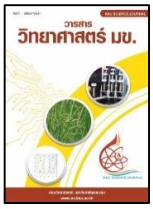
KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



ผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว จากอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Effect of Temperature on Preservation of Prepared Medium from Expired and Non-expired Media and the Growth of Microbes

เพ็ญพักตร์ คำแก้ว[1*] และ จันทิมา เสาร์ห้า[2]

Penpak Komkaew[1*] and Chanthima Saoha[2]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2]สถานปฏิบัติการเภสัชกรรมการผลิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[2]Industrial Pharmacy Practice Site, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่มีผลจากการจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วจากอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ จำนวน 18 ตัวอย่าง โดยเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วไว้ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ระยะเวลา 90 วัน ประเมินผลการทดลองจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ และการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีทดสอบมาตรฐาน ISO 11133:2014 ประเมินแบบเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ (Test organisms) ที่เป็นจุลินทรีย์เป้าหมาย (Target microorganisms) และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganisms) ผลการทดลองพบว่า สภาวะอุณหภูมิห้องมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 28.79 ± 0.29 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 56.11 ± 1.15% RH และสภาวะห้องเย็น อุณหภูมิมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.33 ± 0.15 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 89.46 ± 1.29% RH เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานพบว่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เกินเกณฑ์มาตรฐาน และมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณและชนิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งผลการตรวจสอบพบการปนเปื้อนเชื้อรามากที่สุด รองลงมาเป็นแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ในกรณีที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงเกินไปคือ > 70% RH จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีทดสอบของ ISO 11133:2014 ประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Nutrient broth (NB) มีค่าคะแนนการเจริญของเชื้อเท่ากับ 2 คะแนน แสดงว่ามีเชื้อเจริญเหมาะสมต่อการนำไปใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Lauryl tryptose broth (LSTB) และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) มีค่าคะแนนการเจริญของเชื้อเท่ากับ 2 คะแนน แสดงว่ามีเชื้อเจริญ และเกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ เหมาะสมกับการนำไปใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) มีค่าเฉลี่ย Productivity ratio (P_R) > 0.7 เหมาะสมกับการนำไปใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Eosin methylene blue agar (EMB) และ MacConkey agar (MCA) มีค่าคะแนนการเจริญของเชื้อเท่ากับ 2 คะแนน แสดงว่าเชื้อเจริญขึ้นเต็มเส้น เหมาะสมกับการนำไปใช้ สรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่หมดอายุและหมดอายุในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็นยังคงมีคุณภาพและ

*Corresponding Author, E-mail: penpko@kku.ac.th

Received: date: 20 March 2024 | Revised date: 24 May 2024 | Accepted date: 4 June 2024

ประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ทำให้ห้องปฏิบัติการเลือกเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อได้ตามความเหมาะสมและความจำเป็นของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ที่สำคัญอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมดอายุยังคงมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้งานได้ ทำให้ห้องปฏิบัติการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่าและประหยัดงบประมาณได้

ABSTRACT

The aim of this study was to monitor the change of the microbiological quality of 18 prepared media samples (both expired and non-expired) which were stored at room temperature and in a cold storage room for 90 days. Microbial contamination in culture media was evaluated using standard testing methods outlined in ISO 11133:2014. Qualitative and quantitative evaluations were conducted with two types of test organisms: target and non-target microorganisms. The result showed that the average room temperature was 28.79 ± 0.29 ºC, and the average relative humidity was 56.11 ± 1.15% RH. In the cold storage room, the average temperature was 13.33 ± 0.15 ºC, and the average relative humidity was 89.46 ± 1.29% RH. Compared to standard values, both temperature and relative humidity exceeded the standards value. This might associate with the amount and type of microbial contamination that found on the media, with the highest contamination of mold followed by gram-negative and gram-positive bacteria. Moreover, mold appearance was found on media at higher humidity (> 70% RH). For the quality culture medium testing: following ISO 11133:2014 test methods, liquid culture media: Nutrient Broth (NB) revealed a growth score of 2. This indicated that the media was suitable for microbial growth. Lauryl tryptose broth (LSTB) and brilliant green lactose bile broth (BGLB) also showed a score of 2 which demonstrated the media was remained in a good condition for microbial growth and gas production was in 1/3 of the gas trap. Similarly, the result that found on the solid media showed plate count agar (PCA) with an average productivity ratio (P_R) > 0.7, which was suitable for the utilization. Eosin methylene blue agar (EMB) and MacConkey agar (MCA) both presented score of 2, demonstrated fully microbial growth and were suitable for use. The results of this study indicated that both unexpired and expired culture media stored at room temperature and cold storage conditions still remained with the high potential property of culture media and suitable for the utilization. The data showed the advantage and effectiveness of storage temperature for maintaining the quality of media at both temperatures. This could help the technician reduce the frequency of media preparation and moreover, it could reduce the cost of expense on media.

คำสำคัญ: การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว

Keywords: Performance Testing of Culture Media, Microbial Contamination, Expired Media, Prepared Medium

บทนำ

ด้วยสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีบทบาทหน้าที่หลักในการผลิตบัณฑิต มหาบัณฑิต และดุษฎีบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยา เปิดการเรียนการสอนรายวิชาต่างๆ ทางด้านจุลชีววิทยา และรายวิชาปฏิบัติการ และยังให้ความสำคัญในการให้บริการวิชาการแก่สังคม โดยมีห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ที่มี

ภารกิจหลักในการบริการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำ อาหาร และอื่นๆ ซึ่งมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายประเภทและหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงการจัดเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วในสภาวะต่างๆ ให้มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) เป็นอาหารซึ่งมีส่วนประกอบของสารอาหารในรูปของเหลว (liquid) กึ่งแข็ง (semi-solid) และของแข็ง (solid) ประกอบด้วยสารธรรมชาติ และ/หรือสารสังเคราะห์ที่เป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์เจริญแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน หรือเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หรือเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (ศิวิมล, 2562) สามารถจัดจำแนกอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ประเภท ได้แก่ 1) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2) ลักษณะทางกายภาพ 3) การใช้งาน และ 4) วิธีการเตรียม (International Organization for Standardization, 2014) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วหากต้องการเก็บไว้ใช้ได้นานๆ นั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นมา และกระบวนการที่ใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาในอาหาร หากต้องการเก็บไว้ใช้งานเป็นเวลาหลายวัน ควรทำการเตรียมในขวดที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ หรือเก็บในถุงพลาสติกที่สามารถป้องกันการระเหยของน้ำได้ (ทนิฐ, 2550) โดยทั่วไปการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว จะเก็บในที่เย็น (5 ± 3 องศาเซลเซียส) และไม่ควรโดนแสง หากเป็นพวกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทลงในจานเพาะเชื้อ (plate agar) ให้เก็บในถุงพลาสติกปิดสนิท สามารถเก็บได้ 2 สัปดาห์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นหลอดหรือขวดจะสามารถเก็บได้ 3 เดือน (APHA, 2022) แต่ต้องสังเกตตัวอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทั้งนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม supplement ลงไปในตัวอาหารเรียบร้อยแล้ว ถือเป็นข้อยกเว้น เนื่องจาก supplement เป็นสารที่สลายตัวง่ายควรใช้ภายในวันที่เตรียม และควรมีการตรวจสอบคุณลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการจัดเก็บตามเวลาที่กำหนด

จากปัญหาการดำเนินงานที่ผ่านมาการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว จะจัดเก็บในอุณหภูมิในตู้เย็น ซึ่งมักพบปัญหาตู้เย็นมีพื้นที่แคบและไม่เพียงพอต่อการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว หากเกิดเหตุการณ์กรณีไฟฟ้าดับบ่อยทำให้ตู้เย็นไม่ทำงาน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลง เสื่อมสภาพ และเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จึงทำให้ไม่สามารถนำมาใช้งานได้และต้องทิ้งไปเป็นจำนวนมาก อีกทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปมีราคาค่อนข้างแพง หลังจากเปิดใช้ควรใช้ให้หมดภายในระยะเวลา 6 เดือน ถึง 1 ปี ซึ่งทางห้องปฏิบัติการจึงมักพบอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ระหว่างเปิดใช้งานมีสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีและจับตัวเป็นก้อน หรืออาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุก่อนที่จะใช้หมด

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการจัดเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว จากอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ ตามประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ชนิดกึ่งแข็ง และชนิดแข็ง ที่เป็น Non-selective Enriched medium Selective medium และ Differential medium คัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ของห้องปฏิบัติการด้านการเรียนการสอนพื้นฐานทั่วไปที่ใช้เป็นประจำ นำมาศึกษาผลของการจัดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและห้องเย็น ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทางจุลชีววิทยา และนำผลการทดลองที่ได้มาใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลเบื้องต้น โดยคาดว่าผลงานวิจัยนี้จะสามารถหาวิธีจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วให้มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้นและเก็บที่อุณหภูมิเหมาะสมซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก มีความสะดวก ไม่ซับซ้อน โดยไม่จำเป็นต้องทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่หมดอายุ สามารถนำมาใช้ในการเรียนการสอนพื้นฐาน เพื่อใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ประหยัด และที่สำคัญลดค่าใช้จ่ายให้กับห้องปฏิบัติการที่มีขนาดเล็กที่มีเพียงเครื่องมือพื้นฐานทั่วไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปหมดอายุและไม่หมดอายุ ที่เป็น Non-selective medium Enriched medium Selective medium และ Differential medium จำนวน 3 ประเภท ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Nutrient broth (NB) exp. 1 ปี 2 เดือน Lauryl tryptose broth (LSTB) exp. 4 ปี 3 เดือน และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB)

exp. 4 ปี 6 เดือน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง Motility nitrate medium (MNM) exp. 2 ปี 3 เดือน OF basal medium (OFM) exp. 1 ปี 2 เดือน และ Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) exp. 1 ปี อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) exp. 4 ปี 1 เดือน Eosin methylene blue agar (EMB) exp. 2 ปี 7 เดือน และ MacConkey agar (MCA) exp. 3 ปี 11 เดือน รวมจำนวน 18 ตัวอย่าง

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 160 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 920 หลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth (LSTB) และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 160 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซที่คว่ำอยู่ จำนวนอย่างละ 1,080 หลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility nitrate medium (MNM) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ใส่ glycerol 5 มิลลิลิตร ต้มเดือดให้วุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 12 x 160 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 460 หลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อ OF basal medium (OFM) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล glucose 1% ละลายให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 12 x 160 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 460 หลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด และทิ้งไว้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม MSRV selective supplement จำนวน 1 vial ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร ลงในหลอด vial พลิกกลับเบาๆ ทิ้งให้ละลาย) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV medium base ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่จานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 - 18 มิลลิลิตร จำนวน 460 จาน

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) Eosin methylene blue agar (EMB) และ MacConkey agar (MCA) ละลายส่วนประกอบในน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว แบ่งใส่จานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 - 18 มิลลิลิตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 920 จาน

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุที่เตรียมแล้ว แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 90 วัน โดยชุดการทดลองที่ 1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วไปจัดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และชุดการทดลองที่ 2 เก็บไว้ในห้องเย็น บันทึกอุณหภูมิและความชื้นทุกวัน โดยอ่านค่าจากเครื่อง Digital thermo-hygrometer

4. การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

4.1 ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนอาหารด้วยตาเปล่า

ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุกวัน ในอาหารเลี้ยงชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ สภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น จากข้อ 3 เป็นระยะเวลา 90 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสังเกตจากความขุ่น เพื่อดูการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งและชนิดแข็ง สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีการเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2 การย้อมสีแกรมเพื่อดูชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอาหารเลี้ยงชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ สภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น จาก ข้อ 4.1 นำมาดูชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสังเกตจากความขุ่นเพื่อดูการเจริญของเชื้อ นำไปย้อมแกรม ส่องดูขนาด รูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งและชนิดแข็ง สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีการเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทุกชนิดนำไปย้อมแกรม และระบุว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใดบ้าง

4.3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ด้วยวิธี Spread plate

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วหมดอายุและไม่หมดอายุ สภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ชนิดเหลวและชนิดแข็ง จากข้อ 3 โดยเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน นำมาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ด้วยวิธี Spread plate ดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Nutrient broth (NB) Lauryl tryptose broth (LSTB) และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายเจือจาง 0.85% normal saline solution (NSS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจาง 10 เท่า ทีระดับ 3 ระดับความเจือจาง 10^1 - 10^3 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละระดับความเจือจาง เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PCA (Spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณและแปลผล

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) Eosin methylene blue agar (EMB) และ MacConkey agar (MCA) ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อป้ายที่พื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ นำไม้พันสำลีจุ่มลงในสารละลายเจือจาง 0.85% Normal saline solution (NSS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจาง 10 เท่า ที่ระดับ 3 ระดับความเจือจาง 10^1 - 10^3 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเจือจาง เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PCA (Spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณและแปลผล

5. การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 11133:2014

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วหมดอายุและไม่หมดอายุ สภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น จากข้อ 3 โดยเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน มาทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธี ISO 11133:2014 ประเมินแบบเชิงคุณภาพ (Qualitative) และเชิงปริมาณ (Quantitative) ดังนี้

5.1 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ด้วยวิธี Qualitative single tube (Turbidity)

ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Nutrient broth (NB) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ใส่เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อ บันทึกผลและแปลผลตามวิธีของ ISO 11133:2014

5.2 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แบบกึ่งหาปริมาณและคุณภาพทดสอบ ด้วยวิธี Qualitative single tube (Turbidity)

ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Lauryl tryptose broth (LSTB) และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (Target microorganism) คือ *Escherichia coli* DMST 4212 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) คือ *Enterococcus faecalis* DMST 4736 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลและแปลผลตามวิธีของ ISO 11133:2014

5.3 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ด้วยวิธี Method for quantitative test

ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) จากการคำนวณหาค่า Productivity ratio (P_R) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ และ Tryptic soy agar (TSA) อาหารเลี้ยงเชื้ออ้างอิง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (Spread plate) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TSA คำนวณหาค่า Productivity ratio (P_R) บันทึกผลและแปลผลตามวิธีของ ISO 11133:2014

5.4 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ด้วยวิธี Method for qualitative test: qualitative streaking

ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Eosin methylene blue agar (EMB) และ MacConkey agar (MCA) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (Target microorganism) *Escherichia coli* DMST 4212 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^3 - 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Staphylococcus aureus* DMST 8013 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขนาด 1 ไมโครลิตร เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายและไม่ใช่เป้าหมายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยเขี่ยเชื้อแต่ละชนิดต่อ 1 เส้น (ไม่ให้แต่ละเส้นตัดกัน) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนเส้น บันทึกผลและแปลผลตามวิธีของ ISO 11133:2014

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

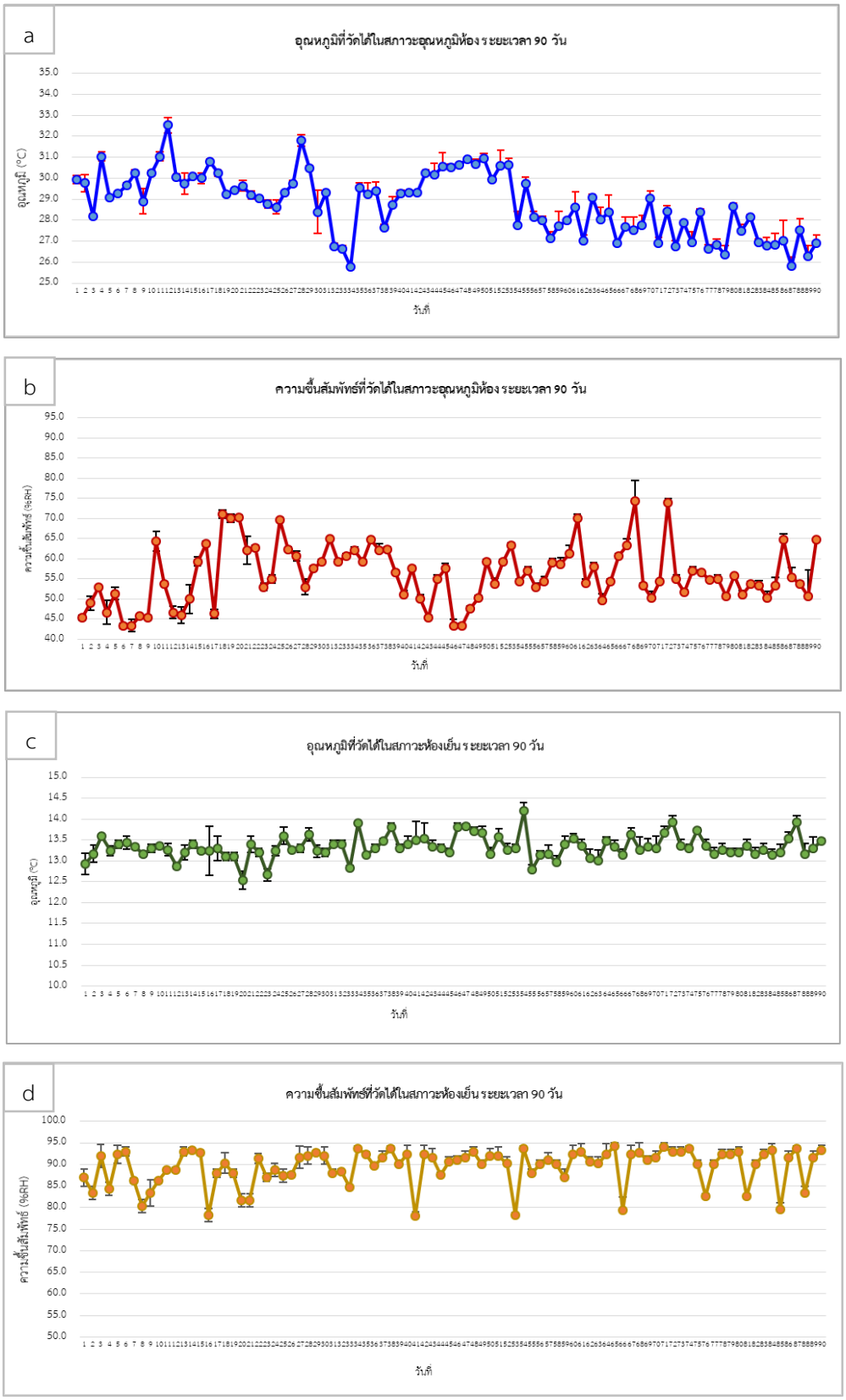
จากการศึกษาครั้งนี้ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ร้อยละ (Percentage) ค่าเฉลี่ย (Mean) สวนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และนำข้อมูลจากการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด มาวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน ISO 11133:2014

