



## บริษัท นอร์ทเทอรัน ฟู้ด คอมเพล็กซ์ จำกัด

วิธีการปฏิบัติงาน	เรื่อง : การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์	หน้า 1 ของ 47
รหัสเอกสาร : WI-QC-73	วันที่ประกาศใช้ : 1 สิงหาคม 2562	แก้ไขครั้งที่ : 06
จัดทำโดย :  หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ	ทบทวนโดย :  ผู้จัดการฝ่ายวางแผนและควบคุมการผลิต	อนุมัติโดย :  ตัวแทนฝ่ายบริหารคุณภาพ

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติที่ถูกต้องตรงกันในการวิเคราะห์ตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์

### 2. ผู้ปฏิบัติงาน

พนักงานควบคุมคุณภาพ

### 3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ควรมีขนาดพอเพียงสำหรับฆ่าเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายเชื้อจาก เป็นต้น

3.2 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ตู้อบฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง ใช้สำหรับฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่เป็นโลหะ ควรมีขนาดพอเหมาะ มี Thermostat สำหรับควบคุมอุณหภูมิ

3.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ตู้ควรจะมีขนาดพอเหมาะ เพื่อป้องกันการแออัดของการเพาะเชื้อ การควบคุมอุณหภูมิสามารถเปลี่ยนแปลงจากที่ตั้งไว้ไม่เกิน  $\pm 1^{\circ}\text{C}$

3.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ควรมีขนาดพอเหมาะกับการทำงานที่มี Thermostat สำหรับควบคุมอุณหภูมิในการรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น (Agar) ที่เป็นส่วนประกอบให้เหลวอยู่เสมอที่อุณหภูมิ  $50 - 60^{\circ}\text{C}$

3.5 ตู้เย็น (Refrigerator) สำหรับเก็บตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ อุณหภูมิที่ใช้ควรอยู่ระหว่าง  $0 - 4.4^{\circ}\text{C}$

3.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ทำจากแก้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 90-100 mm.

3.7 หลอดทดลองฝาเกลียว (Screw cap tubes) ควรมีขนาดพอเหมาะ

3.8 หลอดดัดกักก๊าซ (Durhams tube) ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีปฏิกิริยาการเกิดก๊าซ ขนาด 10x75 mm.

3.9 ขวดทำให้เชื้อจาก (Bottle) ขนาด 150 และ 250 ml. ทนต่อความร้อนใน Autoclave ได้

3.10 ปิเปต (Pipettes) ขนาด 1, 2, 5 และ 10 ml.

3.11 ภาชนะใส่จานเพาะเชื้อ ควรเป็นภาชนะที่ทำด้วยเหล็กปลอดสนิม ขนาดพอเหมาะ

3.12 ภาชนะใส่ Pipettes ควรทำด้วยเหล็กปลอดสนิม มีจำนวนมากพอกับ Pipettes โดยใส่ประมาณ 20 Pipette ต่อ 1 กระบอก



3.13 เครื่องชั่ง (Balance) ควรมีความไว 0.1 กรัม และชั่งได้ถึง 200 กรัม

3.14 ตะเกียงเบนเซน

3.15 ที่ใส่หลอดทดลอง (Racks) และตะกร้า ใช้สำหรับใส่หลอดทดลอง

3.16 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)

3.17 ห่วงเย็บเชื้อ (Loop)

3.18 ถาดสำหรับใส่ Disinfectant ใช้สำหรับใส่ Pipette ที่ใช้แล้วหรือเครื่องใช้อื่นที่ใช้แล้ว

3.19 โต๊ะหรือ Counter สำหรับทำงาน ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่าง เทอาหารสำหรับเพาะเชื้อ ฯลฯ จะต้องสะอาดมีการถ่ายเทอากาศดี และต้องปราศจากฝุ่น

#### 4. การเตรียมเครื่องมือ

4.1 การฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ที่จะใช้ในการทำ Lab จะต้องทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4.2 การอบอุปกรณ์ ภาชนะที่ใช้ในการทำ Lab เช่น จานเพาะเชื้อ (Petri dish), ปิเปต (Pipettes) ต้องทำการอบที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3 การล้าง อุปกรณ์ทุกชนิดที่จะต้องล้างต้องผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หรือน้ำยาฆ่าเชื้อ

##### 4.3.1 ปิเปต (Measuring pipette)

###### 4.3.1.1 นึ่งฆ่าเชื้อ

###### 4.3.1.2 ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 รอบ

4.3.1.3 แช่ในกรด Decon 90 2% หรือน้ำยาทำความสะอาดชนิด Non-ionic ในระดับที่เหมาะสม ประมาณ 30 – 60 นาที

###### 4.3.1.4 ทำความสะอาดด้วยฟองน้ำ หรือสก็อตไบร์

###### 4.3.1.5 ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จนปราศจากน้ำยาทำความสะอาดที่ตกค้างอยู่

###### 4.3.1.6 อบให้แห้ง

###### 4.3.1.7 ใช้สำลีอุดปลายด้านที่ใช้ดูดตัวอย่าง

###### 4.3.1.8 อบฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน

##### 4.3.2 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

###### 4.3.2.1 นึ่งฆ่าเชื้อ

###### 4.3.2.2 ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 รอบ

4.3.2.3 แช่ในกรด Decon 90 2% หรือน้ำยาทำความสะอาดชนิด Non-ionic ในระดับที่เหมาะสม ประมาณ 30 – 60 นาที



4.3.2.4 ทำความสะอาดด้วยฟองน้ำ หรือสก็อตไบร์

4.3.2.5 ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จนปราศจากน้ำยาทำความสะอาดที่ตกค้างอยู่

4.3.2.6 อบให้แห้ง

4.3.2.7 เก็บใส่กระบอก จานเลี้ยงเชื้อสแตนเลส

4.3.2.8 อบฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน

4.3.3 Tip ของ Easy pipette และ แท่งแก้วอ

4.3.1.1 นึ่งฆ่าเชื้อ

4.3.1.2 ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 รอบ

4.3.1.3 แช่ในกรด Decon 90 2% หรือน้ำยาทำความสะอาดชนิด Non-ionic ในระดับที่เหมาะสม ประมาณ 30 – 60 นาที

4.3.1.4 ทำความสะอาดด้วยฟองน้ำ หรือสก็อตไบร์

4.3.1.5 ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จนปราศจากน้ำยาทำความสะอาดที่ตกค้างอยู่

4.3.1.6 อบให้แห้ง

4.3.1.7 ห่อด้วยกระดาษฟอยด์อีกครั้ง

4.3.1.8 อบฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน

## 5. การตรวจสอบประสิทธิภาพและการบำรุงรักษาเครื่องมือ

### 5.1 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

5.1.1 ตรวจสอบระดับน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดก่อนใช้งานทุกครั้ง และน้ำที่ใช้ต้องเป็นน้ำกลั่น

5.1.2 ตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องเดือนละ 1 ครั้ง โดยใช้ Geobacillus stearothermophilus หากเครื่องมือไม่เสื่อมประสิทธิภาพ เชื้อดังกล่าวจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้อุณหภูมิ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

5.1.3 ควรทำความสะอาดภายใน Chamber และเปลี่ยนน้ำใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อมีสิ่งสกปรกตกลงไป

5.1.4 ตรวจสอบการทำงานของระบบต่างๆ โดยเฉพาะ Safety valve ปีละ 1 ครั้ง โดยช่างผู้ชำนาญการ

### 5.2 เครื่องชั่ง (Balance)

5.2.1 ควรตั้งเครื่องชั่งบนฐานที่มั่นคงไม่สั่นไหวง่าย ถ้าเป็นเครื่องชั่งไฟฟ้าต้องปรับระดับลูกน้ำให้อยู่ในตำแหน่งที่กำหนดทุกครั้งก่อนใช้งาน

5.2.2 ปรับค่าสมดุลย์ (ปรับให้ได้ศูนย์หรือแนวสมดุลย์) ในลักษณะที่ไม่มีน้ำหนักขึ้นชั่งทุกครั้งก่อนใช้งาน



5.2.3 ทำความสะอาดเครื่องชั่งทุกครั้งหลังใช้งาน

5.2.4 ตรวจสอบความเที่ยงตรงทุกๆ 3 เดือน โดยใช้ตุ้มน้ำหนักมาตรฐาน ซึ่งยอมให้มีค่าความเบี่ยงเบนได้ 0.1 กรัม

5.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

5.3.1 จัดบันทึกเวลา และอุณหภูมิที่ใช้เครื่องทุกครั้ง รวมทั้งอย่าใช้ของที่จะอบมากเกินไป

5.3.2 ทำความสะอาดภายในตู้อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง

5.3.3 ตรวจสอบระบบการทำงาน สอบเทียบเทอร์โมมิเตอร์ที่ติดมากับตัวตู้ และระบบการกระจายตัวของความร้อนที่จุดต่างๆ ปีละ 1 ครั้ง โดยช่างผู้ชำนาญการ

5.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

5.4.1 จัดบันทึกระดับอุณหภูมิของตู้ทุกครั้งที่มีการทำงาน (อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงได้  $37 \pm 1$  °C )

5.4.2 ทำความสะอาดภายในตู้ด้วย Detergent หรือน้ำยาฆ่าเชื้ออย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง

5.4.3 ตรวจสอบการทำงาน สอบเทียบเทอร์โมมิเตอร์ที่ติดมากับตัวตู้โดยช่างผู้ชำนาญ ปีละ 1 ครั้ง

5.5 อ่างน้ำ (Water bath)

5.5.1 ตรวจสอบระดับน้ำภายใน Chamber ทุกวัน ถ้าพบว่าพร่องไปควรเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง

5.5.2 ตรวจสอบอุณหภูมิของน้ำทุกๆ วัน เครื่องมือนี้จะใช้อุณหภูมิ 40.0 หรือ 46.0 °C ซึ่งยอมให้มีค่าเบี่ยงเบนได้ 0.1 °C บันทึกผลที่อ่านได้ในแต่ละครั้ง เพื่อดูอุณหภูมิที่เบี่ยงเบนที่ต้องการทุก 1 เดือน

5.5.3 ทำความสะอาดใน Chamber สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเห็นว่าสกปรก ถ้าไม่ใช้งานเกินกว่า 2 สัปดาห์ ควรปล่อยน้ำทิ้ง ทำความสะอาดและเช็ดให้แห้ง

## 6. การเตรียมพื้นที่ก่อนการตรวจสอบ

6.1 เปิด สวิตช์ หลอด UV Lamp ทิ้งไว้ ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการเตรียมตู้เชื้อเชื้อ

6.2 พ่น Alcohol 70% ให้ทั่วในตู้เชื้อเชื้อ โดยเฉพาะช่องลม

6.3 เปิดสวิตช์ตู้เชื้อเชื้อโดยใช้ลมระดับแรง

6.4 ใช้ผ้าสำหรับทำความสะอาดชุบน้ำยาฆ่าเชื้อ เช็ดมือและแขน (ถึงบริเวณข้อศอก)

6.5 เปิดลมระดับนี้ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที(จนตู้แห้ง)ก่อนเริ่มทำการตรวจสอบ

6.6 นำอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเข้าในตู้เชื้อเชื้อ โดยอุปกรณ์ทุกชนิดต้องแห้ง

6.7 เมื่อเริ่มทำการตรวจสอบให้ใช้ลมระดับเบา และเปิดไว้ตลอดการปฏิบัติงาน

ข้อควรระวัง

1. ต้องถอดนาฬิกา หรือเครื่องประดับก่อนปฏิบัติงาน

2. การพ่น Alcohol และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ต้องให้ทั่วถึง



3. ขณะปฏิบัติงาน ถ้ามีความจำเป็นต้องออกจากพื้นที่ของตู้แช่เย็น เมื่อกลับเข้ามาจะต้องทำความสะอาดมือและแขนก่อนที่จะเริ่มปฏิบัติงานต่อทุกครั้ง

## 7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 7.1 Buffer Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

7.1.1 ชั่ง Peptone 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จนละลายให้หมด ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร จะได้ Buffer Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

7.1.2 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.1.3 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

### 7.2 Plate Count Agar

7.2.1 ชั่งอาหาร 22.5 กรัม

7.2.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.2.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดดูลูแลมป์

7.2.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.2.5 ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50 – 60 °C ก่อนนำไปใช้งาน

### 7.3 Potato Dextrose Agar

7.3.1 ชั่งอาหาร 39.0 กรัม

7.3.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.3.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดดูลูแลมป์

7.3.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.3.5 ชั่ง Tartaric Acid จำนวน 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยวิธีปลอดเชื้อ จะได้สารละลาย Tartaric Acid ความเข้มข้นร้อยละ 10

7.3.6 ปิเปตสารละลาย Tartaric Acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้อาหารมี pH อยู่ประมาณ 3.5 (ใช้กรด tartaric 1.9 มล. ต่อ อาหาร PDA 100 มล.)

