

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงให้ถูกต้อง รักษาสมบัติทางพันธุกรรม รักษา Viability ของเชื้อ

2. ขอบข่าย

ครอบคลุมการควบคุม การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา จำนวน 4 ห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- 2.1. ห้องปฏิบัติการศูนย์บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์
- 2.2. ห้องปฏิบัติการหมวดเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์
- 2.3. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ (ห้องหมายเลข 1204 – 1205)
- 2.4. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ (ห้องหมายเลข 1204 – 1206)

3. อ้างอิง

- 3.1. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงของศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 3.2. Bunchanan, R. E. 1994. Bergy's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 8th ed. 1268 p.
- 3.3. แบบฟอร์ม เรื่อง แบบทะเบียนประวัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (F - 306)

4. นิยาม

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบ ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ในการทำการตรวจพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ และใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพภายใน

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง แบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

- 4.1. Master Culture เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็น Freeze dried ampoule หรือ Deep tube stock agar หรือ Agar plate ใช้สำหรับการเตรียม Stock Culture ที่ได้รับมาจากหน่วยงานหรือองค์กรต่าง ๆ
- 4.2. Stock Culture เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บอยู่ในรูปของ Frozen glycerol มีอายุการเก็บรักษา 2 – 5 ปี ใช้สำหรับการเตรียม Working Culture
- 4.3. Working Culture มีอายุการเก็บรักษา 1 – 4 สัปดาห์ ขึ้นกับความถี่ในการใช้งาน และชนิดของเชื้อ ใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพการทดสอบ

5. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

- 5.1. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้นั้นเป็นเชื้อที่ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หรือกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นเชื้อที่อยู่ในหลอด Deep tube stock Agar และ slant agar tube ลงบันทึกในแบบฟอร์ม เรื่อง แบบทะเบียนประวัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (F - 306)
- 5.2. ทำการถ่ายเชื้อจากหลอด Master culture โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารเหลว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมตามคำแนะนำจากแหล่งจุลินทรีย์อ้างอิง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไป streak ลงบนอาหาร TSA plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ Yeast & Mold ถ่ายเชื้อจากหลอด slant โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อลงในอาหาร SDA plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน
- 5.3. เมื่อครบเวลานำ plate ของเชื้อออกมาเพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อสังเกตลักษณะของเชื้อต้องเหมือนกันทั้ง plate จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางด้านชีวเคมีตาม Bergy's Manual of determinative bacteriology หรือตามวิธีการของชุดทดสอบ API ซึ่งเหมาะสมตามเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
- 5.4. ขั้นตอนการเตรียม Stock culture ของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
 - 5.4.1. เตรียมหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ตามวิธีการปฏิบัติงาน เรื่อง วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทางจุลชีววิทยา (W – 317)
 - 5.4.2. ถ่ายเชื้อโคโลนีเดียวที่ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีแล้ว จากอาหารแข็ง โดยใช้ needle เขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารเหลวที่เหมาะสม นำไปบ่มตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
 - 5.4.3. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารเหลวปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลายกลีเซอรอล เข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องเขย่าสารละลายในหลอดทดสอบ ประมาณ 10 วินาที จากนั้นเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสเป็น Stock Culture ข้างหลอดบันทึกชื่อเชื้อจุลินทรีย์ วันที่เก็บโดยทำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็น Stock Culture จำนวน 10 หลอด แล้วบันทึกลงในแบบฟอร์ม เรื่อง แบบทะเบียนประวัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (F - 306)
 - 5.4.4. เชื้อจุลินทรีย์ระดับ Stock culture เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 2 ปีให้นำเชื้อออกมาทดสอบความบริสุทธิ์ และคุณสมบัติเฉพาะโดยทำตามข้อ 5.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการทดสอบให้นำไปทำเป็น Stock culture เก็บไว้ใหม่ และทำการทดสอบซ้ำทุก ๆ 1 ปี

