว่า 3-240 MPN/100 มิลลิลิตร จำนวน 11 ตัวอย่าง และไม่พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัลโคลิ-ฟอร์มแบคทีเรียน้อยกว่า 3 MPN/100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ตัวอย่าง จากการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยวิธี Neighbor - joining พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์ทั้ง 21 ไอโซเลต สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *Bacillus cereus* จำนวน 8 ไอโซเลต และ *B. subtilis* จำนวน 4 ไอโซเลต กลุ่มที่ 2 *Acinetobacter* sp. จำนวน 4 ไอโซเลต และ *A. baumannii* จำนวน 1 ไอโซเลต กลุ่มที่ 3 *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 2 ไอโซเลต และ กลุ่มที่ 4 *Klebsiella* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต ตามลำดับ

คำหลัก การระบุชนิด, ตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ, ลำดับนิวคลีโอไทด์

Abstract

The objectives of this study were to investigate the quality of the drinking water vending machine and to determine the bacterial contamination of drinking water. Samples of water and the swabbing on their dispenser were collected from 15 drinking water vending machines within a radius of 500 meters around Burapha University were collected. The quality of drinking water was examined by physical and

microbiological parameters. The results revealed that, 2 out of 15 samples of drinking water (13.33 %) were found to be contaminated with 6 isolates of bacteria. There were 15 isolates of bacteria found from the swab test on the water dispensers. Analysis of bacteria using MPN method showed that 11 samples were contaminated with coliform bacteria (>3-460 MPN/100 ml) and 11 samples were contaminated with fecal coliform bacteria (>3-240 MPN/100 ml). Four samples were not found contaminated with coliform bacteria and fecal coliform bacteria (<3 MPN/100 ml). The identification of bacterial using their morphological characteristics and molecular genetic studies based on 16S rRNA sequences and the construct of phylogenetic relationships also showed that each isolates are genetically distinct. After the analysis of relatedness, the neighbor joining tree showed that a total of twenty-one of bacteria were isolated can be divided into four clades: clade 1 consisted of 8 isolates of *Bacillus cereus,* 4 isolates of *B. subtilis*; clade 2 contained 4 isolates of *Acinetobacter* sp. 1 isolate of *A. baumannii*; clade 3 contained 2 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and clade 4 contained 2 isolates of *Klebsiella* sp, respectively
Keywords: Identification, water vending machine, nucleotide sequencing

1. บทนำ

น้ำถือว่าเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญมากในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ซึ่งใช้ในการอุปโภค บริโภคและใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการบริโภคน้ำที่ใช้ต้องปราศจากสิ่งเจือปนที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายหากปนเปื้อนด้วยสารเคมีหรือแบคทีเรียในปริมาณที่เกินมาตรฐานย่อมแสดงถึงความไม่ถูกสุขลักษณะของน้ำ และหากบริโภคเข้าไปอาจก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคบิด อหิวาตกโรค ไทฟอยด์ ท้องร่วง เป็นต้น [1] ในปัจจุบันน้ำดื่มที่วางขายมีหลากหลายรูปแบบทั้งแบบบรรจุขวด และแบบตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญสาธารณะ [2] ในปี 2556 มีรายงานจากรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขว่าช่วงฤดูร้อนเผยผลการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำดื่มในครัวเรือนไทย พบว่า ผ่านเกณฑ์มาตรฐานเพียงร้อยละ 33 โดยเฉพาะน้ำจากตู้หยอดเหรียญผ่านเกณฑ์ไม่ถึงครึ่ง นอกจากนี้องค์การอนามัยโลกเผยว่าขณะนี้ประชากรโลกเสียชีวิตจากการดื่มน้ำไม่สะอาดปีละ 5 แสนคน ส่วนในประเทศไทยสำนักระบาดวิทยารายงานเมื่อปี 2557 พบผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โรคบิด ซึ่งเกิดจากการดื่มน้ำไม่สะอาดทั่วประเทศ 1 ล้านกว่าคน และเสียชีวิต 8 คน [3] โดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มักพบในการปนเปื้อนในน้ำ ได้แก่ Coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, และ *Bacillus cereus* เป็นต้น ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน โรคอุจจาระร่วง และ โรคอาหารเป็นพิษ [4-5] ปัจจุบันมีข้อมูลของหลายหน่วยงานที่แสดงว่า น้ำดื่มจากตู้หยอดเหรียญมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน เช่น กัญญา และคณะ (2558) [6] ได้รายงานการสำรวจคุณภาพการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญในเขตอำเภอพระนครศรีอยุธยา และนำมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่า มีน้ำดื่มไม่ผ่านเกณฑ์ จำนวน 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73.33 โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่า 500 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 43.33) จำนวนโคลิฟอร์มรวมโดยวิธี MPN มากกว่า 2.2 จำนวน 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 23) ตรวจพบ *S. aureus* จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10) เป็นต้น จากปัจจัยดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยได้เห็นถึงความสำคัญของน้ำดื่มโดยเฉพาะแบบตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ ซึ่งพบมากในบริเวณหอพักรอบมหาวิทยาลัยบูรพา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาคุณภาพของน้ำดื่ม และตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ รวมทั้งตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในน้ำดื่มจากตู้หยอดเหรียญ และระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยคาดหวังว่าข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำดื่ม และเพื่อเป็นแนวทางสำหรับผู้บริโภคในการเลือกบริโภคน้ำดื่มจากตู้หยอดเหรียญที่สะอาดปราศจากสิ่งเจือปน