7.3.7 เขย่าให้สารละลาย Tartaric Acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ทั่วถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ก่อนนำไปใช้งาน

7.3.8 ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50 – 60 °C ก่อนนำไปใช้งาน



7.4 Lauryl Sulphate Tryptose Broth

7.4.1 ชั่งอาหาร 35.6 กรัม

7.4.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.4.3 ดูดอาหารที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.4.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20

นาที

7.4.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

7.5 Eosin methylene blue agar

7.5.1 ชั่งอาหาร 36 กรัม

7.5.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.5.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดตุลัมป์

7.5.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา

20 นาที

7.5.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

7.6 Brilliant-green Lactose Bile Broth

7.6.1 ชั่งอาหาร 40 กรัม

7.6.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.6.3 ดูดอาหารที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.6.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา

20 นาที

7.6.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

7.7 Tryptone water

7.7.1 ชั่งอาหาร 20 กรัม

7.7.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.7.3 ดูดอาหารที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.7.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา

20 นาที

7.7.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน



#### 7.8 Baird Parker Agar

7.8.1 ชั่งอาหาร 58 กรัม

7.8.2 นำน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.8.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดดูแลมป์

7.8.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20

นาที

7.8.5 ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50 – 60 °C เติม Egg York Tellurite Sterile Emulsion ก่อนนำไปใช้งาน

สัดส่วนการเติม Egg York Tellurite Sterile Emulsion ตามตาราง

รายการ	ปริมาณ
1. BPA	60 กรัม
2. น้ำกลั่น	950 มล.
3. Egg York Tellurite Sterile Emulsion	50 มล.

#### 7.9 Nutrient Broth

7.9.1 ชั่งอาหาร 8 กรัม

7.9.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.9.3 ดูดอาหารที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.9.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20

นาที

7.9.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

#### 7.10 Lactose Broth

7.10.1 ชั่งอาหาร 13 กรัม

7.10.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจน

เดือด

7.10.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดดูแลมป์ในปริมาณขวดละ 225 มิลลิลิตร

7.10.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20

นาที

7.10.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน



7.11 Selenite Cysteine Broth

7.11.1 ชั่งอาหาร 4 กรัม

7.11.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจน

เดือด

7.11.3 ผุดอาหารที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.11.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

20

7.11.5 ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

7.12 Bismuth Sulfite Agar

7.12.1 ชั่งอาหาร 52.33 กรัม

7.12.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจน

เดือด

7.12.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดดูแลมป์

7.12.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.12.5 ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 50 – 60 °C ก่อนนำไปใช้งาน

7.13 Triple Sugar Iron Agar

7.13.1 ชั่งอาหาร 65 กรัม

7.13.2 นำน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจน

เดือด

7.13.3 เทอาหารที่เตรียมลงในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.13.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.13.5 เอียง Slant ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน

7.14 Nutrient Agar

7.14.1 ชั่งอาหาร 8 กรัม

7.14.2 นำน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจน

เดือด

7.14.3 เทอาหารที่เตรียมลงในหลอดทดลองฝาเกลียว

7.14.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.14.5 เอียง Slant ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปใช้งาน





7.15 Mannitol egg yolk – polymyxin (MYP) agar

7.14.1 ชั่งอาหาร 43 กรัม

7.14.2 นำน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ไปต้มให้เดือดแล้วนำอาหารที่ชั่งไว้ใส่แล้วคนให้เข้ากัน รอจนเดือด

7.14.3 เทอาหารที่เตรียมลงในขวดตุลัมบีในปริมาณที่พอเหมาะ

7.14.4 นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7.14.5 นำไปทำให้เย็น อุณหภูมิ 50 - 60 °C จากนั้นเติม PolymyxinB sulfate ละลายให้เข้ากัน

สัดส่วนการเติม Egg York Tellurite Sterile Emulsion ตามตาราง

รายการ	ปริมาณ
1. MYP	43 กรัม
2. น้ำกลั่น	900 มล.
3. Sterile Egg York Emulsion	100 มล.
4. Polymyxin B Sulfate	0.1 – 0.01 g/L.

7.16 Ammonium Oxalate Crystal Violate

7.16.1 ชั่ง Crystal Violate 2 กรัม ละลายใน Ethyl Alcohol 95% 20 มิลลิลิตร

7.16.2 ชั่ง Ammonium Oxalate 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

7.16.3 นำสารละลายข้อ 7.16.1 และข้อ 7.16.2 คนให้ละลายเข้ากัน

7.17 สารละลายไอโอดีน

7.17.1 ชั่ง Iodine 1 กรัม บดให้ละเอียด

7.17.2 ชั่ง Potassium Iodide (KI) 2 กรัม บดให้ละเอียด

7.17.3 นำสารข้อ 7.17.1 และข้อ 7.17.2 มาผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7.18 Safranin

ชั่ง Safranin 0.25 กรัม ละลายใน Ethyl Alcohol 95% 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลวสีแดงไปใช้



## 8.การเตรียมน้ำสำหรับทำ Dilution

8.1 ตรวจนับชนิดและจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจสอบ เพื่อกำหนดจำนวนหลอดทดลองที่จะใช้

8.2 ตริยมน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water ดังนี้

8.2.1 Buffer Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

8.2.1.1 ชั่ง Peptone 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น

8.2.1.2 ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

8.3 บรรจุน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 9 มิลลิลิตร. โดยใช้ Easy pipette จำนวนหลอดนั้นขึ้นอยู่กับมาตรฐานการตรวจสอบของตัวอย่างแต่ละชนิด (ตามตารางการเลือกใช้น้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water สำหรับการทำ Dilution )

8.4 กรณีที่เตรียมทั้งน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water พร้อมกัน ให้ทำสัญลักษณ์แยกกันไว้ทุกครั้งเพื่อป้องกันการสับสน

8.5 นำมาฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

ตารางการเลือกใช้น้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water สำหรับการทำ Dilution

รายการ	น้ำกลั่น	Buffer Peptone Water	Lactose Broth
1. Heaping และ Koji	*		
3.Swab test		*	
4. TPC		*	
5. Yeast & Mold		*	
6. Coliform		*	
7. E.Coli		*	
8. Staphylococcus aureus		*	
9.Salmonella		*	
10. Bacillus Cereus			*

## 9. การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่าง Lot ละ 1 หรือตามผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด กรณี เป็นสินค้า ขนาด 5 ลิตร ขึ้นไป ให้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง ในขวดเก็บตัวอย่าง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

## 10. การทำ Dilution

### 10.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

10.1.1 หลอดทดลองที่มีน้ำสำหรับทำ Dilution

10.1.2 pipette ขนาด 1, 2, 5, 10 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

10.1.3 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

### 10.2 ขั้นตอน

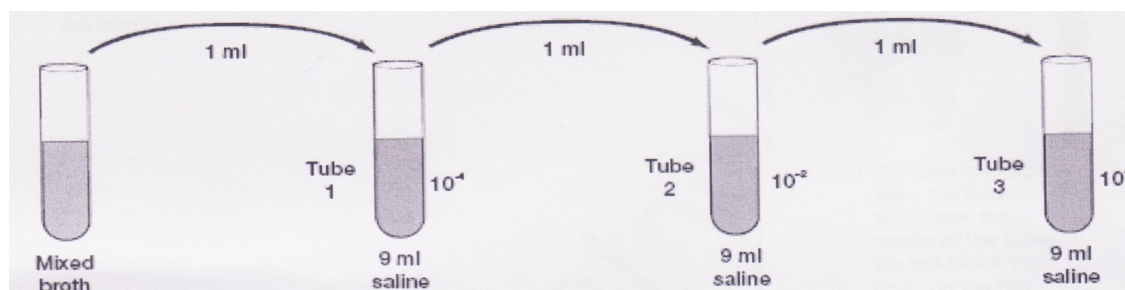
10.2.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง เช่น Heaping Koji และ Moromi

10.2.1.1 ใช้ปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวในขวดที่บรรจุตัวอย่างนั้นมา 1 มล. ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water ที่เตรียมไว้สำหรับทำ Dilution ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ความเข้มข้นของหลอดนี้ คือ  $1:10 (10^{-1})$

10.2.1.2 เขย่าหลอดทดลองข้อ 10.2.1.1 ด้วย Vortex Mixer เพื่อให้ตัวอย่างกระจายตัว

10.2.1.3 ปิเปตตัวอย่างข้อ 10.2.1.2 มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water หลอดใหม่ ความเข้มข้นของหลอดใหม่คือ  $1:100 (10^{-2})$

10.2.1.4 ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 10.2.1.1 – 10.2.1.3 เรื่อยไปจนได้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการ ตามมาตรฐานการตรวจสอบของตัวอย่างนั้นๆ ดังแสดงในรูป



10.2.1.5 ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นที่ต้องการใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ มาตรฐานการเลือกใช้ความเข้มข้นตามตารางที่แนบมาทำขั้นตอนการปฏิบัติงาน

### 10.2.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว

10.2.2.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างนั้นมา 1 มิลลิลิตร ปล่อยลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water ที่เตรียมไว้สำหรับ ทำ Dilution ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ความเข้มข้นของหลอดนี้ คือ  $1:10 (10^{-1})$

10.2.2.2 เขย่าหลอดทดลองข้อ 10.2.2.1 ด้วย Vortex Mixer เพื่อให้ตัวอย่างกระจายตัว

10.2.2.3 ปิเปตตัวอย่างข้อ 10.2.2.2 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water หลอดใหม่ ความเข้มข้นของหลอดใหม่คือ  $1:100 (10^{-2})$

10.2.2.4 ทำซ้ำเรื่อยไปจนได้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการ ตามมาตรฐานการตรวจสอบของตัวอย่างนั้นๆ ดังแสดงในตาราง



10.2.2.5 ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นที่ต้องการใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ปริมาณ 1 มิลลิเมตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ

ข้อควรระวัง

1. น้ำกลั่น หรือ Buffer Peptone Water ก่อนที่จะนำมาใช้ ต้องไม่ร้อนเกินไป โดยทดสอบด้วยการนำมาแตะที่ท้องแขน ถ้ารู้สึกอุ่นๆ ไม่ร้อนจัดแสดงว่าใช้ได้
2. อุปกรณ์ทุกชนิดก่อนนำเข้าไปในตู้เยี่ยเชื้อต้องเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อและต้องแห้งก่อน
3. ปิเปตหนึ่งอันใช้ดูดตัวอย่างได้เพียงหนึ่งครั้งเท่านั้น

#### ตารางการเลือกทำ Dilution

รายการ	ความเข้มข้นที่นำมาใส่ในจานเพาะเชื้อ
1. Heaping	$10^{-1}$ และ $10^{-3}$
2. Koji	$10^{-5}$ และ $10^{-7}$
3. ผลิตรากที่บรรจุร้อน	Yeast and Mold ใช้ $10^{-1}$
	TPC ใช้ $10^{-1}$ และ $10^{-2}$
4. ผลิตรากที่บรรจุอุณหภูมิปกติ	Yeast and Mold ใช้ $10^{-1}$
	TPC ใช้ $10^{-1}$ และ $10^{-2}$
5. ผลิตรากที่เหี่ยว	Yeast and Mold ซึ่งตัวอย่างใน Buffer Peptone อัตราส่วน 90 มล. : 10 กรัม เชย้า แล้วปิเปต 1 มล. เป็น $10^{-1}$
	TPC ซึ่งตัวอย่างใน Buffer Peptone อัตราส่วน 90 มล. : 10 กรัม เชย้า แล้วปิเปต 1 มิลลิเมตร เป็น $10^{-1}$ ใช้ $10^{-1}$ และ $10^{-2}$
6. Swab test	$10^{-1}$ และ $10^{-3}$



## 11. วิธีการวิเคราะห์

### 11.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ตามวิธี AOAC,2000

#### 11.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 11.1.1.1 Buffer Peptone Water

##### 11.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar

#### 11.1.2 วิธีการ

11.1.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใน Buffer Peptone Water 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ dilution ที่ 1 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 1 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 2 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 2 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 3 หรือให้เจือจางต่อไปจนกว่าจะอ่านจุลินทรีย์ได้ 30 หรือ 300 โคโลนี

11.1.2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ความเข้มข้นละ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด

11.1.2.3 เทอาหาร Plate count agar ที่ยังเหลวอยู่มีอุณหภูมิประมาณ 50 - 60 °C ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

11.1.2.4 ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง กลับจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37±1 °C เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง

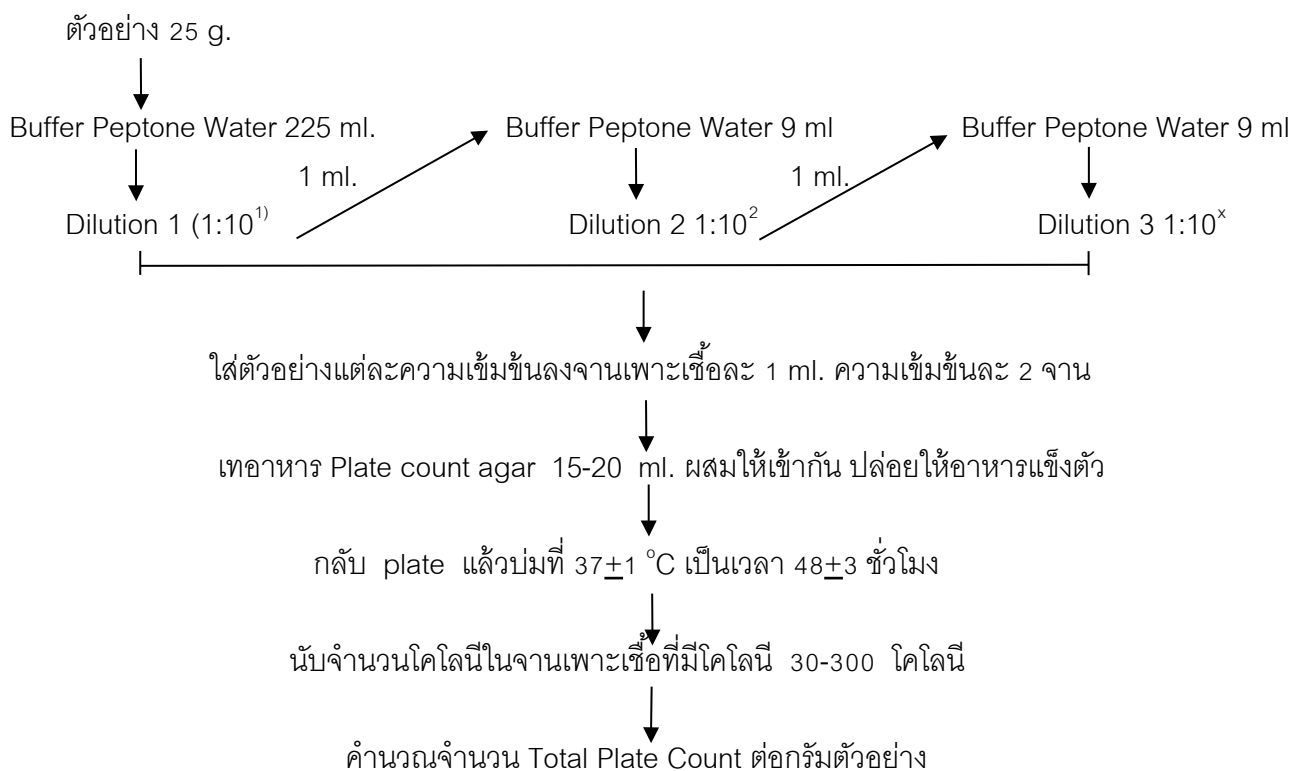
11.1.2.5 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณ 30-300 โคโลนี แล้วหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม

#### การคำนวณ

$$\text{Total Plate Count (Cfu/g.)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาตร หรือ น้ำหนักตัวอย่าง}}$$



11.1.3 Flow chart





## 11.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) ตามวิธี AOAC,2000

### 11.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 11.2.1.1 Buffer Peptone Water

#### 11.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar

### 11.2.2 วิธีการ

11.2.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใน Buffer Peptone Water 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ dilution ที่ 1 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 1 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 2 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 2 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 3 หรือให้เจือจางต่อไปจนกว่าจะอ่านจุลินทรีย์ได้ 30 หรือ 300 โคโลนี

11.2.2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ความเข้มข้นละ 2 จาน โดยเริ่มจากระดับความเข้มข้นต่ำสุด

11.2.2.3 เทอาหาร Potato Dextrose agar ที่ยังเหลวอยู่มีอุณหภูมิประมาณ 50 - 60 °C ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

11.2.2.4 ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง กลับจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่  $30 \pm 1$  °C เป็นเวลา  $72 \pm 3$  ชั่วโมง

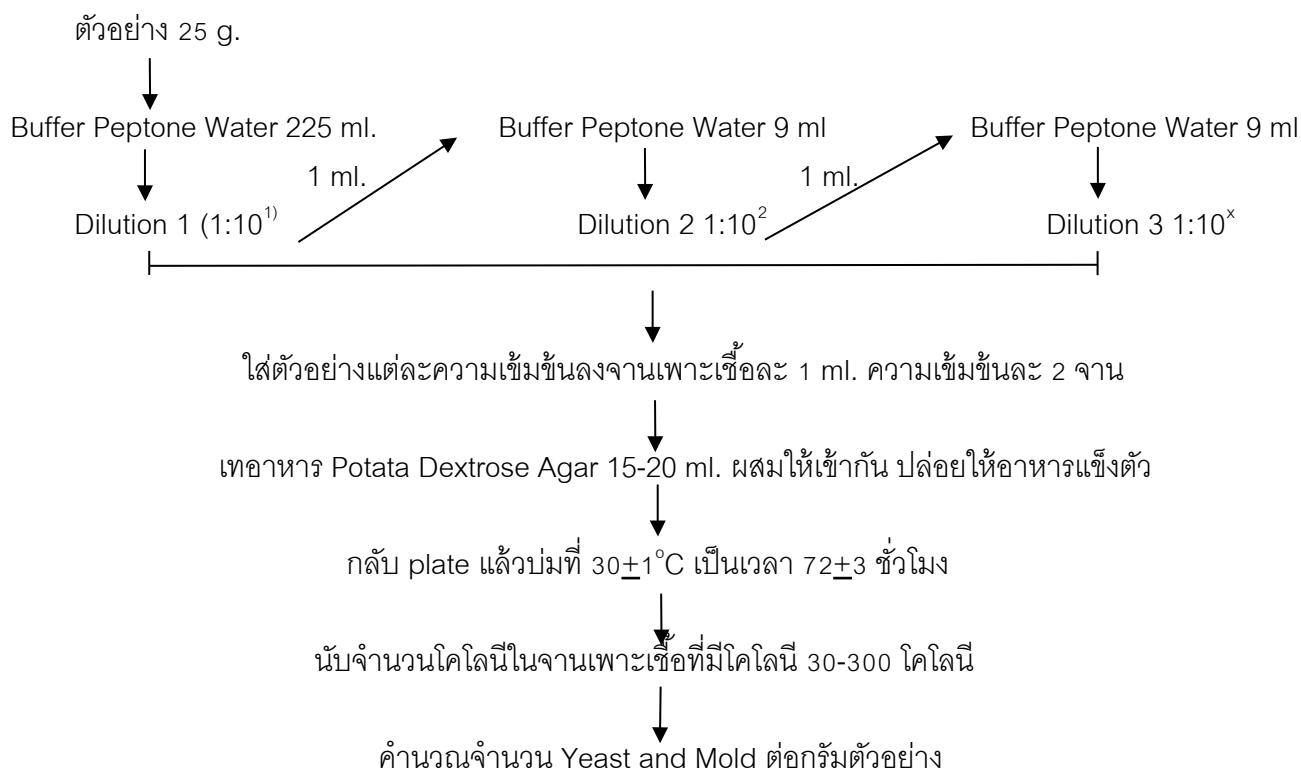
11.2.2.5 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณ 30-300 โคโลนี แล้วหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม

### การคำนวณ

$$\text{Yeast and Mold (Cfu/g.)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาตร หรือ น้ำหนักตัวอย่าง}}$$



11.2.3 Flow chart







### 11.3 Coliform ตามวิธี AOAC,2000

#### 11.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 11.3.1.1 Buffer Peptone Water

##### 11.3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate tryptose broth

##### 11.3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green Lactose Bile Broth

##### 11.3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar

#### 11.3.2 วิธีการ

11.3.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ dilution ที่ 1 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 1 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 2 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 2 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 3 หรือให้เจือจางต่อไปจนกว่าจะอ่านจุลินทรีย์ได้ 30 หรือ 300 โคโลนี

11.3.2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Lauryl sulphate tryptose broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

11.3.2.3 นำหลอดทดลองไปป้อนในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา  $48\pm 2$  ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อ Coliform เจริญในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซใดเลย แสดงว่าให้ผลลบ และไม่มีเชื้อ Coliform เจริญในตัวอย่าง

11.3.2.4 การรายงานจำนวน Coliform ในตัวอย่างที่เกิดก๊าซขึ้น โดยเทียบกับตาราง MPN แล้วรายงานเป็นจำนวน Coliform ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

#### 11.3.3 การยืนยัน Coliform

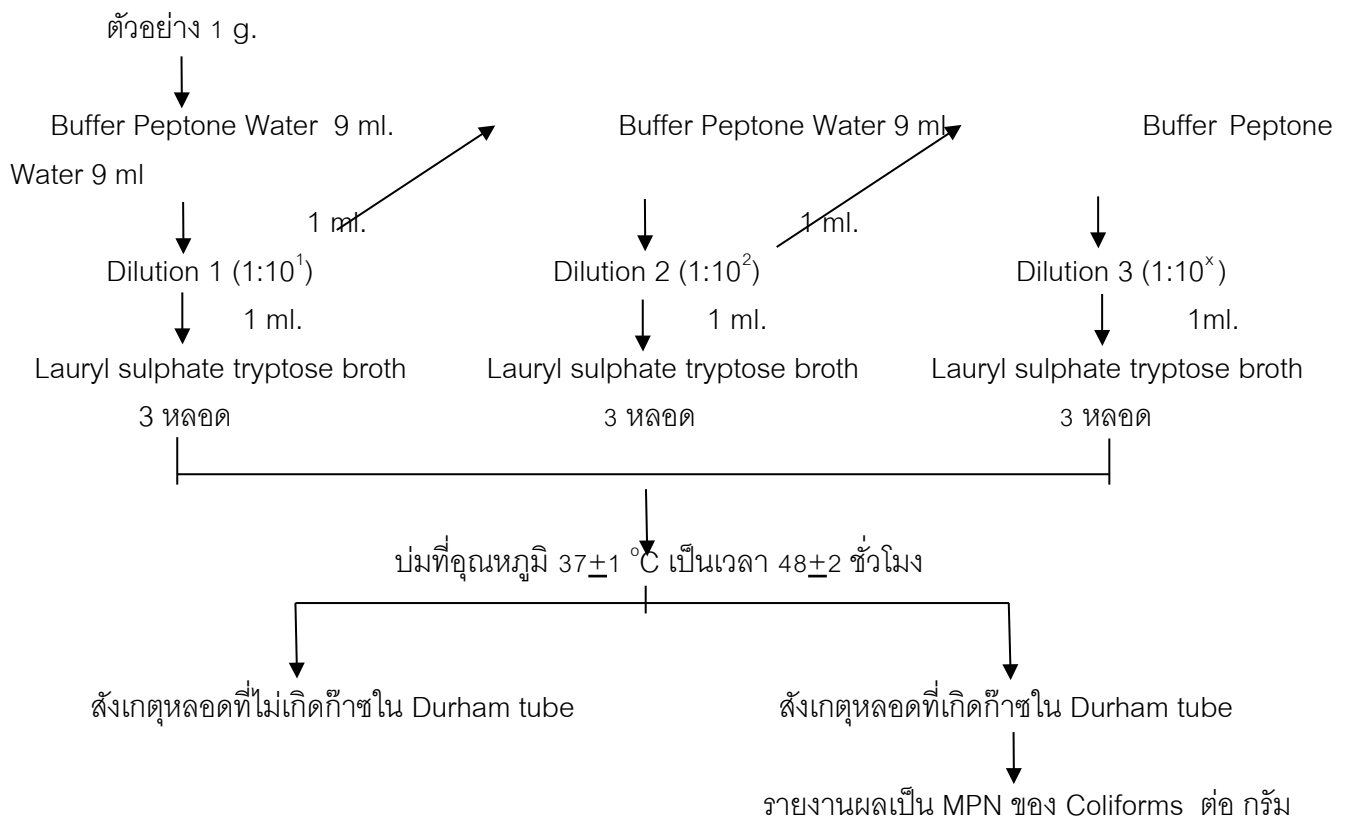
11.3.3.1 ใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ (Loop) เชี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบที่คาดว่าจะมีเชื้อ Coliform ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar ในจานเพาะเชื้อ

11.3.3.2 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

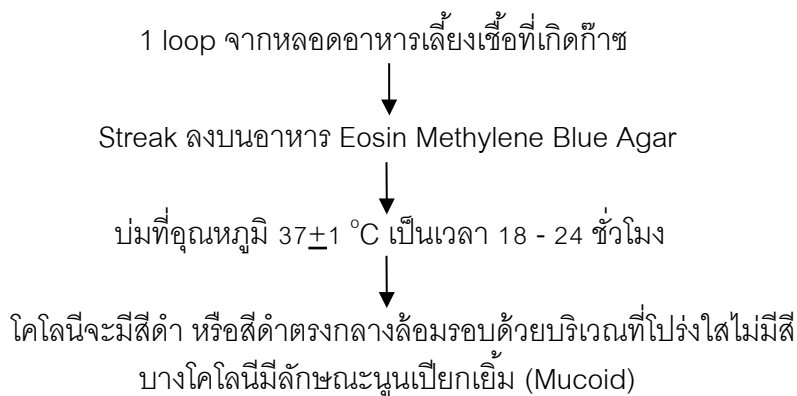
11.3.3.3 ตรวจสอบโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ Coliform โดยโคโลนีจะมีสีดำ หรือสีดำตรงกลางล้อมรอบด้วยบริเวณที่โปร่งใสไม่มีสี บางโคโลนีมีลักษณะหนูนเปือกเี่ยม (Mucoid)

