

## การประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบทางจุลชีววิทยา

### ตอนที่ 3: การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับห้องปฏิบัติการที่ทดสอบน้ำด้านจุลชีววิทยา

เรียบเรียงโดย ดร.รวิวรรณ อางสำอาง

บทความนี้เรียบเรียงมาจาก Standard Methods for the Examination of Water & Waste Water, 21<sup>st</sup> Edition ในหัวข้อ 9020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL ซึ่งกล่าวถึงการประกันคุณภาพ/การควบคุมคุณภาพการทดสอบทางจุลชีววิทยาของห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบตัวอย่างน้ำตอนนี้เป็นตอนที่ 3 จะกล่าวถึงข้อแนะนำสำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับห้องปฏิบัติการที่ทดสอบน้ำด้านจุลชีววิทยา

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีทดสอบที่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบ (cultural methods) จะขึ้นอยู่กับ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างถูกวิธี ใช้วัสดุที่มีคุณภาพดี พร้อมทั้งวิธีการเตรียมและการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ให้ดีที่สุด ส่วนวิธีการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดควรจะใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วพร้อมใช้งาน (commercially prepared media) ถ้าหาได้ อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้มีคุณภาพที่ แตกต่างกันในแต่ละผู้ผลิต และถึงแม้จะเป็นผู้ผลิต เดียวกันก็ยังมีคุณภาพแตกต่างกันในแต่ละชุดผลิตด้วย การสั่งซื้ออาหารเลี้ยงเชื้อควรจะซื้อใน ปริมาณที่จะใช้ได้ไม่เกิน 1 ปี และใช้อาหารเลี้ยง เชื้อขวดที่มาถึงก่อน (first-in, first-out) ถ้า ปฏิบัติได้ควรจะสั่งซื้ออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาด บรรจุ 114 กรัม แทนที่จะเป็นขนาดบรรจุ 454 กรัม เพื่อที่จะไม่ต้องเปิด-ปิดขวดบ่อยครั้งทำให้ ขวดถูกปิดสนิทมากที่สุด เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมาถึง ห้องปฏิบัติการ ให้ทำการบันทึกชนิด ปริมาณและ ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งหมายเลขชุด การผลิต (lot number) วันหมดอายุ วันที่ได้รับ และวันที่เปิดขวดออกมาใช้งาน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแห้งสำเร็จรูป (dehydrated media) ควรเก็บรักษาในที่แห้งที่มี อุณหภูมิคงที่ ปราศจากแสง อาหารเลี้ยงเชื้อที่

เกาะเป็นก้อน เปลี่ยนสี หรือแสดงให้เห็นว่า เปลี่ยนแปลงสภาพจากเดิมต้องทิ้งไป อาหารเลี้ยง เชื้อที่เก็บไว้นานไม่ได้ใช้แต่อายุเกินจากที่ผู้ผลิตระบุไว้ ต้องไม่นำมาใช้งาน ระยะเวลาในการเก็บอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้เปิดใช้ไม่ควรเกิน 2 ปี ถ้าเก็บที่ อุณหภูมิห้อง ให้ทำการเปรียบเทียบ recovery ของอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่เพิ่งซื้อใหม่ ๆ กับชุดที่ ได้รับการตรวจสอบการใช้งานแล้วโดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เปิดใช้งานแล้วควรเก็บไว้ไม่เกิน 6 เดือน อาหาร เลี้ยงเชื้อชนิดแห้งสำเร็จรูปจะดูความชื้นได้ง่าย ดังนั้นควรป้องกันอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปิดใช้งานแล้ว จากความชื้นเข้า โดยการปิดขวดให้สนิทมากที่สุด เท่าที่จะทำได้ และปิดทันทีหลังใช้งาน ถ้าอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็งหรือเปลี่ยนสีจากเดิม ต้องทิ้งทันที และ ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือในขวดไว้ใน desiccator

#### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ควรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะที่มี ปริมาตรเป็นสองเท่าของปริมาตรที่ต้องการเตรียม ต้องคนอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันขณะที่ให้ความร้อน โดยเฉพาะอาหารแบบวุ้น ต้องระมัดระวังไม่ให้ อาหารเลี้ยงเชื้อไหม้หรือเดือดจนล้นภาชนะโดยการ ต้มในภาชนะที่มีน้ำต้มเดือดอยู่ (boiling water bath) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในปริมาณที่

