



เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้มาตรฐาน

ผศ.ดร.สุเมธี ส่งเสมอ

สาขาอุตสาหกรรมอาหาร ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมน้ำมันหอมระเหย

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

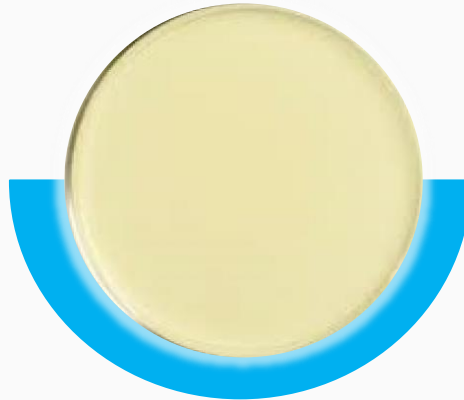


เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ Quantitative test

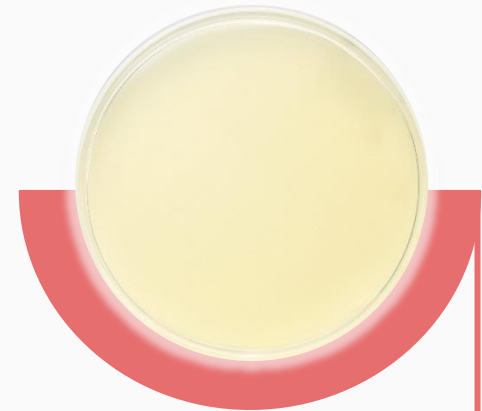
อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป
(Simple media / non-selective media)



Plate count agar
(PCA)



Potato dextrose agar
(PDA)



Malt extract agar
(MEA)

Plate count agar (PCA)

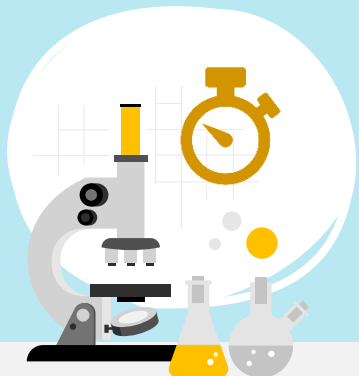


Potato dextrose agar (PDA)



Malt extract agar (MEA)





การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

1.

Viable Plate Count or Standard Plate Count

- Spread plate
- Pour plate

2.

The most-probable numbers (MPN)