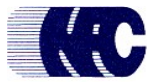
11.3.3.4 บันทึกจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละระดับความเจือจางที่มีเชื้อจุลินทรีย์ Coliform ที่ได้รับการยืนยัน

### 11.3.4 Flow chart



### การยืนยัน Coliform





ตาราง การอ่านค่า MPN/ของวิธีหาปริมาณ Coliform ในตัวอย่างอาหาร

จำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส			MPN/g
0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6.1
0	1	2	9.2
0	1	3	12
0	2	0	6.2
0	2	1	9.3
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9.4
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11
1	0	3	15
1	1	0	7.3
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24
1	3	0	16
1	3	1	20
1	3	2	24
1	3	3	29

จำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส			MPN/g
0.1	0.01	0.001	
2	0	0	9.1
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	100
3	3	3	>1000



11.4 Escherichia Coli ตามวิธี AOAC,2000

11.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

11.4.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green Lactose Bile Broth

11.4.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar

11.4.1.3 Tryptone Water

11.4.2 วิธีการ

11.4.2.1 ใช้เข็มเย็บเชื้อ (Needle) เย็บเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวก จากการทดสอบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น Coliform ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green Lactose Bile Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 44.5 °C ก่อนนำไปใช้งาน

11.4.2.2 เย็บเชื้อ E.Coli ที่เป็นเชื้อมาตรฐานลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-green Lactose Bile Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อีก 2 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Control)

11.4.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5±0.5 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อ E.Coli เจริญในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซใดเลย แสดงว่าให้ผลลบ และไม่มีเชื้อ E.Coli

11.4.3 การวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล E.Coli

11.4.3.1 ใช้ห่วงเย็บเชื้อ (Loop) เย็บเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบที่คาดว่าเป็นเชื้อ Coliform ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar ในจานเพาะเชื้อ

11.3.3.2 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

11.3.3.3 ตรวจหาโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ E.Coli โดยโคโลนีจะมีสีน้ำเงินอมดำ และมีสีเลื่อมด้ามเข็มสะท้อนแสง เย็บเชื้อครั้งละ 1 โคโลนี ลงใน Tryptone Water แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5±0.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

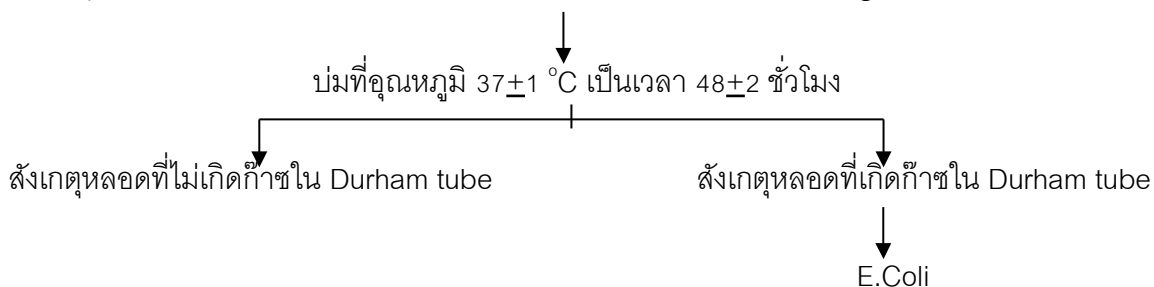
11.3.3.4 เย็บเชื้อ E.Coli มาตรฐานลงใน Tryptone Water เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม

11.3.3.5 ทดสอบสารอินโดล โดยหลอดทดลองที่มีอินโดลเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นเชื้อ E.Coli จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

11.3.3.6 คำนวณและรายงานค่า MPN ของ Coliform และ E.Coli ในตัวอย่าง 1 กรัม

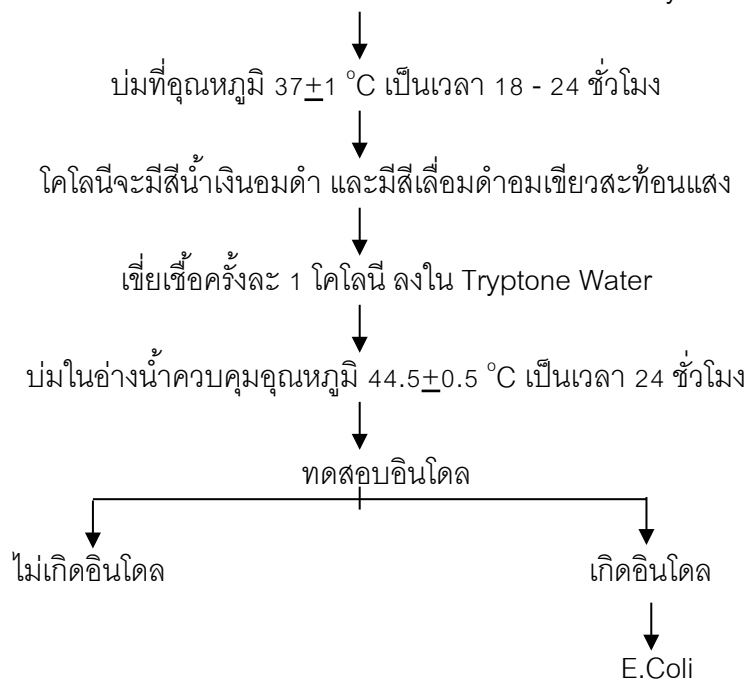
#### 11.4.4 Flow chart

1Loop จากหลอดที่ให้ผลบวกจากการหา Coliform ลงในอาหาร Brilliant-green Lactose Bile Broth



การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน E.Coli

Streak เชื้อจากหลอดทดลองที่ให้ผลบวก ลงในอาหาร Eosin Methylene Blue Agar





## 11.5 การวิเคราะห์หาเชื้อ Staphylococcus aureus ตามวิธี AOAC,2000

### 11.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

11.5.1.1 Buffer Peptone Water

11.5.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar

11.5.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth

11.5.1.4 พลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma)

### 11.5.2 วิธีการ

11.5.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใน Buffer Peptone Water 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ dilution ที่ 1 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 1 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 2 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 2 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 3 หรือให้เจือจางต่อไปจนกว่าจะได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

11.5.2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar

11.5.2.3 จุ่มแท่งแก้วสำหรับ Spread ลงในแอลกอฮอล์ แล้วนำแท่งแก้วมาผ่านเปลวไฟ รอให้เย็นลง เปิดฝาจานเพาะเชื้อ ทำการกระจายตัว

11.5.2.4 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กลับจานเพาะเชื้อและนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

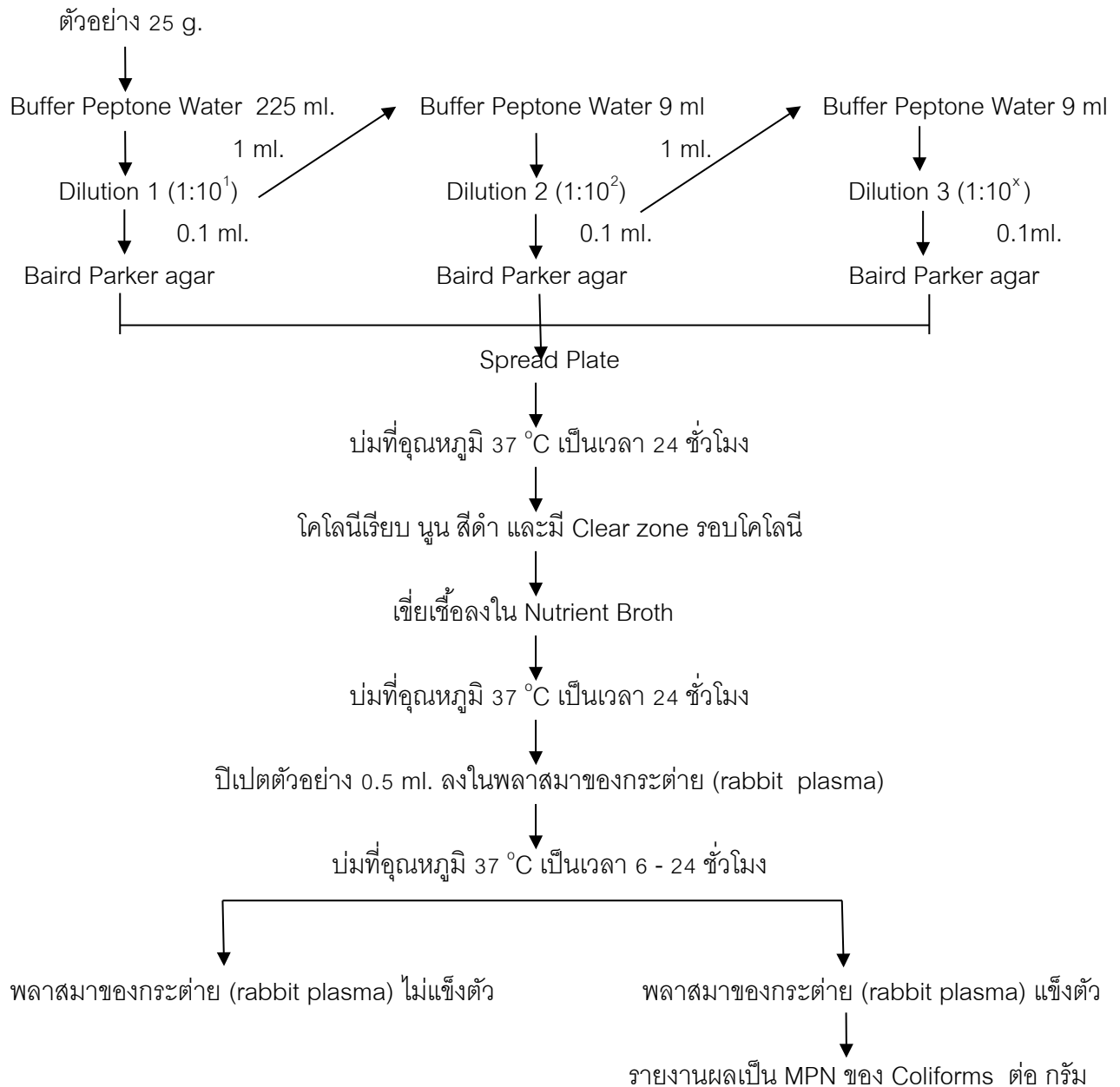
11.5.2.5 ตรวจหาโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ Staphylococcus aureus จะเรียบ ฐาน สีดำ และมี Clear zone รอบโคโลนี

11.5.2.6 เลือกลโคโลนีที่คาดว่าจะเป็เชื้อ Staphylococcus aureus มาทดลอง โดยเชี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

11.5.2.7 ปิเปตเชื้อจากข้อ 7 ใส่หลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมพลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

11.5.2.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมา ทำการบ่มต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวแสดงว่าผลเป็นบวก ตรวจพบเชื้อ Staphylococcus aureus

### 11.5.3 Flow chart





11.6 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* sp. ตามวิธี AOAC,2000

11.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

11.6.1.1 Lactose Broth เข้มข้นร้อยละ 0.5

11.6.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth

11.6.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth Sulfite Agar

11.6.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar

11.6.2 วิธีการ

11.6.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ลงใน Lactose Broth เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากัน

11.6.2.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

11.6.2.3 ปิเปตตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 36(±1) °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

11.6.2.4 Streak ตัวอย่างอาหารจากข้อ 11.6.2.3 มาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth Sulfite Agar แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 36(±1) °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

11.6.2.5 ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะมีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ บางครั้งอาจมีโคโลนีที่สะท้อนแสง อาหารรอบๆ โคโลนีมีสีน้ำตาล