ไม่มาก แต่ถ้าเตรียมในปริมาณมากโดยการให้ความร้อนด้วยวิธีใช้แผ่นให้ความร้อน (hot plate) หรือตะเกียงแก๊ส ควรใช้แผ่นให้ความร้อนที่มีแท่งคนแบบแม่เหล็กอยู่และควรปิดป้ายแสดงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวันที่ที่เตรียม สำหรับน้ำที่ใช้ต้องใช้น้ำสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ (reagent water) การวัดปริมาตรของน้ำและอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้ภาชนะหรือปิเปตที่มีขีดบอกปริมาตรและควรได้รับการทวนสอบปริมาตรแล้ว ห้ามใช้ปิเปตชนิดเป่าของเหลวออกจนหมด (blow-out pipets) หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเสร็จแล้ว ต้องนำมาเก็บรักษาไว้ ถ้าจะนำมาใช้งานต้องนำมาหลอมใหม่ในน้ำต้มเดือด (boiling water) หรือหลอมโดยการใช้น้ำร้อน

หลังจากฆ่าเชื้อและทำให้เย็นลงแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนหนึ่งมาตรวจสอบและบันทึกค่า pH การตรวจสอบค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้ใช้ surface probe ถ้า pH ไม่เป็นไปตามที่ผู้ผลิตระบุให้ปรับค่า pH ได้ ในกรณีที่ต้องปรับค่า pH น้อยกว่า 0.5 pH unit ให้ใช้สารละลาย 1 N NaOH หรือ HCl ให้ได้ค่า pH ตามที่ผู้ผลิตระบุ แต่ถ้าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แตกต่างจากที่ผู้ผลิตระบุมากกว่า 0.5 pH unit ต้องทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อชุดนั้น แล้วทำการตรวจสอบวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบ pH ของน้ำที่ใช้ ถ้า pH ของน้ำไม่เป็นที่น่าพอใจคือไม่ผ่านเกณฑ์ให้น้ำจากแหล่งใหม่ ถ้าน้ำมีคุณภาพ

ใช้ได้ให้ใช้น้ำเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่และตรวจสอบ pH ถ้า pH ยังไม่ผ่านอีกให้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่

บันทึกปัญหาของ pH ลงในแบบบันทึกการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและแจ้งให้ผู้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อทราบถ้าปัญหาเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความผิดปกติของสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว หรือมีการตกตะกอน และบันทึกการสังเกตด้วยตาตั้งกล่าวให้พิจารณาความแตกต่างของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ว่าอาจเป็นสาเหตุของปัญหาดังกล่าวข้างต้นหรือไม่ ถ้าพบปัญหาดังกล่าวต้องทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อชุดนั้นไป



## 2. การฆ่าเชื้อ (Sterilization)

การฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อใช้อุณหภูมิ 121 ถึง 124 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาตามตารางที่ 1 การฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave แบบ double-walled จะทำให้รักษาความดันและอุณหภูมิในเครื่องได้ ระยะเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับรูปแบบและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ การมีคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ห้ามใช้อุณหภูมิสูงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตและเวลาที่อยู่ในเครื่องไม่ควรเกิน 45 นาที (exposure time) หมายถึงเวลาที่นับตั้งแต่นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปใส่ในเครื่องจนถึงนำออกจากเครื่อง)

**ตารางที่ 1** ระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อด้วย autoclave

Material	Time at 121°C
Membrane filters and pads	10 min
Carbohydrate-containing media (lauryl tryptose, BGB broth, etc.)	12-15 min
Contaminated materials and discarded cultures	30 min
Membrane filter assemblies (wrapped), sample collection bottles (empty)	15 min
Buffered dilution water, 99 mL in screw-cap bottle	15 min
Rinse water, water >100 mL	Adjust for volume



ในปัจจุบันรูปแบบของ autoclave มีหลายรูปแบบซึ่งเป็นแบบอัตโนมัติและรวมถึงที่มีรูปร่างตั้งตามแนวนอนที่เลื่อนได้ มีประตูที่มีการปิดผนึกอย่างดี มีโปรแกรมการฆ่าเชื้อที่ให้เลือกได้หลายรูปแบบ พร้อมทั้งมีโปรแกรมการวัดอุณหภูมิและความดันได้อย่างต่อเนื่องได้หลายจุดในตัวเครื่อง นอกจากนี้ยังรวมถึงการมีระบบการทำให้เย็นลงและระบบการดึงเอาไอน้ำออก ส่วนการนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกมา จาก autoclave ให้นำออกมาเมื่อความดันของ autoclave ลดลงถึง 0 หรือในกรณีที่เป็นระบบอัตโนมัติประตูเครื่องจะเปิดออก ห้ามฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้ง

ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อของ autoclave ทุกเดือนโดยนำ *Bacillus stearothermophilus* spore suspensions หรือ strips (มีผู้ผลิตขายในเชิงพาณิชย์) บรรจุลงในภาชนะที่เป็นแก้ว นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปใส่ในหลอดซึ่งบรรจุ trypticase soy broth และอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้ามีการเจริญเติบโตของเชื้อใน spores ที่ฆ่าเชื้อแล้วหลังการอบเพาะเชื้อแสดงว่าการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ