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิห้องและห้องเย็น ที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่หมดอายุและหมดอายุ วัดด้วยเครื่อง Thermo-hygrometer อ่านผลทุกวัน ระยะเวลา 90 วัน พบว่าสภาวะอุณหภูมิห้อง ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิเท่ากับ 28.79 ± 0.29 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 56.11 ± 1.15% RH และสภาวะห้องเย็น ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิเท่ากับ 13.33 ± 0.15 องศาเซลเซียส ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 89.46 ± 1.29% RH ดังรูปที่ 1

ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง เมื่อนำค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์นำไปเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ คือ อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 45 – 70% RH พบว่าอุณหภูมิเกินเกณฑ์การยอมรับ แต่ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงที่กำหนด ซึ่งเป็นการควบคุมสภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา (ทนิฐ, 2550) และสภาวะห้องเย็น เมื่อนำค่าเฉลี่ยของอุณหภูมินำไปเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ คือ อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิเกินเกณฑ์การยอมรับที่ได้กำหนดไว้ สำหรับเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว (APHA, 2022) ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ไม่ได้กำหนดไว้



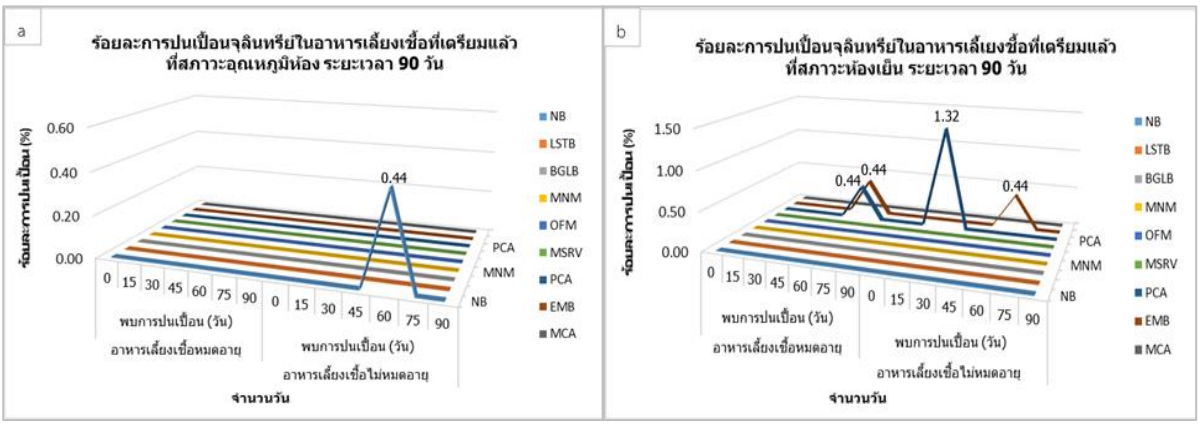
รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ที่ใช้เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว ระยะเวลา 90 วัน อุณหภูมิที่วัดได้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (a) ความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (b) อุณหภูมิที่วัดได้ในสภาวะอุณหภูมิห้องเย็น (c) และ ความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ในสภาวะอุณหภูมิห้องเย็น (d)

2. ผลตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนอาหารด้วยตาเปล่า

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุกวัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว ระยะเวลา 90 วัน โดยสังเกตการปนเปื้อนด้วยตาเปล่า พบว่าสภาวะอุณหภูมิห้องอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ LSTB BGLB MNM OFM MSRV PCA EMB และ MCA ไม่พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 90 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ NB พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 60 วัน คิดเป็นร้อยละ 0.44 สภาวะห้องเย็นอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ NB LSTB BGLB MNM OFM และ MSRV ไม่พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 90 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ PCA และ EMB พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 60 วัน คิดเป็นร้อยละ 0.44 อาหารเลี้ยงเชื้อไม่หมดอายุ PCA พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 15 วัน คิดเป็นร้อยละ 1.32 และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่หมดอายุ EMB พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 60 วัน คิดเป็นร้อยละ 0.44 ดังรูปที่ 2