2. วิธีการเนินการวิจัย

2.1 ตรวจสอบคุณภาพของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ และการเก็บตัวอย่างน้ำดื่ม

สุ่มตัวอย่างตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญรอบมหาวิทยาลัยบูรพาในรัศมี 500 เมตร จำนวน 15 ตู้ โดยวิธีการเลือกเก็บตัวอย่างโดยทำการสุ่มแบบการเลือกแบบบังเอิญ [7] จากนั้นทำการตรวจสอบหลักเกณฑ์เกี่ยวกับสถานที่ตั้ง และหลักเกณฑ์เกี่ยวกับคุณลักษณะตู้น้ำโดยใช้เกณฑ์ประกาศการควบคุมการประกอบกิจการตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญของกระทรวง

สาธารณสุข พ.ศ. 2553 [2] สังเกต และบันทึกผล จากนั้นตรวจสอบความสะอาดของหัวจ่ายน้ำ และการทำ swab test บริเวณหัวจ่ายน้ำแล้วนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อในห้องปฏิบัติการ สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำดื่มทำโดยบรรจุตัวอย่างน้ำใส่ในขวดแก้วดูแรนขนาด 250 มล. ที่ปราศจากเชื้อทันทีเนื่องจากในสถานการณ์จริงผู้บริโภคบรรจุน้ำใส่ภาชนะทันที ปิดฝาขวดให้แน่นเพื่อให้ได้ตัวอย่างลักษณะเดียวกับน้ำที่ผู้บริโภคมาใช้บริการ โดยเก็บ 1 ตัวอย่าง/ตู้ จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างน้ำดื่มในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และปิดฉลากพร้อมระบุรายละเอียดให้ชัดเจนเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มทางกายภาพ

ก่อนเก็บตัวอย่างน้ำดื่มทำการล้างภาชนะบรรจุตัวอย่างน้ำด้วยน้ำที่จะเก็บ 2 – 3 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำจนเกือบเต็มขวด เหลือที่ว่างไว้ประมาณ 1 นิ้ว ปิดฝาขวดให้สนิท และนำไปทดสอบคุณภาพน้ำดื่มโดยวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) โดยใช้ pH meter (HP9010, Singapore) ทดสอบสีและความขุ่นจากการสังเกตด้วยตาเปล่า ทดสอบรสชาติด้วยการชิม ทดสอบกลิ่นด้วยการดม โดยใช้ผู้ทดสอบอย่างน้อย 5 คน [6]