11.6.3 การจำแนกและการทดสอบทางชีววิทยา

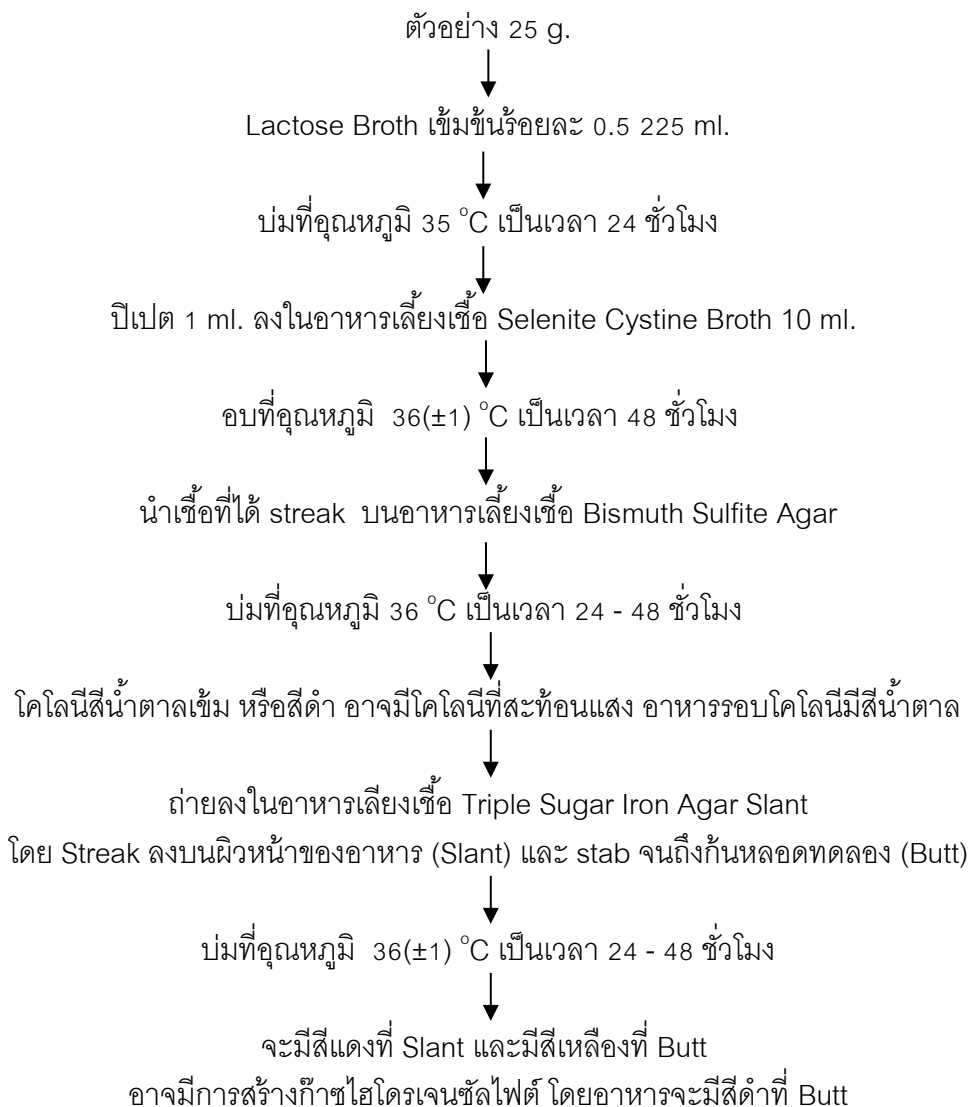
11.6.3.1 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *Salmonella* sp. จากอาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth Sulphite Agar ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron Agar Slant โดย Streak ลงบนผิวหน้าของอาหาร (Slant) และ stab จนถึงก้นหลอดทดลอง (Butt)

11.6.3.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 36(±1) °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

11.6.3.3 ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* sp. ดังนี้ จะมีสีแดงที่ Slant และมีสีเหลืองที่ Butt อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยอาหารจะมีสีดำที่ Butt



#### 11.6.4 Flow chart





## 11.7 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Bacillus cereus* ตามวิธี BAM,2002

### 11.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 11.7.1.1 Buffer Peptone Water

#### 11.7.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-egg yolk-Polymyxin Agar (MYP)

#### 11.7.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

### 11.7.2 วิธีการ

11.7.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ลงใน Buffer Peptone Water 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำ 1 นาที นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 30 นาที จะได้ dilution ที่ 1 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 1 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 2 ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร จาก dilution ที่ 2 ใส่ใน Buffer Peptone Water 9 มิลลิลิตร ได้ dilution ที่ 3 หรือให้เชื้อจากต่อไปจนกว่าจะได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

11.7.2.2 ปิเปิดตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร MYP Agar ที่เตรียมไว้

11.7.2.3 จุ่มแท่งแก้วสำหรับ Spread ลงในแอลกอฮอล์ แล้วนำแท่งแก้วมาผ่านเปลวไฟ รอให้เย็นลง เปิดฝาจานเพาะเชื้อ ทำการกระจายตัว

11.7.2.4 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กลับจานเพาะเชื้อและนำไปบ่มเพาะเชื้อที่  $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง

11.7.2.5 ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของ *B.cereus* โดยโคโลนีมีสีชมพู รอบๆ โคโลนีจะขุ่นบันทึกผล พร้อมกับนำมาทดสอบขั้นต่อไป

11.7.2.6 เชื้อเชื้อที่มีลักษณะที่สงสัยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar Slant นำไปบ่มเพาะเชื้อที่  $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา  $24 \pm 2$  ชั่วโมง

11.7.2.7 ตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะเฉพาะ

### 11.7.3 การย้อมสีแกรมแบบที่เร็ว

11.7.3.1 ทำความสะอาดสไลด์ และทำให้แห้ง โดยวิธีฉายไฟบนเสนหรือเช็ด ซับด้วยกระดาษหรือผ้าสะอาด

11.7.3.2 หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด

11.7.3.3 ใช้ลูป (Loop) แตะเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้

11.7.3.4 เกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (Air dry)

11.7.3.5 ตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 – 3 ครั้ง

11.7.3.6 หยดสี Crystal Violet ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วเททิ้ง

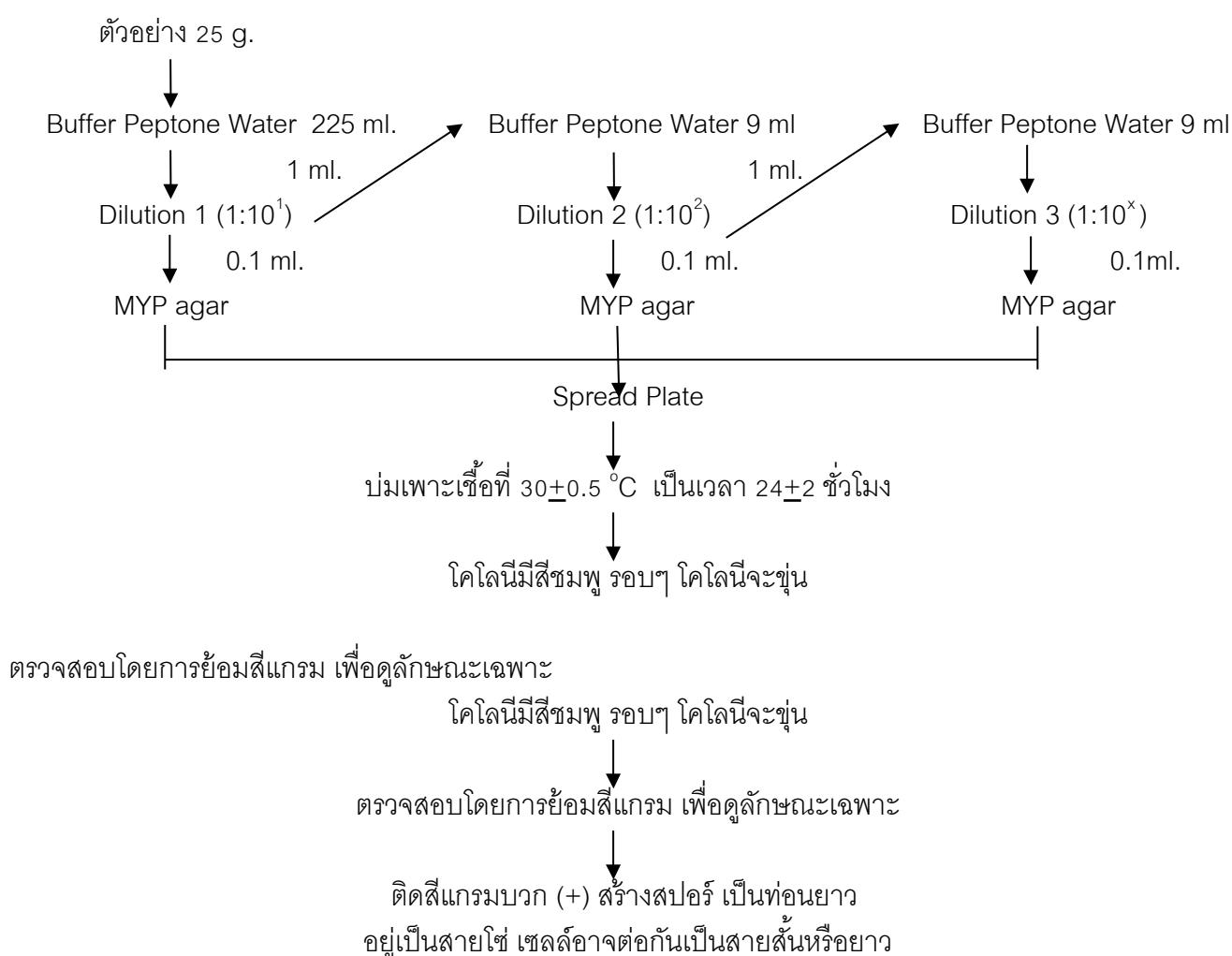


11.7.3.7 หยดสารละลาย Lugol' Iodine บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วเททิ้ง

11.7.3.8 ล้างสีออกด้วย Ethyl Alcohol 95% ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

11.7.3.9 หยด Safranin บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *B.cereus* ติดสีแกรมบวก (+) สร้างสปอร์ เป็นท่อนยาว อยู่เป็นสายโซ่ เซลล์อาจต่อกันเป็นสายสั้นหรือยาว

#### 11.7.4 Flow Chart





11.8 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยใช้ Petrifilm ตามวิธี AOAC,2000

11.8.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave
2. Stomacher
3. Laminar Safety Cabinet
4. Vortex
5. Balance ; resolution 0.01 g
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
7. Stomacher Sterilized Bag
8. Sterilized pipette หรือ Auto pipette ขนาด 100 – 1000 ml พร้อม กับ disposable tip
9. ตัวกดพลาสติก (TPC Plastic spreader)
10. ตะเกียงเบนเสน
11. Colony counter
12. Petrifilm Aerobic count Plate ของ บริษัท 3 M ประกอบด้วย
  - 12.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar
  - 12.2 Cold water soluble gelling agent ที่เคลือบอยู่บนแผ่นฟิล์มด้านล่าง
  - 12.3 แผ่นฟิล์มด้านบนที่เคลือบด้วย Gelling agent และสารบ่งชี้ (Indicator) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride
13. Butterfield's phosphate buffer

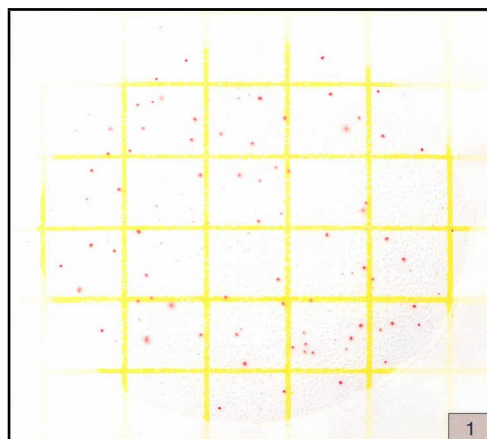


#### 11.8.2 วิธีการปฏิบัติ

1. ชั่งตัวอย่าง 50  $\pm$  0.5 กรัม บรรจุในถุง Stomacher sterilized ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic Technique)
2. เติม Butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 450  $\pm$  2.0 มล. ใส่ในถุงตัวอย่าง แล้วนำไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher (ตัวอย่างจะมีอัตราส่วนเท่ากับ 1:10) ซึ่งตัวอย่างภายหลังการตีปั่นแล้วควรทำการทดสอบภายใน 15 นาที
3. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มล. จากถุง Stomacher sterilized ที่ตีปั่นแล้ว เติมนลงในสารละลาย Butterfield's phosphate buffered dilution water ปริมาตร 9 มล. จะได้การเจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 สำหรับการเจือจางอัตราส่วนลำดับต่อไปให้ทำเช่นเดียวกัน โดยก่อนปิเปตสารละลายใส่ในหลอดเจือจางต่อไป ต้องผสมสารละลายด้วยเครื่อง Vortex ทุกครั้ง เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันก่อน ทำการตรวจวิเคราะห์โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มล. จากอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมลงใน Petrifilm ดังนี้
4. วาง Petrifilm บนพื้นราบ ให้แผ่นฟิล์มด้านใสอยู่ด้านบน เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น
5. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากอัตราส่วนการเจือจางที่ต้องการ 1 มล. ลงตรงกลางแผ่น จากนั้นปล่อยแผ่นฟิล์มลง
6. วาง Plastic spreader ลงบนแผ่น Petrifilm โดยให้ด้านที่มีร่องวงกลมคว่ำหน้าลง จากนั้นค่อยๆ ใช้นิ้วกดลงตรงกลาง
7. Plastic spreader จนเห็นว่าสารละลายกระจายเต็มวงกลม อย่าบิดหรือเลื่อน Plastic spreader ไปมา
8. ยก Plastic spreader ออก แล้วทิ้งแผ่น Petrifilm ไว้ประมาณ 1 นาที ก่อนเคลื่อนย้ายเพื่อให้菌แห้งตัว
9. นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 35  $\pm$  1°C เป็นเวลา 48  $\pm$  3 ชม. สามารถเรียงซ้อน Petrifilm ได้ไม่เกิน 20 แผ่น
10. อ่านผลทันทีที่ครบกำหนดโดยนับ Colony สีแดงทุกโคโลนี (ดู ภาพแสดง Petrifilm Aerobic count ประกอบ) ภายใต้พื้นที่วงกลม 20 ตร.ซม. ในช่วง 30-300 โคโลนี
11. คำนวณจำนวนโคโลนีต่อกรัม โดยการนำค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ คูณด้วย Dilution factor กรณีที่นับจำนวนโคโลนีในแผ่นที่ต่าง Dilution กัน ให้คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละ Dilution ก่อน แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีทั้งหมดอีกที รายงานผลเป็นจำนวน Colony Forming Unit (Cfu/g or ml)
12. กรณีที่จำนวนโคโลนีในแผ่นมีมากกว่า 300 โคโลนี ให้ประมาณจำนวนโคโลนีโดยนับจำนวนโคโลนีในพื้นที่ 1 ตร.ซม. แล้วนำค่าที่นับได้มาคำนวณเทียบกับพื้นที่ทั้งหมด กรณีนี้ให้รายงานผลเป็น Estimated Counts