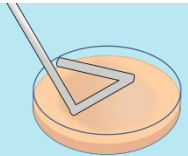


Viable Plate Count or Standard Plate Count

Pour plate



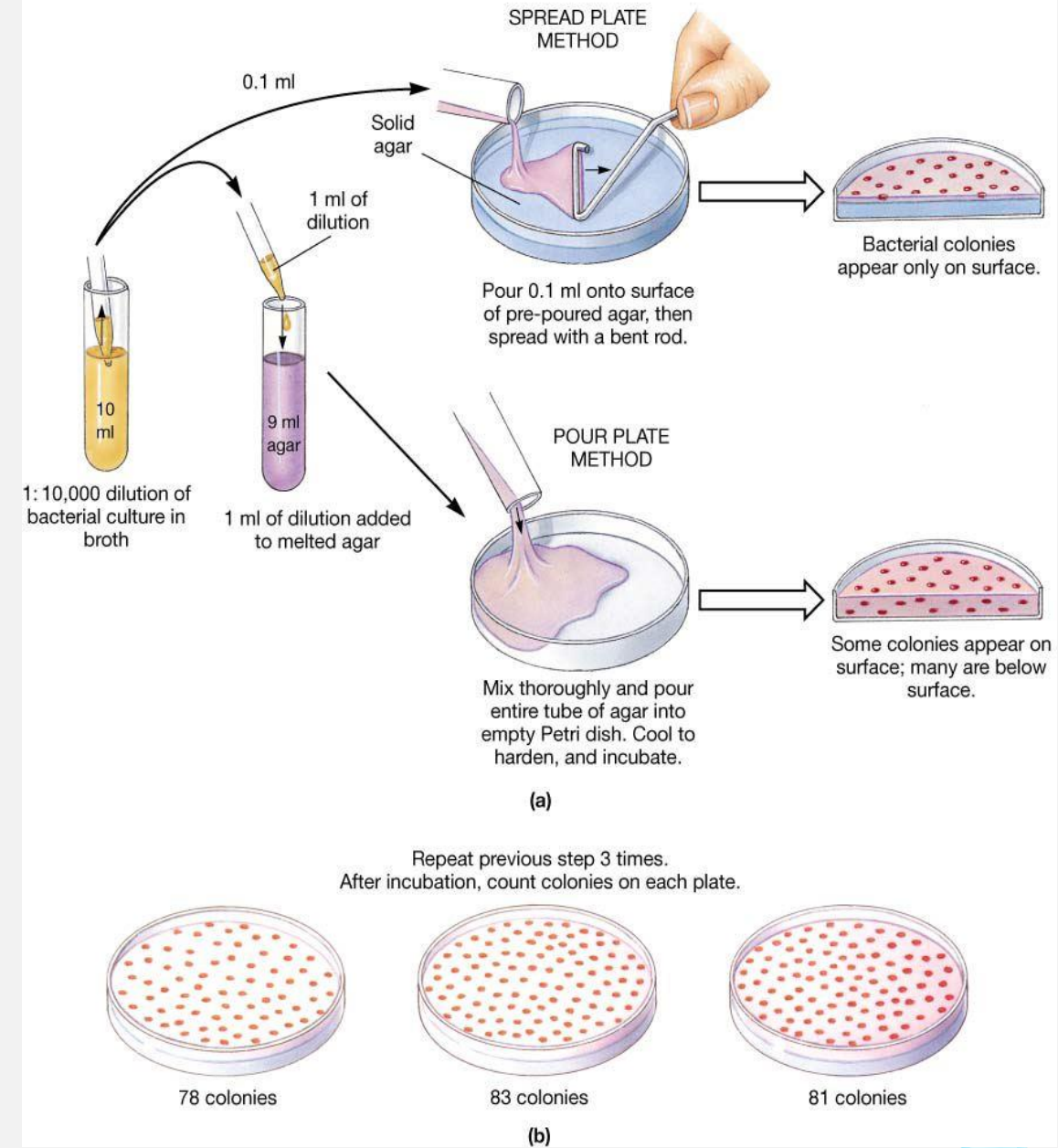
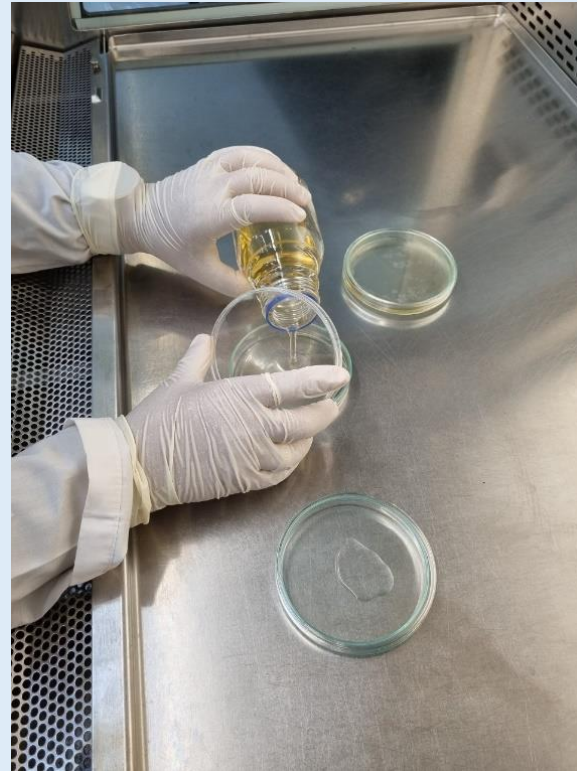
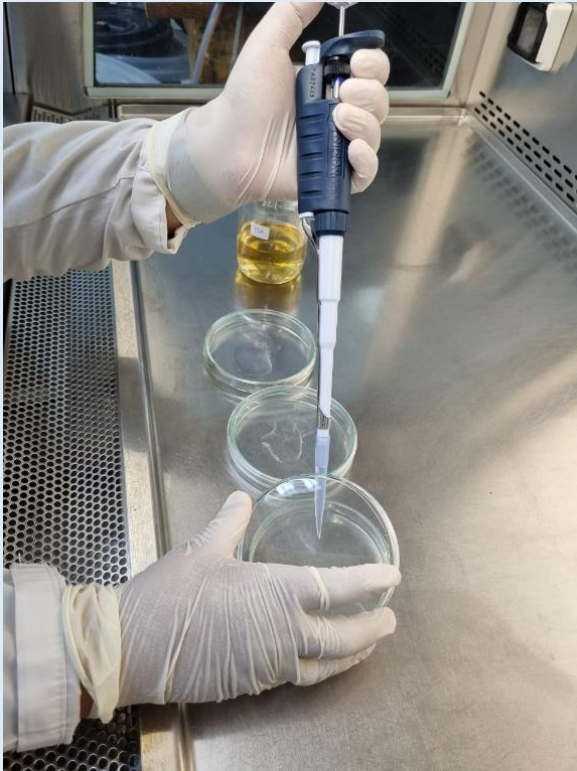
Spread plate



