ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ง.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) (ดัดแปลงจาก วิลาวัณย์, 2539) มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือ 0.75% NaCl จนได้อัตราส่วนที่ต้องการ

2. ปิเปตตัวอย่างที่ถูกเจือจางเป็นอัตราส่วนต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้ออัตราส่วนละ 3 จานเพาะเชื้อ

3. เทอาหารเพาะเชื้อ plate count agar (ผ่านการ autoclave แล้ว และมีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส) ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเลื่อนจานเพาะเชื้อในแนวตั้ง แนวตามเข็มนาฬิกา และแนวทวนเข็มนาฬิกา แนวละ 5 ครั้ง

4. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง กลับจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส นาน 24 – 48 ชั่วโมง นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อและนำไปคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง

ง.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count) (ดัดแปลงจาก วิลาวัณย์, 2539) มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือ 0.75% NaCl จนได้อัตราส่วนที่ต้องการ

2. ปิเปตตัวอย่างที่ถูกเจือจางเป็นอัตราส่วนต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้ออัตราส่วนละ 3 จานเพาะเชื้อ

3. เทอาหารเพาะเชื้อ potato dextrose agar (ผ่านการ autoclave และมีอุณหภูมิประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส และผ่านการปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 3.5 ด้วยสารละลาย 10% tartaric acid แล้ว) ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 20 – 25 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยการเลื่อนจานเพาะเชื้อในแนวตั้ง แนวตามเข็มนาฬิกา และแนวทวนเข็มนาฬิกา แนวละ 5 ครั้ง

4. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 – 5 วัน สำหรับยีสต์ และ 5 – 7 วัน สำหรับรา นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปคำนวณหาจำนวนยีสต์และราในตัวอย่าง

ง.3 การคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

การคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (คณาจารย์ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์, 2549) ทำได้ดังนี้

1. กรณีที่จำนวนเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ

ถ้าจานเพาะเชื้อจานใดจานหนึ่ง จากตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง (dilution) ระดับเดียวกันมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25 – 250 โคโลนี ให้นำจำนวนที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง (dilution factor)

ถ้ามีตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง 2 ระดับ ที่ติดกันมีจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 25 – 250 โคโลนี ให้นับจำนวนทั้ง 2 ระดับ นำค่าที่นับได้ของแต่ละระดับคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง แล้วหาอัตราส่วนความแตกต่างของค่าที่สูงต่อค่าที่ต่ำ ถ้าไม่เกิน 2 เท่า ให้นำค่าที่ได้จากทั้ง 2 ระดับ มาหาค่าเฉลี่ย แต่หากมากกว่า 2 เท่า ให้รายงานค่าที่ต่ำกว่า

2. กรณีที่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญน้อยกว่า 25 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ให้รายงานผลเป็นค่าจริงที่นับได้จากการทำให้เจือจางต่ำที่สุด (เข้มข้นมากที่สุด) นำจำนวนที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง โดยรายงานว่าเป็นค่าประมาณ (est.)

3. กรณีที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญเลย ให้รายงานผลเป็นค่าน้อยกว่าค่าของการทำให้เจือจางต่ำที่สุด โดยรายงานว่าเป็นค่าประมาณ (est.)

4. กรณีที่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญมากกว่า 250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ

ถ้าสามารถนับได้ทั้งหมด ให้นำจำนวนที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง โดยรายงานว่าเป็นค่าประมาณ (est.)

ถ้าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญจากระดับการทำให้เจือจางสูงที่สุด (เข้มข้นน้อยที่สุด) อยู่ระหว่าง 4 – 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับจำนวนจุลินทรีย์ในพื้นที่ 12 ตารางเซนติเมตร (นับในแนวนอน 6 ตารางที่ติดกัน และในแนวตั้ง 6 ตารางที่ติดกัน) หาค่าเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตร คูณด้วยจำนวนพื้นที่ของจานเพาะเชื้อทั้งหมด แล้วคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง

ถ้าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญจากระดับการทำให้เจือจางสูงที่สุดมีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แต่ประมาณด้วยสายตาแล้วสามารถที่จะนับได้ ให้นับจำนวนจากพื้นที่ที่เป็นตัวแทนของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพียง 4 ตารางเซนติเมตร หาค่าเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตร คูณด้วยจำนวนพื้นที่ของจานเพาะเชื้อทั้งหมด แล้วคูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจาง โดยที่ระดับการทำให้เจือจางที่ต่ำกว่านั้น ให้รายงานเป็น too numerous to count หรือ TNTC

ถ้าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับมีค่าเกิน 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้รายงานผลเป็นค่ามากกว่าพื้นที่ของจานเพาะเชื้อคูณด้วย 100 คูณด้วยแฟคเตอร์การเจือจางสูงที่สุด

5. กรณีที่ในจานเพาะเชื้อมี spreader ถ้าจำเป็นต้องนับ ให้นับโคโลนีที่ spreader เป็น 1 โคโลนี แต่หากมี spreader มากกว่า 25% ให้รายงานว่า spreader หรือ SPR

6. กรณีที่เกิดการปนเปื้อนหรือเกิดการผิดพลาด ให้รายงานผลว่า laboratory accident หรือ LA

ในการรายงานผล ให้ปัดค่าที่คำนวณได้ในหน่วยของ CFU/ml หรือ CFU/g ให้มีเลขนัยสำคัญเพียง 2 ตัว ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่ 3 มีค่ามากกว่า 5 ให้ปัดตัวเลขตำแหน่งที่ 2 ให้สูงขึ้น 1 ค่า แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่ 3 มีค่าน้อยกว่า 5 ให้ปัดทิ้งไป และถ้าตัวเลขตำแหน่งที่ 3 มีค่าเท่ากับ 5 ให้ปัดขึ้น ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่ 2 เป็นเลขคี่ และให้ปัดทิ้ง ถ้าเป็นเลขคู่