### ภาพแสดง Petrifilm Aerobic count

โคโลนีของแบคทีเรียใน Petrifilm Aerobic Count จะถูกย้อมเป็นสีแดง



### 11.8.3 อื่นๆ

- 1 การควบคุมคุณภาพตัวอย่างทดสอบตัวอย่างที่ได้รับให้ดำเนินการทดสอบทันที กรณีที่ต้องเก็บตัวอย่างไว้รอทดสอบให้พิจารณาตามประเภทของตัวอย่างดังนี้
  - 1.1 ตัวอย่างแห้งเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อม
  - 1.2 ตัวอย่างอาหารวัตถุดิบแบบเปียกเก็บไว้ในอุณหภูมิแช่แข็ง
- 2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ
  - 2.1 เจ้าหน้าที่ทดสอบ ทำความสะอาดพื้นที่ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % สวมถุงมือแพทย์ และฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% รอให้แห้ง จากนั้นเช็ดถุงตัวอย่าง บริเวณที่จะทำการทดสอบด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70%
  - 2.2 ทำการสุ่มตัวอย่างทดสอบให้ได้ปริมาณที่ต้องการแล้วนำตัวอย่างผสมให้เข้ากันในถุงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นมัดปากถุงให้พองโดยให้มีพื้นที่ว่างในถุงเพียงพอต่อการคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นกลับถุงไปมาบน ล้าง ซ้าย ขวา เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
  - 2.3 ตัวอย่างที่เหลือให้แบ่งเก็บไว้ในถุงซีปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 500 กรัม และ Label รหัสของ Sample Code ไว้ที่ข้างถุง เพื่อเป็น Retain sample สำหรับการตรวจสอบซ้ำในกรณีที่จำเป็น
  - 2.4 ถุงมือพลาสติกที่สวมอยู่นั้นให้ทำการฉีดพ่นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนทำการเตรียมตัวอย่างถัดไป ถ้าถุงมือขาดให้ทำการเปลี่ยนถุงมือทันที
- 3 ข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน
  - 3.1 การปฏิบัติงานจะต้องทำด้วยวิธีปราศจากเชื้อ Aseptic Technique
  - 3.2 การใช้ก๊าซหุงต้ม และปลั๊กไฟต้องทำในตู้ Laminar Safety Cabinet และระวังการเกิดเพลิงไหม้



4 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

4.1 ทำการทดสอบสองซ้ำ (Duplicate) ที่ Dilution เดียวกัน

4.2 ทำการทดสอบซ้ำทุก 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบ ไม่เกิน 300 Colony จึงจะถือว่า "Acceptable" กรณีพบว่าผลการทดสอบ ซ้ำไม่ผ่าน (Unacceptable) ให้ทำการสุ่มตัวอย่างที่ทำซ้ำดังกล่าวทำซ้ำอีกครั้ง และให้ทำการระงับผลการทดสอบที่ทำในวันนั้นไว้ก่อนเพื่อรอดูผลการทดสอบซ้ำ ถ้าผลการทำซ้ำครั้งที่สองผ่าน ให้ดำเนินการตามปกติ กรณีที่ผลการทดสอบครั้งที่สองไม่ผ่านให้ทำการ Recheck ผลการทดสอบในวันนั้นซ้ำทั้งหมด

11.8.4 เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน : วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา : โดยใช้Petrifilm SP-QC-83 ประกอบด้วย

- 1 AOAC Official Method 990.12., **Aerobic Plate Count in Foods**, Dry Rehydratable film method (1998). SP-QC-83
- 2 AOAC Official Method of analysis (2000), AOAO Official Method 966.23B. **Preparation of Test Sample**, Chapter 17, Page 4-5. SP-QC-83
- 3 3M Petrifilm, Aerobic Count Plate. SP-QC-83



## 11.9 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ Yeast and Mold โดยใช้ Petrifilm ตามวิธี AOAC, 997.02

### Petrifilm Yeast and Mold Count Plates

#### หลักการ

วิธีนี้ใช้แผ่นเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ, สีย้อมเพื่อช่วยให้เห็นการเจริญของเชื้อชัดเจน และสารก่อเจลที่ละลายได้ด้วยน้ำเย็น (Cold water soluble gelling agent) ทำการทดสอบโดยเติมตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจางหรือเจือจางแล้วปริมาตร 1 มล. ลงบนแผ่นเพาะเชื้อ ตัวอย่างถูกกระจายเป็นพื้นที่ 30 ตร. ซม. ด้วยแรงกดบนแผ่นพลาสติกที่ใช้ในการกระจายตัวอย่าง (Spreader) สารก่อเจลจะถูกทิ้งไว้ให้แข็งตัว ก่อนที่จะนำแผ่นเพาะเชื้อไปบ่มภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นจำนวนยีสต์และราจะถูกนับภายหลังการบ่ม

### 11.9.1 น้ำยาและอุปกรณ์

#### 1. Petrifilm Yeast and Mould Count Plates: ประกอบด้วย

- อาหารเลี้ยงเชื้อ SABHI (modified Sabouraud Dextose agar) nutrients เสริมด้วยยาต้านจุลชีพ Chlorotetracycline และ Chloramphenicol
- Cold water soluble gelling agent
- สารบ่งชี้ปฏิกิริยาของ Phosphatase enzyme (5-bromo-4-chloro-3-inodyl phosphate)
- พื้นที่วงกลมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อมีขนาด 30 ตร.ซม.

#### 2. ตัวกดพลาสติก (Plastic spreader) ใช้สำหรับกำหนดขอบเขตของพื้นที่ในการเจริญเติบโตและช่วยให้มีการแผ่กระจายของตัวอย่างบนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ

#### 3. ไปเปต (Pipets): เป็นไปเปตที่ผ่านการ calibrate สำหรับใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาแล้ว

#### 2. เครื่องนับโคโลนี (Colony counter): แบบมาตรฐาน

#### 3. Blender: High speed mechanical blender ที่ปั่นได้ที่ความเร็ว 10000-120000 rpm หรือเครื่องย่อย (stomacher)

#### 6. สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างมีดังนี้ Butterfield's Phosphate Buffer (ตาม AOAC), 0.1% Peptone Water, Peptone salt diluent, Buffered Peptone Water, Sterile Water, Saline Solution **ห้ามใช้** buffers ที่มีองค์ประกอบของ Sodium citrate, bisulfite หรือ thiosulfate เพราะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ

การเตรียมตัวอย่าง

: เตรียมตัวอย่างอาหารตามที่ทางโรงงานกำหนด อาจเริ่มจาก Dilution 1:10 หรือมากกว่า โดยใช้สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างข้างต้น โดยปั่น หรือนำไปย่อยประมาณ 2 นาที ก่อนนำมาลงแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 1 มล. อาจทำ Dilution เพิ่มหลายระดับตามความเหมาะสม





### 11.9.2 วิธีการวิเคราะห์

1. วาง Petrifilm บนพื้นราบ ให้แผ่นฟิล์มด้านใสอยู่ข้างบน
2. ไปเปิดสารละลายตัวอย่าง 1 มล.
3. เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น แล้วค่อยๆ ปลดอยสารละลายตัวอย่างลงตรงกลางแผ่น
4. ปลดอยแผ่นฟิล์มลง
5. วาง Spreader ลงบนแผ่น Petrifilm
6. วางนิ้วกดลงตรงร่องข้างแกนพลาสติกจนเห็นว่าสารละลายกระจายเต็มวงกลม อย่าบิดหรือเลื่อน Spreader ไปมา อาจใช้นิ้วมือเดียวหรือสองมือตามแต่นัด
7. ยก Spreader ออก ทิ้งแผ่น Petrifilm ไว้ 2-3 นาที ก่อนเคลื่อนย้าย เพื่อให้菌แข็งตัว
8. บ่ม Petrifilm Yeast and Mold Count Plates ที่อุณหภูมิ 20-25 °C นาน 5 วัน สามารถเรียงซ้อน Petrifilm ได้ไม่เกิน 20 แผ่น
9. อ่านผลโดยดูตามคำแนะนำในคู่มือการแปลผล

### 11.9.3 การอ่านและวิเคราะห์ผล

1. นำแผ่นออกมาอ่านผลทันที หลังจากครบกำหนดระยะเวลาที่บ่มเชื้อ
2. การอ่านผลยีสต์: โคโลนีของยีสต์จะมีสีน้ำตาล-เขียว หรือ ไม่มีสี ซึ่งโคโลนีจะมีลักษณะนูน มีขอบเขตชัดเจน  
การอ่านผลเชื้อรา: โคโลนีของเชื้อราส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล หรือสีที่สร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น สีดำ, เหลือง, เขียว ซึ่งจะมีลักษณะโคโลนีค่อนข้างใหญ่ ขอบโคโลนีไม่ชัดเจนเนื่องมาจากการแผ่กระจายของเส้นใย
3. การนับจำนวนโคโลนี: นับจำนวนโคโลนีของยีสต์และรา โดยนำจำนวนที่นับได้ทั้งหมดมาคูณด้วย Dilution factor
  - กรณีที่มีการทำซ้ำใน Dilution เดียวกันให้นับจำนวนในแต่ละแผ่นบวกกัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของทั้งหมด
  - กรณีที่มีการทำซ้ำต่าง Dilution กัน ให้หาค่าเฉลี่ยของแต่ละ Dilution ก่อน นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของทั้งหมด
  - กรณีที่มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 150 โคโลนี ให้เลือกนับโคโลนีในช่องสี่เหลี่ยมพื้นที่ 1 ตร. ซม. แล้วนับมาคูณเทียบกลับเป็นพื้นที่ 30 ตร. ซม. แล้วรายงานผลเป็นค่าคาดคะเน (Estimated counts)



หมายเหตุ: กรณีที่มีจำนวนยีสต์ในจำนวนมาก อาจทำให้แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลทั้งแผ่นได้ ในขณะเดียวกันถ้ามีจำนวนราในจำนวนมากก็อาจทำให้ทั้งแผ่นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล, ดำ หรือ เหลืองได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของรา กรณีทั้งสองนี้ไม่ให้อ่านผลแบบคาดคะเน แต่ควรจะทำ Dilution เพิ่มจากเดิมเพื่อความแม่นยำในการอ่านผล

#### 11.9.4 การเก็บรักษา

1. ซอง Petrifilm ที่ยังไม่ได้เปิดใช้ ให้แช่เย็นที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 8 °C
2. ซองที่เปิดแล้วแต่ใช้ไม่หมด ให้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 1 เดือน ห้ามนำเข้าแช่เย็นอีกเด็ดขาด
3. ระวังอย่าเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ > 25 °C หรือในที่ที่มีความชื้น > 50% RH เพราะจะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อ
4. เมื่อใช้แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วให้ฆ่าเชื้อใน Autoclave 121°C นาน 15 นาที ก่อนทิ้ง

#### 11.9.5 เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน :วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา : โดยใช้ Petrifilm Yeast and Mold Count Plate SP-QC-88 ประกอบด้วย

1. AOAC Official Method 997.02 (SP-QC-88)
2. 3M petrifilm Yeast and Mold Count Plate คู่มือการแปลผล (SP-QC-88)

### 11.10 การวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี 3M Petrifilm ตามวิธี AOAC, 2003.07

Staph Express Count เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยเจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น อาหารดัดแปลง Baird-Parker ซึ่งเป็นอาหารที่ทำให้เกิดสีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยโคโลนีจะมีสีแดง-ม่วง กรณีที่พบเฉพาะโคโลนีสีแดง-ม่วง บนแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อถือว่าการทดสอบเสร็จสมบูรณ์สามารถรายงานผลได้ทันที