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่สภาวะอุณหภูมิห้องอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ NB พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 60 วัน อาจเป็นเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นอาหาร Non-selective medium เชื้อทุกชนิดสามารถเจริญได้และมีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทำให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Mesophile สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางระหว่าง 25 - 40 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุที่ไม่พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป็นเพราะเทคนิคและขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงปฏิบัติได้อย่างถูกต้องเหมาะสม ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิห้องได้ถึง 90 วัน สภาวะห้องเย็นอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ PCA และ EMB ที่ระยะเวลา 60 วัน พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์น่าจะเป็นเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เป็นอาหาร Non-selective medium เชื้อทุกชนิดสามารถเจริญได้ดี การเก็บรักษาที่ห้องเย็นทำให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrophile สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 15 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554) และอาจเกิดจากอาหารเสื่อมสภาพหรือมีการปนเปื้อนของสปอร์ของแบคทีเรียและเชื้อราทนความร้อนสูงตั้งแต่อยู่ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นได้ ดังนั้นเมื่อเปิดขวดออกแล้ว ควรหลีกเลี่ยงการเปิดขวดอาหารบ่อยๆ ถ้ามีอากาศจากภายนอกความชื้นเข้ามาในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ Productivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และช้อนที่ใช้ตักอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีสารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลงไปในขวดอาหารได้ (รวิวรรณ, 2549) อาหารเลี้ยงเชื้อไม่หมดอายุ PCA พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 15 วัน และรองลงมาเป็น EMB ที่ระยะเวลา 60 วัน ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทลงบนจานเพาะเชื้อแล้วสามารถเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์ อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วประเภทหลอดทดลองฝาเกลียวสามารถเก็บไว้ได้นาน 3 เดือน อุณหภูมิ < 30 องศาเซลเซียส (APHA, 2022) ทั้งนี้ที่สภาวะห้องเย็นอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุชนิดเหลวและกึ่งแข็งประเภทหลอดทดลองฝาเกลียว สามารถเก็บรักษาไว้ได้ถึง 90 วัน

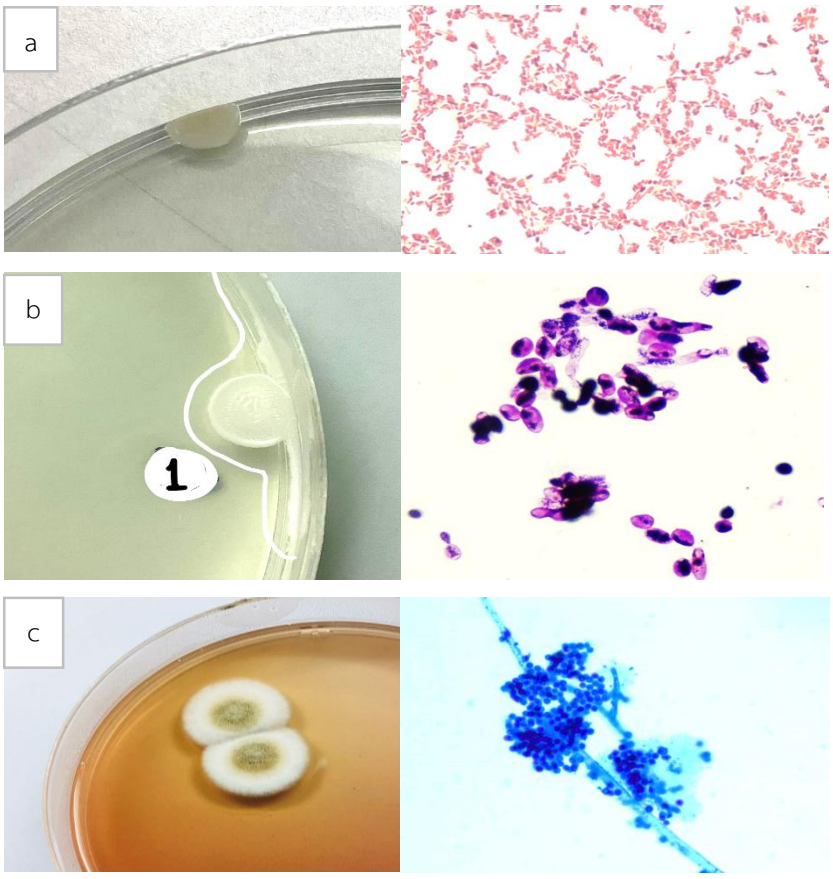


รูปที่ 2 ร้อยละการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงชื้อที่เตรียมแล้วสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ระยะเวลา 90 วัน อาหารเลี้ยงชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุสภาวะอุณหภูมิห้อง (a) อาหารเลี้ยงชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุสภาวะห้องเย็น (b)

2.2 การย้อมสีแกรมเพื่อดูชนิดของจุลินทรีย์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จากข้อ 2.1 มาย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง ขนาด การติดสีแกรม ซึ่งแบคทีเรียจะย้อมด้วยสีแกรม เชื้อราย้อมด้วยสี Methylene blue นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิห้อง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่หมดอายุ พบจำนวนเชื้อรามากที่สุด คือ 44 โคโลนี รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เท่ากับ 21 และ 9 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ พบจำนวนเชื้อรามากที่สุดเช่นกัน คือ 70 โคโลนี รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก เท่ากับ 30 และ 7 โคโลนี ตามลำดับ สภาวะห้องเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่หมดอายุ พบจำนวนเชื้อรามากที่สุด คือ 38 โคโลนี รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เท่ากับ 21 และ 5 โคโลนี ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุ พบจำนวนเชื้อรามากที่สุดเช่นกัน คือ 25 โคโลนี รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมลบ 5 โคโลนี และไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมบวก ดังรูปที่ 3

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาย้อมสีแกรมเพื่อดูชนิด พบจำนวนเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือ แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก พบทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ซึ่งเกี่ยวกับคุณภาพของอากาศทั้ง 2 สภาวะที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เกินเกณฑ์มาตรฐาน อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณความชื้นที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อรา (Janghoo, 2012) ในกรณีที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงเกินไป > 70% RH จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย ระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นนำไปสู่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (Lax *et al.*, 2019) ความชื้นที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเพื่อการดำรงชีวิตที่แบคทีเรียหรือเชื้อราแต่ละชนิดจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่เหมาะสมกับการควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราควรอยู่ในช่วง 40 – 60% RH (สุนทรี, 2563)