Viable Plate Count is one of the most common methods, for enumeration of bacteria. Serial dilutions of bacteria are plated onto an agar plate. Dilution procedure influences overall counting process. The suspension is spread over the surface of growth medium. The plates are incubated so that colonies are formed. Multiplication of a bacterium on solid media results in the formation of a macroscopic colony visible to naked eye. It is assumed that each colony arises from an individual viable cell. Total number of colonies is counted and this number multiplied by the dilution factor to find out concentration of cells in the original sample. Counting plates should have 30-300 colonies at least. Since the enumeration of microorganisms involves the use of extremely small dilutions and extremely large numbers of cells, scientific notation is routinely used in calculations.



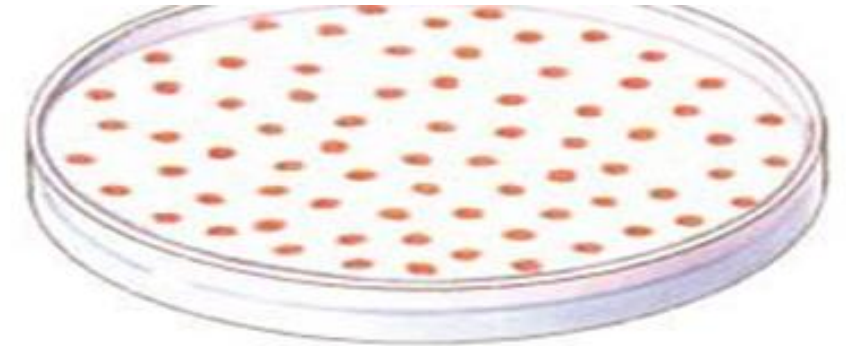
Spread plate vs Pour plate



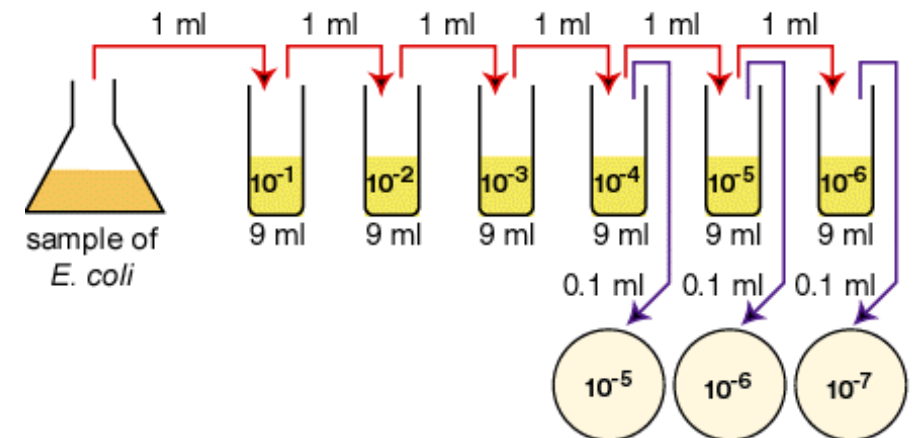


Serial Dilution method: 10 fold serial dilution

Normally, the bacterial sample is diluted by factors of 10 and plated on agar. After incubation, the number of colonies on a dilution plate showing between 30 and 300 colonies is determined. A plate having 30-300 colonies is chosen because this range is considered statistically significant. If there are less than 30 colonies on the plate, small errors in dilution technique or the presence of a few contaminants will have a drastic effect on the final count. Likewise, if there are more than 300 colonies on the plate, there will be poor isolation and colonies will have grown together.