กรณีที่พบโคโลนีสีอื่นๆ เช่น โคโลนีสีดำหรือสีน้ำเงิน-เขียว ขึ้นอยู่กับกับโคโลนีสีแดง-ม่วง บนแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยได้โดยการใช้แผ่นปฏิริยา 3M Petrifilm Staph Express disk ที่ประกอบด้วย toluidine blue-O เชื้อ *S.aureus* ที่จะสร้างเอนไซม์ ทำปฏิริยา Deoxyribonuclease (DNase) ซึ่งทำให้เกิดวงสีชมพูล้อมรอบโคโลนี โดย *S.aureus* (บางครั้งรวมไปถึง *Staphylococcus hyicus* และ *Staphylococcus intermedius*) เชื้อกลุ่มที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase-positive staphylococci) เท่านั้นที่จะทำให้เกิดวงสีชมพู เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆจะไม่สร้างวงสีชมพูดังกล่าว

#### 11.10.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Incubator ช่วงใช้งานอุณหภูมิ  $35\pm 1$  หรือ  $37\pm 1$  °C

Electronic balance

Autoclave ช่วงใช้งานอุณหภูมิ 121 °C

ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิช่วงการใช้งาน 2-8 องศาเซลเซียส

นาฬิกาจับเวลา

Vortex Mixer

หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 13 x 100 mm

Pipette sterile ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร

#### 11.10.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Butterfield's phosphate buffer

Petrifilm Staph Express Count plate

Petrifilm Staph Express Disk

#### 11.10.3 วิธีการทดสอบ

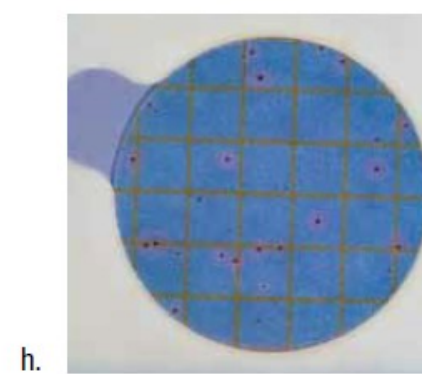
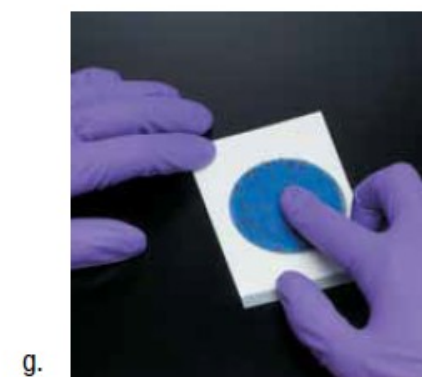
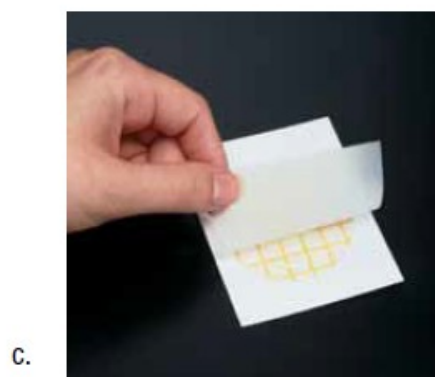
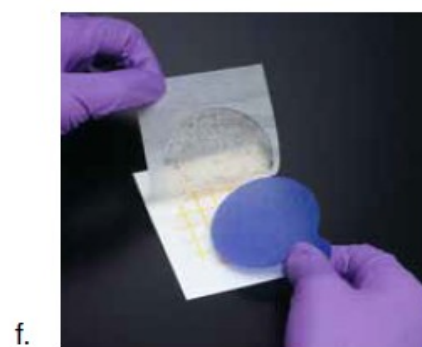
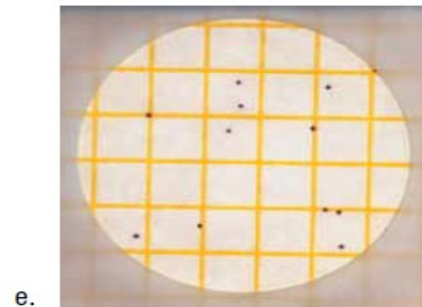
##### การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 50g เติม BPB 450 ml ตีปั่น 2 นาที ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน หากชั่งตัวอย่างน้อยกว่า 50 g ให้ทำการเจือจางตัวอย่างโดยใช้ Diluent ในอัตราส่วน 1:10
2. เพื่อความเหมาะสมของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับตัวอย่างที่มีความเป็นกรด หรือด่าง ควรทำการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6-8 ด้วย 1N NaOH สำหรับตัวอย่างที่เป็นกรด และ 1N HCl สำหรับตัวอย่างที่เป็นด่าง  
หมายเหตุ ห้ามใช้ buffers ที่มีองค์ประกอบของ citrate, bisulfite หรือ thiosulfate เพราะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

## 11.10.4 การวิเคราะห์

1. วาง Petrifilm บนพื้นราบ ให้แผ่นฟิล์มด้านใสอยู่ข้างบน (รูป a)
2. ไปเปิดสารละลายตัวอย่าง 1 มล. เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น แล้วค่อยๆ ปล่อยสารละลายตัวอย่าง ลงตรงกลางแผ่น (รูป b)
3. ปล่อยแผ่นฟิล์มลง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ (รูป c)
4. วาง spreader เฉพาะของ Petrifilm Staph Express Count plate ลงบนแผ่น Petrifilm (รูป d) ค่อยๆ ใช้นิ้วกดตรงกลาง spreader จนเห็นว่าสารละลายกระจายเต็มวงกลม อย่าบิดหรือเลื่อน spreader ไปมา
5. ยก spreader ออก ทิ้งแผ่น Petrifilm ไว้ 1-2 นาที ก่อนเคลื่อนย้าย เพื่อให้มันแข็งตัว
6. ปุ่ม Petrifilm ที่  $35 \pm 1$  หรือ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส นาน  $24 \pm 2$  ชม. สามารถเรียงซ้อน Petrifilm ได้ ไม่เกิน 20 แผ่น
7. อ่านผล โดยจำนวนของเชื้อ *S. aureus* จะมีโคโลนีสีม่วง-แดง ทั้งหมด (รูป e) และรายงานผลโดย ต้องนำจำนวนที่ได้ไปคูณกับจำนวนเท่าของการเจือจาง
8. กรณีที่ต้องการยืนยันผลเชื้อ จะต้องใช้แผ่น DNase disk เพื่อทำการยืนยันผล โดยนำแผ่น disk ดังกล่าวออกจากซอง จับแถบที่ยื่นออกมา (รูป f) เปิดแผ่น Petrifilm ด้านบนขึ้น จากนั้นวางแผ่น disk ลงในหลุมภายในขอบโพน ให้สัมผัสกับโคโลนีที่ต้องการยืนยันผล แล้วปิดแผ่นฟิล์มลงมา ใช้นิ้วค่อยๆ ลูบ แผ่นฟิล์มแนบกับแผ่น disk เพื่อให้แผ่น disk สัมผัสกับเนื้อเจล และเพื่อไล่ฟองอากาศ (รูป g)
9. นำ Petrifilm ไปป้อนต่อที่อุณหภูมิ  $35 \pm 1$  หรือ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชม.
10. อ่านผล โดยนับจำนวนโคโลนีที่มีสีชมพูล้อมรอบ และรายงานผลโดยต้องนำจำนวนที่ได้ไป คูณกับจำนวนเท่าของการเจือจาง ดูคู่มือการแปลผลประกอบ (รูป f)

การรายงานผล : รายงานผลการทดสอบ CFU/g





**Butterfield's Phosphate-Buffered dilution water (BPB)**

1. ส่วนประกอบ (Stock solution)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34.0	g
น้ำกลั่น	500	ml

2. วิธีการเตรียม

วิธีการเตรียม Stock Solution

ชั่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่ระบุ เติมน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml  
นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 min

วิธีเตรียม BPB

ดูด 1.25 ml ของ Stock solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ให้ได้ 1000 ml บรรจุอาหารใส่ขวด  
ขนาดที่เหมาะสม ปริมาตร 450 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 min

11.10.5 การเก็บรักษา

- 1.ซอง Petrifilm ที่ยังไม่ได้เปิดใช้ ให้แช่เย็นที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 8 °C
- 2.ซองที่เปิดแล้วแต่ใช้ไม่หมด ให้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 1 เดือน ห้ามนำเข้าแช่เย็นอีกเด็ดขาด
- 3.ระวังอย่าเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ > 25 °C หรือในที่ที่มีความชื้น > 50% RH เพราะจะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อ
- 4.เมื่อใช้แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วให้ฆ่าเชื้อใน Autoclave 121°C นาน 15 นาที ก่อนทิ้ง

11.10.6 เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน :วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา : โดยใช้ Petrifilm

*Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี 3M Petrifilm ตามวิธี AOAC, 2003.07 SP-QC-89 ประกอบด้วย

1. AOAC Official Method AOAC, 2003.07
2. 3M petrifilm คู่มือการแปลผล *Staphylococcus* express Count plate (SP-QC-89)



11.11 การวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อ coliform / E.coli ในตัวอย่างอาหาร chromID™ Coli agar ตาม certified NF VALIDATION according to ISO 16140 no. BIO12/19-12/06. และ BIO 12/5-01/99

## 1. วัตถุประสงค์

สำหรับเป็นคู่มือปฏิบัติงานให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการทดสอบเชื้อ Coliforms และ  $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F) ตาม certified NF VALIDATION according to ISO 16140 no. BIO12/19-12/06. และ BIO 12/5-01/99

## 2. ขอบข่าย

วิธีการปฏิบัติงานนี้ครอบคลุมการทดสอบหาเชื้อ Coliforms และ  $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* ในตัวอย่างอาหารคน และตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภค (น้ำประปา และ น้ำบรรจุขวด) ที่วิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ

## 3. อ้างอิง

- 3.1 Certified Protocols NF VALIDATION (BIO12/19-12/06.)
- 3.2 Certified Protocols NF VALIDATION (BIO 12/5-01/99.)
- 3.3 ISO 16140 :2016
- 3.4 ISO 8199
- 3.5 ISO 9308-1
- 3.4 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F)

## 4. คำนิยาม และหลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Chromogenic medium สำหรับใช้ในการตรวจนับเชื้อ  $\beta$ D-glucuronidase positive *Escherichia coli* และเชื้อกลุ่ม Coliforms bacteria

chromID™ Coli agar มีส่วนประกอบที่เป็นตัวคัดแยกเชื้อหลักๆ 2 ชนิด คือ ส่วนประกอบชนิดที่ 1 เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตรวจจำแนกเชื้อ  $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* โดยจะให้ลักษณะ โคโลนีสีชมพู หรือสีม่วง ส่วนประกอบที่ 2 เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับการตรวจจำแนกเชื้อกลุ่ม galactosidase positive หรือ กลุ่มเชื้อ Coliforms โดยจะให้ลักษณะ โคโลนีสีฟ้า หรือ สีเทา (สำหรับ Gram negative bacteria อื่นๆ จะให้โคโลนีสีใส ไม่มีสี) นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวกแทบทั้งหมด ด้วย

	$\beta$ D-glucuronidase positive <i>E. coli</i>	Other coliforms	Other Gram negatives
Color	Pink/violet	Blue/grey	Colorless
Size (mm)	0.5 - 2.0	0.5 - 2.0	0.1 - 1.0



## 5. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1 เครื่องชั่ง ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 กรัม และ 0.01 กรัม
- 5.2 Stomacher และ Stomacher bag
- 5.3 Inoculating needle และ Inoculating loop
- 5.4 ช้อน กรรไกร และ forceps ปลอดเชื้อ
- 5.5 ปีเปตขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร
- 5.6 Incubator  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.7 Incubator  $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.8 เครื่อง water-baths ที่ตั้งอุณหภูมิได้ตั้งแต่  $50 - 95^{\circ}\text{C}$
- 5.9 เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่  $44 - 47^{\circ}\text{C}$
- 5.10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปลอดเชื้อ
- 5.11 เครื่องกรอง และ กระดาษกรอง

## 6. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 6.1 Buffer Peptone water
- 6.2 Peptone Salt Solution
- 6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ chromID™ Coli agar (COLI ID-F) (REF. 42017)
  - 6.3.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
    - 6.3.1.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
    - 6.3.1.2 คลายฝาขวด ให้หลวมเล็กน้อย
    - 6.3.1.3 วางขวดอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเครื่อง water-baths ที่ตั้งค่าอุณหภูมิประมาณ  $50^{\circ}\text{C}$  จากนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง  $95^{\circ}\text{C}$  และตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งละลาย (ประมาณ 45 นาที )
    - 6.3.1.4 หมุนฝาขวดปิดกลับ ( สวมถุงมือเพื่อป้องกันความ ร้อน ) และ ทำการ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
    - 6.3.1.5 ตั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาทีก่อนนำไปตั้งไว้ใน เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่  $44 - 47^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้งาน ซึ่งไม่ควรตั้งทิ้งไว้ นานเกิน 6 ชั่วโมง

## 7. การควบคุมคุณภาพ

- 7.1 การทำ QC Air Sampling บริเวณที่วิเคราะห์ โดยกำหนดไม่เกิน 15 โคโลนี/เพลท/15 นาที
- 7.2 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต้องเป็นอุปกรณ์ปลอดเชื้อทั้งหมด รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วย
- 7.3 ในทุกขั้นตอนของการทดสอบต้องใช้ Aseptic technique
- 7.4 ระวังเรื่อง การปนเปื้อนและการปนเปื้อนข้ามของจุลินทรีย์





## 8. ขั้นตอนการวิเคราะห์

### 8.1 วิธีการที่ผ่านการรับรองจาก NF Validation

#### 8.1.1 การนับจำนวน $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส (NF VALIDATION certificated No. BIO 12/5-01/99)

##### 8.1.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution (หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)

##### 8.1.1.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง

##### 8.1.1.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 8.1.1.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ chrom ID™ Coli agar ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

8.1.1.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง (หากตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบ มีการปนเปื้อนของเชื้อสูง ให้ทำการเททับด้วย chrom ID™ Coli agar ประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง และรอให้อาหารแข็ง)

##### 8.1.1.6 คว่ำเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 44 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

##### 8.1.1.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300 โคโลนี)

#### 8.1.2 การนับจำนวน $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* และ Coliforms ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (NF VALIDATION certificated No. BIO12/19-12/06.)