รูปที่ 3 การย้อมสีแกรมและย้อมเชื้อราเพื่อดูชนิดการปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสีของแบคทีเรียแกรมลบ (a) การติดสีของแบคทีเรียแกรมบวก (b) และ การย้อมสีเชื้อราด้วย Methylene blue (c)

2.3 ตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยวิธี Spread plate

จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยวิธี Spread plate ตรวจสอบทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วที่หมดอายุและไม่หมดอายุสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อาหารชนิดเหลวและชนิดแข็ง ได้แก่ NB LSTB BGLB PCA EMB และ MCA ผลการทดสอบพบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ ทั้งสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น เนื่องจากได้คัดแยกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปนเปื้อนออกไปแล้วจากการสังเกตด้วยตาเปล่า จึงทำให้ไม่พบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

3. ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 11133:2014

3.1 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity)

ทดสอบทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ใส่เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อ อ่านผลและแปลผลดังนี้ ขุ่นมาก มีเชื้อเจริญ เท่ากับ 2 คะแนน ขุ่นน้อย มีเชื้อเจริญไม่ดี เท่ากับ 1 คะแนน และไม่ขุ่น เชื้อไม่เจริญ เท่ากับ 0 คะแนน ผลการทดสอบพบว่าสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 คะแนน แสดงว่ามีระดับความขุ่นมากแสดงว่ามีเชื้อเจริญ เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 11133:2014 ดังตารางที่ 1

วิธีทดสอบประสิทธิภาพ Liquid culture media สำหรับ Qualitative single tube method เป็นวิธีการประเมินจากความขุ่น (turbidity) เพื่อดูการทดสอบ Productivity โดยดูผลจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Target microorganism) สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตดี แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารที่จำเป็นครบถ้วนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	NB ไม่หมดอายุ		NB หมดอายุ		NB ไม่หมดอายุ		NB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
1	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
2	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
3	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.8	เหมาะสม
4	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
5	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
6	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
7	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
8	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
9	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
10	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ย การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 [b] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity) (ต่อ)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	NB ไม่หมดอายุ		NB หมดอายุ		NB ไม่หมดอายุ		NB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
11	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
12	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
13	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม
เฉลี่ย[b]	2.0		2.0		2.0		2.0	

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ย การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 [b] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

3.2 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แบบกึ่งหาปริมาณและคุณภาพทดสอบ ด้วยวิธี Qualitative single tube (Turbidity)

ทดสอบทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Lauryl tryptose broth (LSTB) และ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) ใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (Target microorganism) *Escherichia coli* DMST 4212 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Enterococcus faecalis* DMST 4736 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลและแปลผลตามวิธีของ ISO 11133:2014 อ่านผลและแปลผลดังนี้ ขุ่นมาก มีเชื้อเจริญ เท่ากับ 2 คะแนน ขุ่นน้อย มีเชื้อเจริญไม่ดี เท่ากับ 1 คะแนน และไม่ขุ่น เชื้อไม่เจริญ เท่ากับ 0 คะแนน ผลการทดสอบพบว่า สภาวะอุณหภูมิห้องอาหารเลี้ยงเชื้อ LSTB หมดอายุและไม่หมดอายุ เมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (Target microorganism) *Escherichia coli* DMST 4212 มีการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 1.9 และ 2.0 คะแนน ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 1.9 คะแนน สภาวะห้องเย็นอาหารเลี้ยงเชื้อ LSTB หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 คะแนน อาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 1.9 และ 2.0 คะแนน ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Enterococcus faecalis* DMST 4736 อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความขุ่น ไม่มีการเจริญของเชื้อ ทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ดังนั้นสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อ LSTB และ BGLB หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับ 1.9 - 2.0 คะแนน มีระดับความขุ่นมากแสดงว่ามีเชื้อเจริญได้ดี เกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน และผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 11133:2014 ดังตารางที่ 2 และ 3

วิธีทดสอบประสิทธิภาพ Liquid culture media สำหรับ Qualitative single tube method เป็นวิธีการประเมินจากความขุ่น (Turbidity) เพื่อดูการทดสอบ Productivity และการเกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ โดยดูผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Target microorganism) สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตดีแสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารที่จำเป็นครบถ้วนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย ผลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism) ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth (LSTB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	LSTB ไม่หมดอายุ		LSTB หมดอายุ		LSTB ไม่หมดอายุ		LSTB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
1	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
2	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม
3	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
4	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
5	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
6	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
7	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
8	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
9	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
10	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
11	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
12	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
13	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
เฉลี่ย[c]	2.0		1.9		2.0		2.0	

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (target microorganism) *Escherichia coli* DMST 4212 [b] หมายถึง การเกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ [c] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	BGLB ไม่หมดอายุ		BGLB หมดอายุ		BGLB ไม่หมดอายุ		BGLB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
1	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
2	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
3	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม
4	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
5	2.0[b]	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม
6	2.0[b]	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
7	1.7	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (target microorganism) Escherichia coli DMST 4212 [b] หมายถึง การเกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ [c] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Qualitative single tube (turbidity) (ต่อ)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	BGLB ไม่หมดอายุ		BGLB หมดอายุ		BGLB ไม่หมดอายุ		BGLB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
8	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
9	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
10	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
11	2.0[b]	เหมาะสม	1.7	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
12	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
13	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม	2.0[b]	เหมาะสม
เฉลี่ย[c]	1.9		1.9		2.0		1.9	

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (target microorganism) Escherichia coli DMST 4212 [b] หมายถึง การเกิดก๊าซ 1/3 ของหลอดดักก๊าซ [c] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

3.3 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ด้วยวิธี Method for quantitative test

ทดสอบทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *Staphylococcus aureus* DMST 8013 เจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ปิเปตเชื้อลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ และ Tryptic soy agar (TSA) อาหารเลี้ยงเชื้ออ้างอิง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TSA คำนวณหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า Productivity ratio (P_R) จากผลการทดสอบพบว่าในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่า Productivity ratio (P_R) โดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.76 - 2.80 ซึ่งมากกว่า 0.7 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน และผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 11133:2014 ดังตารางที่ 4

วิธีทดสอบประสิทธิภาพ Solid culture media สำหรับ Quantitative test ประเมินจากค่า Productivity ratio (P_R) เป็นการประเมินประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เปรียบเสมือนการวัดประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆ ว่าสามารถเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมายได้ดีแค่ไหน โดยเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้ออ้างอิง หากมีค่า Productivity ratio (P_R) ≥ 0.7 แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบมีประสิทธิภาพในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Target microorganism) ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Method for quantitative test

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	PCA ไม่หมดอายุ		PCA หมดอายุ		PCA ไม่หมดอายุ		PCA หมดอายุ	
	ค่า P_R[a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R[a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R[a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R[a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]
1	0.85±0.02	เหมาะสม	0.85±0.10	เหมาะสม	0.76±0.02	เหมาะสม	0.92±0.06	เหมาะสม
2	1.12±0.22	เหมาะสม	1.36±0.53	เหมาะสม	1.41±0.20	เหมาะสม	0.94±0.40	เหมาะสม

[a] หมายถึง ค่า productivity ratio (P_R) จากสูตรคำนวณ PR = N_S/N_0 เมื่อ N_S = จำนวนเชื้อทั้งหมดบน test medium (PCA) N_0 = จำนวนเชื้อทั้งหมดบน reference medium (TSA) [b] หมายถึง คือ ค่า productivity Ratio (P_R) = ≥0.7 จึงจะเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Method for quantitative test (ต่อ)

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	PCA ไม่หมดอายุ		PCA หมดอายุ		PCA ไม่หมดอายุ		PCA หมดอายุ	
	ค่า P_R [a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R [a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R [a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]	ค่า P_R [a] (เฉลี่ย±SD)	แปลผล[b]
3	0.92±0.01	เหมาะสม	2.71±0.48	เหมาะสม	1.86±0.38	เหมาะสม	1.53±0.29	เหมาะสม
4	2.01±1.45	เหมาะสม	1.50±0.74	เหมาะสม	1.49±0.64	เหมาะสม	1.87±0.67	เหมาะสม
5	2.80±0.28	เหมาะสม	1.67±0.73	เหมาะสม	2.20±1.21	เหมาะสม	2.50±0.45	เหมาะสม
6	1.79±0.47	เหมาะสม	1.16±0.13	เหมาะสม	1.33±0.39	เหมาะสม	1.26±0.29	เหมาะสม
7	1.81±0.50	เหมาะสม	0.88±0.28	เหมาะสม	1.20±0.33	เหมาะสม	1.34±0.15	เหมาะสม
8	1.39±0.24	เหมาะสม	1.23±0.17	เหมาะสม	1.37±0.18	เหมาะสม	1.33±0.09	เหมาะสม
9	1.51±0.11	เหมาะสม	1.45±0.06	เหมาะสม	1.28±0.08	เหมาะสม	1.38±0.20	เหมาะสม
10	1.51±0.17	เหมาะสม	1.68±0.44	เหมาะสม	1.43±0.24	เหมาะสม	1.94±0.12	เหมาะสม
11	0.94±0.17	เหมาะสม	0.94±0.26	เหมาะสม	0.87±0.14	เหมาะสม	1.56±0.72	เหมาะสม
12	1.44±0.35	เหมาะสม	0.99±0.05	เหมาะสม	0.86±0.16	เหมาะสม	0.84±0.33	เหมาะสม
13	1.19±0.06	เหมาะสม	1.22±0.13	เหมาะสม	1.36±0.09	เหมาะสม	1.28±0.08	เหมาะสม

[a] หมายถึง ค่า productivity ratio (P_R) จากสูตรคำนวณ PR = N_S/N_0 เมื่อ N_S = จำนวนเชื้อทั้งหมดบน test medium (PCA) N_0 = จำนวนเชื้อทั้งหมดบน reference medium (TSA) [b] หมายถึง คือ ค่า productivity Ratio (P_R) = ≥0.7 จึงจะเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

3.4 การทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ด้วยวิธี Method for qualitative test: qualitative streaking

ทดสอบทุก 7 วัน จำนวน 13 ครั้ง ระยะเวลา 90 วัน ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Eosin methylene blue agar (EMB) และ MacConkey agar (MCA) ใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย (target microorganism) *Escherichia coli* DMST 4212 และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Staphylococcus aureus* DMST 8013 ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขนาด 1 ไมโครลิตร เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายและไม่ใช่เป้าหมายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยเขี่ยเชื้อแต่ละชนิดต่อ 1 เส้น (ไม่ให้แต่ละเส้นตัดกัน) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนเส้นอาหาร อ่านผลและแปลผลดังนี้ เชื้อเจริญขึ้นเต็มเส้นเท่ากับ 2 คะแนน เชื้อเจริญมากกว่าครึ่งเส้นเท่ากับ 1 คะแนน และเชื้อไม่เจริญหรือขึ้นน้อยกว่าครึ่งเส้นเท่ากับ 0 คะแนน ผลการทดสอบพบว่าสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็นอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB หมดอายุและไม่หมดอายุ เมื่อใส่เชื้อเป้าหมาย *Escherichia coli* DMST 4212 มีเชื้อเจริญขึ้นเต็มเส้น โคโลนีมีสีม่วงเข้มตรงกลางมีสีดำมันวาวคล้ายโลหะ (Green metallic sheen) มีค่าคะแนน เฉลี่ยเท่ากับ 2.0 คะแนน ส่วนเชื้อที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Staphylococcus aureus* DMST 8013 ไม่พบการเจริญของเชื้อ สภาวะอุณหภูมิห้องอาหารเลี้ยงเชื้อ MCA หมดอายุและไม่หมดอายุ เมื่อใส่เชื้อเป้าหมาย *Escherichia coli* DMST 4212 มีเชื้อเจริญขึ้นเต็มเส้น โคโลนีมีสีชมพู ล้อมรอบด้วยตะกอนสีชมพูของเกลือน้ำดี (Lactose fermenter with bile precipitate) มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 และ 1.9 คะแนน ตามลำดับ สภาวะห้องเย็นอาหารเลี้ยงชื้อ MCA หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 คะแนน เชื้อที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (Non-target microorganism) *Staphylococcus aureus*