2.3 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มทางจุลชีววิทยา

ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และฟีคัลโคลิฟอร์ม โดยใช้วิธี MPN (Most Probable Number) โดยเลือกระบบหลอดเลี้ยงเชื้อระบบ 3 หลอดซึ่งแสดงถึงจำนวนหลอดอาหารเหลว lauryl sulfate tryptose (LST) ที่ใช้หมักต่อปริมาณตัวอย่างน้ำชุดหนึ่งๆ เป็น 3 โดยระบบ 3 หลอดจะใช้หลอดหมักทั้งหมด 9 หลอด โดยนำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และฟีคัลโคลิฟอร์ม 10, 1 และ 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth และมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บรรจุอยู่ภายใน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกหลอดที่มีแก๊สจาก LST broth หลังจากบ่มเชื้อนาน 24-48 ชั่วโมง แตะของเหลวมาใส่ในอาหารเหลว Brilliant green lactose bile (BGLB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่เกิดแก๊ส นำผลที่ได้ไปอ่านผลตามตาราง MPN ของจุลินทรีย์ต่อ 100 มล. เพื่อหาปริมาณ coliform ในการยืนยันผลคัดเลือกหลอดที่มีแก๊สจากอาหารเหลว BGLB broth หลังจากบ่มเชื้อนาน 24-48 ชั่วโมง แตะของเหลวมาใส่ใน EC broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นแตะของเหลวจากหลอด EC broth ที่เกิด แก๊สมา streak บนอาหาร Eosin-methylene blue (EMB) agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้เป็นโคโลนีโคโลนีจะมีลักษณะสีโลหะตะกั่วหรือสีดำ (metallic sheen) จากนั้นให้ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) จุ่มเอาโคโลนีที่แยกเดี่ยว ๆ เห็นชัดในแต่ละจานเพาะเชื้อประมาณ 2-3 โคโลนีใส่ลงในอาหาร LST broth แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเป็นเชื้อโคลิฟอร์มจะให้แก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส สำหรับเชื้อฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเชื้อไปทำการย้อมสีแกรม และนำไปตรวจดูลักษณะของรูปร่างสปอร์ การติดสีย้อม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกผล [8]

2.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างน้ำดื่ม และหัวจ่ายน้ำ

ปิเปตตัวอย่างน้ำดื่ม 1 มล. ลงบนจานอาหาร Nutrient agar (NA) จากนั้นทำการเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับหัวจ่ายน้ำเมื่อทำการ swab test แล้วนำมาเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร Nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารด้วยเทคนิค plate count บันทึกผล และทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วบนอาหาร NA โดยเทคนิค quadrant streak บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนี รูปร่าง ขอบโคโลนี ระดับ ความนูน สีของโคโลนี และบันทึกผล

2.5 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วบนอาหาร NA จากนั้นนำแบคทีเรียมาย้อมสีแบบแกรม (Gram staining) [9] และนำไปตรวจดูลักษณะของรูปร่างสปอร์ การติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกผล

2.6 การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB และนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Bacterial DNA extraction KIT (Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียในส่วนของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 primer (5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3) และ rP2 primer (5’-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3’) [10] ตามวิธีการของบริษัท Vivantis, Malaysia

จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้บริการจาก MACROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank จนทราบสกุล ชนิด และ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความเหมือนหรือใกล้เคียงกันมากที่สุดในฐานข้อมูลโดยรู้ได้จากเปอร์เซ็นต์ของความเหมือนในการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast) จัดเรียงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ align โดยใช้ ClustalW Multiple alignment [11] ซึ่งเป็นโปรแกรมประยุกต์เพิ่มเติมที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 [12] จากนั้นนำมาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม MAGA X โดยใช้วิธี Neighbor - joining ตามหลักการ Kimura 2 – parameter model (1,000 bootstrap replications) [13]