##### 8.1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution (หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)

##### 8.1.2.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง

##### 8.1.2.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 8.1.2.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ chrom ID™ Coli agar ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

8.1.2.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง (เพื่อช่วยให้การอ่านผลเป็นไปได้ง่ายขึ้น แนะนำให้ผู้ใช้งานทำการเททับด้วย chrom ID™ Coli agar ประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง และรอให้อาหารแข็ง เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจปรากฏหลังจากการบ่ม)

##### 8.1.2.6 คว่ำเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

##### 8.1.2.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300 โคโลนี)

## 8.2 วิธีการที่ไม่ได้ผ่านการรับรองจาก NF Validation

### 8.2.1 การนับจำนวน $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* และ Coliforms ในตัวอย่างน้ำเพื่อการบริโภค (เช่นน้ำประปา หรือน้ำบรรจุขวด)

#### 8.2.1.1 การอาหารเลี้ยงเชื้อ และเตรียมตัวอย่าง

- ทำการเทอาหาร chrom ID™ Coli agar ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหาร รอจนอาหารแข็ง และทำให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
- กรองตัวอย่างน้ำ ตามปริมาตร ที่ต้องการทดสอบ เช่น 100 หรือ 250 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองตามวิธีมาตรฐาน ISO9308-1

#### 8.2.1.2 นำกระดาษกรองวางบนผิวหน้าอาหาร chrom ID™ Coli agar ไม่ให้เกิดฟองอากาศ

#### 8.2.1.3 นำเข้าปัมที่ตู่บ่ม $36 \pm 2$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา $21 \pm 3$ ชั่วโมง

#### 8.2.1.4 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่ขึ้นบนกระดาษกรอง ทำการคำนวณจำนวนของเชื้อ $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* และโคลิฟอร์มที่ปรากฏต่อปริมาตรตัวอย่างน้ำตามมาตรฐาน ISO 8199

## 9. การอ่านผลการทดสอบ

### อ่านลักษณะโคโลนี

- เชื้อ  $\beta$ D-glucuronidase positive *E. coli* จะให้ลักษณะโคโลนีสีชมพูเข้ม จนถึงสีม่วง
- เชื้อ Coliforms จะให้ลักษณะโคโลนีสีฟ้า-เทา
- เชื้ออื่นๆ จะให้ลักษณะโคโลนีไม่มีสี

	$\beta$ D-glucuronidase positive <i>E. coli</i>	เชื้อโคลิฟอร์มอื่นๆ	เชื้อแกรมลบอื่นๆ
สี	ชมพู/ ม่วง	ฟ้า/ เทา	ไม่มีสี
ขนาด ( mm.)	0.5 - 2.0	0.5 - 2.0	0.1 - 1.0

## 10. การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลในหน่วยของ CFU ต่อตัวอย่างกรัม หรือ มิลลิลิตร

## 11. การเก็บรักษา

11.2 เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ  $2-8^{\circ}\text{C}$

11.2 หลีกเลี้ยงไม่ให้สัมผัสกับแสงโดยตรง

12.เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Coliform และ *E.coli* ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-99)



11.12 การวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร Baird Parker agar with RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) ตาม ISO 6888-2: 1999,

### 1. วัตถุประสงค์

สำหรับเป็นคู่มือปฏิบัติงานให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการทดสอบเชื้อ coagulase positive staphylococci โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar with RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) โดยไม่ต้องทำการ Confirmation

### 2. ขอบข่าย

วิธีการปฏิบัติงานนี้ครอบคลุมการทดสอบหาเชื้อ coagulase positive staphylococci ในตัวอย่างอาหารคนและตัวอย่างอาหารสัตว์ ที่วิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ

### 3. อ้างอิง

- 3.1 ISO 6888-2: 1999, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
- 3.2 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF Agar (RPFA)

### 4. คำนิยาม และหลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF Agar (RPFA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยสารอาหารมากมายที่เหมาะสมกับการคัดเลือกเชื้อ Staphylococci coagulase+ โดยส่วนประกอบหลักต่างๆ ได้แก่ glycine และ sodium pyruvate มีส่วนกระตุ้นให้เชื้อที่ได้รับบาดเจ็บมีการฟื้นฟู และซ่อมแซมเซลล์ ทำให้เจริญได้ดี, lithium chloride และ potassium tellurite เป็นตัวที่คัดเลือกสายพันธุ์ Staphylococci coagulase+ ทำให้เกิดลักษณะโคโลนีสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังมี rabbit plasma and bovine fibrinogen ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิด coagulation และ trypsin inhibitor ช่วยในการเกิด Halo หรือโซนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี

### 5. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1 เครื่องชั่ง ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 กรัม และ 0.01 กรัม
- 5.2 Stomacher และ Stomacher bag
- 5.3 Inoculating needle และ Inoculating loop
- 5.4 ช้อน กรรไกร และ forceps พลอดเชื้อ
- 5.5 ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร
- 5.6 Incubator  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.12 Incubator  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.13 เครื่อง water-baths ที่ตั้งอุณหภูมิได้ตั้งแต่  $50 - 95^{\circ}\text{C}$
- 5.14 เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่  $44 - 47^{\circ}\text{C}$
- 5.15 จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปลอดเชื้อ

## 6. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 6.1 Buffer Peptone water
- 6.2 Peptone Salt Solution
- 6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF agar (BP RPF)
  - 6.3.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
    - 6.3.1.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
    - 6.3.1.2 คลายฝาขวด ให้หลวมเล็กน้อย
    - 6.3.1.3 วางขวดอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเครื่อง water-baths ที่ตั้งค่าอุณหภูมิประมาณ 50°C จากนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 95 °C และตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งละลาย (ประมาณ 45 นาที)
    - 6.3.1.4 หมุนฝาขวดปิดกลับ (สวมถุงมือเพื่อป้องกันความ ร้อน ) และ ทำการ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
    - 6.3.1.5 ตั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาทีก่อนนำไปตั้งไว้ใน เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่ 44 - 47°C จนกว่าจะใช้งาน
    - 6.3.1.6 สำหรับ Supplement (R2) ให้เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 ml. ผสมให้ เข้ากัน
    - 6.3.1.7 นำขวดอาหาร R2 ที่ผสมแล้วไป pre-heat ที่อุณหภูมิ 37°C
    - 6.3.1.8 จากนั้นนำอาหารจากขวด R2 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวด R1 แล้วผสมให้เข้า กัน พร้อมนำไปใช้งาน

## 7. การควบคุมคุณภาพ

- 7.1 การทำ QC Air Sampling บริเวณที่วิเคราะห์ โดยกำหนดไม่เกิน 15 โคโลนี/เพลท/15 นาที
- 7.2 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต้องเป็นอุปกรณ์ปลอดเชื้อทั้งหมด รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ใน การเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วย
- 7.3 ในทุกขั้นตอนของการทดสอบต้องใช้ Aseptic technique
- 7.4 ระวังเรื่อง การปนเปื้อนและการปนเปื้อนข้ามของจุลินทรีย์

## 8. ขั้นตอนการวิเคราะห์

- 8.1 การเตรียมตัวอย่าง  
เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution (หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)
- 8.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง
- 8.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 8.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF agar (BP RPF) ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศา เซลเซียส ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร
- 8.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง
- 8.6 คว่ำเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีโคโลนี ไม่ ชัดเจนให้บ่ม ต่ออีก เป็น 48 ชั่วโมง
- 8.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300 โคโลนี)

### 9.การอ่านผลการทดสอบ

อ่านลักษณะโคโลนี

- โคโลนีสีเทา-ดำ รอบๆมีโซนสีขาวขุ่น



### 10.การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลในหน่วยของ CFU ต่อตัวอย่างกรัม หรือ มิลลิลิตร

### 11. การเก็บรักษา

11.2 เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 2-8°C

11.3 หลีกเลี้ยงไม่ให้สัมผัสกับแสงโดยตรง

12. เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Staphylococcus ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-98)

### 11.13 การวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อ *Bacillus cereus* ใน ชิ้นงานอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA

#### วิธีการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA

##### ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA

1. นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA ( 100 ml.) มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้มให้ละลาย จนหมดในหม้อน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 °c และนำไปพักไว้ใน Water-bath ที่อุณหภูมิ 44-47 °c
2. เติม BACARA™ enrichment supplement ปริมาตร 4 ml. และ BACARA™ selective supplement ปริมาตร 0.5 ml. ลงไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น ผสมให้เข้ากันดี โดยพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้งานโดยการ Spread plate หรือ pour plate เป็นเวลา 24±2 °c ที่อุณหภูมิ 30±1 °c

##### การรายงานผล

หลังจากบ่มครบเวลาแล้ว ลักษณะ Typical colony ของเชื้อ *Bacillus cereus* group จะเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ มีสีชมพู/ส้ม รอบๆ โคโลนีเป็นโซนขุ่นเหมือนไข่ดาว ซึ่งหากพบลักษณะโคโลนีเช่นนี้ ผู้ใช้งานสามารถรายงานว่าเป็น *Bacillus cereus* group ได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการ Confirmation



ลักษณะ Typical colony ของอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA

##### ข้อควรระวัง

ห้ามลงไฟที่หลอด Supplement ก่อนปิดฝา เนื่องจาก Supplement มีส่วนประกอบของสารไวไฟ

เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ใน คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-100)



12. ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

12.1 กรณีที่พบว่าข้อมูลที่ได้เกินมาตรฐานที่กำหนด ใน Specification (FM-QC-89) ให้ทำการตรวจสอบซ้ำด้วยวิธีการเดิม

12.2 กรณีผลิตภัณฑ์หลังการบรรจุให้สุ่มตัวอย่างจากคลังสินค้ามาตรวจซ้ำ และนำไปต้มในตู้บ่มผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  °C เป็นเวลา 5 วัน ถ้าภาชนะบรรจุไม่มีลักษณะบวม หรือเกิดฟองก๊าซจนดันฝาออก แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นยอมรับได้

12.3 กรณี ที่ตรวจสอบแล้วไม่ผ่าน ให้แผนกควบคุมคุณภาพออกใบรายงานผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด ตามขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่อง การควบคุมผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด PM-QC-05

12.4 บันทึกข้อมูลลงใน “สมุดบันทึกการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์” (FM-QC-40)

13. เอกสารอ้างอิง รวบรวมไว้ ใน : เทคนิคพื้นฐานและวิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา SP-QC-82 ประกอบด้วย

13.1 “การวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา” หน่วยวิจัยและพัฒนาอาหาร สำนักวิจัยสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

13.2 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม “วิธีวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา” กระทรวงอุตสาหกรรม มอก. 335 เล่ม 1-2523. รวบรวมไว้ ใน

13.3 “วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา” ตามมาตรฐาน AOAC,2000 และตามมาตรฐาน BAM,2002. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.รวบรวมไว้ ใน

13.4 อกิยญา จันทรวัฒน์. เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.รวบรวมไว้ ใน

13.5 บัญญัติ สุขศรีงาม. ชีววิทยาเบื้องต้นของเซลล์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ : 2526.

13.6 พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์, นิธิยา รัตนานนท์. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus*.

13.7 คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา.

14. เอกสารที่เกี่ยวข้อง

14.1 การควบคุมผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด (PM-QC-05)

14.2 เทคนิคพื้นฐานและวิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา (SP-QC-82)

14.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ Petrifilm (SP-QC-83)

14.4 สมุดบันทึกการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (FM-QC-40)

14.5 วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา :โดยใช้ Petrifilm Yeast and Mold Count Plate (SP-QC-88)

14.6 Specification (FM-QC-89)

14.7 คู่มือการแปลผล *Staphylococcus* express Count plate (SP-QC-89)

14.8 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus* ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-98)

14.9 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Coliform และ *E.coli* ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-99)

14.10 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* ยี่ห้อ *Biomerieux* (SP-QC-100)