5.5. ขั้นตอนการเตรียม Working culture ของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

5.5.1. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จาก Stock culture ลงในหลอดอาหารวุ้นเอียง (slant) แล้วนำไปป้อนตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากนั้นเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 4 องศาเซลเซียส เป็น Working Culture ข้างหลอดอาหารบันทึกชื่อเชื้อจุลินทรีย์ วันที่เก็บ วันหมดอายุการเก็บ ซึ่งมีอายุการเก็บ รักษา 2 เดือน

5.5.2. บันทึกการเตรียม Working culture ลงในแบบฟอร์ม เรื่อง แบบทะเบียนประวัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (F - 306)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gram Staining (24 h)	-	-	+	+	+	+	ND	ND	+	-	-	+	-	+
Oxidase (24 h)	-	-	ND	ND	-	-	ND	ND	d	-	+	-	-	d
Indole production	+	+	ND	ND						-	-	-	-	
Methyl red	+	+	ND	ND						-		-	+	
Voges Proskauer	-	-	ND	ND						+		+	-	
Simmon's citrate growth	-	-	ND	ND						+	+	-	-	
H ₂ S production	-	-	ND	ND						-	-	-	+	
Urea hydrolysis	-	-	ND	ND	+w	+w				-	d	+	-	
Phenylalanine deaminase	-	-	ND	ND						-			-	
Lysine decarboxylase	+	+	ND	ND						+	-		+	
Arginine dihydrolase	(-)	(-)	+	+						-	+		+	
Motility	(+)	(+)	(-)	(-)	-	-				+	(+)	+	+	+
Gelatin liquefaction (22 C)	-	-	ND	ND						-	+	+	-	
KCN growth	-	-	ND	ND						+			-	
acid production form														
D - glucose	+	+	ND	ND				+		+	-	+	+	
Gas form D - glucose	+	+	ND	ND				+		+	-	+	-	
Lactose	+	+	+	+	+	+	-			+		-	-	
Sorbitol	+	+	(+)	(+)			v			+			+	
L - Arabinose	+	+	ND	ND	-	-		ND	ND	+	-		-	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Salicin	d	d	ND	ND	-	-		ND	ND	+			-	
Inositol	-	-	ND	ND			-	ND	ND	+	-		-	
Esculin hydrolysis	d	d								+			(-)	
Acetate utilization	+	+								d			+	
Nitrate reduction	+	+			+	+			d	+	+	d	+	d
Lipase	-	-	(+)	(+)						-	+	+	-	
Catalase production (24 h)	+	+	-	-	+	+			+	+	+	+	+	+
Oxidation fermentation	F	F								F			F	
Coagulase					+	+						ND		

หมายเหตุ1. หมายเลข 1 – 14 บนหัวตาราง มีความหมายดังนี้

- 1 หมายถึง *Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887)
- 2 หมายถึง *Escherichia coli* ATCC 8739 (TISTR 780)
- 3 หมายถึง *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (TISTR 379)
- 4 หมายถึง *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (DMST 2860)
- 5 หมายถึง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517)
- 6 หมายถึง *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (DMST 8013)
- 7 หมายถึง *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (TISTR 5774)
- 8 หมายถึง *Aspergillus niger* ATCC 16404 (TISTR 3552)
- 9 หมายถึง *Bacillus cereus* ATCC 11778 (TISTR 687)
- 10 หมายถึง *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (TISTR 1540)
- 11 หมายถึง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (TISTR 1467)
- 12 หมายถึง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008)
- 13 หมายถึง *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (TISTR 1484)
- 14 หมายถึง *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

2. ND หมายถึง ไม่ต้องทำการทดสอบ หรือไม่ดำเนินการทดสอบ (Not Determined)

6. ข้อควรระวัง

ให้ดำเนินการเฝ้าระวังสถานะแวดล้อม โดยบันทึกลงในแบบฟอร์ม เรื่อง แบบบันทึกอุณหภูมิสำหรับ
งานจุลชีววิทยา (F - 331)