3. ผลการวิจัย

3.1 การตรวจสอบตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ

จากการสำรวจสุขลักษณะ และหลักเกณฑ์เกี่ยวกับสถานที่ตั้งของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามี 1 ตัวอย่างจาก 15 ตัวอย่างผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศการควบคุมการประกอบกิจการตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญของกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2553 (ตารางที่ 1)

3.2 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มทางกายภาพ

จากตัวอย่างน้ำดื่มทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ผลการทดสอบรสชาติ กลิ่น สีและความขุ่น จากการสำรวจความพึงพอใจของผู้ทดสอบ พบว่า มีตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่างที่มีลักษณะไม่ปกติในด้านรสชาติ ตามความคิดเห็นของผู้ทดสอบ และค่า pH ของตัวอย่างน้ำดื่มอยู่ในสภาวะเป็นกลาง คือ 6.89-7.10 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 362) พ.ศ. 2556 เรื่อง น้ำบริโภคจากตู้น้ำดื่มอัตโนมัติ [14] (ตารางที่ 2)

3.3 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มทางจุลชีววิทยา

จากการตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี MPN พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มมากกว่า 3-460 MPN/100 มิลลิลิตร จำนวน 11 ตัวอย่าง ฟีคัลโคลิฟอร์มมากกว่า 3 -240 MPN/100 มิลลิลิตร จำนวน 11 ตัวอย่าง และไม่พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มแบคทีเรียและฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรียน้อยกว่า 3 MPN/100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และฟีคัลโคลิฟอร์ม พบว่ามีลักษณะสีของโคโลนีบนอาหารคัดเลือก EMB ที่แตกต่างกัน ได้แก่ โคโลนีมีสีดำ สีฟ้าคล้ำ สีม่วงอมชมพู สีม่วง และสีชมพู เป็นต้น

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์เกี่ยวกับสถานที่ตั้ง และคุณลักษณะของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญเทียบกับประกาศการควบคุมการประกอบกิจการตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญของกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2553

เกณฑ์การตรวจสอบตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ							
รหัส	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
J1	+	+	-	-	-	+	-
J2	+	+	+	+	-	+	+
G1	+	+	+	+	-	+	-
G2	-	-	+	-	-	-	-
G3	+	-	-	-	-	-	-
B1	+	-	+	+	-	+	-
B2	+	-	-	+	-	+	-
B3	+	-	+	+	-	-	-
L1	+	-	+	+	-	-	-
S1	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	-	+	-
S3	+	-	-	+	-	+	+
F1	+	-	+	+	-	+	+
F2	-	-	+	+	-	+	-
F3	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ (+) ใช้แทนไม่ผ่านเกณฑ์ สัญลักษณ์ (-) ใช้แทนผ่านเกณฑ์ 1= ที่ตั้งอยู่ห่างจากสิ่งปฏิกูลไม่น้อยกว่า 30 ม. 2= บริเวณพื้นที่ตั้งไม่เฉอะแฉะ 3= ยกระดับสูงจากพื้น(≥10ซม.) 4= สภาพตู้ภายนอก 5= ฝาเปิดปิดของช่องรับน้ำ 6=หัวจ่าย 7= ช่องจ่ายน้ำ

3.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างน้ำดื่ม และหัวจ่ายน้ำ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 6 ไอโซเลต และการแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบบนหัวจ่ายน้ำได้จำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งพบว่า ลักษณะโคโลนีเจริญบนจานอาหารของตัวอย่างน้ำดื่มแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม และลักษณะโคโลนีเจริญบนจานอาหารของหัวจ่ายน้ำแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบน้ำดื่มโดยใช้วิธีทางกายภาพ และผลการทดสอบการตรวจแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และ ฟีคัลโคลิฟอร์มต่อ 100 มิลลิลิตร

รหัส	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
J1	-	-	-	7.05	39	39
J2	-	-	-	6.98	23	23
G1	-	-	-	7.09	<3	<3
G2	-	-	-	6.92	23	23