DMST 8013 ไม่พบการเจริญของเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดที่หมดอายุและไม่หมดอายุทั้งสองสภาวะ ดังนั้นสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB และ MCA หมดอายุและไม่หมดอายุ มีค่าคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับ 1.9 - 2.0 คะแนน เชื้อเป้าหมาย (Target microorganism) เจริญได้ดี เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน และผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 11133:2014 ดังตารางที่ 5 และ 6

วิธีทดสอบประสิทธิภาพ Solid culture media สำหรับ Qualitative test ต้องทำ Qualitative streak method เพื่อดูการทดสอบ Productivity โดยดูผลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Target microorganism) สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตดี แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารที่จำเป็นครบถ้วนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมาย และดูการทดสอบ Selectivity โดยดูผลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Non-target microorganism) ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างสมบูรณ์มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Method for qualitative test: qualitative streaking

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	EMB ไม่หมดอายุ		EMB หมดอายุ		EMB ไม่หมดอายุ		EMB หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
1	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
2	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
3	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
4	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
5	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
6	2.0	เหมาะสม	1.8	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
7	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
8	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
9	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม
10	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
11	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
12	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
13	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
เฉลี่ย[b]	2.0		2.0		2.0		2.0	

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยของการเจริญเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย *Escherichia coli* DMST 4212 [b] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (MCA) หมดอายุและไม่หมดอายุ ในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น ด้วยวิธี Method for qualitative test: qualitative streaking

ครั้ง	สภาวะอุณหภูมิห้อง				สภาวะห้องเย็น			
	MCA ไม่หมดอายุ		MCA หมดอายุ		MCA ไม่หมดอายุ		MCA หมดอายุ	
	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล	ค่าคะแนน[a]	แปลผล
1	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
2	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
3	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
4	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
5	1.9	เหมาะสม	1.8	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม
6	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
7	2.0	เหมาะสม	1.8	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม
8	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
9	1.8	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม
10	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
11	1.8	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
12	2.0	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
13	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	1.9	เหมาะสม	2.0	เหมาะสม
เฉลี่ย[b]	1.9		2.0		2.0		2.0	

[a] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยของการเจริญเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย *Escherichia coli* DMST 4212 [b] หมายถึง ค่าคะแนนเฉลี่ยจำนวนครั้งทั้งหมด

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า ผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว จากอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุ ทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้องและห้องเย็น อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เกินเกณฑ์มาตรฐานและมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ผลประเมินประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุและไม่หมดอายุประเภทอาหารเหลวและอาหารแข็ง ในอุณหภูมิทั้งสองสภาวะยังคงมีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ตามมาตรฐาน ISO 11133:2014 ทำให้ห้องปฏิบัติการเลือกเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อได้ตามความเหมาะสมและความจำเป็นของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ที่สำคัญอาหารเลี้ยงเชื้อหมดอายุยังมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้งานได้ ทำให้ห้องปฏิบัติการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ประหยัดงบประมาณ ลดค่าใช้จ่ายให้กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีเพียงเครื่องมือพื้นฐานทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากโครงการวิจัยสถาบัน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ขอขอบคุณ ผศ.ดร.นันทวัน ฤทธิ์เดช เป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและกำลังใจ พร้อมทั้งหัวหน้าสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รศ.ดร.โสภณ บุญลือ ที่สนับสนุนและอนุเคราะห์สถานที่ทำงานวิจัย ขอขอบคุณทุกท่านทั้งที่ได้กล่าวนามและไม่ได้กล่าวนาม

เอกสารอ้างอิง

ทนิฐ หงส์ดุสิต. (2550). การประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยา. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 - 72.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2554). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 85 – 87.

รวิวรรณ อาจสำอาง. (2549). การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 54(172): 23 - 25.

ศิวิมล นันสุนานนท์. (2562). เอกสารประกอบการฝึกอบรมการใช้และการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน ISO 11133:2014. กรุงเทพฯ: ศูนย์ฝึกอบรมและบริการที่ปรึกษา บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด.

สุนทรี สวนทับทิม และพรเพ็ญ ก่ำนารายณ์. (2563). การตรวจวัดสภาพแวดล้อมและการสำรวจชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในอากาศของห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การแพทย์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 28(8): 1463 - 1472.

APHA. (2022). Standard methods for the examination of water and wastewater. 24th edition. New York: American Public Health Association. 1072 - 1073.

International Organization for Standardization. (2014). ISO 11133:2014 (E). Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

Janghoo, Seo. (2012). Influence of Moisture on Mold Growth in Building Materials. Air-Conditioning and Refrigeration Engineering 24(12): 852 - 857. doi: 10.6110/KJACR.2012.24.12.852.

Lax, S., Cardona, C., Zhao, D., Winton, V.J., Goodney, G., Gao, P., Gottel, N., Hartmann, E.M., Henry, C., Thomas, P.M., Kelley, S.K., Stephens, B. and Gilbert, J.A. (2019). Microbial and metabolic succession on common building materials under high humidity conditions. Nature Communications 10(1): 1 - 12. doi: 10.1038/S41467-019-09764-Z.

❑❑❑❑❑