30-300

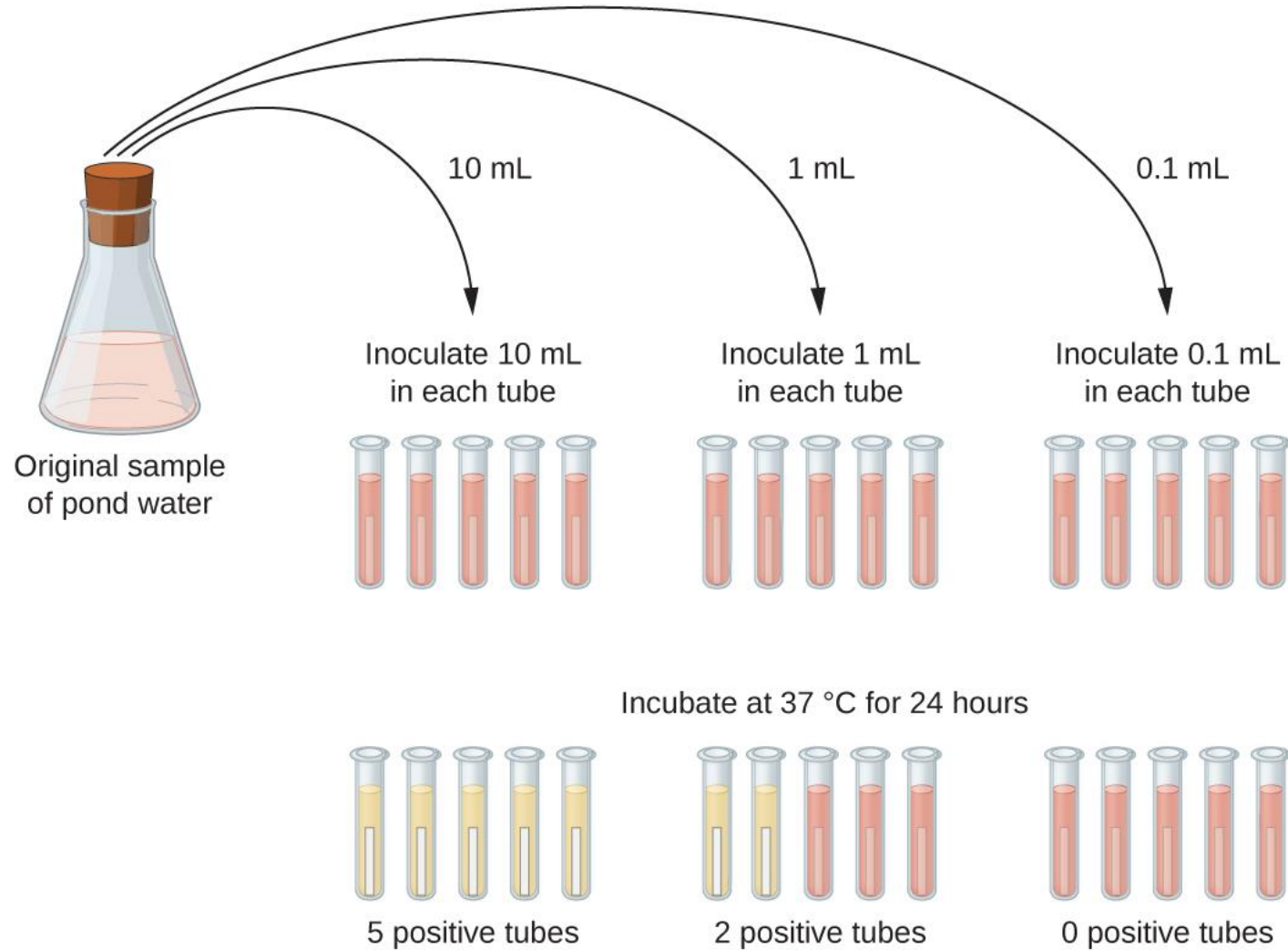


Calculation

$$\text{CFU/ml หรือ CFU/g} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง} \times \text{ปริมาตรอาหารที่เติม}}$$



The most-probable numbers (MPN)





เทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ ในการนับจุลินทรีย์

1. ลดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม



- การแต่งกายและความสะอาดเป็นหัวใจสำคัญของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- สถานที่ที่จะใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีการทำความสะอาดเป็นอย่างดีอาจใช้น้ำยาทำความสะอาด แล้วใช้แอลกอฮอล์ในการฉีดพ่น



เทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ ในการนับจุลินทรีย์

2. เตรียมสถานที่ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



- เปิด UV-C เพื่อทำการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศและพื้นผิวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในการเช็ดถูบริเวณที่จะมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



3. เตรียมเครื่องมือที่ใช้ให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ

อุปกรณ์แต่ละชนิดมีวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (Aseptic) ก่อนนำมาใช้งาน

เครื่องแก้ว เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขวดรูปชมพู่ (Flask) นำมาทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยการนำไปวางไว้ในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



ก



ข



ค

ขั้นตอนการทำให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

ก = การนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในกระบอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข = การปิดฝากระบอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค = การอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



เทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ ในการนับจุลินทรีย์

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ



อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Agar)



อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Broth)

โดยปัจจุบันนี้มีอาหารสำเร็จรูปจำหน่ายทั่วไป การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำได้ง่ายเพียงทำการคำนวณหาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเติมลงในน้ำแล้วทำการละลายโดยใช้ความร้อน อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดสามารถนำมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลังจากต้มเดือดโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้ออีก แต่โดยส่วนใหญ่แล้วหลังจากการต้มเพื่อละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมักต้องนำอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมาทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง



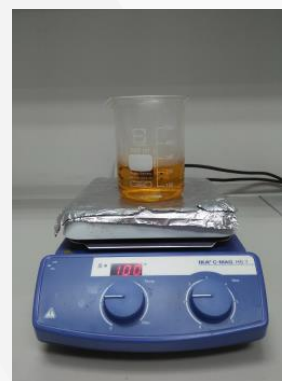
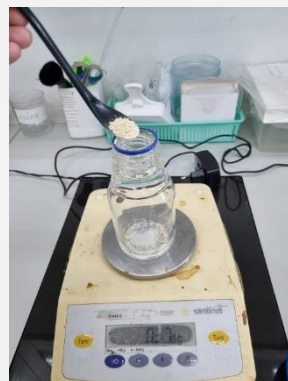
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ทำการคำนวณปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อจากฉลากที่ติดไว้ข้างขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้ง โดยก่อนใช้งานให้ตรวจสอบวันหมดอายุ จากนั้นจึงมองหาปริมาณต่อกรัมของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (1,000 มิลลิลิตร) แล้วนำมาคำนวณปริมาณของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องการเตรียม





วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



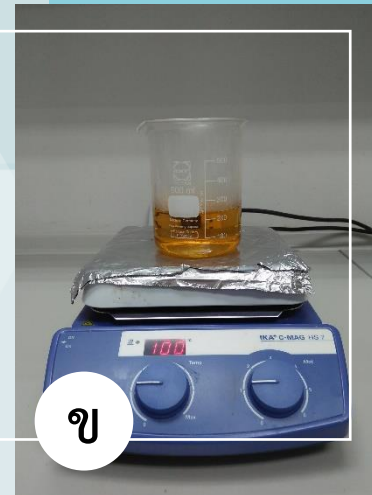
2. ทำการชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปตามที่คำนวณได้และเติมน้ำในปริมาณที่ต้องการ จากนั้นจึงนำมาต้มให้เดือดเพื่อละลายของแข็งทั้งหมดในน้ำ



เทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้มาตรฐาน



การละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ **ระวัง Over-heat**

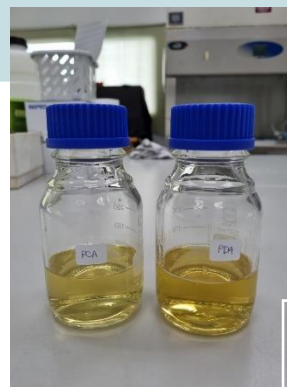


การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ก=ชั่งอาหาร ข= ต้มอาหารให้เดือด



วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายทั้งหมดแล้วไปใส่
ในขวดรูปชมพู่หรือขวดดูแรน (Duran) ปิดฝาให้
เรียบร้อย ก่อนนำไปเข้าหม้อนึ่งความดัน





วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ



4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอกให้หมอนึ่งลดความดันและลดอุณหภูมิลงจนสามารถเปิดฝาหม้อนึ่งความดันได้ (อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส) จึงนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วออกมานอกหม้อนึ่ง แล้วรอให้เย็นประมาณ 45 50 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้งาน



การเทเพลท





Dispensing sterile media into petri dishes

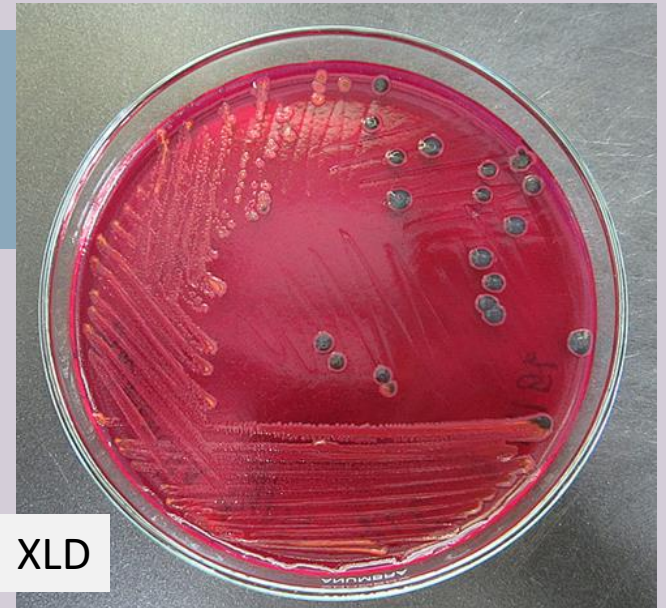
- 1** Lay out the sterile petri dishes on a level, clean (disinfected) bench surface.
- 2** Mix the medium gently by rotating the flask or bottle. Avoid forming air bubbles. Flame-sterilize the neck of the flask or bottle and pour 15-20 ml of medium into each dish (90-100 mm diameter). If air bubbles enter while pouring, rapidly flame the surface of the medium before gelling occurs. Rotate the dish on the surface of the bench to ensure an even layer of agar. Agar plates should be of an even depth (not less than 4 mm) and of a firm gel. Procedure for dispensing and solidifying high protein media (inspissation) such as Dorset egg medium is given above.
- 3** When the medium has gelled and cooled, stack the plates and seal them in plastic bags to prevent loss of moisture and reduce the risk of contamination. Do not leave the plates exposed to bright light especially sunlight.



เทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ห้ามนำอาหารที่มีส่วนผสมที่ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนไปเข้าหม้อนึ่งความดัน เช่น อาหารที่มีส่วนผสมของ Iron salts, Brilliant green และ bile salts เป็นต้น เช่นอาหาร Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar ใช้การกรองแล้วเติม supplement ลงไปเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส

อาหารชนิดนี้สามารถใช้คัดเลือก (Selective) และบอกความแตกต่าง (Differential) ของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีเกลือโซเดียมดีออกซีโคเลต (Sodium deoxycholate) เป็นสารสำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่พวกแบคทีเรีย Enterics นอกจากนั้นยังมี Ferric ammonium citrate และ Sodium thiosulfate ซึ่งทำให้เกิดโคโลนีที่มีสีดำตรงกลางอันเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* สร้างเอนไซม์ Desulfhydrase เพื่อเปลี่ยน Thiosulfate ให้กลายเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์แล้วเกิดปฏิกิริยากับ Ferric Ion



XLD



Blood agar

Blood agar

- i) Autoclave at 121°C for 15 minutes.
- ii) Cool to 45-50°C.
- iii) Aseptically add 50 ml of defibrinated sheep blood.

Chocolate (Heated Blood) Agar

- i) Prepare as described for Blood agar except after adding blood, heat the medium in a 70°C water bath until it becomes brown in colour. This takes about 10-15 minutes during which time the medium should be mixed gently several times.
- ii) Allow the medium to cool to about 45°C, remix and dispense in sterile petri dishes as described for blood agar.
- iii) Leave standing for thirty minutes to solidify.

Cooked meat medium

- (i) Autoclave at 121°C for 15 minutes. Reduce pressure slowly and cool without agitation, to 45-50 °C.
- (ii) Dispense into 20 ml universal tubes with screw caps, filling the tubes to about three-quarters. If not used within 24 hrs, reheat (100°C) prior to use to drive off absorbed oxygen.





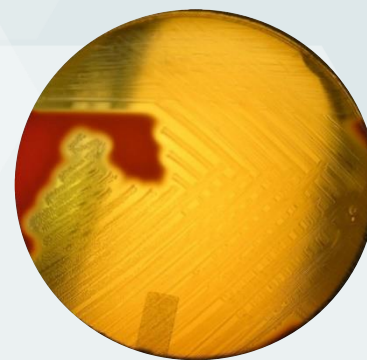
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่าง



Blood agar

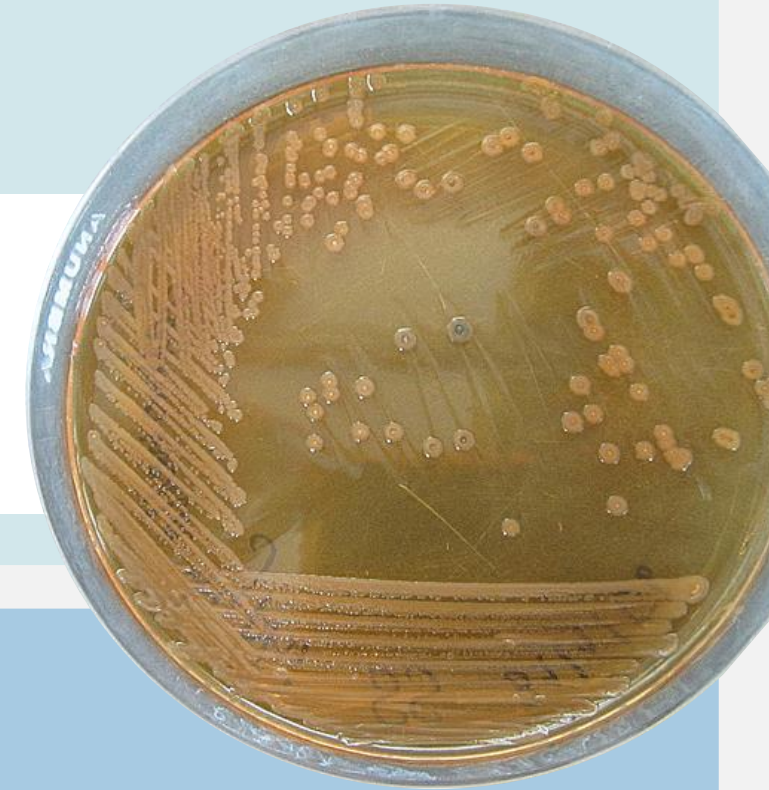
มี defibrinated ของเลือดม้าซึ่งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีเอนไซม์ในการย่อย haemolysin จะทำให้เกิด clear zone รอบๆโคโลนี