รหัส	1	2	3	4	5	6
G3	-	-	-	7.02	<3	<3
B1	-	-	-	6.95	23	7.4
B2	-	-	-	6.97	23	23
B3	-	-	-	6.89	23	9
L1	-	-	-	6.99	23	23
S1	-	-	-	7.10	240	93
S2	-	+	-	6.93	460	240
S3	-	-	-	6.91	23	23
F1	-	-	-	7.02	43	43
F2	-	+	-	6.97	<3	<3
F3	-	-	-	7.07	<3	<3

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ (+) ใช้แทนไม่ผ่านเกณฑ์ สัญลักษณ์ (-) ใช้แทนผ่านเกณฑ์ 1= สี และความขุ่น 2= รสชาติ 3= กลิ่น 4= ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5= โคลิฟอร์ม (MPN/100 มล.) 6= ฟีคัลโคลิฟอร์ม (MPN/100 มล.)

3.5 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบการย้อมแกรมแบคทีเรีย พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลตที่ย้อมติดสีแดงของซาฟรานินซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบโดยมีรูปร่างเป็นรูปร่างท่อนสั้น และแท่ง และพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 12 ไอโซเลต เนื่องจากติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตมีรูปร่างเป็นแท่ง

ตารางที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหาร Nutrient agar ของตัวอย่างน้ำดื่ม

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA	ไอโซเลต
1	โคโลนีมีสีขาวขุ่น มันวาว ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	3
2	โคโลนีมีสีขาวขุ่นมันวาวและเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเขียว ตรงกลางนูน ขอบหยัก	2
3	โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน มันวาว ตรงกลางนูน ขอบหยัก	1

ตารางที่ 4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหาร Nutrient agar (NA) ของหัวจ่ายน้ำ

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA	ไอโซเลต
1	โคโลนีมีสีขาวขุ่น มันวาว ขอบเรียบ	3
2	โคโลนีมีสีขาวขุ่น มันวาว ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	7
3	โคโลนีมีสีขาวขุ่น พื้นผิวของโคโลนีขรุขระและด้าน ตรงกลางนูน ขอบหยัก	4
4	โคโลนีมีสีขาว มันวาว ตรงกลางนูน ขอบเรียบ	1

3.6 การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

จากการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์จำนวน 21 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 และ ไพรเมอร์ rP2 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอในส่วนยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 21 ไอโซเลต โดยมีขนาดประมาณ 1500 bp ทุกไอโซเลตเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast search พบว่า สามารถเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์จากน้ำดื่มจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ WB1, WF3, WG2, WL1, WS2 และ WS3 และจากหัวจ่ายน้ำจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ SF1-1, SG3-1, SJ1-1, SB1-2, SB2-2, SB3-2, SF3-2, SG2-2, SL1-2, SS3-2, SF1-3, SG1-3, SJ2-3, SG2-3 และ SF2-4 (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 ชนิดของแบคทีเรียจากน้ำดื่มโดยใช้การเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Genbank

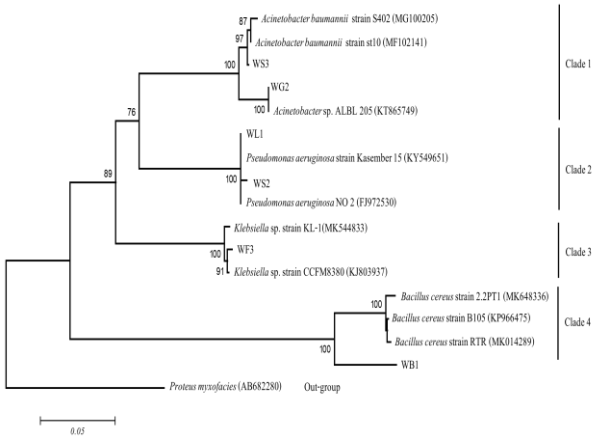
ไอโซเลต	สายพันธุ์	ความเหมือน (%)
WB1	*Bacillus cereus* strain RTR	99
WF3	*Klebsiella* sp. strain CCFM8380	99
WL1, WS2	*Pseudomonas aeruginosa* NO2	99
WG2	*Acinetobacter* sp. ALBL 205	99
WS3	*Acinetobacter baumannii* strain st10	99

