การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

รวิวรรณ อาจสำอาง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจำเป็นต้องเตรียมอย่างถูกต้องตามขั้นตอน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญของเทคนิคของการทดสอบทางจุลชีววิทยา ในปัจจุบันนี้ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแห้งสำเร็จรูปหรือที่เรียกว่า dehydrated media ซึ่งต้องเติมน้ำและละลายให้เข้ากันแล้วจึงฆ่าเชื้อด้วย autoclave บางกรณีห้องปฏิบัติการต้องมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ อาจเรียกว่าเป็นการเตรียมแบบ in-house คือเตรียมจากส่วนประกอบพื้นฐาน (basic ingredients) วิวัฒนาการในขณะนี้ได้ก้าวหน้าไปถึงมีการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อที่พร้อมใช้งานเนื่องจากฆ่าเชื้อแล้วและขายในลักษณะที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ (plates) หรือขวด (bottles) ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทหลังนี้จะมีราคาแพงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในห้องปฏิบัติการเองจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแห้งสำเร็จรูป แต่ห้องปฏิบัติการบางแห่งที่มีจำนวนบุคลากรน้อยและมีพื้นที่น้อย จะนิยมใช้กันมาก

รูปแบบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแห้งสำเร็จรูป

ควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่เย็น แห้ง ไม่ถูกแสงสว่าง ถ้ามีอุณหภูมิสูงและความชื้นสูง ควรเก็บในตู้เย็น ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเก็บรักษาเป็นอย่างดีจะสามารถเก็บได้นานถึงอย่างน้อย 3 ปี อย่างไรก็ตามควรมีการวางแผนการซื้อเพื่อที่จะได้ใช้หมดภายใน 1 ปี หรือ 2 ปี

หลังจากการใช้ครั้งแรก คือ เมื่อเปิดขวดออกแล้ว คุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับสภาพของการเก็บรักษา ดังนั้นเวลาซื้อควรเลือกซื้อขนาดที่เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงการเปิดขวดอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อยๆ ถ้ามีอากาศภายนอกและความชื้นเข้ามาในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่เปิดจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ productivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง นอกจากนี้ ช้อนที่ใช้ตักอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีสารเคมีหรือเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลงไปในอาหารในขวดได้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (prepared media)

อายุของอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไม่ว่าในหลอดทดลอง (tubes) ในขวดหรือในจานเพาะเชื้อ ขึ้นอยู่กับสภาวะของการเก็บรักษาและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไม่ควรเก็บเอาไว้นอกเสียจากว่าจะได้มีการป้องกันไม่ให้มีการสูญเสียน้ำ ซึ่งการป้องกันอาจทำได้โดยใช้หลอดที่มีจุกแบบเกลียว (screw - capped tubes) และขวดที่มีจุกแบบเกลียว (screw - capped bottles) แทนการใช้หลอดหรือขวดที่ปิดด้วยสำลี (cotton - plugged containers) ควรทำแบบนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บจานเพาะเชื้อที่เทอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนานกว่า 1 สัปดาห์ และอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่มีจุกแบบเกลียว ไม่ควรเกิน 6 เดือน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วไม่ว่าอยู่ในจานเพาะเชื้อหรือในหลอดควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2° - 8°ซ

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ระบุไว้ที่ฉลาก ตามอัตราส่วนที่ต้องการเตรียม

2. ตวงน้ำกลั่นหรือ deionized water หรือน้ำชนิดอื่นๆ ที่มีคุณภาพเทียบเท่า ลงในกระบอกตวง

3. เติมน้ำส่วนหนึ่งลงในอาหารที่ชั่งแล้ว ผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วกวน แล้วเติมน้ำที่เหลือผสมให้เข้ากัน

4. ให้ความร้อนถ้าจำเป็นเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี โดยการต้มให้เดือด เขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้ส่วนล่างของภาชนะไหม้ หรืออาจต้มในอ่างน้ำเดือด อาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมควรจะต้มเพื่อให้วุ้นละลายเท่านั้น ถ้าต้มนานเกินไปจะทำให้เกิดฟอง

5. วัด pH และปรับค่า pH ถ้าค่า pH ต่างจากที่ระบุไว้ที่ฉลาก

6. แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในภาชนะที่เหมาะสม ถ้าเป็นของเหลวอาจแบ่งโดยใช้ปิเปต

แบบธรรมดาหรือแบบอัตโนมัติ ซึ่งเหมาะสมกับอาหารที่ต้องแบ่งในหลอดที่ไม่มากนัก แต่ถ้ามีจำนวนหลอดมาก ควรใช้เครื่องที่เป็นอัตโนมัติ (electrically operated machine) อย่างไรก็ตามในทั้งสองกรณี ก่อนใช้ ต้องมีการล้างด้วยน้ำกลั่นก่อน แล้วตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ หลังจากเสร็จการใช้งานต้องมีการล้างปิเปตด้วยน้ำอุ่นและน้ำยาทำความสะอาด น้ำประปา และน้ำกลั่น ตามลำดับ ทั้งนี้ในกรณีของปิเปตอัตโนมัติควรถอดแยกเป็นชิ้นๆ แล้วล้างทำความสะอาด

7. นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที หรือตามที่ผู้ผลิตระบุสำหรับปริมาตรที่มากกว่า 500 มิลลิลิตร เวลาในการฆ่าเชื้อควรเพิ่มขึ้นเป็น 20 ถึง 30 นาที หรือมากกว่าถ้าจำเป็น ในการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรทชนิดที่ไม่ทนความร้อนไม่ควรใช้อุณหภูมิสูงกว่า 116°ซ หรือ 118°ซ ประสิทธิภาพของ autoclave จะลดลงอย่างมากถ้าใส่ของมากเกินไป หรือมีที่ว่างระหว่างภาชนะใน autoclave ไม่ควรวางภาชนะให้ติดกัน ควรให้มีที่ว่างอย่างน้อยครึ่งนิ้วในทุกมุม

ก่อนใช้งานควรหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อให้พอใช้งานเพื่อที่จะใช้ให้หมดภายใน 3 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 44° - 46°ซ ก่อนใช้ถ้ามีการตกตะกอนต้องทิ้งไป ไม่นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาหลอมใหม่อีกครั้ง

หมายเหตุ สารเคมีหรือ substrates เช่น คาร์โบไฮเดรท จะต้องเป็นรีเอเจนท์เกรด (reagent grade) นอกเสียจากว่าจะมีการระบุไว้ ในการเก็บรักษา stock reagents ต้องปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต ถ้าสารเคมีตัวใดแสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อน เช่น มีการเปลี่ยนสี ถูกทำลายไป หรือสูญเสียน้ำไปหรือดูดน้ำมากเกินไป ต้องทิ้งไป

การปรับ pH

วัดปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ ซึ่งอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ และห้องปฏิบัติการควรใช้อุณหภูมินี้เพื่อวัด pH ก่อนใช้งาน การวัด pH ที่อุณหภูมิ 45°ซ ในสภาพที่เป็นวุ้นยังเหลวอยู่จะไม่ถูกต้อง ทำให้ได้ค่า pH ที่ต่างจาก pH ที่ผู้ผลิตระบุไว้ เนื่องจากวัดที่อุณหภูมิต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีค่าแก้มาใช้ในการคำนวณด้วย

ก่อนใช้เครื่องวัด pH ควรทิ้งให้อิเล็กโทรดสมดุล ที่อุณหภูมิที่ต้องการจะวัด บางรุ่นอาจใช้เวลาถึง 30 นาที ปรับให้บัฟเฟอร์มีอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการวัด pH ซึ่งควรเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิห้อง (25°ซ) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นควรบดให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้วก่อนที่จะจุ่มอิเล็กโทรดลงไป การใช้อิเล็กโทรดแบบผิวสัมผัส (surface electrodes) จะเหมาะสมกับการวัด pH ของอาหารเป็นวุ้น และต้องรักษาอุณหภูมิระหว่างการวัดให้คงที่

การฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อและการเก็บรักษา

ก่อนฆ่าเชื้อ ต้องต้มอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นให้เดือด ขณะต้มต้องเขย่าเป็นครั้งคราว เติมน้ำถ้ามีการสูญเสียน้ำ แล้วฆ่าเชื้อใน autoclave เนื่องจาก pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจเปลี่ยนแปลงระหว่างการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้เวลาและอุณหภูมิ เกินกว่าที่กำหนดไว้ อาหารที่มีวุ้นควรบรรจุในขวด

ควรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะที่เหมาะสมเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการสูญเสียน้ำก่อนใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการสูญเสียน้ำจากอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดระหว่างการเก็บรักษา อาจใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ หรือพลาสติกปิดรอบจุกก่อนเข้า autoclave การใช้จุกแบบเกลียวจะลดการสูญเสียน้ำได้ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในหลอดจะถูกใช้ภายในเวลาสั้นๆ อาจใช้จุกที่เป็นโพลีโพรไพลีน (polypropylene) หรือ stainless steel อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2° - 8°ซ ในที่แห้งไม่มีฝุ่นละออง ไม่มีแสงสว่าง

ประเภทของการฆ่าเชื้อ

1. การฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Steam sterilization)

การฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำใช้ได้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำ และจุกที่ทำจากวัสดุที่เป็นยาง ฝ้าย กระดาษ ใช้อุณหภูมิ 121°ซ ไม่น้อยกว่า 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเจือจางต้องฆ่าเชื้อหลังจากเตรียมไม่เกิน 1 ชั่วโมง ควรปิดฝาให้หลวมเล็กน้อย เพื่อให้ไอน้ำเข้ามาสัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และให้อากาศในภาชนะออกมาได้ ระหว่างที่เข้า autoclave ใส่สปอร์ควบคุม (spore controls) ที่ใช้ทดสอบ autoclave จำนวน 1 หรือ 2 ช่วงในตำแหน่งกลางๆ ของ autoclave โดยใส่ในภาชนะที่คล้ายคลึงกับภาชนะที่ใช้ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใน

autoclave ต้องแน่ใจว่าใส่ของใน autoclave ไม่แน่นจนเกินไป ก่อนที่จะให้ไอน้ำขึ้นสูงต้องไล่อากาศใน autoclave ออกก่อนโดยอัตโนมัติหรือปรับด้วยมือ โดยปล่อยออกมาผ่านวาวล์ (value) ไม่ควรใส่ของใน autoclave จนมากเกินไป เพื่อที่จะป้องกันไม่ให้อัตราการไล่อากาศออกและอัตราการลดความร้อนลงของเครื่อง autoclave เร็วเกินไป