Beta hemolytic Streptococcus species seen with transmitted light

S.S Agar

- i) Heat to boiling for 1 minute to completely dissolve the powder. DO NOT AUTOCLAVE and avoid over heating.
- ii) Cool to 45-50°C and dispense into petri dishes.



Sabouraud agar

- i) Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
- ii) Avoid over heating. Cool to 45-50°C.
- iii) Aseptically add 0.5g cycloheximide, 20,000 units penicillin and 40,000 units streptomycin to each litre of autoclaved Sabouraud agar.
- iv) Pour 15-20 ml of the ready media on to petri dishes.

Storage and Inspection of Media and Reagents

Media	Type	Storage Inspection
Solid Media in Plates	Store in plastic bags at 2-5°C or at room temperature, agar-side up. Puncture the plastic bags in a few areas to allow air exchange and to reduce excessive condensation. Store both selective and non-selective media for up to 3 months.	Prior to use, look for evidence of contamination, uneven filling or bubbles on the surface of agar, color changes, hemolysis and signs of dehydration such as shrinking, cracking and loss of volume. Discard any defective plates.
Solid Media in Tubes	Store both selective and non-selective media at 2-5°C for up to 3 months.	Prior to use, look for evidence of contamination, uneven filling, color changes, hemolysis and signs of dehydration such as shrinking, cracking and loss of volume. Discard any defective tubes
Liquid Media in Screw Capped Tubes or Bottles	Store for up to 3 months (tightly capped).	Prior to use, inspect liquid media in tubes with screw caps stored longer than two months. Check the fluid level in approximately 5% per batch and/or per rack of media to be used in testing to determine if more than 5% of the fluid has evaporated.



References

- International Organization for Standardization. (2014). Microbiology of food, animal feed and water—preparation, production, storage, and performance testing of culture media. ISO 11133: 2014.
- มอก.2240 เล่ม 1 2548 จุลชีววิทยาอาหารของอาหารและอาหารสัตว์
ข้อแนะนำในการเตรียมและผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อแนะนำทั่วไปในการ
ประกันคุณภาพสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ
- มอก.2240 เล่ม 2 2548 จุลชีววิทยาอาหารของอาหารและอาหารสัตว์
ข้อแนะนำในการเตรียมและผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อแนะนำในการปฏิบัติ
สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Credit some photo from google search



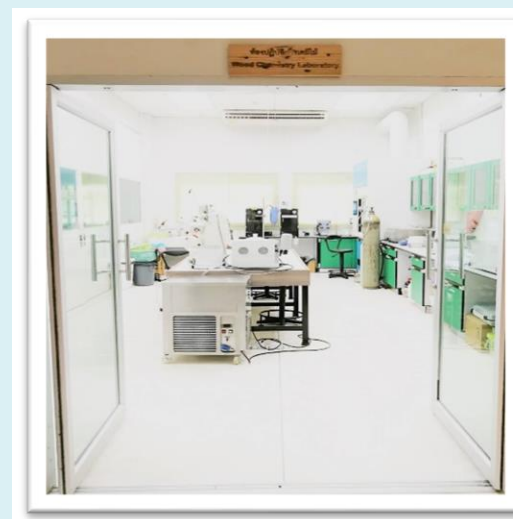
Facebook: ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมน้ำมันหอมระเหย

Website: <https://essentialoil.wu.ac.th/>

Email: wu_essentialoil@hotmail.com

ยินดีต้อนรับครับ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมน้ำมันหอมระเหย
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์



ขอบคุณครับ