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียจากหัวจ่ายน้ำโดยใช้การเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลต	สายพันธุ์	ความเหมือน (%)
SF1-1, SG3-1, SJ1-1	*Acinetobacter* sp. Strain EX-1	97-99
SB1-2, SB2-2 SB3-2, SF3-2, SG2-2, SL1-2, SS3-2	*Bacillus cereus* strain B105	98-99
SF1-3, SG1-3, SJ2-3, SG2-3	*Bacillus subtilis strain* APBSMLB131	97-99
SF2-4	*Klebsiella sp. Strain* KL-1	99

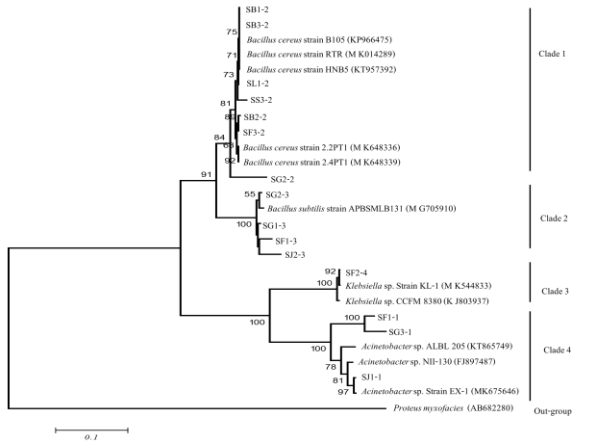
จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 21 ไอโซเลตมาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor - joining วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1,000

ครั้งตามวิธีการของ Kimura 2-parameter model ในการวิเคราะห์ พบว่า สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์จากน้ำดื่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *Acinetobacter* sp. และ *A. baumannii* จำนวน 2 ไอโซเลต, กลุ่มที่ 2 *P. aeruginosa* จำนวน 2 ไอโซเลต, กลุ่มที่ 3 *Klebsiella* sp. จำนวน 1 ไอโซเลต, และกลุ่มที่ 4 *B. cereus* จำนวน 1 ไอโซเลต (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงสายวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำดื่ม 6 ไอโซเลต กับแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor - joining ใช้โมเดล Kimura 2-parameter model (1,000 bootstrap replications)

และสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวจ่ายน้ำแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *B. cereus* จำนวน 7 ไอโซเลต, กลุ่มที่ 2 *B. subtilis* จำนวน 4 ไอโซเลต, กลุ่มที่ 3 *Klebsiella* sp. จำนวน 1 ไอโซเลต และกลุ่มที่ 4 *Acinetobacter* sp.จำนวน 3 ไอโซเลต (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงสายวิวัฒนาการระหว่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหัวจ่ายน้ำ 15 ไอโซเลต กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor - joining ใช้โมเดล Kimura 2-parameter model (1,000 bootstrap replications)