หลังจากครบเวลาการฆ่าเชื้อแล้ว ควรลดความดันภายใน autoclave อย่างช้าๆ ซึ่งจำเป็นสำหรับของเหลว เนื่องจากของเหลวจะสูญเสียไปขณะเดือด ถ้าลดความดันอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าฆ่าเชื้อของที่แห้ง เช่น เครื่องมือที่ใช้สำหรับการสุ่มตัวอย่าง หรือภาชนะเปล่า หรือขวดเปล่า จะลดความดันได้อย่างรวดเร็วโดยผ่านทาง exhaust values เมื่อเวลาถึง 15 นาที การไล่อากาศอย่างรวดเร็วผ่านทาง exhaust values นี้จะป้องกันการสะสมของ condensation และทำให้เครื่องมือที่กระดาษหุ้มอยู่แห้งเร็วขึ้น จานเพาะเชื้อ ปิเปต หลอด ที่ใช้แล้วควรจะฆ่าเชื้อก่อนทิ้ง โดยใช้หลักการเดียวกับการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ จานเพาะเชื้อพลาสติก ควรใส่ในถุงที่ทนความร้อนใน autoclave ถ้ามีจำนวนจานเพาะเชื้อมากควรเพิ่มเวลาในการฆ่าเชื้อในจานเพาะเชื้อให้พอ

2. การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (Hot-air sterilization)

เป็นการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) โดยให้วัสดุที่อยู่ในจุดกึ่งกลางของเครื่องมีความร้อนไม่น้อยกว่า 170°ซ ไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง (ปกติจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงที่ 170°ซ) ไม่ควรใส่ของที่จะฆ่าเชื้อแน่นจนเกินไป

3. การฆ่าเชื้อด้วยการกรอง (Filter-sterilization)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรทและที่เตรียมจากของเหลวบางประเภทซึ่งสามารถถูกทำลายด้วยความร้อนจำเป็นต้องใช้วิธีฆ่าเชื้อด้วยการกรอง แผ่นกรอง (membrane filters) ที่ใช้อยู่ตามปกติจะทำด้วยเซลลูโลส เอสเตอร์ หรือไนลอน หรือโพลีเตตระฟลูออโรเอททีลีน (polytetrafluoroethylene) ซึ่งแผ่นกรองเหล่านี้อาจจะฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave หรืออาจซื้อจากผู้ผลิตที่ทำขายในเชิงพาณิชย์ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพร้อมใช้งาน ในการใช้งานสำหรับฆ่าเชื้อของเหลวที่ไม่ทนความร้อน (สารอาหาร อาจเสียหายได้เมื่อผ่านความร้อน) ต้องผ่านของเหลวโดยใช้เข็มฉีดยา (syringe) ซึ่งมีแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ pore size ไม่มากกว่า 0.2 ถึง 0.45 ไมครอน ติดอยู่ แบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกกักอยู่ที่แผ่นกรองเนื่องจากแบคทีเรียจะมีขนาดตั้งแต่ 0.8 ถึง มากกว่า 1.0 ไมครอน

การทดสอบประสิทธิภาพและความปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ไม่ว่าจะเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป หรือที่ซื้อมาแบบชนิดพร้อมใช้งาน (prepared form) ต้องมีการตรวจสอบความชื้น (hydration) ความใส (clarity) สภาพผิวหน้า สี ความหนา และความปราศจากเชื้อ โดยการเลือกสุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทแล้วในจานเพาะเชื้อหรือที่เตรียมใส่หลอดทดลองแล้วมาบางส่วน เพื่อเป็นตัวแทนของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง batch ที่เตรียมวันนั้น แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิที่ปกติ ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นพวก selective หรือ differential media ควรมีการทดสอบ productivity และ selectivity โดยเลือกใช้เชื้ออ้างอิง (reference cultures) ที่เหมาะสมกับอาหารแต่ละชนิด

สรุปแล้วห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่มีระบบการประกันคุณภาพที่ดีควรมีระบบการจัดการเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่จัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่ทำการทดสอบตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม หรือทดสอบอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง สามารถขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการได้จากสำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ โทรศัพท์ 0-2201-7325 หรือ http:// www.dss.go.th

เอกสารอ้างอิง

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Edited by Frances Pouch Downes and Keith Ito. 4th ed. Washington, DC. American Public Health Association, 2001, p. 601-607.