สำหรับการฆ่าเชื้อสารละลายหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทนต่อความร้อนให้ใช้การกรองโดยผ่านแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน ( $\mu\text{m}$ ) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพร้อมภาชนะรับสารละลายหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีเปต จานเพาะเชื้อขวดเก็บตัวอย่าง ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave หรือตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ วัตถุที่เป็นของแข็งหรือวัตถุแข็งชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ทนต่อความร้อนให้ใช้การฆ่าเชื้อด้วย ethylene oxide ในเครื่อง gas sterilizer และควรใช้ spore strip หรือ spore suspensions ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้งและ ethylene oxide

### 3. การนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นและแบบเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วมาใช้งาน

วางอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นที่หลอมแล้วใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 44 ถึง 46 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้หมดแต่อย่าเก็บไว้นานเกินกว่า 3 ชั่วโมง การวัดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นที่อยู่ใน water bath ให้นำขวดที่บรรจุน้ำหรือบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกันนำมาให้ความร้อนและทำให้เย็นลงโดยใช้สภาวะเหมือนกับอาหารเลี้ยงเชื้อจริง แล้วนำ thermometer ใส่ลงในขวดดังกล่าวเพื่อวัดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งควรจะเป็น 45 ถึง 46 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมสำหรับการ pour plate ถ้าต้องการ pour plate สำหรับใช้ในการ streak plate ต้องทำให้ผิวหน้าของวุ้นแห้งโดยเปิดฝา plate เพียงเล็กน้อยเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที โดยทำใน laminar hood เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นนำมาหลอมใช้ใหม่

ควรให้ความระมัดระวังในการจับหรือเคลื่อนย้ายหลอดที่มี fermentation tubes อยู่ข้างในเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศในหลอดดักแก๊สข้างใน ซึ่งจะทำให้เกิดการอ่านผลแบบผลบวกปลอม (false positive)

### 4. การเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ

ควรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่จะถูกใช้หมดตามระยะเวลาที่ระบุไว้ในตารางที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของสีต้องมีการเก็บรักษาโดยการป้องกันไม่ได้ถูกแสง ถ้ามีการเปลี่ยนสีต้องทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อชุดดังกล่าว สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นที่เทลงบน plates ถ้าไม่ต้องการใช้ทันทีต้องปิด plates ด้วยฝาและนำไปใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงถ้าต้องการเก็บไว้เกิน 2 วัน ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวจะเก็บไว้ได้นานมากกว่า 2 สัปดาห์ถ้าปิดฝาด้วยฝาแบบเกลียวหรือจุกแบบอื่นที่ปิดได้สนิท หรือปิดด้วยจุกแบบหลวมแต่ต้องเก็บในถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง หรือในภาชนะอื่นที่มีฝาปิดอย่างสนิทเพื่อป้องกันน้ำระเหยออก

## ตารางที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้ในภาชนะต่างๆ

Medium	Holding Time
Membrane filter (MF) broth in screw-cap flasks at 4 °C	96 h
MF agar in plates with tight-fitting covers at 4 °C	2 weeks
Agar or broth in loose-cap tubes at 4 °C	2 weeks
Agar or broth in tightly closed screw-cap tubes or other sealed containers	3 months
Poured agar plates with loose-fitting covers in sealed plastic bags 4 °C	2 weeks
Large volume of agar in tightly closed screw-cap flask or bottle at 4 °C	3 months

ทำเครื่องหมายระดับของเหลวที่หลุดทุกหลอดและฝาระวังการสูญเสียของเหลวในหลอดขณะเก็บรักษา ถ้าสูญเสีย 10% หรือมากกว่าต้องทิ้งไป ถ้าเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้เย็น ให้นำมาอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบก่อนใช้งานจริง และยกเลิกการใช้งานถ้าพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชุดนั้นมีการเจริญของเชื้อ

### 5. การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

จัดทำบันทึกสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุดการผลิต (batch) โดยมีข้อมูล ผู้เตรียม วันที่ ชื่อและ lot number ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่ซั่ง ปริมาตรที่เตรียม อุณหภูมิและระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ การวัดค่า pH และการปรับ pH เปรียบเทียบค่า recovery ในเชิงปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ lot ใหม่กับ lot ที่ใช้อยู่ที่ได้รับการยอมรับแล้ว นอกจากนี้ยังต้องตรวจสอบความปลอดภัย (sterility) การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมบวกและลบ (positive และ negative control cultures) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด

สำหรับต่อไปจะเป็นตอนสุดท้ายจะกล่าวถึงการควบคุมคุณภาพของการทดสอบสำหรับห้องปฏิบัติการที่ทดสอบน้ำด้านจุลชีววิทยา