สรุปและอภิปรายผล

คุณภาพน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญโดยรอบมหาวิทยาลัยบูรพานั้นมีหลายตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำดื่มของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียทั้งในน้ำดื่ม และหัวจ่ายน้ำ โดยจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า คุณภาพของตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญมี 1 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ได้แก่ ตู้รหัส F3 คิดเป็นร้อยละ 6.67 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยปัจจัยที่ทำให้ตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญไม่เป็นไปตามเกณฑ์นั้นมีได้หลายสาเหตุ ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากขาดการบำรุงดูแลรักษาตู้ และการไม่ดูแลรักษาภายในบริเวณตู้ เช่น จากตัวอย่างตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญบางแห่งมีสาหร่ายและตะไคร่น้ำสีเขียวเกาะภายในตู้และหัวจ่ายน้ำ ซึ่งอาจกลายเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ได้ ปัญหาในข้อนี้ถึงแม้ว่าจะมีการบำรุงรักษาเครื่องกรองน้ำเป็นประจำ แต่ถ้าหัวจ่ายไม่สะอาดสามารถส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งผู้ประกอบการธุรกิจตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญควรต้องมีการบำรุงดูแลรักษาตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญอย่างสม่ำเสมอ โดยผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ นรา ระวาดชัย และ วรางคณา สังสิทธิสวัสดิ์ (2555) [15] พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำดื่มจากตู้หยอดเหรียญอัตโนมัติคือ สภาพพร้อมใช้งานของประตูเปิด-ปิด ช่องจ่ายน้ำ เช่น ไม่มีประตูเปิด-ปิดช่องจ่าย หรือประตูเปิดปิดช่องจ่ายน้ำชำรุด มีผลต่อคุณภาพน้ำดื่มตู้หยอดเหรียญอัตโนมัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.03) เป็นต้น จากการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำดื่ม และหัวจ่ายน้ำจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับน้ำดื่มและหัวจ่ายน้ำ ได้แก่ *B. cereus, B. subtilis Acinetobacter* sp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, และ *Klebsiella* sp. ซึ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้พบกลุ่มที่เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม เช่น *Klebsiella* sp. เป็นต้น แต่ไม่พบกลุ่มที่เป็นฟีคัลโคลิฟอร์ม นอกนั้นจะเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนจากดิน, บ่อน้ำ, ขยะ หรืออาจมาจากการสัมผัสจากผิวหนังที่มีการปนเปื้อนซึ่งการพบเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้อาจส่งผลต่อคุณภาพของน้ำดื่มทำให้น้ำดื่มไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข [2] นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียที่พบในการปนเปื้อนมากับน้ำดื่มสอดคล้องกับงานวิจัยของ กัญญา และคณะ (2558) พบว่าคุณภาพน้ำดื่มตู้หยอดเหรียญในอำเภอพระนครศรีอยุธยามีหลายแหล่งที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำดื่มของกระทรวงสาธารณะสุขโดยพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มรวม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* และ *Citrobacter* และยังตรวจ

พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *S. aureus* โดยเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสารพิษ และยังเป็นสารพิษที่อาจก่อโรคทางทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ McFeters (1990) [16] ได้ศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำดื่มในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย ได้แก่เชื้อ *Acinetobacter,Cytophoga,Moraxella*, *Pseudomonas Alcaligenes* spp., *Flavobacterium, Achromobacter* เป็นต้น Bitton (1994) [17] รายงานว่าในน้ำดื่มจากตู้กดน้ำสาธารณะมักพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน ได้แก่เชื้อ *P. aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *A. baumanii* และ *Flavobacterium meningosepticum* จะเห็นได้ว่าเชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่สามารถทำให้เกิดโรคได้หลายโรค และหลายอาการได้ซึ่งกำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อกระทรวงสาธารณสุขในปัจจุบัน โดยในงานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง เช่น นิสิตนักเรียน และประชาชนทั่วไปที่นิยมดื่มน้ำจากตู้กดน้ำหยอดเหรียญเนื่องจากสะดวกและใกล้หอพักหรือที่อยู่อาศัยในบริเวณนั้น ดังนั้น ผู้บริโภคจึงควรตระหนักถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้น และควรมีการตรวจสอบสภาพตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญก่อนบริโภคเสมอโดยต้องเลือกตู้กดน้ำที่สะอาด และถูกสุขลักษณะตามที่ประกาศการควบคุมการประกอบกิจการตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญของกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2553 รวมถึงให้ผู้ประกอบการทำการตรวจสอบ และบำรุงดูแลรักษาตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญอย่างสม่ำเสมอ โดยเฉพาะชิ้นส่วนไส้กรองน้ำที่ทำหน้าที่ในการกรองจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำดิบ และบริเวณหัวจ่ายน้ำที่ต้องสัมผัสกับน้ำดื่มที่ออกมาจากตัวเครื่อง เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในการเลือกบริโภคน้ำดื่มจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากโครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน โดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัย (โครงการ วมว.) สนับสนุนโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

[1] ธัญธิมา สุรวิทย์. 2545. รายงานการวิจัยการตรวจคุณภาพน้ำดื่มในหอสถาบันราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. สถาบันราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, ปทุมธานี, ข้อมูลจาก http://opac.vru.ac.th/BibList.aspx?keylid=54573&word=น้ำ--วิจัย.&type=su:log=false (วันที่สืบค้นข้อมูล 5 กุมภาพันธ์ 2562).

[2] กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2556. การประเมินคุณภาพน้ำจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ, ข้อมูลจาก http://foodsan.anamai.moph.go.th/download/D_Media/Handbook/คู่มือปฏิบัติตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญOK.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล 21 ตุลาคม 2561).

[3] สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2558. น้ำดื่ม-น้ำแข็ง เสี่ยงปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์, ข้อมูลจาก https://www.thaihealth.or.th (วันที่สืบค้นข้อมูล 22 ก.พ. 2562).

[4] ประมวล อุปมัย.2545. การตรวจเชื้อแบคทีเรียอาหารเป็นพิษในอาหารปรุงสำเร็จในโรงอาหาร วิทยาเขตกำแพงแสน,วิทยานิพนธ์, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์.

[5] พลับพลึง เทพวิทักษ์กิจ, เสาวนิตย์ บุณพัฒนศักดิ์, อโณทัย ศรีตนไชย และมุทิตา น้อยอ้าย. 2555. ความชุกของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย, ข้อมูลจาก http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/net/BDMS/data/543416673.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล 21 ตุลาคม 2561).

[6] กัญญา กอแกว, วรรณดี แสงดี, ดารานัย รบเมือง และกานดาวดี โนชัย. 2558. สำรวจการปนเปอนของจุลินทรีย จากน้ำดื่มตูหยอดเหรียญในเขตอำเภอพระนครศรีอยุธยา, ข้อมูลจาก http://research.rmutsb.ac.th/fullpaper/2558/2558240240382.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล 21 ตุลาคม 2561).

[7] กัลยา วานิชย์บัญชา. 2542. สถิติสำหรับงานวิจัย, ข้อมูลจากhttp://pioneer.netserv.chula.ac.th/~jaimorn/re6.html (วันที่สืบค้นข้อมูล 21 ตุลาคม 2561).

[8] ชัชวาล อินทรมนตรี และเพ็ญศรี บุญตามช่วย. 2552. การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย, ข้อมูลจาก http://www.aquathai.org/i0_6b586.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล 22 ก.พ. 2562).

[9] Coico, R. 2005. Gram Staining, Current Protocols in Microbiology, 00 (1): Appendix 3C. doi:10.1002/9780471729259.mca03cs00.

[10] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, Journal of Bacteriology, 173, 697–703.

[11] Thompson, J.D., Higgins. D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research, 11(22), 4673-80.

[12] Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series. 41, 95-98.

[13] Kumar, S., Stecher, G., Li, M, Knyaz, C., &Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, Molecular Biology and Evolution, 35 (6), 1547–1549.

[14] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 362) พ.ศ. 2556 เรื่อง น้ำบริโภคจากตู้น้ำดื่มอัตโนมัติ.2556. ข้อมูลจาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/8_No56_362.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล 1 สิงหาคม 2562).

[15] นรา ระวาดชัย, วรางคณา สังสิทธิสวัสดิ์. 2555. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำดื่มจากตู้หยอดเหรียญอัตโนมัติ, วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 17(3), 480-492.

[16] McFeters, G.A. 1990. Microbiology of drinking water distribution, Drinking Water Microbiology, Chapter 3. pp. 40-45.

[17] Bitton, G. 1994. Microbiological aspects of drinking water treatment and distribution, Wastewater Microbiology, pp. 261-92.